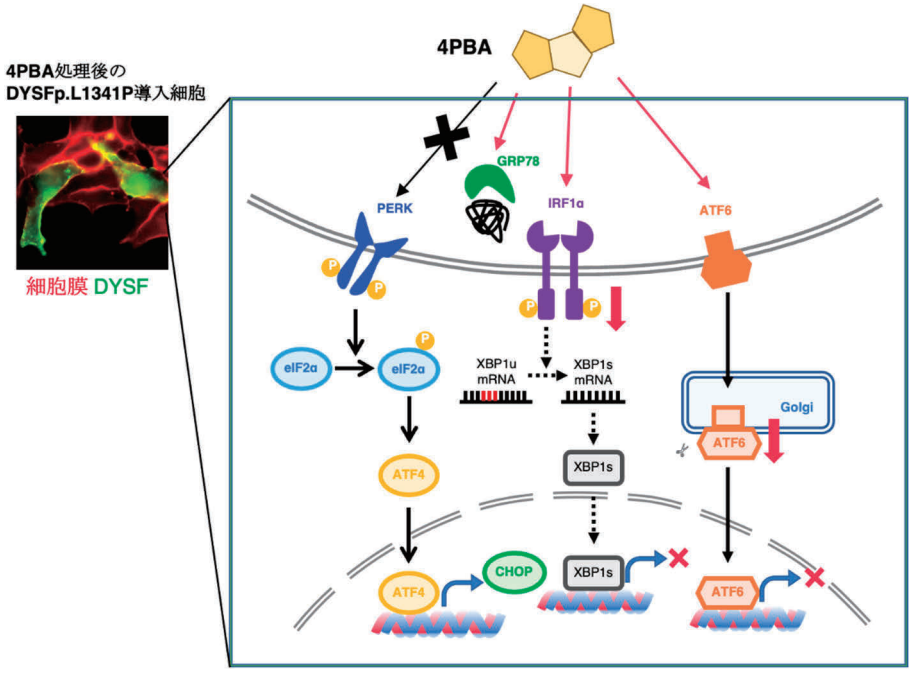
130　タンパク質品質管理機構を制御する筋萎縮治療法の開発	富永　香菜

【目的】筋ジストロフィーは著しい筋力低下により生活に困難が生じる希少遺伝性疾患である。我々はこれまで主に筋細胞膜の維持や修復に関わる Dysferlin（DYSF）に遺伝子変異があるタイプの筋ジストロフィー（ジスフェルリノパチー : Dysferlinopathy）について研究を行ってきた。ジスフェルリノパチー患者では、変異によって DYSF タンパクの構造異常をおこし、細胞内でのタンパク質の過剰な凝集や分解が生じている。我々は、独自に開発した *in vitro* アッセイを利用して、新規の病的ミスセンス変異を見出し、それら変異の一部について、ケミカルシャペロンである 4-Phenylbutyric acid（4PBA）が効果的であることを確認した。そこで、本研究では、4PBA がミスセンス変異をもつ DYSF の膜移行を亢進するメカニズムを明らかにし、より効果的で安全な化合物を発見ことすることを目的とした。

【方法】本研究で使用する DYSF-T2A-DsRED 発現ベクターを構築した。DYSF の細胞膜上発現量と細胞内を評価するために、元来 DYSF の発現がないヒト胎児腎細胞 HEK293T に各ベクターを導入して一過性に発現させ、抗 2A-peptide 抗体および Alexa Fluor® 647 標識抗体を用いてフローサイトメトリーおよび蛍光免疫染色を実施した。また、DYSF WT および病的ミスセンス変異ベクターを導入した HEK293T 細胞に 0.15 vol/vol% DMSO（コントロール）および 1mM 4PBA を添加し、24〜48 時間インキュベーションした。処理時間終了後、DsRED 陽性細胞をフローサイトメトリーにて回収し、ウエスタンブロッティングにて小胞体ストレス関連タンパク質を確認した。

【結果】病的ミスセンス変異をもつ DYSF を導入した細胞について、フローサイトメトリーおよび免疫染色にて細胞膜上の DYSF 発現量を観察したところ、4PBA 処理により細胞膜上への DYSF 発現が亢進されることを確認した。DYSF 病的ミスセンス変異に対する 4PBA の作用機序について小胞体ストレス応答関連タンパク質についてウエスタンブロッティングにて確認したところ、小胞体シャペロン誘導因子 GRP78 や小胞体ストレスセンサーATF6、IRE1 に対しては抑制されるが、小胞体ストレスセンサーPERK シグナルについては効果がみられないことがわかった。

ジスフェルリノパチーモデルにおける 4PBA の小胞体ストレス応答機構への影響



130. タンパク質品質管理機構を制御する筋萎縮治療法の開発

富永　香菜

山口大学 医学系研究科 高次脳機能病態学講座

Key words：筋ジストロフィー，Dysferlinopathy，4-Phenylbutyric acid，小胞体ストレス応答

緒　言

筋ジストロフィーは著しい筋力低下により生活に困難が生じる希少遺伝性疾患であり、患者の生命予後やQOLを考慮すると病態解明をもとにした根本治療法の開発は急務である。

我々は、筋膜修復タンパク質の一つである *Dysferlin（DYSF）* 遺伝子に変異があるタイプの筋ジストロフィー（ジスフェルリノパチー：Dysferlinopathy）の治療法開発に関する研究を行っている。DYSFは、主に骨格筋において筋細胞膜上に存在する一回膜貫通型タンパク質であり、傷害後のカルシウムイオン依存性の細胞膜修復に関わっていることが知られている。ジスフェルリノパチー患者では、変異によってDYSFタンパクの構造異常を起こし、細胞内でのタンパク質の過剰な凝集や分解が生じている。その結果、DYSFタンパクの筋膜への局在が見られず、筋膜修復能力も低い。加えて、ジスフェルリノパチー患者がもつ変異うち、約42%はミスセンス変異との報告があるが、これまでにどの変異がDYSFタンパクの構造異常を引き起こし、筋力低下を引き起こす原因となっているのか不明であった。

我々は、病因となり得るミスセンス変異を見つけるために細胞膜にのみ局在するDYSFを捉える独自の *in vitro* アッセイを開発し、患者から見つかったミスセンス変異115種類に関してジスフェルリノパチーを引き起こすことが予測される新規病的ミスセンス変異を64種類特定することに成功した。さらに、それら病的変異の内25個の変異（約40%）に対して、ケミカルシャペロンである4-Phenylbutyric acid（4PBA）がDYSFタンパクの細胞膜への移行を促すことを見出した。この化合物をジスフェルリノパチーマウスモデル（Dysf-MMex38）に飲ませたところ、骨格筋の膜修復機能の著しい改善を促すことを発見した（図1）[1]。以上の成果は、根本的な治療法がなかった筋ジストロフィーに対する治療法の開発に向けた重要な成果である。一方で、骨格筋において、4PBAがどのようにDYSF発現を安定化と細胞膜への移行を促進し、筋細胞膜の修復機構の改善につながっているのか、その詳細なメカニズムは未解明であった。

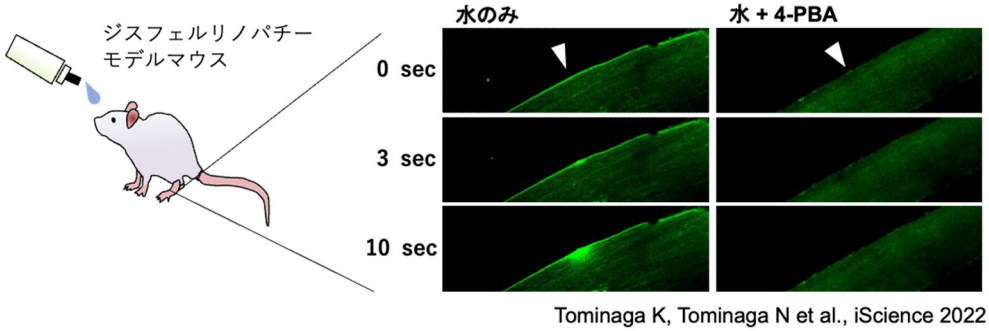


図1. 4PBAによる筋繊維創傷治癒効果
病的ミスセンス変異 p.L1341P と同様の変異をもつジスフェルリノパチーモデルマウスに4PBAを飲水に混ぜて2日間投与した後、筋繊維に損傷を与えてライブイメージングにより観察したところ、4PBA投与群では損傷箇所の膜修復機能が向上していた。

本研究では、4PBA がミスセンス変異をもつ DYSF の膜移行を亢進するメカニズムを明らかにし、より効果的で安全な化合物を発見することを目的とする。

方　法

1. DYSF 病的ミスセンス変異の機能評価

本研究で使用する病的ミスセンス変異をもつ DYSF の発現ベクターを新規に構築した。pcDNA3.1 ベクターに組み込まれた Human DYSF（isoform 8）に T2A 配列を付加した DsRED の ORF を導入してプラスミドを作製した（野生型 : WT)。さらに、PCR 法をベースにして部分特異的変異を導入し、病的ミスセンス変異体を 4 種類（p.V67D、p.L1341P、p.W999C、p.W1968R）作製した。DYSF の細胞膜上発現量と細胞内を評価するために、元来 DYSF の発現がないヒト胎児腎細胞 HEK293T に各ベクターを導入して一過性に発現させ、抗 2A-peptide 抗体（Novos Biological）および Alexa Fluor® 647 標識抗体（Abcam）を用いてフローサイトメトリー（BD FACSFortessa または Agilent NovoCyte Penteon）および蛍光免疫染色を実施した。フローサイトメトリーでは死細胞除去のために DAPI を使用した。得られたデータは、Flowing Software（https://flowingsoftware.com/）または NovoExpress Software にて解析した。蛍光免疫染色では細胞膜の染色のために抗 Na^+／K^+-ATPase 抗体、核染色のために DAPI を使用した。

2. 病的ミスセンス変異の小胞体ストレスへ応答の影響と 4PBA の小胞体ストレス応答抑制効果の検討

DYSF WT および病的ミスセンス変異ベクターを導入し、終夜 37℃で培養した。翌日、DMSO で溶解した 4PBA（SML0309、Sigma-Aldrich）を添加し、24～48 時間インキュベーションした。処理時間終了後、トリプシンにて細胞を回収し、BD FACSAria™ Ⅲにて DsRED 陽性細胞を回収した。回収した細胞を溶解し、ウエスタンブロッティングにて小胞体ストレス関連タンパク質を確認した。使用した一次抗体は下記の表に示す。小胞体ストレスを誘導する薬剤として Tunicamycin を使用した。

表 1. 本研究で使用した一次抗体

ANTIBODY	SOURCE	IDENTIFIER	DILUSION	M.W,
Phospho-eIF2α (Ser51) (D9G8) XP® Rabbit mAb	CST	#3398T	1:1000	38kDa
eIF2α (D7D3) XP® Rabbit mAb	CST	#5324T	1:1000	38kDa
Anti-Grp78	GeneTex	GTX113340	1:10000	72kDa
Anti-ATF4	GeneTex	GTX101943	1:1000	39kDa
Anti-GADD153 (CHOP)	GeneTex	GTX112827	1:500	19kDa
Anti-IRE1 (pSer724)	GeneTex	GTX132808	1:1000	110kDa
Anti-ERN1 (IRE1)	GeneTex	GTX113682	1:1000	110kDa
ATF6 Antibody (70B1413.1)	Novus Biologicals	NBP1-40256	1:250	60/36 kDa
Anti-β-Actin	GeneTex	GTX110564	1:5000	42kDa

結　果

1. DYSF 病的ミスセンス変異の機能評価

DYSF は細胞外にわずか 13 アミノ酸しか露出しない膜貫通型タンパク質であるため、生細胞のままで細胞膜上の DYSF 発現量を確認することができなかった。我々が作製した DYSF-T2A-DsRED ベクターでは DYSF の N 末端側に T2A 配列が付加されているため、T2A 配列を認識する抗 2A-peptide 抗体により細胞膜上の DYSF を捉えることが可能となった（図 2a)。そこで、作製した DYSF-T2A-DsRED ベクターを導入した HEK293T 細胞に、1 mM 4PBA を 24 時間処理した。生細胞にて抗 2A-peptide 抗体を染色しフローサイトメトリーにて解析したところ、病的ミスセンス変異体において、コントロール（0.1 vol/vol% DMSO 処理）では DYSF の細胞膜

上への発現が見られないことに対し、4PBA 処理では有意に DYSF 発現量が増加することを確認できた(図 2b)。また、同様の方法により、免疫染色にて細胞膜上の DYSF 発現量を観察したところ、フローサイトメトリーの結果と同様に 4PBA 処理によって細胞膜上への DYSF 発現が見られることがわかった（図 2c)。

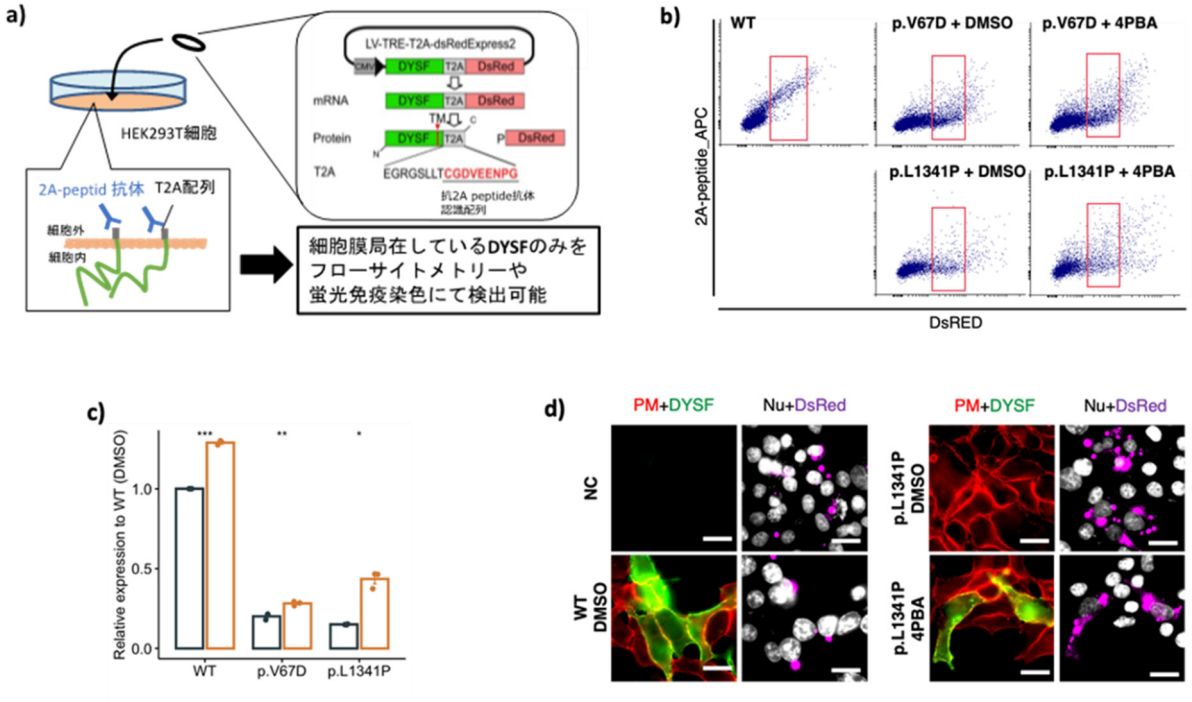


図 2. DYSF 病的ミスセンス変異の機能評価

a) 独自に構築した *in vitro* アッセイの概要図。バイシストロニックベクターシステムを応用した一回膜貫通型タンパク質の細胞膜発現定量解析法を開発した。

b) フローサイトメトリーによる DYSF 膜局在量の確認。DsRED 陽性分画における 2A-peptide 陽性率を DYSF の細胞膜発現量と定義して比較した（赤枠）。

c) 4PBA による DYSF の細胞膜発現量の増加。DsRED 陽性かつ 2A-peptide 陽性分画の GeoMean を算出しグラフ化した（n＝3）。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001（Student t test）。

d) 蛍光免疫染色による DYSF タンパク質の細胞膜上への発現の検討。PM：Plasma membrane（抗 Na^+／K^+-ATPase 抗体）、Nu：Nuclei（DAPI）。スケールバー：25 μ m。

2. 病的ミスセンス変異の小胞体ストレスへの影響と 4PBA の効果

4PBA はケミカルシャペロンのひとつであり、フォールディング異常を生じるタンパク質に対して構造を正常化させる働きがあることが知られている。4PBA は新生児期に発症する尿素サイクル異常症患者に対する医療用医薬品としてすでに FDA に認可を受けており、2012 年に本邦でも承認されている薬剤である。さらに、遺伝性疾患である嚢胞性線維症や ALS の治療薬として臨床応用研究が試みられている。その作用メカニズムとして、4PBA はこれらの原因タンパク質の小胞体への蓄積を防ぎ，輸送を正常化させることによって小胞体ストレスを抑制している可能性が考えられている。ジスフェルリノパチーに関しても同様に病的変異により異常な構造をとる DYSF について、小胞体ストレス状態の改善に働いていると推測される。そこで本研究では病的ミスセンス変異をもつ DYSF が小胞体ストレスを誘導し、4PBA によって改善されると予測し実験を行った。

本実験では 4PBA 処理によって最も細胞膜への発現量が亢進し、かつ、4PBA の筋膜修復効果が確認できた変異である p.L1341P を使用した。初めに，小胞体ストレスの指標となる小胞体シャペロン GRP78 の誘導に対す

る 4PBA の影響を調べた。DYSF WT および DYSF p.L1341P を導入した細胞では GRP78 の誘導が促進されていたが、4PBA 処理により減少していた（図 3a）。次に、膜タンパク質である小胞体ストレスセンサーATF6 と IRE1 の誘導に対する影響を検討したところ、DYSF WT、DYSF p.L1341P ともに 4PBA 処理により抑制されることがわかった（図 3b）。さらに、もうひとつの小胞体ストレスセンサーPERK の活性化に対する 4PBA の影響を検討したところ、PERK シグナルの下流因子であるリン酸化 eIF2α、ATF4、GADD153（CHOP）について、4PBA 処理により誘導が亢進される傾向にあった（図 3b）。以上の結果から、DYSF 病的ミスセンス変異に対する 4PBA の作用機序について、小胞体シャペロン誘導や小胞体ストレスセンサーATF6、IRE1 に対しては抑制に働くが、小胞体ストレスセンサーPERK シグナルについては効果がみられないことがわかった。

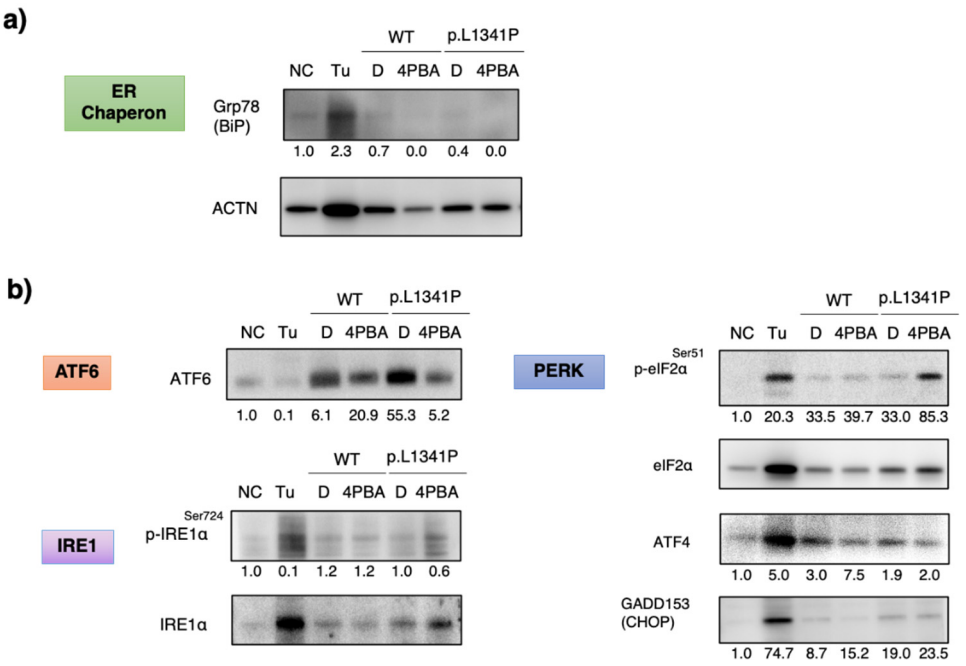


図 3. 4PBA 処理した DYSF 病的変異に対する小胞体ストレス応答の検討

a）ウエスタンブロッティングによる小胞体シャペロン GRP78 誘導の検討。DYSF WT および DYSF p.L1341P を発現させた HEK293T に 1 mM 4PBA を 48 時間処理した細胞を使用した（5 μg/lane）。数値はバンドの Intensity を測り、ACTN の Intensity で補正した。

b）ウエスタンブロッティングによる古典的小胞体ストレスセンサーATF6、IRE1、PERK 誘導の検討。a）と同様の条件の細胞を使用した。AFT6、ATF4、GADD153 について、数値はバンドの Intensity を測り、ACTN の Intensity で補正した。p-IRE1α、p-eIF2α について、IRE1α、eIF2α の Intensity で各々補正した。

NC：Negative control、Tu：1 μg/mL Tunicamycin、D：0.1 vol/vol% DMSO、4PBA：1 mM 4PBA。

考　察

筋ジストロフィーはタイプによって症状の経過やリスクが異なるため、症状だけでなく遺伝子診断により病型を正確に見極めることが重要である。我々が考案したフローサイトメトリーを利用した新規アッセイ系は、細胞膜上に存在する DYSF タンパクのみを検出することができる画期的な方法である。このアッセイ系を利用して、これまで不明であった病的変異を新たに特定することができた。この成果を応用し、今後筋ジストロフィーの遺伝子診断に利用できると考えている。

さらに、このアッセイ系を応用して骨格筋の膜修復機構を改善する化合物候補として 4PBA を見出した。これまで他の研究チームの報告では、4PBA は古典的小胞体ストレスセンサーに働き、小胞体ストレスが軽減されることがわかっていた。本研究の対象である DYSF 病的ミスセンス変異については小胞体ストレスセンサーATF6 および IRE1 への関与は確認できたが、PERK シグナルについては作用が認められなかった。4PBA は小胞体へのタンパク質の蓄積の減少に働いているが、ジスフェルリノパチーの場合過剰な異常タンパク質の蓄積が生じるため、特定のシグナルに対して効果がなかった可能性もある。PERK シグナルの誘導の抑制が確認できなかった原因をさらに追求することにより、4PBA で効果が見られなかった他の病的ミスセンス変異に対しても効果的な治療薬につながる可能性がある。今後、PERK シグナル誘導のより詳細なメカニズム解明とともに、PERK シグナルを標的としたドラッグスクリーニングを行う予定にしている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山口大学大学院医学研究科の富永直臣である。

文　献

1） Tominaga K, Tominaga N, Williams EO, Rufibach L, Schöwel V, Spuler S, Viswanathan M, Guarente LP. 4-Phenylbutyrate Restores Localization and Membrane Repair to Human Dysferlin Mutations. iScience. 2021 Dec 20;25(1):103667. eCollection 2022 Jan 21. PMID: 35028538 DOI: 10.1016/j.isci.2021.103667.