

2-5 筋レポジトリーの拡充とそれを活用した 筋ジストロフィー関連疾患の病態解明と診断・治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

西野 一三

総括研究報告

1. 研究目的

本邦を代表する筋疾患研究者の力を結集し、国立精神・神経医療研究センターを中心とする筋診断ネットワークと筋レポジトリーを将来的に維持・発展させつつ、最大限活用し、医学的・科学的に重要な成果を生み出すことで、社会に貢献することを目的とする。具体的には、下記の4つを柱として研究を進めた。

- (1) 筋疾患診断ネットワークおよび筋レポジトリーの維持と発展： これまでに形成してきた筋病理診断を中心とする筋疾患診断ネットワークを国内のみならず、アジア諸国を中心とする海外拠点施設にも拡大して支援を行うことで、筋疾患診断体制をさらに充実させ国際的筋疾患診断拠点とする。またそのことにより、国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリーを更に充実させる。
- (2) 病因・病態解明： 筋疾患には依然として原因不明のものが多く、本邦の基礎研究者および筋疾患研究者の力を結集して、筋炎など周辺疾患も含みつつ、筋ジストロフィー関連疾患の分子レベルの病因・病態を明らかにする。
- (3) 診断法開発と活用： 病因・病態解明研究で得られた成果を活用して診断法を開発し、これまで確定診断が困難であった筋疾患の診断を可能にする。さらにその方法を活用して、国内外の臨床の現場を後方支援する。
- (4) 治療法開発： 病因・病態解明研究で得られた成果を活用して、分子病態に基づく治療法開発を進める。特にこれまで研究開発費で研究が進められてきている本邦独自のリードスルー薬および筋線維肥大薬の実用化を推進する。

2. 研究組織

主任研究者

西野一三 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部

分担研究者

大澤 裕	川崎医科大学 医学部 神経内科学
青木正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科学
戸田達史	東京大学大学院医学系研究科 神経内科学
大野欽司	名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報学分野
林由起子	東京医科大学医学部医学科 病態生理学分野
平澤恵理	順天堂大学大学院医学研究科
土田邦博	藤田医科大学 総合医科学研究所 難病治療学
林 良雄	東京薬科大学薬学部薬品化学教室
原 雄二	静岡県立大学教育研究推進部 地域 ・産学連携推進室
村山 尚	順天堂大学医学部
三橋弘明	東海大学工学部生命化学科
中森雅之	大阪大学大学院医学系研究科
竹田哲也	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
飯田有俊	国立精神・神経医療研究センター メディカル・ゲノムセンター 臨床ゲノム解析部
林晋一郎	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部
株田智弘	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
今村道博	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
本橋紀夫	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

3. 研究成果

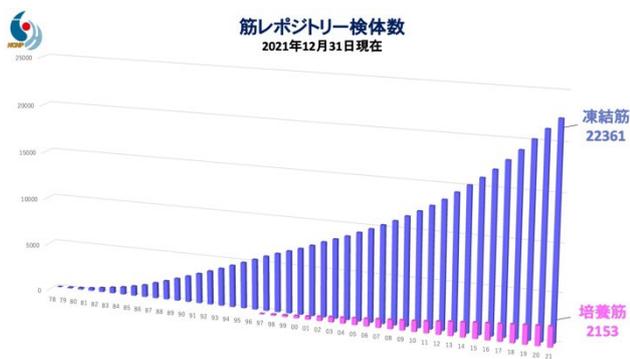
我々は、肢帯型筋ジストロフィー関連疾患の分子病態、次世代技術等を活用することにより、国立精神・神経医療研究センターを初めとする機関に蓄積

された患者検体を有効活用して解明し、さらに治療法開発の基盤を形成することを目指している。具体的には、1) 原因不明の各種遺伝性筋疾患の病因・病態解明研究、2) ハイスループット診断法開発研究、3) 分子病態に基づく治療法開発研究、4) 以上を可能にするための基盤的研究、の4つを柱として研究を進めた。

1) 筋疾患診断ネットワークおよび筋レポジトリの維持と発展

a) 筋病理診断と検体数

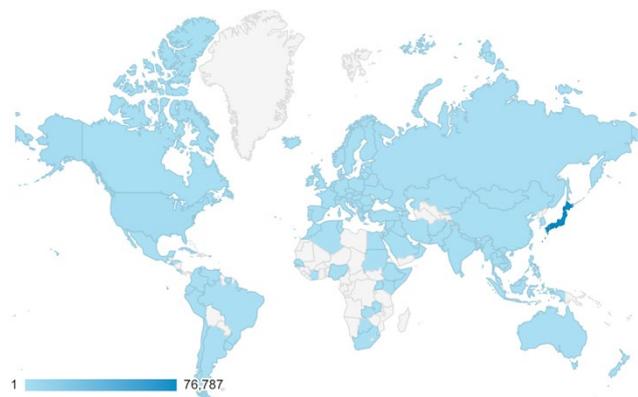
2021年(暦年)の総筋病理診断件数は、2020年と同じ1103件であった。2020年は2019年と比較すると42件減少していたがこれは、コロナ禍により海外からの凍結筋運搬が困難になったためであり、国内例だけで見ると2019年以降も診断件数は増加している。このことは、コロナ禍においても我々の筋病理診断が必要とされており、本邦筋疾患医療を下支えしている実態がより明らかとなった。総検体数は、2021年末で22361検体となった。また培養筋も2153検体となり、世界最大規模の筋レポジトリが更に充実した。神経・筋疾患研究支援基盤として各種研究活用されることで、筋疾患学の発展に寄与した。



b) 国際的均てん化と筋疾患教育

2018年以来タイ・マヒドン大学との共同で開催して

いる国際筋病理セミナーは、コロナ禍の影響で中止とした。また同病院と共同で作製した、筋生検および検体固定方法の解説ビデオ(日本語版・英語版・タイ語版)は、2018年1月の疾病研究第一部HP上での公開以来世界118カ国/地域よりアクセスがあり、全世界の筋疾患医療均てん化に寄与している(図はアクセスがあった国、2022年3月31日現在)。昨年同時期は106カ国であり、新たに12カ国からのアクセスがあったことになる。



2) 病因・病態解明

a) 眼咽頭遠位型ミオパチー

2019年、東京大学の石浦らとの共同研究で、これまで原因が不明であった眼咽頭遠位型ミオパチーが *LRP12* 遺伝子の5'非翻訳領域のCGGリピートの異常伸長によることを明らかにした(Ishiura H, et al. Nat Genet. 2019 Aug;51(8):1222-1232)。この発見を元に、更に *GIPC1* 遺伝子(Deng J, et al. Am J Hum Genet. 2020 Jun 4;106(6):793-804)(中国との共同研究)および *NOTCH2NLC* 遺伝子(Acta Neuropathol Commun. 2020 Nov 25;8(1):204)の5'非翻訳領域のCGGリピートの異常伸長によっても同様に眼咽頭遠位型ミオパチーを来すことを見いだした。更に、本邦では *LRP12* 遺伝子リピート伸長例が半数以上を占めること、また腓腹筋・ヒラメ筋が障害されやすいこと、左右差を伴う例が多いことを明らかにした(Kumutpongpanich T, et al. JAMA Neurol. 2021 Jul 1;78(7):853-863)。また従来、神経核内封入体病の診断的所見とされてきた皮膚生検での核内封入体が眼咽頭遠位型ミオパチーでも認められることを初めて明らかにした(Ogawasara M, et al. Neuropathol Appl Neurobiol. 2022

Apr;48(3):e12787. doi: 10.1111/nan.12787. Epub 2021 Dec 28)。またつい最近、国際共同研究により *HNRNPA2B1* 遺伝子のヘテロ接合性のフレームシフト型変異が早発型 OPDM を引き起こすことを見いだした (Kim HJ, et al. Nat Commun, in press)。

b) ACTN2 ミオパチー

ACTN2 遺伝子の c.1439A>G (p.Asn480Ser)バリエントをホモ接合型に有する血縁関係のない日本人筋疾患患者 3 家系を同定し、ACTN2 遺伝子の劣性 (潜性) 変異によりミオパチーを来し得ること、さらに、いずれの患者においても、不規則なコア構造を認めることを世界で初めて明らかにした (Acta Neuropathol. 2021 Oct;142(4):785-788)。

c) Pompe 病

Pompe 病は遺伝性筋疾患でありながら治療が可能な疾患であり、見逃すことなく、早期に診断を付けることが望まれている。特に台湾では既に 2005 年から全新生児の酵素活性スクリーニングが実施されており、本邦よりも数倍~10 倍程度高い頻度で患者が見いだされている。ここで問題となるのは、本邦では患者が本当に少ないのか、見逃されているのかという点である。そこで、2015 年 7 月~2018 年 1 月に筋病理診断を実施した全 2408 例を対象に、病利用標本作製する際に、未染のスライドガラス標本を 1 枚余分に作製し、その切片を用いて酵素活性スクリーニングを実施した。その結果、Pompe 病患者は 1 例も存在していなかった。一方、過去の筋病理診断例について調べてみると 1978 年~2020 年までの 43 年間に Pompe 病と診断した例は 41 例あった。5 年ごとに評価すると、2000 年以前の頻度は 5 年につき 5 例であったが、2001 年~2005 年には 10 例と倍増していた。その後は漸減し、2015 年以降は 1 例も同定されていないことが明らかとなった。これは、Pompe 病が治療可能となり、さらにその後、乾燥濾紙血スクリーニングが実施されるようになった時代背景を反映しているものと考えられた。すなわち、本邦においては、乾燥濾紙血スクリーニングなどにより、筋生検を実施することなく Pompe 病の診断が行われていること、実際に、本邦では有病率が低いことが明らかとなった (Saito Y, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry, Epub ahead of print)。

d) MLIP ミオパチー

国際共同研究により、*MLIP* 遺伝子の両アレル性変異により横紋筋融解や筋痛を伴うミオパチーが起こることを明らかにした (Lopes Abath Neto O, et al. Brain.

2021 Oct 22;144(9):2722-2731)。

e) JAG2 関連筋ジストロフィー

国際共同研究により、*JAG2* 遺伝子の両アレル性変異を伴いジストロフィー性変化を来した 13 家系 23 名の患者を初めて見だし報告した (Coppens S, et al. Am J Hum Genet. 2021 May 6;108(5):840-856)。

f) その他

福山型筋ジストロフィーを初めとする各種筋ジストロフィーの病態解明研究が班員によって行われた。

3) 診断法開発と活用

a) 筋炎マーカー開発

皮膚筋炎ではミクソウイルス抵抗性タンパク質 A (MxA) が筋線維に発現し、皮膚筋炎の組織診断に有用であることを報告した。この成果を基に MxA 発現を確認して皮膚筋炎と病理診断され、かつ、皮膚筋炎特異的自己抗体を検討した例が 2020 年末までに 256 例集積した。これは世界最大の病理学的に診断が確定した皮膚筋炎コホートである。このコホートを用いることで、これまでに皮膚症状を伴わない皮膚筋炎 (dermatomyositis sine dermatitis: DMSD) が確かに存在すること (Inoue M, et al. JAMA Neurol. 2020 Jul 1;77(7):872-877)、また、抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎では、筋線維膜上への MAC 沈着を伴う perifascicular necrosis, 筋周鞘のアルカリホスファターゼ活性、筋周鞘結合組織断片化を呈すること (Tanboon J, et al. Neurology. 2021 Jan 19;96(3):e448-e459) を明らかにしてきたが、今年度はさらに、皮膚筋炎では、陽性自己抗体で分類したサブタイプごとに筋病理学的特徴が異なることを初めて明らかにした (Neurology. 2022 Feb 15;98(7):e739-e749)。さらには、抗合成酵素症候群の筋病理所見についても陽性自己抗体ごとの特徴があることを同定し、現在論文投稿中である。

b) 眼咽頭遠位型ミオパチーの病理診断

従来、神経核内封入体病の診断的所見とされてきた皮膚生検での核内封入体が特に *NOTCH2NLC* 遺伝子に CGG リピート伸長を有する OPDM3 を中心に、眼咽頭遠位型ミオパチーでも認められることを初めて明らかにした (Ogawasara M, et al. Neuropathol Appl Neurobiol. 2022 Apr;48(3):e12787. doi: 10.1111/nan.12787. Epub 2021 Dec 28)。さらに筋生検検体を用いて検討を進めたところ、眼咽頭遠位型ミオパチーと臨床病理学的に類似する眼咽頭筋ジストロフィーでは有意に筋核内の p62 陽性封入体の出現頻度が高いことが明らかとなった。この所見は、筋病理標本上で両疾患を鑑別する際に有用であると考えられる (論文準備中)。

4)治療法開発

a) 悪性高熱症

村山班員らは、RYR1 変異体の CICR 簡易測定系を樹立することにより、悪性高熱症素因の簡便な評価方法を確立した。

村山班員らは、悪性高熱症変異導入マウスにおいて、RyR1 チャンネル活性を抑制する新規オキソリン酸誘導体に悪性高熱発症予防効果があることを明らかにした (Yamazawa T, et al. *Nat Commun.* 2021 Jul 13;12(1):4293)。今後 RyR1 関連筋疾患に対する効果を in vivo および in vitro 実験において更に詳細に検討していく予定である。

b) その他

当班で開発されたアルベカシンによるリードスルー療法が医師主導型試験へと結びついている。その他の病態に基づく各種の治療法開発研究が班員によって行われた。

4. 研究成果刊行一覧

- 1) Munekane A, **Ohsawa Y**, Fukuda T, Nishimura H, Nishimatsu SI, Sugie H, Saito Y, **Nishino I**, Sunada Y: Maximal Multistage Shuttle Run Test-induced Myalgia in a Patient with Muscle Phosphorylase B Kinase Deficiency. *Intern Med.* 15;61(8):1241-1245, Apr, 2022
- 2) Okada Y, Izumi R, Hosaka T, Watanabe S, Shijo T, Hatchome N, Konishi R, Ichimura Y, Okiyama N, Suzuki N, Misu T, **Aoki M**: Anti-NXP2 antibody-positive dermatomyositis developed after COVID-19 manifesting as type I interferonopathy. *Rheumatology (Oxford)*. 61(4):e90-e92, 2022
- 3) Konomatsu K, Izumi R, Suzuki N, Takai Y, Shiota Y, Saito R, Kuroda H, **Aoki M**: A rare case of sporadic inclusion body myositis and rheumatoid arthritis exhibiting ectopic lymphoid follicle-like structures: a case report and literature review. *Neuromuscul Disord.* 31(9):870-876, 2021
- 4) Ohkawara B, Ito M, and **Ohno K**: Secreted Signaling Molecules at the Neuromuscular Junction in Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci.* 22:2455, 2021
- 5) Hitachi K, Nakatani M, Kiyofuji Y, Inagaki H, Kurahashi H, **Tsuchida K**: An analysis of differentially expressed coding and long non-coding RNAs in multiple models of skeletal muscle atrophy: *Int. J. Mol. Sci.* 22:2558, March, 2021
- 6) Kobayashi T, Kurebayashi N, **Murayama T**: The ryanodine receptor as a sensor for intracellular environments in muscles. *Int J Mol Sci*, 22: 10795, 2021
- 7) Hu Y, Iyer KA, Nayak AR, Kurebayashi N, **Murayama T**, Samsó M: Purification of recombinant wild type and mutant ryanodine receptors expressed in HEK293 cells. *Bio-protocol*, 11(15): e4112, Aug, 2021
- 8) Hasuike Y, Tanaka H, Gall-Duncan T, Mehkary M, Nakatani K, Pearson CE, Tsuji S, Mochizuki H, **Nakamori M**: CAG repeat-binding small molecule improves motor coordination impairment in a mouse model of Dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Neurobiol Dis.* 163:105604, Feb, 2022
- 9) Hasuike Y, Mochizuki H, **Nakamori M**: Cellular Senescence and Aging in Myotonic Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 23(4):2339, Feb, 2022
- 10) Hasuike Y, Mochizuki H, **Nakamori M**: Expanded CUG repeat RNA induces premature senescence in myotonic dystrophy model cells. *Front Genet.* in press
- 11) Fujii K, Hirano M, Terayama A, Inada R, Saito Y, **Nishino I**, Nagai Y: Identification of a novel mutation and genotype-phenotype relationship in MEGF10 myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2022 Jan 31:S0960-8966(22)00025-6. [Online ahead of print]
- 12) Hiramatsu Y, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan JH, Ando M, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nozaki F, Kumada T, Murayama K, Suzuki M, Yamamoto Y, Matsui N, Miyazaki Y, Yamaguchi M, Suzuki Y, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Morishita S, **Nishino I**, Tsuji S, Takashima H: Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes. *J Neurol.* 2022 Mar 2. [Online ahead of print]
- 13) Sehara Y, Tsuchiya K, **Nishino I**, Sato H, Ando Y: Resection of Gastric Cancer Remitted Anti-signal Recognition Particle Myopathy. *Intern Med.* 2022 Feb 1. [Online ahead of print]
- 14) Kobayashi T, Nakano T, Ogata H, Sato N, Yamaide F, Yamashita Y, Chikaraishi K, Hino M, **Nishino I**, Ichimura Y, Okiyama N, Hamada H: A 10-year-old girl with low-grade B cell lymphoma complicated by anti-nuclear matrix protein 2 autoantibody-positive juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2021 Dec 13:keab922. [Online ahead of print]
- 15) Ito M, Shima S, Ryunosuke N, Nakano S, Esaka K,

- Ueda A, Maeda S, Moriya R, Kondo M, Imaizumi K, Noda S, Katsuno M, **Nishino I**, Watanabe H: Nemaline Myopathy Initially Diagnosed as Right Heart Failure with Type 2 Respiratory Failure. *Intern Med.* 2021 Nov 13. [Online ahead of print]
- 16) Kabeya Y, Okubo M, Yonezawa S, Nakano H, Inoue M, Ogasawara M, Saito Y, Tanboon J, Indrawati LA, Kumutpongpanich T, Chen YL, Yoshioka W, **Hayashi S**, Iwamori T, Takeuchi Y, Tokumasu R, Takano A, Matsuda F, **Nishino I**: Deep convolutional neural network-based algorithm for muscle biopsy diagnosis. *Lab Invest.* 102(3):220-226. Mar, 2022
 - 17) Oda S, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Sato N, **Nishino I**, Takahashi Y: A case of delayed diagnosis of Becker muscular dystrophy due to underlying developmental disorders. *Brain Dev.* 44(3):259-262. Mar, 2022
 - 18) Fujise K, Okubo M, Abe T, Yamada H, Takei K, **Nishino I**, **Takeda T**, Noguchi S: Imaging-based evaluation of pathogenicity by novel DNMT2 variants associated with centronuclear myopathy. *Hum Mutat.* 43(2):169-179. Feb, 2022
 - 19) Kawazoe T, Tobisawa S, Sugaya K, Uruha A, Miyamoto K, Komori T, Goto YI, **Nishino I**, Yoshihashi H, Mizuguchi T, Matsumoto N, Egawa N, Kawata A, Isozaki E: Myoclonic Epilepsy with Ragged-red Fibers with Intranuclear Inclusions. *Intern Med.* 61(4):547-552. Feb, 2022
 - 20) Tanboon J, Inoue M, Saito Y, Tachimori H, **Hayashi S**, Noguchi S, Okiyama N, Fujimoto M, **Nishino I**: Dermatomyositis: Muscle Pathology According to Antibody Subtypes. *Neurology.* 98(7):e739-e749. Feb, 2022
 - 21) Nishimori Y, **Iida A**, Ogasawara M, Okubo M, Yonenobu Y, Kinoshita M, Sugie K, Noguchi S, **Nishino I**: *TNNI1* Mutated in Autosomal Dominant Proximal Arthrogryposis. *Neurol Genet.* 8(1):e649. eCollection. Feb, 2022
 - 22) Masuzawa R, Takahashi K, Takano K, **Nishino I**, Sakai T, Endo T: DA-Raf and the MEK inhibitor trametinib reverse skeletal myocyte differentiation inhibition or muscle atrophy caused by myostatin and GDF11 through the non-Smad Ras-ERK pathway. *J Biochem.* 171(1):109-122. Jan, 2022
 - 23) Miyahara H, Okiyama N, Okune M, Konishi R, Miyamoto M, Hara M, Iwabuchi A, Takada H, **Nishino I**, Nomura T: Case of anti-nuclear matrix protein 2 antibody-positive juvenile dermatomyositis preceded by linear cutaneous lupus erythematosus on the face. *J Dermatol.* 49(1):e18-e19. Jan, 2022
 - 24) Yoshioka W, Shimizu R, Takahashi Y, Oda Y, Yoshida S, Ishihara N, **Nishino I**, Nakamura H, Mori-Yoshimura M: Extra-muscular manifestations in GNE myopathy patients: A nationwide repository questionnaire survey in Japan. *Clin Neurol Neurosurg.* 212:107057. Jan, 2022
 - 25) Saito M, Ogasawara M, Inaba Y, Osawa Y, Nishioka M, Yamauchi S, Atsumi K, Takeuchi S, Imai K, Motobayashi M, Misawa Y, **Iida A**, **Nishino I**: Successful treatment of congenital myasthenic syndrome caused by a novel compound heterozygous variant in RAPSN. *Brain Dev.* 44(1):50-55. Jan, 2022
 - 26) Yasui T, Nagaoka U, Oya Y, Uruha A, Karashima J, Funai A, Miyamoto K, Matsubara S, Sugaya K, Takahashi K, Inoue M, Okubo M, Sugie K, **Nishino I**: Mild form of Danon disease: two case reports. *Neuromuscul Disord.* (11):1207-1211. Nov, 2021
 - 27) Inoue-Shibui A, Niihori T, Kobayashi M, Suzuki N, Izumi R, Warita H, Hara K, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, **Nishino I**, **Aoki M**, Aoki Y: A novel deletion in the C-terminal region of HSPB8 in a family with rimmed vacuolar myopathy. *J Hum Genet.* 66(10):965-972. Oct, 2021
 - 28) Inoue M, Noguchi S, Sonehara K, Nakamura-Shindo K, Taniguchi A, Kajikawa H, Nakamura H, Ishikawa K, Ogawa M, **Hayashi S**, Y, Kuru S, **Iida A**, **Nishino I**: A recurrent homozygous ACTN2 variant associated with core myopathy. *Acta Neuropathol.* 142(4):785-788. Oct, 2021
 - 29) Awano H, Saito Y, Shimizu M, Sekiguchi K, Nijjima S, Matsuo M, Maegaki Y, Izumi I, Kikuchi C, Ishibashi M, Okazaki T, Komaki H, Iijima K, **Nishino I**: FKRP mutations cause congenital muscular dystrophy 1C and limb-girdle muscular dystrophy 2I in Asian patients. *J Clin Neurosci.* 92: 215-221. Oct, 2021
 - 30) Sugiyama A, Onishi Y, Ito K, Shibuya K, Nakamura K, Oda F, **Nishino I**, Suzuki S, Kuwabara S: Marked Respiratory Failure in an Ambulant Patient with Immune-mediated

- Necrotizing Myopathy and Anti-Kv1.4 and Anti-titin Antibodies. *Intern Med.* 60(16):2671-2675. Aug, 2021
- 31) Lee T, Tokunaga S, Taniguchi N, Misaki M, Shimomura H, Nishino I, Itoh K, Takeshima Y: Underlying diseases in sporadic presentation of high creatine kinase levels in girls. *Clin Chim Acta.* 519:198-203. Aug, 2021
- 32) Kumutponpanich T, Ogasawara M, Ozaki A, Ishiura H, Tsuji S, Minami N, **Hayashi S**, Noguchi S, **Iida A**, **Nishino I**; OPDM_LRP12 Study Group: Clinicopathologic Features of Oculopharyngodistal Myopathy With LRP12 CGG Repeat Expansions Compared With Other Oculopharyngodistal Myopathy Subtypes. *JAMA Neurol.* 78(7):853-863. Jul, 2021
- 33) Matsuzono K, Kumutponpanich T, Kubota K, Okuyama T, Furuya K, Yagisawa T, Horikiri A, Igarashi T, Miura K, Ozawa T, Mashiko T, Shimazaki H, Koide R, Tanaka R, Shimizu H, Imai Y, Kario K, **Nishino I**, Fujimoto S: Noteworthy Cardiovascular Involvement with Sporadic Late-onset Nemaline Myopathy. *Intern Med.* 60(14):2327-2332. Jul, 2021
- 34) Yamazawa T, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue T, Inoue YU, **Nishino I**, Mori S, Inuma H, Manaka N, Kagechika H, Uryash A, Adams J, Lopez JR, Liu X, Diggle C, Allen PD, Kakizawa S, Ikeda K, Lin B, Ikemi Y, Nunomura K, Nakagawa S, Sakurai T, Murayama T: A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke. *Nat Commun.* 12(1):4293. Jul, 2021
- 35) Nishii YS, Noto YI, Yasuda R, Kitaoji T, Ashida S, Tanaka E, Minami N, **Nishino I**, Mizuno T: A Japanese case of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with PABPN1 c.35G > C; p.Gly12Ala point mutation. *BMC Neurol.* 21(1):265. Jul, 2021
- 36) Fujise K, Okubo M, Abe T, Yamada H, **Nishino I**, Noguchi S, Takei K, Takeda T: Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy. *J Biol Chem.* 296:100077. Jan-Jun, 2021
- 37) Inoue M, Saito Y, Yonekawa T, Ogawa M, **Iida A**, **Nishino I**, Noguchi S: Causative variant profile of collagen VI-related dystrophy in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 16(1):284. Jun, 2021
- 38) Asaoka K, Watanabe Y, Itoh K, Hosono N, Hirota T, Ikawa M, Yamaguchi T, Hatta S, Imamura Y, **Nishino I**, Yamauchi T, Iwasaki H: A case of eosinophilic fasciitis without skin manifestations: A case report in a patient with lupus and literature review. *Clin Rheumatol.* 40(6):2477-2483. Jun, 2021
- 39) Tanboon J, Uruha A, Arahata Y, Dittmayer C, Schweizer L, Goebel HH, **Nishino I**, Stenzel W: Inflammatory features in sporadic late-onset nemaline myopathy are independent from monoclonal gammopathy. *Brain Pathol.* (3):e12962. May, 2021
- 40) Ando T, Nakamura R, Kuru S, Yokoi D, Atsuta N, Koike H, Suzuki M, Hara K, Iguchi Y, Harada Y, Yoshida Y, Hattori M, Murakami A, Noda S, Kimura S, Sone J, Nakamura T, Goto Y, Mano K, Okada H, Okuda S, **Nishino I**, Ogi T, Sobue G, Katsuno M: The wide-ranging clinical and genetic features in Japanese families with valosin-containing protein proteinopathy. *Neurobiol Aging.* 100:120.e1-120.e6. Apr, 2021

筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF- β シグナルの解明と分子標的医薬の開発

分担研究者 大澤 裕

所属 川崎医科大学神経内科学

緒言

カベオラは細胞膜の特殊陥入構造物で、その構成蛋白質であるカベオリンは、カベオラの形態形成を司るだけでなく、様々なシグナル分子と結合し、その活性を制御するシグナル伝達の足場蛋白質として機能している。筋鞘膜ではカベオリン-3 が発現するが、興味深いことに、ジストロフィン欠損デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)をはじめとした様々な筋ジストロフィーでは、筋鞘膜のカベオリン-3 は著明に増加し、一方、カベオリン-3 遺伝子変異による肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C)では著減する。このカベオリン-3 の筋ジストロフィー病態における役割の全容は明らかとなっていない。

われわれは、これまでに、カベオリン-3 が、骨格筋量を負に制御する TGF- β 分子マイオスタチンの I 型膜受容体を抑制して筋萎縮を抑制する、一方、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)を抑制して筋肥大を阻害することを明らかとしてきた。本研究は、①カベオリン-3 欠損および高発現 DMD モデルマウスの作出・解析によりカベオリン-3 が DMD 病態シグナルを促進するのか抑制するのかを検証する、②独自に同定したマイオスタチン阻害ペプチド医薬を、DMD モデルマウスに全身投与し、非臨床 POC 取得・ペプチドによる disease modifying therapy の基盤を確立する。③LGMD1C モデルマウスに nNOS を高発現させ nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構を解明する。

方法

①カベオリン-3 欠損・高発現 DMD モデルマウスの作出・解析：骨格筋特異的プロモーター下に LGMD1C 型変異カベオリン-3 (P104L)、および野性型カベオリン-3 を繋いだトランスジェーンを作製した。これを、最重症型 DMD モデル DBA/2-mdx マウス受精卵に注射し、トランスジェニックマウスを作出した。②マイオスタチン阻害ペプチド医薬の DMD モデルマウス投与解析：全身皮下投与によって、ジストロフィー変化が改善するかについて解析した。③ nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構解析：LGMD1C モデルマウスに nNOS を高発現させた。nNOS 活性化が LGMD1C 病態にどのように関与するかを検証した。

結果

①カベオリン-3 欠損・高発現 DMD モデルマウスの作出・解析：それぞれのトランスジェーンを作出して、最重症型 DMD モデル DBA/2-mdx 受精卵への注射をおこなった。Genotyping では、いずれも 2-3 ストレインが得られており、骨格筋ノザンブロット・ウエスタンブロット解析によって、カベオリン-3 トランスジェーンが発現量を検討した。カベオリン-3 高発現によって、DBA/2-mdx マウスのジストロフィー変化が軽減した。②マイオスタチン阻害ペプチド医薬の DMD モデルマウス投与解析：研究開始時と比較して、1,000 倍の阻害活性を示し、高い血中安定性 (ADME 試験、PK 試験) を示す、マイオスタチン阻害特殊ペプチドを同定した。このペプチドの週 3 回、合計 12 回の皮下投与 (Vehicle, 1 mh/kg, 10 mg/kg) によって、用量依存性に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) モデルマウス横隔膜のジストロフィー変化 (壊死・線維化・脂肪化) が軽減した。また、生理学的解析でも、握力・走力、および筋張力の改善が達成され、このペプチド医薬の非

臨床 POC を取得できたものと考えている。このペプチドの、ワンショット投与による血行動態解析では、48 時間後に血中濃度の 3-4 倍という極めて高い骨格筋集積性が示された。そこで、このペプチドを開発物として、将来の First-in-human 治験に向けた非臨床パッケージングの策定を開始した。③ nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構解析：トランスジーンを作出して LGMD1C モデルマウスの受精卵への注射をおこなった。Genotyping で陽性ストレインが得られた。骨格筋のノザンプロット解析によりトランスジーン発現を確認した。

考察

ジストロフィンの発見から現在までに、30 種類以上の筋ジストロフィーの原因遺伝子が同定され、その遺伝子修復治療、mRNA 修復治療などのテーラーメイド療法が世界的に盛んに研究されている。ところが、これまでに DMD 等への糖質ステロイド剤の部分的効果を除けば、この遺伝性難病に対して共通に有効性を示す疾患修飾療法は開発されていない (Takeuchi, et al. J Neurol 260, 2013)。一方、DMD モデルマウス等の「ジストロフィー変化」を示す様々な骨格筋において、カベオリン-3 発現の上昇が認められることは、このシグナル伝達の足場蛋白質が、各種筋ジストロフィー病態シグナルを共通に制御する機構が想定できる。カベオリン-3 欠損、および高発現 DMD モデルマウスで、ジストロフィー変化が改善するか否かを検討することで、カベオリン-3 を起点とする筋ジストロフィー病態シグナルを解明するとともに、治療介入への糸口を探りたい。

カベオリン-3 高発現 DMD モデルマウスでジストロフィー変化の改善が得られたことから、カベオリン-3 は DMD や他の筋ジストロフィー

病態に対し、抑制的に機能している可能性が考えられ、その機構を探っている。

マイオスタチン阻害医薬の世界的な開発競争が行われているが、これら医薬には依然として検討事項も山積している。下肢筋のマイオスタチンを条件付きでノックアウトすると、血中のマイオスタチン濃度は半減するにも関わらず、下肢筋のみの筋肥大が達成され、一方、上肢筋には骨格筋量の変化がないという。この結果からは、マイオスタチンは筋組織内での autocrine/paracrine の作用が主体であり、血中のマイオスタチンリガンドによる endocrine 作用阻害する戦略が有効か否かについて、検討する必要がある。本研究で得られたマイオスタチン阻害特殊ペプチドは、プロトタイプであるプロドメインの IC ペプチドと比較して、マイオスタチン阻害活性、および血中安定性が卓越している。さらに 2021 年度に証明した極めて高い骨格筋集積性を鑑み、2022 年度は皮下投与方法 (用量・間隔) の条件を設定する。さらに、ペプチドの用量漸増試験により、有効域・安全域を確定して、毒性試験を中心とした非臨床試験内容を策定する予定としている。

カベオリン-3 は、これまでの我々の検討から、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を抑制して、その筋肥大を阻害すると考えられる。nNOS 高発現トランスジーンを導入したカベオリン-3 欠損 LGMD1C モデルマウスで筋萎縮が抑制されるか否かについて、2022 年度は骨格筋解析により検討する。これにより、nNOS による筋肥大機構、さらには、その治療介入の可能性について検討していきたい。

本研究は、骨格筋シグナル伝達の足場蛋白質カベオリン-3 と、その結合分子であるマイオスタチンの膜受容体および nNOS を介した筋ジストロフィー病態の解明を目標とする。病態の解明から、その治療介入を実現したい。

結論

本研究は、これまでに 2020 年度に設定したマイルストーン:①カベオリン-3 欠損・高発現 DMD モデルマウスの作出、②マイオスタチン阻害特殊ペプチドによる DMD マウスのジストロフィー変化の改善、③nNOS 活性カベオリン-3 欠損 LGMD1C モデルマウス作出を、それぞれ達成できた。2022 年度は、モデルマウス解析、ペプチド上市に向けた非臨床パッケージ策定に取り組む予定である。

参考文献

1. Munekane A, **Ohsawa Y**, Fukuda T, Nishimura H, Nishimatsu SI, Sugie H, Saito Y, **Nishino I**, Sunada Y. Maximal Multistage Shuttle Run Test-induced Myalgia in a Patient with Muscle Phosphorylase B Kinase Deficiency. Intern Med. 2022 Apr 15;61(8):1241-1245.
2. Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, **Ohsawa Y**, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, **Hayashi Y**. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. J Med Chem, 58(3):1544-1549, Feb, 2015
3. **Ohsawa Y**, Takayama K, Nishimatsu S, Okada T, Fujino M, Fukai Y, Murakami T, Hagiwara H, Itoh F, **Tsuchida K**, **Hayashi Y**, Sunada Y. The Inhibitory Core of the Myostatin Prodomain: Its Interaction with Both Type I and II Membrane Receptors, and Potential to Treat Muscle Atrophy. PLoS One, 10(7): e0133713, Jul, 2015
4. Fukai Y, **Ohsawa Y**, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y. Cleavage of β -dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle

without MMP-2 and MMP-9. Biochem Biophys Res Commun, 492(2):199-205, Oct, 2017

Dysferlinopathy および類似疾患の次世代シーケンサーを用いた診断および結合蛋白に注目した病態研究

分担研究者 青木正志

所属 東北大学 神経内科

研究協力者

井泉瑠美子 1)、小野洋也 1)、中村尚子 1)、鈴木直輝 1)、菅野新一郎 2)、高橋俊明 3)、割田 仁 1)、加藤昌昭 1)、西山亜由美 1)、島倉奈緒子 1)、舟山 亮 4)、中山啓子 4)、新堀哲也 5)、青木洋子 5)、三宅克也 6,7)、林 由起子 8)、川原玄理 8)

所属

- 1 東北大学 神経内科
- 2 東北大学 加齢医学研究所
- 3 仙台西多賀病院
- 4 東北大学 細胞増殖制御学
- 5 東北大学 遺伝医療学
- 6 香川大学 組織細胞生物学
- 7 国際医療福祉大学 基礎医学研究センター
- 8 東京医科大学 病態生理学

緒言

Dysferlinopathy は、筋細胞膜蛋白質 dysferlin の欠損によって引き起こされる成人発症の筋ジストロフィーの総称である。dysferlin 欠損によって筋細胞膜の修復機構が損なわれ、そのため筋細胞の変性、壊死が生じると考えられている。これまで dysferlin のほかにも筋細胞膜修復に関与する dysferlin 結合蛋白質が複数報告されているが、細胞膜修復機構の全容はいまだ不明である。明らかになっていない鍵分子の存在が考えられる。本研究では、新規結合蛋白質を同定し、レーザー膜損傷の実験系を用いて、筋細胞膜修復機構を解明する。得られた知見をもとに治療法開発に取り組む。さらに dysferlinopathy

疑い症例の遺伝子診断・臨床病型の解析を進める。

方法

Dysferlin のドメイン構造に着目し、特定領域のアフィニティカラムを作成する。このカラムに細胞抽出物を反応させて相互作用する蛋白質を抽出し、SDS-PAGE により分離して、質量分析にかけることで結合蛋白質を同定する。そしてレーザー膜損傷の実験系を用いて膜修復機構への関与を評価する。さらに薬剤スクリーニングにより細胞膜修復の治療候補を探索し、動物モデルへの薬剤投与による運動機能や骨格筋構造の異常回復効果の検証を経て、治療応用につなげる。

Dysferlinopathy の症例の収集も継続し、次世代シーケンサーを用いた変異の同定を行った。

結果

細胞抽出物を dysferlin 特定領域のアフィニティカラムと反応させて相互作用する蛋白質を抽出した。SDS-PAGE により分離して、質量分析にかけることで、複数の dysferlin 結合蛋白質を同定した。同定した結合蛋白質の一つである AMPK 複合体に着目し、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行った。dysferlin 変異をもつ患者培養細胞やモデル動物としてゼブラフィッシュおよびマウスにおいて骨格筋を評価し、昨年度発表している。同様の手法を用いて、別の dysferlin 結合蛋白質についての解析を進めている。

臨床遺伝学的解析については、2021 年度も順調に症例の収集を継続しており、219 家系に 92 種の変異を見出している。臨床病型に関しては人類遺伝学会でも発表を行った。

考察

AMPK 複合体をはじめとした新規結合蛋白質について、筋細胞膜修復に関与する既報の分子との関連についても今後解析をすすめ、膜修復機構の全容解明と dysferlinopathy の病態解明につなげていく。ゲノム創薬など低分子薬以外のカテゴリーの薬剤や薬物送達法に関する検討も今後行っていく。

臨床遺伝学的な解析も継続的な症例の蓄積が将来的な治療開発には重要である。

結論

本研究の成果は根治療法がいまだない dysferlinopathy の治療法の開発に結びつく可能性がある。引き続き筋細胞膜修復機構の全容解明とそこから得られた知見をもとにした治療法開発に取り組んでいく。

参考文献

1. Li Y, Chen W, Ogawa K, Koide M, Takahashi T, Hagiwara Y, Itoi E, Aizawa T, Tsuchiya M, Izumi R, Suzuki N, **Aoki M**, Kanzaki M. Feeder-supported in vitro exercise model using human satellite cells from patients with sporadic inclusion body myositis. *Sci Rep*. 12(1):1082, 2022
2. Okada Y, Izumi R, Hosaka T, Watanabe S, Shijo T, Hatchome N, Konishi R, Ichimura Y, Okiyama N, Suzuki N, Misu T, **Aoki M**. Anti-NXP2 antibody-positive dermatomyositis developed after COVID-19 manifesting as type I interferonopathy. *Rheumatology (Oxford)*. 61(4):e90-e92, 2022.
3. Konomatsu K, Izumi R, Suzuki N, Takai Y, Shirota Y, Saito R, Kuroda H, **Aoki M**. A rare case of sporadic inclusion body myositis and rheumatoid arthritis exhibiting ectopic lymphoid follicle-like structures: a case report and literature

review. *Neuromuscul Disord*. 31(9):870-876, 2021.

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の分子病態および治療に関する研究

(CDP-リビトールのプロドラッグ治療は ISPD 欠損筋ジストロフィーを改善する)

分担研究者

戸田 達史 1)

研究協力者

徳岡 秀紀 2)、金川 基 3)、小林 千浩 2)

所属

- 1) 東京大学大学院・医学系研究科・神経内科学
- 2) 神戸大学大学院・医学研究科・脳神経内科学/分子脳科学
- 3) 愛媛大学大学院・医学系研究科・医化学・細胞生物学

緒言

ジストログリカン (DG) 異常症は、ジストロフィン糖タンパク複合体の中心に位置する膜タンパク質 DG の糖鎖異常によって生じる筋ジストロフィーの総称で、*fukutin* を原因遺伝子とする福山型先天性筋ジストロフィーが代表的であるが、いずれも有効な治療薬は開発されていない。

最近、我々は DG 糖鎖にリビトールリン酸と呼ばれる特異的な修飾構造が含まれていることを報告した⁽¹⁾。DG 糖鎖中のリビトールリン酸が欠失すると、DG 糖鎖の伸長不全が生じ、細胞膜-基底膜間の結合力が低下して筋細胞が脆弱化することにより、DG 異常症の原因になると考えられている。DG 糖鎖のリビトールリン酸修飾に関わる DG 異常症の原因遺伝子として、現在までに *fukutin*、*FKRP* (*fukutin-related protein*)、*ISPD* (*Isoprenoid synthase domain-containing protein*) の 3 種類が同定されており、ISPD は CTP とリビトール 5 リン酸から CDP リビトール (CDP-Rbo) を生合成する酵素、*fukutin* や *FKRP* は CDP-Rbo を基質として DG 糖鎖にリビトールリン酸を付加する酵素であることが試験管内で示されている⁽¹⁾。

これまで欧米を中心に *ISPD* 遺伝子の常染色体顕性変異によって Walker-Warburg 症候群や筋-眼-脳病といった中枢神経異常を伴う重症筋ジストロフィーや肢帯型筋ジストロフィーを発症することが報告されているが、生体筋組織において *ISPD* の異常が筋ジストロフィー発症に直結する DG 糖鎖異常を引き起こすという証拠はなかった。*ISPD* 欠損に伴う筋ジストロフィーモデルマウスを確立すること、お

よびその疾患モデルを用いて *ISPD* 遺伝子異常に伴う筋ジストロフィーに対する有効な治療薬候補を開発することを本研究の目的とした。

方法

ISPD 欠損を伴う疾患モデルを確立するため、*Myf5-Cre* を用いた筋特異的 *Ispd* 欠損マウス (コンディショナルノックアウトマウス: cKO) を作出した。握力や体重、血清クレアチニンキナーゼ (CK) 値などを解析するとともに、骨格筋について生化学的解析、病理学的解析を行った。4 週齢の cKO マウスに対してヒト *ISPD* 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを 2.0×10^{12} vector genome 静脈注射し、体重、握力、筋肉中 CDP-Rbo 濃度、DG 糖鎖及び筋ジストロフィー病理の改善について評価した。

次に膜透過性や安定性向上を目的とした CDP-Rbo のプロドラッグ化合物を複数作製し、スクリーニングで糖鎖回復活性が高かった誘導体を 4 週齢の cKO に対して 3 週間繰り返し筋肉注射して、局所での治療効果を評価した。

最後に *ISPD* 変異を持つ 2 人の患者由来の皮膚線維芽細胞に対して、 $200\mu\text{M}$ の TetA および CDP-Rbo を添加し、糖鎖回復活性を比較した。

結果

cKO は WT、Het と比較して 4 週齢より握力が低く、体重も低下しており、有意な CK 値上昇を認めた。また、20 週齢までに約 8 割の個体が死亡した。筋肉中 CDP-Rbo 濃度は WT、Het、cKO の順に低下した。cKO は骨格筋 DG 糖鎖の伸長不全と基底膜ラミニンとの結合活性低下を認め、筋病理では壊死再生や中心核線維の増加、筋線維の大小不同、結合組織の増加などの典型的な筋ジストロフィー病理を示した。

AAV を投与した遺伝子治療群では、cKO と比較して 12 週齢で体重および握力の増加と CK 値の低下を認めた。筋肉中 CDP-Rbo 濃度は増加し、DG 糖鎖の回復および筋ジストロフィー病理の改善を認め、発症後の cKO であっても遺伝子治療により筋ジストロフィー症状が改善することが示された。

水酸基をアシル化したり、リン酸基を保護した CDP-Rbo のプロドラッグを 10 種類作製した。マウス筋で明らかな毒性を認めず、CDP-Rbo よりも糖鎖回復が高かったプロドラッグとして CDP-Rbo テトラアセチル体 (TetA) を選定した。TetA の長期局所投与実験では、生食を注射した群と比べて、

CDP-Rbo 群、TetA 群ともに壊死線維の減少を認めましたが、再生線維およびマクロファージ浸潤は TetA 群のみ有意な低下を認め、結合組織浸潤は CDP-Rbo 群と比較して TetA 群で有意な改善を認めた。

最後に *ISPD* 変異を伴う患者由来ヒト線維芽細胞に対するプロドラッグ添加実験では、CDP-Rbo と比較して TetA では有意な糖鎖回復を認めた。

考察

本研究によって、*ISPD* の機能不全により筋肉中 CDP-Rbo 濃度が低下することが示され、哺乳類の骨格筋細胞において *ISPD* が CDP-Rbo 合成の主体を担っていることが示唆された。また骨格筋における *ISPD* の機能不全によって、DG 糖鎖の伸長不全が生じ、重度の筋ジストロフィー症状が生じることを示した。また、AAV を用いた遺伝子治療により、この病態が発症後でも改善することを示した。

さらに *ISPD* が CDP-Rbo 合成を担っている酵素であることに着目し、*ISPD* 機能不全の病態に対して、低分子薬である CDP-Rbo プロドラッグ補充療法の有効性を証明することに成功した。

結論

本研究では *ISPD* 欠損に伴う筋ジストロフィーの疾患モデルマウスを確立し、マウスに対する AAV を用いた遺伝子治療および CDP-Rbo プロドラッグによる低分子治療が有効であることを示した。CDP-Rbo 補充療法の実用化に向けて、さらに DDS を向上させていく必要がある。

参考文献

- (1) Kanagawa *et al.* *Cell Rep.* **14**, 2209-2223 (2016)
- (2) Tokuoka *et al.* *Nat Commun.* **13**, 1847 (2022)

神経筋接合部・筋の信号伝達障害の病態機構解明と治療研究

分担研究者 大野欽司¹⁾

研究協力者 大河原美静¹⁾、小早川晃範¹⁾、神原俊輔¹⁾

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学

緒言

先天性筋無力症候群(CMS)は神経筋接合部(NMJ)に発現する遺伝子の先天的な遺伝子変異によって神経筋接合部信号伝達が障害される疾患群であり、原因遺伝子によって臨床症状と治療方法が大きく異なる¹⁻⁴。CMSの臨床症状として、筋の易疲労性・持続的な筋力低下・筋萎縮・筋低形成に加えて、耳介低位・高口蓋などの顔面小奇形が時に認められる。自己免疫機序による重症筋無力症と異なり日内変動や易疲労性が明らかでなく、日差変動を呈する症例がある。CMSの多くは、2歳以下に発症するが、出生直後の数日間のみ認められた筋力低下が軽快し思春期・成人期に再増悪し成人発症と判断される例や、新生児期に全く症状がない成人発症例も存在する。特に常染色体優性遺伝性疾患であるスローチャンネル症候群では成人発症例が認められる⁵。さらに、*SYT2*-CMS⁶と*SNAP25B*-CMS⁷の2型も常染色体優性遺伝形式であるが報告症例数が少なく成人発症の有無は不明である。他のCMSはいずれも常染色体劣性遺伝形式を示す。

次世代シーケンサの活用によりCMSの原因遺伝子の同定が飛躍的に進展し、34種類の遺伝子における原因遺伝子変異が同定されており14の病型に分類が可能である。特に以下の7病型は近年明らかにされてきた病型である。

- i. シナプス間隙の構造分子の変異によるCMS (*COLQ*⁸⁻¹⁰, *LAMB2*¹¹, *COL13A1*¹²)
- ii. 神経終末のアセチルコリンの再合成に関わる分子の変異によるCMS (*CHAT*¹³)
- iii. 神経終末のアセチルコリンの放出に関わる分子の変異によるCMS (先天性ランバートイートン筋無力症候群) (*SYT2*⁶, *SNAP25*⁷, *VAMP1*¹⁴, *UNC13A*¹⁵, *RPH3A*¹⁶, *LAMA5*¹⁷)
- iv. アセチルコリン小胞の再充填の欠損によるCMS (*PREPL*)¹⁸
- v. 神経終末形成障害によるCMS (*MYO9A*¹⁹, *SLC25A1*²⁰)
- vi. 核膜ラミン関連タンパク1 (*LAP1*)分子の欠損によるCMS (*TOR1AIP1*)²¹
- vii. クロマチンリモデリング酵素の欠損によるCMS (*CHD8*)²²

本研究においてさらなるCMS原因遺伝子の解明に資するべく神経筋接合部を構築する新たな分子の同定を行なった。

方法

Laser capture microdissectionならびにRibotagマウスのRNA-seq解析により筋終板に特異的に発現する分子の同定を行った。同定したconnective tissue growth factor (*Ctgf*)/cellular communication network factor 2 (*Ccn2*)のC2C12筋管解析、ならびに*Ctgf/Ccn2*ノックアウトマウスの解析を行った。

結果

Laser capture microdissectionとRibotagマウスの解析にて*Ctgf/Ccn2*は筋終板に1.60-1.83倍多く発現することを明らかにした。*Ctgf/Ccn2*はマウス胎児筋終板に集積しており、E17.5に発現がピークに達した。

Deletion mutantを用いた免疫沈降実験にて*Ctgf/Ccn2*のCTドメインがLRP4の第3βペプチドドメインに結合することを明らかにした。*In vitro* plate-binding assay、ならびにcell surface-binding assayにて*Ctgf/Ccn2*のCTドメインがMuSKとLRP4の結合を増強することを見出した。*Ctgf/Ccn2*はagrin処理したC2C12筋管膜に発現するLRP4の量を増加させるとともにLRP4のリン酸化を促進した。同時に、*Ctgf/Ccn2*はC2C12筋管においてMuSKリン酸化を亢進させアセチルコリン受容体のクラスタリングも増強した。逆にレンチウイルスによる*Ctgf/Ccn2*ノックダウンによりC2C12筋管のMuSKリン酸化が低下し、アセチルコリン受容体のクラスタリングも低下した。これらの低下をLRP4のectodomainがレスキューした。

マウス*Ctgf/Ccn2*ノックアウトにより骨格筋膜に発現するLRP4が減少しMuSKリン酸化も低下した。ノックアウトはマウスの骨格筋分化と運動ニューロン分化には弱拡大レベルでは影響を与えなかったが、共焦点顕微鏡による観察では運動神経終末のsynaptophysinの軸索への異常な進展とアセチルコリン受容体クラスタの形成障害を認めた。電顕における観察でも神経終末のミトコンドリアが著減し、シナプス小胞数とアクティブゾーンの現象を認めた。反復神経刺激による微小終板電位の異常減衰を認めるとともに、微小終板電位の頻度の顕著な低下を認めた。

考察

LRP4はagrin受容体として筋終板でLRP4/MuSK共受容体を形成するとともに、神経終末にも発現し神経終末の分化に必須の分子であることが報告されているが、そのリガ

ドは不明である^{23,24}。Ctgf/Ccn2 は NMJ における LRP4 の retrograde signal のリガンドである可能性が示された。

結論

さらなる CMS 原因遺伝子の解明に資するべく神経筋接合部を構築する新たな分子の検討を行い、Ctgf/Ccn2 が神経終末に作用する NMJ 形成に必須の分子であることを同定した²⁵。

参考文献

1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, et al. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes, . DOI: 10.1002/9780470015902.a9780470024314, eLS. John Wiley & Sons, Inc. 2014.
2. Ohno K, Ohkawara B, and Ito M: Recent advances in congenital myasthenic syndromes. Clin Exp Neuroimmunol. 7:246-259, 2016
3. Ohno K, Ohkawara B, and Ito M: Agrin-LRP4-MuSK signaling as a therapeutic target for myasthenia gravis and other neuromuscular disorders. Expert Opin Ther Targets. 21:949-958, 2017
4. Ohkawara B, Ito M, and Ohno K: Secreted Signaling Molecules at the Neuromuscular Junction in Physiology and Pathology. Int J Mol Sci. 22:2455, 2021
5. Shen XM, Okuno T, Milone M, et al.: Mutations Causing Slow-Channel Myasthenia Reveal That a Valine Ring in the Channel Pore of Muscle AChR is Optimized for Stabilizing Channel Gating. Hum Mutat. 37:1051-1059, 2016
6. Herrmann DN, Horvath R, Sowden JE, et al.: Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of lambert-eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. Am J Hum Genet. 95:332-339, 2014
7. Shen XM, Selcen D, Brengman J, et al.: Mutant SNAP25B causes myasthenia, cortical hyperexcitability, ataxia, and intellectual disability. Neurology. 83:2247-2255, 2014
8. Ohno K, Brengman J, Tsujino A, et al.: Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:9654-9659, 1998
9. Ohno K, Brengman J, and Engel A: How does an A-to-G splice donor site mutation at position+3 result in aberrant splicing? A lesson learned from a mutation in the COLQ gene. Am J Hum Genet. 65:A80-A80, 1999
10. Nakata T, Ito M, Azuma Y, et al.: Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction. Hum Mutat. 34:997-1004, 2013
11. Maselli RA, Ng JJ, Anderson JA, et al.: Mutations in *LAMB2* causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome. J Med Genet. 46:203-208, 2009
12. Logan CV, Cossins J, Rodriguez Cruz PM, et al.: Congenital Myasthenic Syndrome Type 19 Is Caused by Mutations in COL13A1, Encoding the Atypical Non-fibrillar Collagen Type XIII alpha1 Chain. Am J Hum Genet. 97:878-885, 2015
13. Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, et al.: Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:2017-2022, 2001
14. Salpietro V, Lin W, Delle Vedove A, et al.: Homozygous mutations in VAMP1 cause a presynaptic congenital myasthenic syndrome. Ann Neurol. 81:597-603, 2017
15. Engel AG, Selcen D, Shen XM, et al.: Loss of MUNC13-1 function causes microcephaly, cortical hyperexcitability, and fatal myasthenia. Neurol Genet. 2:e105, 2016
16. Maselli RA, Vazquez J, Schrupf L, et al.: Presynaptic congenital myasthenic syndrome with altered synaptic vesicle homeostasis linked to compound heterozygous sequence variants in RPH3A. Mol Genet Genomic Med. 6:434-440, 2018
17. Maselli RA, Arredondo J, Vazquez J, et al.: Presynaptic congenital myasthenic syndrome with a homozygous sequence variant in LAMA5 combines myopia, facial tics, and failure of neuromuscular transmission. Am J Med Genet A. 173:2240-2245, 2017
18. Regal L, Shen XM, Selcen D, et al.: PREPL deficiency with or without cystinuria causes a novel myasthenic syndrome. Neurology. 82:1254-1260, 2014
19. O'Connor E, Topf A, Muller JS, et al.: Identification of mutations in the MYO9A gene in patients with congenital myasthenic syndrome. Brain. 139:2143-2153, 2016
20. Chaouch A, Porcelli V, Cox D, et al.: Mutations in the Mitochondrial Citrate Carrier SLC25A1 are Associated with Impaired Neuromuscular Transmission. J Neuromuscul Dis. 1:75-90, 2014
21. Cossins J, Webster R, Maxwell S, et al.: Congenital myasthenic syndrome due to a TOR1AIP1 mutation: a new disease pathway for impaired synaptic transmission. Brain Commun. 2:fcaa174, 2020
22. Lee CY, Petkova M, Morales-Gonzalez S, et al.: A spontaneous missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome. Neuropathol Appl Neurobiol. 46:588-601, 2020
23. Wu H, Lu Y, Shen C, et al.: Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. Neuron. 75:94-107, 2012
24. Yumoto N, Kim N, and Burden SJ: Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. Nature. 489:438-442, 2012
25. Ohkawara B, Kobayakawa A, Kanbara S, et al.: CTGF/CCN2 facilitates LRP4-mediated formation of the embryonic neuromuscular junction. EMBO Rep. 21:e48462, 2020

核膜病の病態解明、ならびに小型魚類を用いた筋疾患治療法の探索

分担研究者 林 由起子

所属 東京医科大学

病態生理学分野

緒言

核膜関連タンパク質の異常による遺伝性疾患を総称して核膜病と呼ぶ。我々は核膜病の代表的疾患である Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーを中心に、モデルマウスを用いた解析を進めている。

今年度は核膜病の特徴の 1 つである核の形態異常と金編成との関連について検討したので報告する。

方法

筋変性の軽い A 型ラミン変異導入マウス (H222P) と顕著な筋変性を示すエメリン欠損マウス (Emd) と H222P との重複変異マウス (EH) を用いて、単離単一筋線維、培養筋細胞、筋壊死・再生モデルを用いて、筋核の形態変化と筋変性との関連を検討した。

結果

単一筋線維の核形態は H222P、EH 共に若齢期から認められ、週齢に伴い、増悪すること、培養筋芽細胞では、形態異常を示す核は目立たないが、分化に伴い核の形態異常が増加することを明らかにした。また、筋壊死・再生モデルにおいて、H222P も EH も共に筋再生能に異常はなく、再生筋では核の変形が改善するが、筋変性は進行することを見出し、報告した。

考察

H222P と EH は共に筋核の顕著な形態変化を特徴とするが、筋変性の程度とは関連しな

かった。また、H222P、EH マウスともに筋再生能も野生型と同様であった。再生筋では筋核の形態異常は改善するが、筋変性は再生筋でも進行することが明らかとなった。

以上の結果より、筋核の形態異常と筋変性との間には明らかな関連は見出されなかった。今後、機械刺激やクロマチンの制御と遺伝子発現変化について検討を進めることで、核膜関連筋疾患の筋変性メカニズムを明らかにしていく。

結論

核膜病における筋核の形態異常と筋変性の間には明らかな関連は見出されなかった。

参考文献

なし

筋疾患におけるメカノトランスダクション 機構の解明

分担研究者

平澤恵理 1)

研究協力者

中田智史 2), 山下由莉 1)

所属

1) 順天堂大学大学院・医学研究科老人性疾患
病態・治療研究センター/老化・疾患生体制御
学

2) 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科
女性スポーツ研究センター

緒言

健全筋は、適切なメカニカルストレスにより維持されているが、疾患筋においては、メカニカルストレスへの脆弱性が筋崩壊の原因になることが知られる。病的及び老化骨格筋に特徴的なメカノカスケードを解明し、最適化することで筋ジストロフィー治療におけるリハビリテーションや高齢者へ筋肥大を促すトレーニングのオーダーメイド提供が可能になると期待される。本研究では、3年間を通し、疾患筋における適正なメカニカルストレスの提案を目指す。

方法

過去の本研究班においてこれまでに行った腱切除、神経切除術に加え、今期3年間を通して尾部懸垂も検討し、異なるメカニカルストレス免荷モデルにおける萎縮シグナルを検討している。メカニカルシグナル伝達の違いにより、筋量変化の有無や程度が異なる可能性を検討する。トレッドミル使用による運動負荷モデルも開始した。令和3年度は、マウスによる *in vivo* モデルに加えて細胞モデルを検証した。一軸伸展装置を用いて、C2C12細胞を用いたメカニカルストレスを定性定量的に負荷する *in vitro* 系モデルを確立し、Duchenne型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞由来の筋細胞 (DMD-

筋細胞) で検証した。

結果

Duchenne型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞由来の筋細胞 (DMD-筋細胞) で検証した。DMD-筋細胞では一軸伸展刺激により、メカニカルストレスに対して培養液中の Creatin Kinase (CK) が有意に上昇した ($P < 0.05$, $N=8$)。

考察

今後 DMD-筋細胞モデルを使って、電気刺激による収縮と一軸伸展を組み合わせ、生理的運動負荷を模倣する系を確立し、定性定量的なメカニカルストレスによる疾患筋の変化を検証する。今後、筋細胞の成熟度の形態学的確認も進める。

結論

病的骨格筋においては、*in vitro* の一軸伸展刺激に対し、脆弱性を示した。今後、特徴的なメカノカスケードを解明し、最適化する。

参考文献

- 1 Nakada S, Yamashita Y, Machida S, Miyagoe-Suzuki Y, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan facilitates neuronal nitric oxide synthase delocalization in denervation-Induced muscle atrophy Cells. 2020 Nov 23;9(11):2524 doi: 10.3390/cells9112524
- 2 平澤 恵理、山下 由莉 難治性疾患(難病)を学ぶ シュワルツ・ヤンペル症候群 遺伝子医学 10(3) 98 - 100 2020年7月
- 3 Yamashita Y, Nakada S, Yoshihara T, Nara T, Furuya N, Miida T, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle. Sci Rep. 2018 May 17;8(1):7766. doi:10.1038/s41598-018-25635-x.
- 4 *Ning L, Xu Z, Furuya N, Nonaka R, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan

inhibits autophagy to maintain
muscle homeostasis in mouse soleus
muscle. *Matrix Biol.* 2015 Aug 28.

- 5 Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y 1999. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23:354-8
- 6 Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I. et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 70, 1368-75 (2002).
- 7 Xu Z, Ichikawa N, et al. Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition *Matrix Biol.* 2010 Jul;29(6):461-70.
- 8 Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva JA Trejo, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N and Ueno T, PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to the proteasome 2 activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* 2014 Apr;10(4):631-41.

骨格筋分化と筋萎縮を標的とした筋疾患の病態解明と治療法開発

分担研究者 土田邦博 1)

所属 藤田医科大学総合医科学研究所

難病治療学

研究協力者 常陸圭介 1), 中谷直史 2), 高山健太郎 3), 林良雄 4), 上田洋司 1), 永岡唯宏 1), 宇根隼人 5), 西野一三 5)

所属

1) 藤田医科大学総合医科学研究所

難病治療学研究部門

2) 星城大学リハビリテーション学部

3) 京都薬科大学生命薬科学系衛生化学分野

4) 東京薬科大学薬学部薬品化学

5) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第一部

緒言

骨格筋は、筋特異的転写制御因子や細胞増殖因子の秩序だった巧妙な発現制御により形成される。損傷時には、転写制御因子が再誘導されユビキチン・プロテアーゼ系による筋のタンパク分解が生じる。骨格筋は、可塑性に富んだ組織であり、筋ジストロフィーを中心とした神経筋疾患、神経遮断、栄養不足、非活動、老化、慢性炎症やがんによる悪液質では萎縮し、運動負荷では肥大する。社会的な問題となった COVID-19 の流行による運動不足、座りがちなライフスタイルにより、骨格筋の萎縮、柔軟性の喪失が生じ、腰痛、身体活動の抑制の原因ともなっている。超高齢社会を迎えた本邦では、サルコペニア・フレイルの増加も問題となっている。近年、200 塩基以上からなる長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) の骨格筋における機能解析が進んでいる。本研究では、筋分化経路と筋萎縮における lncRNA の役割を詳細に解析した。さらに、複数の筋萎縮系と筋肥大系で発現に変動の見られる因子を絞り込んだ。老化による筋萎縮に寄与する増

殖因子の作用について精査した。ミオスタチン阻害では顕著な筋肥大が見られる。その系で発現上昇が見られる翻訳後修飾因子について詳細な解析を開始した。

方法

筋分化制御転写因子の一つであるミオジェニン (MyoG) のプロモーター領域から発現する lncRNA の *Myoparr* (Myogenin-promoter-associated lncRNA) を発見した。*Myoparr* は、RNA 結合タンパク質 (RBP) の Ddx17 とヒストンアセチル化酵素 PCAF との相互作用を強め、Myog の発現を調節し筋分化を決定していることを、Ribo トラップ法とクロマチン免疫沈降法を駆使して精査した。RNA 結合タンパク質 (RBP) は非常に多くの細胞活性に影響を与える。*Myoparr* 結合分子をさらに幅広く探索する目的で Ribo トラップ法と SILAC 法を駆使し質量分析計を用いて同定を試みた。Ddx17 以外に heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNPK) が同定された。筋分化における役割をマウスやヒトの筋芽細胞分化系を転写アッセイ系、免疫沈降法、筋分化アッセイなどを用いて解析した。hnRNPK は筋分化に対して抑制的に作用することを見出した。hnRNPK の作用には、*Myoparr* 依存性と *Myoparr* 非依存性の両方の機構が働いていた。hnRNPK は正常な筋管形成に必須であることが示唆された¹⁾。筋萎縮系として、廃用性群として坐骨神経遮断、ギブス固定、全身性筋萎縮群として大腸がん担がん悪液質モデル、飢餓を選択した。筋肥大モデルとしてミオスタチン遺伝子破壊・代償性足底筋肥大系を用いて、共通に発現変動する lncRNA, mRNA 群を絞り込んだ。RNA-seq で変動遺伝子を探索した。各刺激に共通してあるいは刺激特異的に発現変動する lncRNA, mRNA 群を絞り込んだ²⁾。

ミオスタチン阻害による筋肥大で発現上昇が見られる翻訳後修飾因子について、基質の同定に取り組んだ。骨格筋には、筋衛星細胞以外に、間質に間葉系前駆細胞 (FAP 細胞) が存在する。間葉系前駆細胞の除去が新たな筋萎縮モデルとなることを見出した³⁾。間葉系前駆細胞の数は萎縮老化筋で減少する。老化によ

る筋萎縮に寄与する細胞増殖因子・分泌因子を探索した。

結果

ミオジェニン遺伝子上流から発現誘導される lncRNA である *Myoparr* の RNA 結合蛋白として hnRNAP-K を見出した。*Myoparr* 依存性にミオジェニンの発現を調節する効果とともに、*Myoparr* 非依存性に小胞体ストレスに影響することを示した¹⁾。筋萎縮の中で、廃用性筋萎縮群と全身性筋萎縮群の 2 つがあるが lncMyod と linc-MD1 や新規の lncRNA の発現を指標に差別化可能であることを示した²⁾

間葉系前駆細胞由来の分泌因子である BMP3b の発現低下が筋萎縮の要因になり、老齡筋萎縮モデルに BMP3b (Gdf10) を持続投与することで筋萎縮を改善できるという結果を得た³⁾。老化によって生じる神経筋接合部周辺のシュワン細胞の変性も改善するという知見も得られた³⁾。筋萎縮の治療として、ミオスタチンを標的とする手法が有望であるが臨床応用にはいまだ至っていない。ミオスタチンやアクチビンの細胞外結合タンパク質であるフォリスタチンや前駆体ペプチド誘導体の薬効を東京薬科大学の林教授、京都薬科大の高山先生と共同で詳しく調べ強力な筋肥大効果を呈するペプチドを見出した⁴⁾。ミオスタチン阻害による筋肥大で発現上昇が見られる翻訳後修飾因子については、ミオシンを基質とするという知見が得られた。研究の課程で、Myh 1、4 の二重遺伝子破壊マウスが得られ、単独の KO よりも顕著な筋萎縮を示し、筋力も低下することが示された。今後、翻訳後修飾因子の詳細な解析を行い、独創性のある研究へと展開していきたいと考えている。

考察

筋萎縮は、様々な病態で生じるが、生命活動や生活の質に大きな影響を及ぼす。超高齢社会を迎えた日本では、その対策は急務である。近年のパンデミックによる外出規制も運動不足から筋骨格系に甚大な影響を及ぼしている。本研究の成果から、筋分化・筋萎縮の新たな分子機構が解明され、臨床応用への発展が期待される。

結論

長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) による筋形成および筋萎縮に関与する機構を明らかにする研究を進行させた。筋萎縮および筋肥大モデルで発現変動する lncRNA 群を抽出し差別化可能であることを示した。筋萎縮・肥大解析からミオシンの新しい翻訳後修飾を見出した。筋レポジトリー試料でも病態によって翻訳後修飾が変化することが観察されている。本研究から筋萎縮のトランスレーショナル研究が進行することを目指している。

参考文献

1. Hitachi K, Nakatani M, Funasaki S, Hijikata I, Maekawa M, Honda M, **Tsuchida K**: Expression levels of long non-coding RNAs are related to skeletal muscle mass in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1628, Feb, 2020
2. Hitachi K, Nakatani M, Kiyofuji Y, Inagaki H, Kurahashi H, **Tsuchida K**: An analysis of differentially expressed coding and long non-coding RNAs in multiple models of skeletal muscle atrophy: *Int. J. Mol. Sci.* 22:2558. March, 2021
3. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Nakatani M, Hitachi K, Yamaguchi H, Wakatsuki S, Araki T, Morita M, Yamada H, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa T, Hino J, Fukada S-i., **Tsuchida K**: Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J. Clin. Invest.* 131(1):e139617, Jan, 2021
4. Saitoh M, Takayama K, Hitachi K, Taguchi A, Taniguchi A, **Tsuchida K**, Hayashi Y: Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30(3):126892, Feb, 2020
5. Takayama K, Keisuke H, H. Okamoto H, Saitoh M, Odagiri M, Ohfusa R, Shimada T, Taguchi A, Taniguchi A, Tsuchida K, **Hayashi Y**. Development of myostatin inhibitory D-peptides to enhance the potency increasing skeletal muscle mass in mice. *ACS Med. Chem. Lett.* 2022, 13, 3, 492–498, Feb, 2022

有機化学を基盤とする筋ジストロフィー治療薬の創製研究

分担研究者 林 良雄

所属 東京薬科大学

薬学部 薬品化学教室

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異による重篤な進行性筋変性疾患であり、本疾患の約20%はナンセンス変異に起因する。我々は、ナンセンス変異読み飛ばし(リードスルー)活性を有するジペプチド型抗生物質(+)-ネガマイシン(1)を礎としたリードスルー薬創製研究を展開してきた。これまでに天然類縁体3-エピ-5-デオキシネガマイシン(TCP-107, 2)¹や合成誘導体TCP-112(3)²が良好な活性を示すことを見出した。更に、誘導体2の3位アミノ基に非天然アミノ酸を導入した誘導体TCP-1109(4)では、TGA変異において1の約10倍強力なリードスルー活性を有することを見出した。一方、これら誘導体は単純かつ柔軟な分子構造を有し、結合の自由回転により生体内で様々な分子空間的配座をとることが予想される。そこで、分子を活性配座に固定することができれば、さらなるリードスルー活性の向上が期待できると考えた。

方法、結果、考察

本研究では、TCP-107構造中のβ-アミノ酸部位にシクロプロパン環を導入することで、分子のコンホメーションの固定化を図った。シクロプロパン構造がとりうる4種の配座異性体について検討した。得られた合成誘導体は、PTCとしてTGAを含むDMDモデルマウス由来のcDNA配列をトランスフェクションしたCOS-7細胞を用い、リードスルー活性を算出した。その結果、異性体4種のうち、*down-cis*配座のシクロプロパン構造を有するTCP-304(5)において顕著なリードスルー活性の上昇が確認された³。本結果より、シクロプロパン環による分子固定がリードスルー活性の向上に寄与していることが示唆された。さらに、5の3位アミノ基部の誘導化により2の約10倍もの強力な活

性を有するTCP-306(6)の獲得にも成功した³。この活性はアミノグリコシドG418のリードスルー活性値よりも約2.5倍高いものであった。

高活性誘導体5および6の詳細なリードスルー活性を調べるために、濃度依存性試験を実施した。両誘導体ともに6.25から200 μMにおいて、濃度依存的なリードスルー活性を示した。さらに、PTCとして他のTAG、TAA配列についても同様に評価を行なった。その結果、アミノグリコシドG418は3種類のPTCに対して、比較的類似したリードスルー活性を示した。一方で、ネガマイシン誘導体5および6は、最もリードスルーを起こし易いとされるTGA配列に対し、顕著な活性を示すことがわかった。

結論

本研究では、TCP-107にシクロプロパン環を導入することで、*down-cis*配座を有するTCP-304が高いリードスルー活性を有することを見出した。TCP-304の更なる誘導化により、新規高活性誘導体TCP-306の創製にも成功した。今後、これら誘導体の詳細な活性評価により、DMDにおけるリードスルー薬の創製に繋げていく予定である。

参考文献

1. Taguchi A, Hamada K, Kotake M, Shiozuka M, Nakaminami H, Pillaiyar T, Takayama K, Yakushiji F, Noguchi N, Usui T, Matsuda R, Hayashi Y: Discovery of natural products possessing selective eukaryotic readthrough activity: 3-*epi*-deoxyne-gamycin and its leucine adduct. *ChemMedChem* 9(10):2233-2237, Oct, 2014
2. Hamada K, Omura N, Taguchi A, Baradaran-Heravi A, Kotake M, Arai M, Takayama K, Taniguchi A, Roberge M, Hayashi Y: New negamycin-based potent readthrough derivative effective against TGA-type nonsense mutations. *ACS Med. Chem. Lett.* 10(10):1450-1456, Sep, 2019
3. 林 良雄、田口晃弘、大村紀子、他: ネガマイシン誘導体. PCT/JP2021/012992. WO/2021/200694.

骨格筋における膜リン脂質分布制御の意義解明

分担研究者 原雄二

所属 静岡県立大学薬学部

統合生理学分野

緒言

膜融合は骨格筋線維の形成や膜修復機構など、骨格筋における恒常性維持に必須な現象である。筋線維の形成過程では、筋衛星細胞から派生した筋芽細胞同士が融合し、筋管と呼ばれる長大な管状の構造体が形成される。また、絶え間ない筋収縮・弛緩により発生する筋線維膜の損傷は、小胞融合を介して修復されることが知られており、膜修復の破綻は筋疾患発症をもたらす。しかし細胞膜融合の根幹ともいえる「脂質の局在変化、膜融合後の脂質再配置がいかにか膜構造・膜物性変化に影響を与え、骨格筋機能を統御するか」について、未だその全容は明らかではない。本年度はこれまでの知見のもと（文献1）、細胞膜の張力により活性化される「機械受容イオンチャネル」についてその役割解明を目指してきた。特に筋幹細胞に高く発現する機械受容イオンチャネル PIEZO1 のさらなる機能およびイオンチャネル群がもたらす細胞内情報伝達経路の解明を試みた。

方法

Piezo1 欠損マウス (*Piezo1^{tm1c(KOMP)Wtsi}*) を UCDavis マウスリソースセンターより入手した。筋衛星細胞特異的に Cre レコンビナーゼを発現する *Pax7-Cre^{ERT2}* (小野悠介先生より供与いただいた) と掛け合わせを行った。Cre レコンビナーゼの誘導のためタモキシフェンを腹腔内に5回(1日1回)注入し、さらに5日後に筋線維融解作用を持つヘビ毒(カルジオトキシン)を前脛骨筋に注入することで、筋再生能を評価した。また筋幹細胞の性状解析について、増殖能、分化能等を検討した。内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato タグを付加するマウスについては、野々村恵子博士(東京工業大)より供与いただいた。

また、機械受容イオンチャネルとも知られる TRPM7 について、その遺伝子欠損マウス(森泰生教授・京都大学より供与、文献2)についても同様な解析を行った。

また、細胞内情報伝達経路の解明を目指し、単離筋幹細胞を用いて RNA-seq 解析を試みた(理研・新宅博文博士との共同研究)。

結果

これまで申請者の研究(文献1)をもとに、骨格筋線維の再生過程全般での PIEZO1 の機能解明を試みた。タンパク質レベルでの PIEZO1 の発現を検討するため、内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato が融合した形で発現する *Piezo1-tdTomato* マウスを用いて、PIEZO1 の骨格筋での発現を検討した。実際、同マウスより FACS にて単離した筋衛星細胞にて PIEZO1-tdTomato の発現が強く認められた。

続いて、CreERT2/loxP システムを用いてタモキシフェン誘導型の筋衛星細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの作出・解析を行った。まずカルシウム測光にて筋衛星細胞でのカルシウム動態を検討したところ、PIEZO1 依存的な微細なカルシウム振動が認められた。またカルジオトキシンを用いて筋線維壊死後の筋再生過程を検討したところ、*Piezo1* 欠損マウスでは、筋再生能が著しく低下していることを見出した。さらに単離筋衛星細胞では、増殖能の低下が認められ、PIEZO1 は幹細胞の増殖に関わることが示された。

この表現型の原因を追究すべく、PIEZO1 下流経路の同定を目指した。筋衛星細胞を単離し RNA-seq 解析を行ったところ、*Piezo1* 欠損マウスでは、細胞骨格(アクチン)の形成に関わる因子群の著しい現象が認められた。さらに我々のこれまでの知見のものが損なわれていた。また *Piezo1* 欠損で見られた幹細胞の増殖能の低下は、RhoA 経路の活性化剤にてレスキューされたことから、PIEZO1-RhoA 経路が筋幹細胞に重要な役割を果たすことが示唆された。尚、上記研究は現在投稿中である。

(<https://biorxiv.org/cgi/content/short/2021.03.18.435982v1>)。

一方、PIEZO1 の局在は幹細胞の状態で著し

く変化することが認められたことから、幹細胞に掛かる物理的な力を感知して自身の局在を変化させ、幹細胞の活性化、分裂、増殖など適切な機能をもたらすと考えられる。

また、PIEZO1 以外の機械受容イオンチャネルとして、TRPM7 チャネルについて、その機能解明を試みた。興味深いことに *Trpm7* 欠損マウスでは、*Piezol* 欠損と比較してより強い表現型が認められた。カルジオトキシン注入後、同遺伝子欠損により筋線維の再生は著しく阻害された。一方で免疫染色解析の結果、TRPM7 イオンチャネルは顕著な局在・発現変動は示さなかったことから、TRPM7 は PIEZO とは異なる作用機序により細胞内情報伝達をもたらすものと考えられる。

考察

本研究では PIEZO1 を中心とした、機械受容チャネルの機能解析を行った。幹細胞は外界からの刺激により活性化を受けると考えられており、物理的な力を感知する機構として、PIEZO1 をはじめとした機械受容チャネルが関わることを見出した。

筋衛星細胞は筋線維の再生過程に重要であるが、一方で Rhabdomyosarcoma においても筋衛星細胞と類似した経路が異常に活性化されることが報告されている。本研究で明らかにされた PIEZO1 が機械刺激を感知するメカニズムは、筋衛星細胞による筋再生能のみならず、骨格筋における多様な病態発症においても関わる可能性が考えられる。また我々の検討では機械受容イオンチャネルは成熟筋線維にはほとんど発現していなかったが、一方でわずかに発現するイオンチャネル分子が筋機能に関わる可能性も存在する。今後、膜修復機構を含め、筋機能と機械受容チャネルの相関を明らかにしていきたい。

結論

リン脂質動態により制御される機械受容イオンチャネル PIEZO1 は、骨格筋再生能に重要な役割を果たすことが示された。また機械受容イオンチャネルである *Trpm7* 欠損マウスは重篤な表現型を示すことが明らかになった。今後の

研究により、機械受容イオンチャネル間での機能的なすみ分けなどを明らかにしていきたい。

参考文献

1. Tsuchiya M, Hara Y, Okuda M, Itoh K, Nishioka R, Shiomi A, Nagao K, Mori M, Mori Y, Ikenouchi J, Suzuki R, Tanaka M, Ohwada T, Aoki J, Kanagawa M, Toda T, Nagata Y, Matsuda R, Takayama Y, Tominaga M, Umeda M. Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. *Nat. Commun.*, 9, 2049 (2018).
2. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca^{2+} fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. Qian N, Ichimura A, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H. *Sci Signal.* 2019 Apr 9;12(576):eaaw4847.

リアノジン受容体関連筋疾患の病態解明と治療法開発

分担研究者 村山 尚

研究協力者 呉林 なごみ

所属 順天堂大学医学部薬理学講座

緒言

1型リアノジン受容体 (RyR1) は骨格筋筋小胞体の Ca^{2+} 遊離チャネルであり、筋収縮に重要な役割を果たしている。最近、さまざまな先天性ミオパチーにおいて RyR1 の突然変異が疾患の原因であることが分かってきたが、それらの疾患に対する治療法は未だ確立していない。この原因の一つは、創薬スクリーニング系の確立の遅れにあると考えられる。RyR1 の生理的 Ca^{2+} 遊離機構 (脱分極誘発性 Ca^{2+} 遊離 ; DICR) は T 管膜上の電位センサー (Cav1.1) と RyR1 との相互作用により起こるが、少なくとも 5 種類の必須因子からなる機能的複合体の形成が必要である。本研究では HEK293 細胞に DICR を再構成することで、新たな創薬候補化合物をスクリーニングするシステムの開発を行った。

方法

RyR1 と小胞体内 Ca^{2+} インジケータ (R-CEPIA1er) を安定発現する HEK293 細胞に DICR 必須因子 (Cav1.1、 β 1a、junctophilin 2、Stac3) および内向き整流性カリウムチャネル (Kir2.1) をバキュロウイルスで感染させた。小胞体内 Ca^{2+} 濃度を蛍光プレートリーダー (FlexStation3) でタイムラプス測定し、高カリウム溶液を添加して脱分極刺激を行い、蛍光変化を観察した。

結果

VSV-G バキュロウイルスは哺乳類細胞に高効率で遺伝子導入を行うことが可能である。RyR1/R-CEPIA1er 発現 HEK293 へ DICR 必須因

子を導入したところ、ほとんどすべての細胞に発現が確認された。HEK293 細胞は静止膜電位が浅い (-20 mV) ため、Kir2.1 を発現させて静止膜電位を -70 mV まで低下させた。この細胞に脱分極刺激を行ったところ、カリウム濃度に依存した小胞体内 Ca^{2+} 濃度の低下が観察された。各必須因子を除くと小胞体内 Ca^{2+} 濃度低下は見られなくなった。以上の結果から、HEK293 細胞を用いた DICR の再構成に成功したことが示唆された。

考察

現在は 96 ウェルプレートを用いたアッセイ系であるが 384 ウェルプレート等のさらに多検体測定への拡張も可能である。

薬物スクリーニング系として使用可能かどうかを知るためには、RyR1 活性化薬や RyR1 阻害薬などの対照薬物で評価する必要があり、今後、実験を行っていく予定である。

結論

今回開発した DICR 再構成系は RyR1 関連ミオパチーの治療薬開発に大きな進歩をもたらすことが期待される。

参考文献

1. Yamazawa T et al: A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke. Nat Commun, 12: 4293, 2021
2. Kobayashi T, Kurebayashi N, Murayama T: The ryanodine receptor as a sensor for intracellular environments in muscles. Int J Mol Sci, 22: 10795, 2021.
3. Hu Y et al: Purification of recombinant wild type and mutant ryanodine receptors expressed in HEK293 cells. Bio-protocol, 11: e4112, 2021.

筋ジストロフィー関連疾患モデルとしてのゼブラフィッシュの活用

分担研究者：三橋弘明

所属 東海大学工学部生命化学科

緒言

筋ジストロフィー関連疾患には原因遺伝子が不明のものも多く、エクソーム等により新たな原因遺伝子の候補が見つかることがある。また、既知の原因遺伝子であっても新規な変異を持つ1例症例が見つかることもあり、変異の病原性の評価が重要である。分担研究者は遺伝子改変が容易で発生が早く、多個体の飼育が可能なゼブラフィッシュを筋ジストロフィー関連疾患のモデルとして活用することを目指している。令和3年度はラミンAミオパチーのモデルゼブラフィッシュについて運動による力学的なストレスと核膜への影響を解析した。

方法

当研究室で作製した、アクチンプロモーター制御下に野生型及び疾患変異型EGFP-ラミンAを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ(WT-LMNA, Mut-LMNA)より子世代を得て、受精後3, 5日目の稚魚について観察をおこなった。筋収縮による力学的なストレスの影響を調べるために、ゼブラフィッシュに20mM pentylenetetrazol (PTZ)を投与して激しく運動させた後、DNA損傷マーカーであるH2AX抗体による免疫染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、ラミンAは遺伝子発現にも関与することが知られているため、生後5日の疾患変異型ラミンAゼブラフィッシュからRNAを抽出し、次世代シーケンサーによるRNA-seqを行った。塩基配列データはゼブラフィッシュリファレンスゲノムにマッピングし、統計的に有意な遺伝子発現の変化をリストア

ップした。

結果

WT-LMNA フィッシュの核は正常であったのに対し、Mut-LMNAの核には形態の異常が観察された。形態異常は3日目より5日目で進行していた。PTZ処理により水泳運動を誘発するとMut-LMNAでの核の形態異常の頻度が増加した。形態異常の核では高頻度にH2AXが陽性であった。RNA-seqによる遺伝子発現解析の結果、mut-LMNAを発現するゼブラフィッシュでは、野生型に比べて2倍以上の発現増加を示す遺伝子が66個、減少を示す遺伝子が52個検出され、ラミンAミオパチーの疾患変異が筋線維の遺伝子発現に影響を与えることが示された。DNA損傷、アポトーシス、炎症、代謝関連の遺伝子群が発現増加する傾向にあり、チャンネル遺伝子群が発現減少する傾向にあった。

考察

ラミンAには核膜の支持と遺伝子発現調節の足場の2つの代表的な機能が提唱されているが、本研究よりラミンAミオパチーの疾患変異はその両方の機能を低下させることが示唆された。筋線維は常に筋収縮の力学的な刺激に曝されており、核膜は他の臓器の細胞よりも強い力学的ストレスを受けるものと推測される。筋収縮による核膜ストレスが慢性的なDNA損傷応答を引き起こしていることが示唆され、病態との関連性が考えられた。

結論

ラミンAミオパチー変異は核膜の脆弱化とDNA損傷応答を引き起こし、それに対応した遺伝子発現変化を誘発することが示唆された。鍵となる遺伝子を追求し、病態の解明と治療法の開発へ発展させたい。

筋強直性ジストロフィーの病態解明と治療研究

分担研究者 中森 雅之

所属 大阪大学 医学系研究科 神経内科学

緒言

筋強直性ジストロフィー (myotonic dystrophy, DM)は、CTG 繰り返し配列が異常に伸長する DM1 型 (DM1) と、CCTG 繰り返し配列の異常伸長による DM2 型 (DM2) からなる。DM1、DM2 ともに異常に伸長したリピートをもつ RNA が、MBNL 蛋白をはじめとする核内のスプライシング制御因子を障害する。このため DM は、さまざまな選択的スプライシング調節機構の破たんをきたすスプライシング異常症とされている。DM では多くのスプライシング異常が報告され、症状との関連が示唆されているが、ADL 障害要因となる進行性筋萎縮や心伝導障害、認知機能障害など中枢神経症状の原因はいまだに不明である。また、スプライシング障害の他にも、DM では早期老化が指摘されており、その病態への関与が示唆されている。本研究では、こうした治療開発に不可欠な DM の病態を解明する。また、異常 RNA の毒性を低減して、スプライシング制御障害を抑制する低分子化合物の開発も進める。

方法

DM1 において病態の中核となる、異常伸長 CUG リピートを持つ RNA の細胞老化への直接的な影響を調べるため、ヒト初代線維芽細胞に conditional に異常 RNA を発現させることが可能な transgene を挿入した DM1 モデル細胞を作成した。同一の遺伝的バックグラウンドをもつヒト初代細胞系で、異常 RNA の発現の有無で細胞増殖速度を検討した。また qPCR 法によりテロメア長測定を、RNA-seq 解析により

遺伝子発現変化を、ウェスタンブロット法による蛋白発現変化を評価した。また Comet assay や γ H2-AX 免疫染色により DNA damage を、Mito-SOX assay によりミトコンドリア機能障害を評価した。

CTG/CAG リピート長を短縮させることができる核酸標的低分子ナフチリジンアザキノロン(NA)の長期投与による効果を、DM1 と同じリピート病モデルである DRPLA モデルマウスに Alzet ポンプを留置し、16 週間にわたり脳室内持続投与することで評価した。治療効果は脳各組織でのリピート長、生存期間、Rota rod 試験などの運動機能評価で判定し、RNA-seq による遺伝子発現解析や免疫染色による異常蛋白の定量もおこなった。

結果

われわれが構築した DM1 モデル細胞において、異常 RNA の発現により細胞増殖速度の低下および早期細胞分裂停止が誘導された。異常 RNA 発現細胞では SA- β Gal 陽性細胞の増加がみられ、早期老化現象が確認された。テロメア長の短縮はみられず、テロメア非依存的な細胞老化が示唆された。また遺伝子発現解析の結果から、p16, p21, p51 などの cell cycle regulator、IGFBP3 など secreted mediator of senescence の発現亢進が同定され、蛋白レベルでもこれらは異常 RNA 発現細胞で増加がみられた。さらに、Comet assay や γ H2-AX 免疫染色より異常 RNA 発現細胞で DNA damage が増加していること、Mito-SOX assay によりミトコンドリア機能の障害が確認された。

DRPLA モデルマウスへの NA の脳室内長期持続投与により、モデルマウス線条体でのリピート長の短縮と、生存期間の延長効果が確認された。線条体では異常蛋白の発現が治療群で有意に低下していた。また Rota Rod 試験でも治

療群で有意な運動機能改善効果がみられた。RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析では、リピート長依存的に発現変化する遺伝子群について、NA 治療群で発現異常改善効果がみられた。

考察

DM1細胞モデルをもちいた老化研究により、異常伸長 CUG をもつ RNA は、細胞内でミトコンドリア機能を障害し、ROS の発現亢進、DNA damage および DNA damage response を介して p16, p21, p51 などの cell cycle regulator、IGFBP3 などの secreted mediator of senescence の発現を増加させ、早期老化を誘導する機構が示唆された。

また核酸標的的低分子 NA のモデルマウスへの長期脳室内持続投与は、伸長リピート短縮、異常蛋白減少効果だけでなく、異常リピートによる遺伝子発現異常を網羅的に改善し、運動機能や生存期間も改善することが実証された。

結論

DM1 において、異常伸長 CUG 含有 RNA が早期老化を誘導することが示唆された。また核酸標的的低分子による異常伸長リピート短縮治療は、DM1 などのリピート病において有用であることが示唆された。

参考文献

1. Hasuike Y, Tanaka H, Gall-Duncan T, Mehkary M, Nakatani K, Pearson CE, Tsuji S, Mochizuki H, **Nakamori M**: CAG repeat-binding small molecule improves motor coordination impairment in a mouse model of Dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Neurobiol Dis.* 163:105604, Feb, 2022
2. Hasuike Y, Mochizuki H, **Nakamori M**: Cellular Senescence and Aging in

Myotonic Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 23(4):2339, Feb, 2022.

3. Hasuike Y, Mochizuki H, **Nakamori M**: Expanded CUG repeat RNA induces premature senescence in myotonic dystrophy model cells. *Front Genet.* *in press*

膜リモデリング分子に生じる先天性ミオパチー型 SNV の多階層的解析システムの構築

分担研究者 竹田 哲也

所属 岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 (医)

緒言

先天性ミオパチーは、筋力や筋緊張の低下を伴う筋疾患である。中心核ミオパチー (Centronuclear Myopathy; CNM) は先天性ミオパチーの一つで、T 管と筋小胞体からなる Triad の形成異常により、骨格筋の興奮-収縮連関が正常に起こらない。先行研究より、膜リモデリングに関わる BAR ドメイン蛋白質 (BIN1)、ダイナミン (DNM2) の各遺伝子の一塩基変異 (SNV) が、CNM 発症に関与することが知られていた。しかし、膜リモデリング異常に起因する CNM の発症機序は不明である。

方法

本研究では、CNM 変異型 DNM2、BIN1 の膜リモデリング機能異常について、①*in vitro* 再構成系による分子レベルの解析、②筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析、③モデル生物を用いた個体レベルの解析を行い、CNM の発症機序をマルチスケールで解明し、診断や治療法、創薬開発に向けた学術的基盤の創生を目指した。

結果

分担研究者は現在までに、(1) BIN1 と DNM2 の膜リモデリング機能の定量的な解析に適した、*in vitro* および *in cellulo* における T 管構造の再構成系を確立した。またこれらの再構成系を用いて、(2) CNM 変異型の BIN1 および DNM2 が膜リモデリング機能異常を示すこと、

(3) DNM2 の膜切断機能に必要な GTP アーゼ活性が、CNM 変異型 DNM2 では恒常的に亢進し、T 管構造が切断されることを明らかにした。これらの研究成果については、主任研究者と共著で、原著論文 2 報を発表した (Fujise et al., JBC 2021 ; Fujise et al., Human Mutation 2021)。さらにモデル生物である線虫を用い、(4) 線虫の内在性ダイナミンの機能がヒト DNM2 によって代替可能であること、(5) 変異型 DNM2 を発現したトランスジェニック線虫が、筋機能不全を示唆する行動異常を顕すことを明らかにした (投稿準備中)。

考察

CNM 変異型 BIN1 や DNM2 によって膜リモデリング異常が誘導されるメカニズムについては、今後クライオ電子顕微鏡や高速 AFM を用いた構造生物学的なアプローチも取り入れて明らかにしていく。さらに、線虫の内在性のダイナミン遺伝子 (*dyn-1*) および BIN1 遺伝子 (*amph-1*) のコーディング領域を、CNM 変異型のヒト由来 DNM2 や BIN1 遺伝子で置換した CNM モデル線虫を確立し、その表現型の解析により、CNM の発症機序を個体レベルでも解明していく。

結論

本研究で用いた *in vitro*、細胞、モデル生物を用いた多階層的解析アプローチは、CNM 発症機序の分子・細胞・個体レベルの解明や、疾患責任 SNV の簡便かつ迅速な同定、さらに創薬シーズ化合物のスクリーニング系としての利用など、CNM の新規治療法や創薬開発に寄与できる可能性がある。

参考文献

1. Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Takei, K., Nishino, I., ***Takeda, T.** and Noguchi, S. Imaging-based evaluation of

DNM2 pathogenicity associated with centronuclear myopathy. *Human Mutation* 2021 Nov 27. doi: 10.1002/humu.24307.

2. Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Noguchi, S., *Takei, K., and ***Takeda, T.** Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy. *J. Biol. Chem.* 2021; 296: 100077.

統合的ゲノム解析による遺伝性筋疾患原因遺伝子の探索

分担研究者 飯田 有俊

所属 国立精神・神経医療研究センター メディカル・ゲノムセンター 臨床ゲノム解析部

緒言

遺伝性筋疾患は、臨床的、遺伝学的にも異質性が高い進行性の希少難病である。それゆえ、根本的な治療法も確立されていない。本研究では、NCNP の筋レポジトリで管理される疾患検体を用いて統合的ゲノム解析を行い、新規の疾患原因遺伝子を同定する。疾患の病態経路を明らかにすると共に新しい遺伝子診断法を開発する。疾患遺伝子データベースを構築する。

方法

本研究では、遺伝性筋疾患遺伝子解析パネル（パネル解析）、エクソームシーケンス (exome seq)、全ゲノムシーケンス (WGS)、RNA シーケンス (RNA seq)を用いて、筋疾患原因遺伝子を同定する。パネル解析、exome seq から病理性バリエーションを検索する。exome seq で発見出来なかった場合には、WGS と RNA seq から、イントロンや調節領域の病理性バリエーション、さらには大規模な染色体構造異常を探索する。候補遺伝子 (変異) については、フォローアップシーケンスや追加検体を用いた解析を行なう。*in house* 解析パイプラインを管理、運用する。変異頻度と臨床情報との関連を解析する。疾患遺伝子の確証が取れ次第、主治医、共同医療研究者にデータを報告し、臨床現場の後方支援を行なう。

結果

1. 遺伝性筋疾患のパネル解析

NCNP の筋レポジトリで管理される遺伝性筋疾患の臨床、病理学的診断及び遺伝子診断を行い、臨床後方支援と臨床ゲノム

医療実装のための基盤構築を行なっている。本年度、パネル解析を行なった総症例数は、341 例であった。一方、診断率は約 40% (2021 年 12 月末データ)であった。

2. 眼咽頭遠位型ミオパチー (OPDM)_LRP12 症例の臨床病理学的解析

LRP12 遺伝子の CGG 反復配列の異常伸長を呈する症例について、臨床病理学的解析を行なった。OPDM_LRP12 は日本で最も頻度の高く、眼咽頭筋の筋力低下、特にヒラメ筋と腓腹筋を侵す遠位型ミオパチー、筋病理における縁取り空胞の存在が特徴的であった。

3. OPDM の遺伝学的解析診断

先年度の報告書で、「国内外の医療研究機関に対して OPDM の遺伝子診断サービスを開始した」と記載した。今年度、原因遺伝子 3 遺伝子について解析し、診断率は 12.5%であった。

4. 新規の関節拘縮原因遺伝子 TNNI1 の発見

近位部に拘縮があり、血清 CK 値がある日本人 14 歳の男児とその家系 (常染色体優性遺伝形式) についてゲノム解析を行なった。トロポニン I1 をコードする TNNI1 遺伝子にヘテロ接合型のナンセンスバリエーション c.523A>T (p.K175*)を同定した。

5. ドライ解析システムの効率化

in house 解析パイプラインの運用に際して、refseq に登録されているヒト全遺伝子の全エキソンを特異的に増幅できるプライマーデザイン自動化ツールを構築した。

考察

昨年度に引き続き、NCNP 筋レポジトリの検体を用いて、遺伝性筋疾患の新規原因遺伝子、新規病理性バリエーションと臨床像の関連を提示した。疾患遺伝情報を共有することで研究ならびに診断に大きな進歩をもたらした。

結論

NCNP 筋レポジトリーは、これまで本邦ならびに諸外国の筋疾患研究、診断法に重要な役割を果たしてきた。今年度もまた、新規の原因遺伝子、病因性バリエーションを発見し、病理学的解析、臨床像との相関を明らかにした。

参考文献

1. Nishimori Y, [Iida A](#), Ogasawara M, Okubo M, Yonenobu Y, Kinoshita M, Sugie K, Noguchi S, Nishino I: *TNNI1* Mutated in Autosomal Dominant Proximal Arthrogyriposis. *Neurol Genet.* 8(1): e649, Feb, 2022
2. Saito M, Ogasawara M, Inaba Y, Osawa Y, Nishioka M, Yamauchi S, Atsumi K, Takeuchi S, Imai K, Motobayashi M, Misawa Y, [Iida A](#), Nishino I: Successful treatment of congenital myasthenic syndrome caused by a novel compound heterozygous variant in RAPSN. *Brain Dev.* 44(1):50-55, Jan, 2022
3. Matsumura T, Inoue K, Toyooka K, Inoue M, [Iida A](#), Saito Y, Nishikawa T, Moriuchi K, Beck G, Nishino I, Fujimura H: Clinical trajectory of a patient with filaminopathy who developed arrhythmogenic cardiomyopathy, myofibrillar myopathy, and multiorgan tumors. *Neuromuscul Disord.* (12):1282-1286, Dec, 2021
4. Motoda A, Takahashi T, Watanabe C, Tachiyama Y, Ochi K, Saito Y, [Iida A](#), Nishino I, Maruyama H: An autopsied case of ADSSL1 myopathy. *Neuromuscul Disord.* (11):1220-1225, Nov, 2021
5. Inoue M, Noguchi S, Sonehara K, Nakamura-Shindo K, Taniguchi A, Kajikawa H, Nakamura H, Ishikawa K, Ogawa M, Hayashi S, Okada Y, Kuru S, [Iida A](#), Nishino I: A recurrent homozygous ACTN2 variant associated with core myopathy. *Acta Neuropathol.* 142(4):785-788, Oct, 2021
6. Matsubara T, Saito Y, Kurashige T, Higashihara M, Hasegawa F, Ogasawara M, [Iida A](#), Nishino I, Adachi T, Kubota A, Murayama S: Neuropathy/intranuclear inclusion bodies in oculopharyngodistal myopathy: A case report. *eNeurologicalSci.* 24:100348. eCollection, Sep, 2021
7. Kumutpongpanich T, Ogasawara M, Ozaki A, Ishiura H, Tsuji S, Minami N, Hayashi S, Noguchi S, [Iida A](#), Nishino I: OPDM_LRP12 Study Group: Clinicopathologic features of oculopharyngodistal myopathy with LRP12 CGG Repeat Expansions compared with other oculopharyngodistal myopathy subtypes. *JAMA Neurol.* 78(7):853-863, Jul, 2021
8. Inoue M, Saito Y, Yonekawa T, Ogawa M, [Iida A](#), Nishino I, Noguchi S: Causative variant profile of collagen VI-related dystrophy in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 16(1):284, Jun, 2021

骨格筋幹細胞の分化決定メカニズムの解明と筋疾患治療への応用

分担研究者 林 晋一郎

所属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部

緒言

筋ジストロフィーの根本的治療法の一つとして、骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）を用いた再生医学的治療法が挙げられる。移植された筋幹細胞は増殖・分化・融合して筋再生に寄与するだけでなく、その一部は移植先の筋組織内で再び休止状態となり、組織幹細胞として定着することができる。しかしながら生体外で幹細胞機能を維持したまま増幅させることが困難なことや移植後の定着率の低さなど乗り越えるべき課題も多く、実現に至っていない。Pax3 と Pax7 は筋幹細胞に発現する転写因子であり、筋幹細胞の機能維持に必須であるが、その共役因子、標的因子、および発現制御機構については殆ど明らかにされていない。この理由の一つとして、市販の Pax3/Pax7 抗体に有用なものが無く、免疫沈降法による共役因子の探索やクロマチン免疫沈降-シーケンシング (ChIP-seq) による標的因子の同定を行うことが非常に困難であることが挙げられる。この問題を解決するため、本分担研究者は世界に先駆けて Pax7 に HA タグを付加したノックインマウス (Pax7-HA KI マウス) を作出した。本研究では、この新規 KI マウスを活用し、筋幹細胞における Pax7 の転写調節共役因子および標的因子を明らかにすることで骨格筋幹細胞の機能調節・機能維持メカニズムを明らかにすることを目的とした。

方法

1) Pax7HA KI ホモマウス(Pax7HA/HA)および野生型マウス (6-8 週齢) から筋衛星細胞をセルソーターにより単離し、筋衛星細胞初代培養系を作製した。増殖期の培養筋衛星細胞を回収し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降-ウェスタンブロット法により Pax7 結合タンパク質を同定した。

2) Pax3 の N 末端に PA タグを付加したノックインマウス(Pax3PA KI)の作出を CRISPR-Cas9 システムにより試みた。得られた Pax3PA KI マウス胚 (E10.5 日齢胚) について、Pax3 および PA の発現を免疫染色法およびウェスタンブロット法により解析し、さらに筋発生における *Myod1* の発現を *in situ hybridization* 法により解析した。

結果

1) 培養筋衛星細胞を用いた免疫沈降-質量分析法により、Pax7-HA/HA由来筋衛星細胞で野生型マウス由来筋衛星細胞と比較して2倍以上有意に検出されたタンパク質を267種同定した。Gene Ontology解析の結果、eIF2、eIF3サブユニットを中心とした翻訳開始関連因子が多く見出された。一方、前年度に行ったE12.5胚を用いた免疫沈降-質量分析の結果と同様に、これまでPax7の共役因子として報告されたMLL1/2およびCarm1 (Cell Stem Cell 11, 333-345, 2012) は検出されなかった。

2)今回新たにPAタグが挿入されたPax3PA KIマウスを計6ライン作出した。シーケンシングの結果から、計画通りPAタグはPax3のN末端に挿入されていることを確認した。次に、Pax3-PAマウス胚 (E10.5) でPax3とPAの発現を解析した。ヘテロマウス胚 (Pax3-PA+) ではPAタグタンパク質は検出されなかったが、ホモ胚 (Pax3-PA/PA) においてPax3とPAの共局在を確認した。しかしなが

ら、その後の解析から全てのラインでPax3-PA/PAは胎生致死であることが明らかとなった。Pax3のターゲットであるMyod1の発現および体節の筋発生をWhole mount *in situ* hybridizationによって解析した結果、Myod1の発現量は大きく変化しないものの、前肢への筋前駆細胞の移動不全や、体節の発生異常が見られた。

考察

抗HA抗体とPax7HA/HAマウス由来培養筋衛星細胞を用いた免疫沈降-質量分析法の結果、Pax7と結合する因子として、eIF2およびeIF3サブユニットを中心としたタンパク質翻訳開始に関わる因子が最も多く検出された。ZismanovらはeIF2の翻訳制御が筋衛星細胞の自己複製に重要であり、eIF2のリン酸化を促進することで筋衛星細胞の再生寄与率を上げることができることを報告している (Cell Stem Cell 18:79-90, 2016)。これまでeIFsを含む翻訳関連因子とPax7との結合についての報告はなく、今回の結果は非常に興味深い。eIF2やeIF3などは細胞質だけでなく核にも局在すること知られているが、翻訳関連因子の多くは細胞質に局在しており、核に局限するPax7と結合するという今回の結果はバックグラウンドノイズを検出している可能性も高い。今後、免疫沈降-ウェスタンブロット法により確認をする必要がある。過去にPax7と結合すると報告されたクロマチン制御関連因子であるMLL1/2やCarm1はE12.5日齢胚を用いた結果同様今回も検出されなかった。これらはPax7を強制発現させた細胞で同定された因子であり、内因性のPax7を用いた今回の結果とは実験系が異なることに起因すると考えられる。

新たに作出したPax3PA KIマウスの解析では、E10.5日齢ホモ胚 (Pax3PA/PA) で筋前駆細胞の移動不全・体節の発生異常が見られ

た。また、Pax3PA/PAは胎生致死であり、Pax3のKOマウスはPax3を発現する神経堤細胞の移動不全に起因する円錐動脈管異常により致死となることから (Development 124(2):505-14, 1997)、Pax3PA/PAもPAタグ挿入によるPax3機能不全により同様に致死となることが考えられた。Pax3のN末端へのPAタグのノックインによりPax3の発現量、DNA結合能、あるいは転写活性に影響が出たものと考えられた。

結論

本研究により新規のPax7と結合するタンパク質を同定した。本研究の進展に伴い、骨格筋幹細胞の増殖・分化制御、筋形成の全容が解明されるとともに、その成果が再生医療へと応用されることが強く期待される。

参考文献

1. Y Kawabe, YX Wang, IW McKinnell, MT Bedford, MA Rudnicki. Carm1 regulates Pax7 transcriptional activity through MLL1/2 recruitment during asymmetric satellite stem cell divisions. Cell Stem Cell. 11(3):333-45, 2012.
2. V Zismanov, V Chichkov, V Colangelo, S Jamet, S Wang, A Syme, A E Koromilas, C Crist. Phosphorylation of eIF2 α Is a Translational Control Mechanism Regulating Muscle Stem Cell Quiescence and Self-Renewal. Cell Stem Cell 18:79-90, 2016.
3. S J Conway, D J Henderson, A J Copp. Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the splotch (Sp2H) mutant. evelopment 124(2):505-14, 1997.

細胞内分解機構に基づく筋疾患の病態解明

分担研究者 株田 智弘

所属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第四部

緒言

これまでの国内外の研究から、細胞内分解機構は神経系や骨格筋の維持に必要であり、その破綻は神経・筋疾患の原因となることがわかってきていることから、細胞内分解機構の解明は極めて重要な研究課題である。オートファジー系はリソソームによる細胞内分解機構であり、恒常性の維持に必須の役割を果たしているが、マクロオートファジー以外のオートファジー系に関する研究は立ち遅れているのが現状である。申請は近年、リソソームが直接的に RNA、DNA を取り込み分解するという新規経路 RNautophagy/DNautophagy (RDA)を発見し、その分子メカニズムを解明してきた。さらに、リソソームがタンパク質を直接取り込み分解する新規分解経路も見いだし、RDA とあわせて DUMP と呼んでいる。これまでに、RNA トランスポーターファミリーであるリソソーム膜タンパク質 SIDT2 は DUMP において、リソソームへの基質の取り込みを仲介することを明らかにした。また、我々は、SIDT2 を介した DUMP の破綻が neuropathy and distal myopathy with rimmed vacuoles を引き起こすことを見いだし、研究中である。本研究では、これらの新規経路の分子メカニズムや筋疾患との関連性の解明を行う。

DUMP の分子メカニズムについては、二次構造を形成した RNA がリソソーム内に取り込まれる際に RNA helicase が関与すると推測される。今回、現在までに不明なこの点について解析を進めた。

方法

リソソームにおける存在が報告されている RNA helicase 6 種類に着目した。これら helicase を siRNA を用いて培養細胞で knockdown (KD)し、pulse-chase 実験により細胞内 RNA 分解に影響する helicase を探索した。影響の認められた helicase について、DUMP との関連性を詳細に解析した。

結果

Pulse-chase 実験の結果、RNA helicase 6 種類のうち 2 種類 (helicase A, helicase B と呼ぶ) の KD により、それぞれ細胞内分解が抑制された。リソソーム内分解の阻害剤クロロキンをを用いた結果、クロロキン存在下では helicase A の KD による分解抑制効果は観察されず、helicase B KD では観察された。このことから、helicase A, B はそれぞれリソソーム、リソソーム外における RNA 分解に関与することがわかった。さらに、SIDT2 KO 細胞では、helicase A の KD による分解抑制効果が観察されなかったことから、helicase A は DUMP における RNA 取り込みを仲介することが示唆された。SIDT2 KO 細胞では、helicase B の KD は RNA 分解を抑制し、クロロキンをを用いた実験結果と一致した。

考察

DUMP においてリソソーム膜上のポアを基質 RNA が通過する際、RNA helicase A が RNA の二次構造を解きほぐすことによって通過を容易にしている可能性がある。

結論

RNA helicase A は DUMP における RNA 取り込みを仲介すると考えられる。

遺伝性筋疾患における E3 ユビキチンリガーゼの機能と病態の解明

分担研究者 今村道博

所属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子とその産物であるジストロフィンが同定されて以来、様々な種類の筋疾患について原因遺伝子が明らかにされてきた。これと並行して既に自然発生により樹立されていた種々の筋疾患実験動物の原因遺伝子も明らかにされ、ヒト疾患を再現する動物モデルとして、病態の解明や診断及び治療研究に大きな役割を果たしている。しかしながら、その中であって筋ジストロフィーニワトリ (NH-413) についてはヒト筋疾患との関連が未だ明らかでない。そのため我々は、原因遺伝子として同定された *Wwp1* 遺伝子¹⁾ から発現する変異型 WWP1 E3 ユビキチンリガーゼがヒトの筋疾患と関連するのか、という問いを明らかにする目的で研究を行っている。マウス *Wwp1* 遺伝子に NH-413 ニワトリと同じ R441Q ミスセンス変異 (マウスでは R436Q) を導入したノックインマウスを作製すると、WWP1 タンパク質の分解や筋形質膜からの消失、また、骨格筋組織でのユビキチン化亢進など、NH-413 に認められる生化学的、免疫組織化学的特徴は再現されるが、筋線維の変性は認められなかった。マウス骨格筋では WWP1 に加え、これに酷似した 2 種類の HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ、WWP2 と ITCH、が発現しているため、本研究ではこれらが機能代償的に働く可能性を検討した。

方法

Wwp1 と *Wwp2*、*Itch* 遺伝子それぞれに変異を持つマウスを用いて筋肉の発生および再生、メンテナンスについて生化学的、組織学的

解析を行った。マウスモデルとしては *Wwp1* 遺伝子に NH-413 ニワトリに認められる R441Q ミスセンス変異を模倣し、436 番目のアルギニンがグルタミンに置換されるように遺伝子改変した R436Q ノックインマウス (WWP1-KI) を用いた。*Wwp2* 遺伝子ではエクソン 10 を、*Itch* 遺伝子ではエクソン 11 をゲノム編集し、WW ドメイン 2 をインフレームで欠失し、自己消化を生じるようにした遺伝子改変マウス (WWP2-del と ITCHI-del) を使用した。これらのマウスを単独、あるいは WWP1-KI マウスとの交配により二重変異体にして用い、組織学的および生化学的解析を行った。なお、本研究は国立精神・神経医療研究センターの実験動物倫理問題検討委員会による審査と承認を受けて行われた。

結果

WWP2-del と ITCH-del マウスの下肢骨格筋について調べたところ、どの筋肉においても顕著な組織学的異常は認められなかった。横隔膜や舌、そして心筋についても同様であった。WWP1 を特異的に認識する抗体を用いたイムノブロットでは、いずれのマウス骨格筋でも WWP1 の著しい発現上昇が認められた。一方、WWP2 と ITCH 分子にも一部交差反応する抗 pan-WWP1 抗体を用いて調べたところ、WWP1-KI の骨格筋では WWP1 以外の E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇が認められた。WWP1-KI と WWP2-del の 2 重変異体 (WWP1-KI/WWP2-del) においても、発現の上昇が示されたが、1 年齢を超えた個体では筋線維内に空胞様の構造が認められた。更に長期に飼育したマウスの筋組織を調べたところ、空胞はまず後脛骨筋に現れ、その後加齢に伴って周辺の筋肉へも広がって行くものと推察された。さらに、WWP1-KI /WWP2-del マウスで *Itch* 遺伝子を用いた ITCH-del ヘテロにした場合には、1 年齢未満のより若い月齢であっても空胞が出現してくる

のが確認された。

考察

NH-413 の胸筋では WWP1 が消失するにも関わらず全体のユビキチン化が亢進する。WWP1-KI においても同様の現象を再現するが、これは WWP1 の機能喪失が結果的に他の E3 ユビキチンリガーゼを活性化したものと推察される。また、今回、我々は WWP2-del と ITCH-del の両方の筋肉において WWP1 の発現上昇を認めている。また、抗 pan-WWP1 抗体を使ったイムノプロットでは WWP1-KI マウス骨格筋で WWP1 類似タンパク質の発現が認められた。これらの結果は WWP1 喪失時には WWP2 や ITCH などの HECT 型 E3 ファミリータンパク質の発現が上昇していることを示唆していた。ただし、この抗体で検出されたタンパク質は WWP1 とほぼ同じ大きさであったため、WWP2 や ITCH ではなく NEDD4 E3 である可能性も考えられた。筋組織では WWP1-KI/WWP2-del の二重変異マウスでは、筋線維内に空胞の出現を認めたが、さらにこのマウスの *Itch* 遺伝子の一方のアレル (対立遺伝子) を WW2 ドメインのインフレーム欠失とした場合にはより早期に空胞が認められるようになることから、これら 3 種類の HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼの機能的相互関係が筋変性に関係するのではないかと推察された。ただし、抗 pan-WWP1 抗体への反応性は上昇しているため、空胞出現との関係については更に詳細な解析が必要である。また、C57BL/6 系統の遺伝子背景を持つ雄マウスの筋肉では 1 年近辺から管状構造凝集 (tubular aggregate) と呼ばれる空胞が現れるため、それとの関連についても注意深く検討する必要がある。

結論

我々は *Wwp1* 遺伝子に NH-413 筋ジストロフィーニワトリと同じミスセンス変異を導入した WWP1-KI マウスの筋変性について、WWP1 の類似分子である WWP2 および ITCH

が及ぼす影響を検討した。マウス骨格筋では WWP1 と WWP2、そして ITCH の 3 分子が発現しており、そのうちどれか 1 つの機能が失われると、残りの分子の発現が上昇して相互に機能を補うよう働く可能性が示唆された。これらが筋組織変性へ及ぼす影響についてはより詳細な解析を行う必要がある。

参考文献

1. Matsumoto H, *et al.* The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 582:2212-2218, 2008
2. Hirata Y, *et al.* Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1-KLF15 axis. *JCI Insight*, 21:4(4),2019
3. Imamura M, *et al.* Characterization of WWP1 protein expression in skeletal muscle of muscular dystrophic chickens. *J Biochem*, 159:171-179, 2016

部位特異的な筋幹細胞に着目した骨格筋維持機構の解明

分担研究者：本橋 紀夫

所属：国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

<緒言>

骨格筋は肥大・萎縮の可塑性を有する。同時に筋衛星細胞と呼ばれる筋幹細胞が存在し、増殖・分化して新しい筋線維を形成する筋再生能を持つ。しかし加齢や筋疾患に伴い骨格筋は萎縮を惹き起こし、筋幹細胞の数は減少する¹。これらは運動機能の低下を誘発する要因となり、さらには重度傷害後の再生遅延が寝たきりを惹起する要因にもなり得る事から、筋機能あるいは筋幹細胞数の維持は必須であると考えられる^{2,3}。一方、加齢に伴う筋萎縮、或いは筋幹細胞数の減少は、筋線維タイプあるいは骨格筋部位毎に異なる可能性がある事から^{4,6}、それに付随する筋幹細胞の機能についても骨格筋部位や筋線維タイプ毎に異なる可能性が考えられる。これまで我々は筋線維タイプと筋幹細胞の関係性に着目し、遅筋・速筋線維由来の筋細胞を比較した結果、遅筋由来筋幹細胞は高い自己複製能を持つ事を見出してきた⁷。今年度は、プロテオミクス解析により同定したミトコンドリア複合体構成タンパク質の一つである *Ndufs8* が遅筋由来筋細胞において発現が高く、さらにその細胞特性を決定づける重要な因子である可能性を示した。

<方法>

各筋線維タイプの骨格筋組織(遅筋:前脛骨筋, 遅筋:ヒラメ筋)から由来する筋幹細胞を単離・培養した後、抽出したタンパク質を液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により解析した。得られたデータは Proteome Discoverer 2.4

software を用いて解析し、各細胞に特徴的に発現するタンパク質の定量を行なった。また KeyMolnet を用いてパスウェイ解析を行なった。

Ndufs8 遺伝子の過剰発現あるいは発現抑制については、筋細胞に対してレトロウイルス・レンチウイルスベクターを用いて行なった。その後 BrdU を用いた細胞増殖、筋管に分化した割合を示す筋分化能、及び MyHC(-)EdU(-)リザーブ細胞(*In vitro* で筋幹細胞に相当する)の産生能評価を行った。併せて、切断型カスパーゼ 3 抗体で染色し、アポトーシス細胞数も評価した。

筋細胞における NAD⁺および NADH は、NAD/NADH-Glo Assay kit を用い、またアセチル化 p53 タンパク質発現はウェスタンブロット法を用いて解析した。

<結果>

1. 遅筋および速筋線維由来筋細胞を用いてプロテオミクス解析を行なった結果、遅筋由来の培養筋芽細胞では、より多くのミトコンドリア関連タンパク質を同定する事ができた。特にミトコンドリア複合体 I の構成分子である *Ndufs8* 発現が高い事が明らかになったが、その発現は加齢と共に減少する事も認めた。
2. *Ndufs8* 過剰発現により、筋細胞の自己複製能とアポトーシス耐性が向上する事を認めた。同時にミトコンドリアの形態変化、および代謝機能が変化する事も認めた。一方 shRNA による *Ndufs8* 発現抑制は、それら機能を低下させた。
3. shRNA による *Ndufs8* 発現抑制により、細胞内 NAD/NADH 比は低下しており、その結果 NAD⁺依存性タンパク質脱アセチル化酵素である Sirtuin 活性⁸が低下している事が予想された。さらに Sirtuin の標的分子であるアセチル化 p53 タンパク質を解析した結果、*Ndufs8* 発現抑制に

よりその発現が増加していた。

4. *Ndufs8* を発現抑制した筋細胞に対して、NAD⁺ の前駆体である Nicotinamide mononucleotide (NMN)を添加した結果、細胞内 NAD/NADH 比が上昇する事が確認され、さらにアセチル化 p53 タンパク質量が低下していた。この時、*Ndufs8* が発現抑制された筋細胞は、自己複製能とアポトーシス耐性能において改善傾向を示した。

<考察および結論>

遅筋由来筋細胞において認められる高い自己複製能は、ミトコンドリア複合体 I 構成分子である *Ndufs8* の高発現による NAD⁺/NADH 比の上昇と、それに伴うアセチル化 p53 発現の低下に起因する可能性が示唆された。さらに NMN 添加による NAD⁺補充療法が、筋細胞の機能を改善する事からも、細胞内で産生される NAD⁺が筋細胞の機能維持に重要である事が予想された。一方で、ミトコンドリアを中心とした筋細胞の維持機構が、加齢や筋疾患で認められる筋細胞の機能低下にどのように関与しているかは未だ不明であり、今後さらなる研究が必要である。

<参考文献>

- 1) Shefer, G.; Van de Mark, D. P.; Richardson, J. B.; Yablonka-Reuveni, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*, 294 (1): 50-66.(2006)
- 2) M. M. Murphy, J. A. Lawson, S. J. Mathew, D. A. Hutcheson, G. Kardon, Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138, 3625-3637 (2011).
- 3) J. von Maltzahn, A. E. Jones, R. J. Parks, M. A.

Rudnicki, Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16474-16479 (2013).

4) Day K, Shefer G, Shearer A, Yablonka-Reuveni Z. The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Dev Biol*, 340(2): 330-343 (2010).

5) Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJ. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age (Dordr)* (2013).

6) Yoshioka, K.; Nagahisa, H.; Miura, F.; Araki, H.; Kamei, Y.; Kitajima, Y.; Seko, D.; Nogami, J.; Tsuchiya, Y.; Okazaki, N.; et al. Hoxa10 mediates positional memory to govern stem cell function in adult skeletal muscle. *Sci Adv*, 7 (24) (2021)

7) Motohashi N, Uezumi A, Asakura A, Ikemoto-Uezumi M, Mori S, Mizunoe Y, Takashima R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Shigemoto K: Tbx1 regulates inherited metabolic and myogenic abilities of progenitor cells derived from slow- and fast-type muscle. *Cell Death Differ*. 26(6):1024-1036 (2019)

8) Chen, D.; Bruno, J.; Easlon, E.; Lin, S. J.; Cheng, H. L.; Alt, F. W.; Guarente, L. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev*, 22 (13), 1753-1757 (2008)

The expansion of muscle repository and the development of diagnostic methods and therapies for muscular dystrophy related diseases utilizing the muscle repository

Ichizo Nishino, M.D., Ph.D.

Department of Neuromuscular Research,
National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry

Not only therapy is unavailable but even the cause is unknown for many of most muscle diseases including limb girdle muscular dystrophy. To overcome this situation, we should elucidate the mechanism and develop therapies for muscle disease by maximally utilizing our muscle repository. In this project, we aim: 1) to maintain and further improve the diagnostic network system for muscle disease and muscle repository; 2) to elucidate the cause and mechanism of muscle diseases; 3) to develop diagnostic markers; and 4) to develop therapies for muscle diseases. The number of muscle biopsy samples we receive has been steadily increasing in the last 10 years with more than 1000 samples per year in 2017-2021. As a result, the total number of frozen and cultured muscle samples has reached 22361 and 2153, respectively, by the end of 2021, which constitute the world-leading muscle repository. Using this muscle repository, we have made a number of achievements including: 1) the identification of 65 Japanese oculopharyngodistal myopathy (OPDM) with CGG expansion in LRP gene, in addition to 11 OPDM patients with CGG expansions in GIPC1 and 7 with CGG expansions in NOTCH2NLC2; 1) identification of 63 Japanese ADSSL1 myopathy patients from 59 families; 2) identification of 4 Japanese patients from 3 families with recessive myopathy due to homozygous c.1439A>G (p.Asn480Ser) variant in ACTN2 gene; 3) prospective comprehensive screening of frozen muscle biopsy sections for Pompe disease from July 2015 to January 2018, resulting in no patient identification; 4) characterization of pathological phenotype of dermatomyositis according to positive autoantibodies; and 5) identification of several new causative genes for muscle disease through international collaboration, including MLIP, JAG2 and HNRNPA2B1.