

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

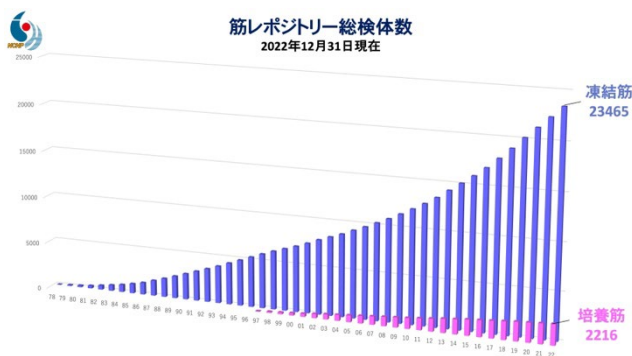
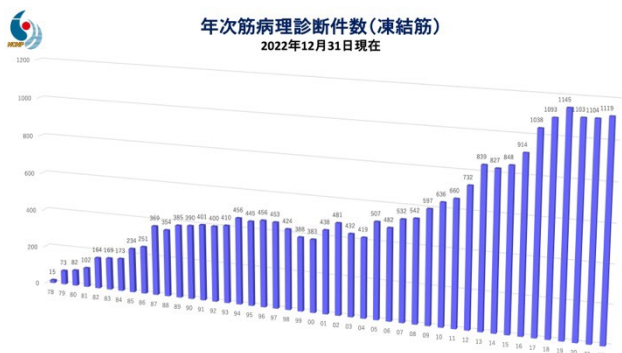
3.研究成果

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

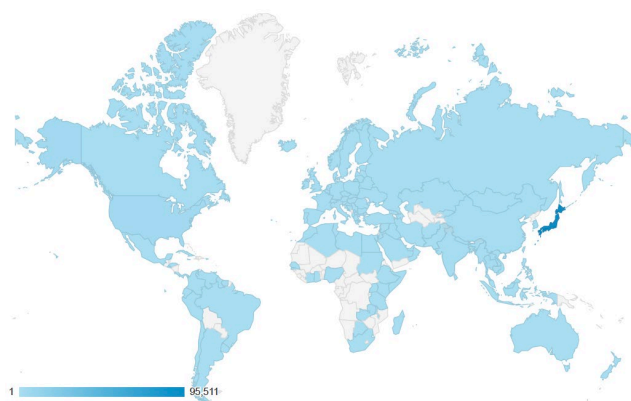
2022年(暦年)の総筋病理診断件数は、2020年より15件多い1119件であった。2020年は2019年と比較すると42件減少していたがこれは、コロナ禍により海外からの凍結筋運搬が困難になったためであったが、その後徐々に回復傾向にある。総検体数は、2022年末で23465検体となった。また培養筋も2216検体となり、世界最大規模の筋レポジトリが更に充実した。神経・筋疾患研究支援基盤として各種研究活用されることで、筋疾患学の発展に寄与した。



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131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、2023年3月31日現在)。昨年同時期は118カ国であり、新たに13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) DNAJB4 ミオパチー

世界で初めて、筋原線維性ミオパチー家系患者にDNAJB4遺伝子の顕性変異を見出した(Inoue M, et al. Acta Neuropathol. 2023 Feb;145(2):235-255)。この疾患はタイプ1線維に特徴的な細胞内封入体を示した。DNAJB4タンパク質は骨格筋のシャペロンタンパク質である。タンパク質の恒常性に寄与しているが、筋原線維が障害されていることから、遅筋におけるサルコメアの維持に必須であり、ここが障害されることが本疾患の病態メカニズムと考えられた。

b) 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てきた。本年度は、最近中国から報告された第 4 の原因遺伝子 *RILPL1* について本邦例を解析し、本邦では *RILPL1* 遺伝子リピート伸長例が見いだされないことを報告した (Eura N, et al. *Am J Hum Genet.* 2022 Nov 3;109(11):2088-2089)。また、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.* 2022 Apr 28;13(1):2306)。

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、未染のスライドグラス標本を 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) GNE ミオパチー

日本人 GNE myopathy 患者で 2 番目に頻度が高い GNE:c.620A>T (p.D207V)は、他のバリエーションとの複合ヘテロ接合体では発症するものの、ホモ接合体では非常に発症率が低い。ホモ接合体は日本人一般集団に 238 名いると推定されるものの、GNE ミオパチー患者では 3 名しか見つかっていない。さらには、

本バリエーションのホモ接合体にも関わらず、全く筋症状のない 78 歳男性も見つかった。そこで、本バリエーションの病原性を明らかにする目的で WGS・RNAseq・シアル酸解析・構造解析研究を行った。本バリエーションは catalytic site から離れており、オリゴマー形成不全に寄与するものの完全にオリゴマーが形成できなくなるわけでないことが構造学的に示唆され、ホモ接合体では低シアル化の程度が軽度であり、軽症型の phenotype を呈することと一致し、ホモ接合体では環境因子などでオリゴマー化の程度に影響があった際にみに低頻度で発症すると考えられた。また、本バリエーションを有する患者はオリゴマー形成を促進する化合物を見つければ治療薬になりうる可能性がある。

e) 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

これまでに我々は特に皮膚筋炎に注目した研究を進め、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明らかにしてきた (*Neurology.* 2022 Feb 15;98(7):e739-e749)。今年度は更に、抗合成酵素症候群の筋病理所見について解析し、抗合成酵素症候群においても陽性自己抗体ごとの特徴があることを同定し報告した (*Brain Pathol.* 2023 Mar 7:e13155. Online ahead of print)。

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 (Ogawara M, et al. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022 Apr;48(3):e12787)。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 (*Acta Neuropathol Commun.* 2022 Dec 7;10(1):176)。

4) 治療法開発

a) 悪性高熱症

村山班員らとともに、共同研究による悪性高熱の病態解明を進めた。体温調整は人間のホメオスタシス維持において重要であり、高熱は身体に重大なストレスをかける。悪性高熱は体温上昇をきたし、致死

的となる疾患である。今回、光学的局所熱パルス法により 1°C以内の精度で細胞の温度を調整し、悪性高熱の原因である重要なカルシウムチャネルであるリアノジン受容体1型(RyR1)の変異型が野生型に比べて熱に感受性があることを発見した。野生型のRYR1遺伝子やMHに関連したいくつかのRYR1変異体を過剰発現させた HEK293 細胞において、局所熱パルスは細胞内で Ca バーストを誘発した。小胞体標的蛍光プローブを用いた蛍光カルシウムイメージングから、Ca バーストは変異体の熱感受性による熱誘発性 Ca 放出(HICR)を起源としていることを明らかにした。さらに、悪性高熱の複雑さが4種の RyR1 変異体の熱感受性が異なることに起因していることを示した。HICR は悪性高熱モデルマウスの骨格筋においても同様に認められた。HICR が悪性高熱の患者の熱発生を加速させる付加的な positive feedback に関与しているものと考えられる (Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Aug 9;119(32):e2201286119)。

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治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) Tanboon J, Inoue M, Hirakawa S, Tachimori H, **Hayashi S**, Noguchi S, Okiyama N, Fujimoto M, Suzuki S, **Nishino I**: Muscle pathology of antisynthetase syndrome according to antibody subtypes. *Brain Pathol.* 2023 Mar 7:e13155.[Online ahead of print]
- 2) Miyashita K, Ii Y, Matsuyama H, Niwa A, Kawana Y, Shibata S, Minami N, **Nishino I**, Tomimoto H: Sporadic Myotonic Dystrophy Type 2 in a Japanese Patient: A Case Report. *Intern Med.* 2023 Feb 15. [Online ahead of print]
- 3) Ikeda K, Yamamoto D, Usui K, Takeuchi H, Oka N, Katoh N, Yazaki M, Kametani F, **Nishino I**, Hisahara S: A Case of Transthyretin Variant Amyloidosis with a TTR A97D (p.A117D) Mutation Manifesting Remarkable Asymmetric Neuropathy. *Intern Med.* 2022 Dec 21. [Online ahead of print]
- 4) Saito Y, Nakamura K, Fukuda T, Sugie H, **Hayashi S**, Noguchi S, **Nishino I**: Muscle biochemical and pathological diagnosis in Pompe disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2022 Apr 25:jnnp-2022-329085. [Online ahead of print]
- 5) Kainaga M, Sasaki T, Kitamura M, Nakayama T, Masuda K, Kakuta Y, **Nishino I**, Imafuku I: Inflammatory Myopathy Associated with Anti-mitochondrial Antibody-negative Primary Biliary Cholangitis Diagnosed by a Liver Biopsy: A Case Report. *Intern Med.* 62(5):797-802. Mar, 2023
- 6) Sasaki R, Yunoki T, Nakano Y, Fukui Y, Takemoto M, Morihara R, Katsuyama E, **Nishino I**, Yamashita T: A young female case of asymptomatic immune-mediated necrotizing myopathy: a potential diagnostic option of antibody testing for rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord.* 33(2):183-186. Feb, 2023
- 7) Matsui N, Takahara M, Yamazaki H, Takamatsu N, Osaki Y, Kaji R, **Nishino I**, Yamashita S, Izumi Y: Case of anti-NT5c1A antibody-seropositive inclusion body myositis associated with severe dysphagia and prominent forearm weakness. *Neurol Clin Neurosci.* 11(1): 46-48. Jan, 2023
- 8) Okubo M, Noguchi S, Awaya T, Hosokawa M, Tsukui N, Ogawa M, **Hayashi S**, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Takahashi Y, Fukuyama T, Funato M, Hosokawa Y, Kinoshita S, Matsumura T, Nakamura S, Oshiro A, Terashima H, Nagasawa T, Sato T, Shimada Y, Tokita Y, Hagiwara M, Ogata K, **Nishino I**: RNA-seq analysis, targeted long-read sequencing and in silico prediction to unravel pathogenic intronic events and complicated splicing abnormalities in dystrophinopathy. *Hum Genet.* 142(1):59-71. Jan, 2023
- 9) Yoshioka W, **Iida A**, Sonehara K, Yamamoto K, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kurashige T, Okubo M, Ogawa M, Matsuda F, Higasa K, **Hayashi S**,

- Nakamura H, Sekijima M, Okada Y, Noguchi S, **Nishino I**: Multidimensional analyses of the pathomechanism caused by the non-catalytic GNE variant, c.620A>T, in patients with GNE myopathy. *Sci Rep.* 12(1):21806. Dec, 2022
- 10) Ogasawara M, Eura N, **Iida A**, Theerawat K, Minami N, Nonaka I, **Hayashi S**, Noguchi S, **Nishino I**: Intracellular inclusions in muscle biopsy can differentiate oculopharyngodistal myopathy and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Acta Neuropathol Commun.* 10(1):176. Dec 2022
- 11) Sakai K, Hayashi K, Saito Y, Kanemoto M, **Nishino I**, Yamada M, Ono K: Late-onset centronuclear myopathy caused by a heterozygous variant of DNM2 (c.1852G>C, p.A618P). *Neurol Clin Neurosci.* 10(6):315-317. Nov, 2022
- 12) Hiramuki Y, Kure Y, Saito Y, Ogawa M, Ishikawa K, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Takahashi Y, Kim DS, Arai N, Mori C, Matsumura T, Hamano T, Nakamura K, Ikezoe K, **Hayashi S**, Goto Y, Noguchi S, **Nishino I**: Simultaneous measurement of the size and methylation of chromosome 4qA-D4Z4 repeats in facioscapulohumeral muscular dystrophy by long-read sequencing. *J Transl Med.* 20(1):517. Nov, 2022
- 13) Eura N, **Iida A**, Ogasawara M, **Hayashi S**, Noguchi S, **Nishino I**: RILPL1-related OPDM is absent in a Japanese cohort. *Am J Hum Genet.* 109(11):2088-2089. Nov, 2022
- 14) Saito Y, Baba S, Komaki H, **Nishino I**: A 7-year-old female with hypotonia and scoliosis. *Brain Pathol.* 32(6):e13076. Nov, 2022
- 15) Tsuboi Y, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Murayama T, Kurebayashi N, Tachibana T, Manome Y, Kikuchi E, Noguchi S, Inoue T, Inoue YU, **Nishino I**, Mori S, Ishida R, Kagechika H, Suzuki M, Fukuda N, Yamazawa T: Mice with R2509C-RYR1 mutation exhibit dysfunctional Ca²⁺ dynamics in primary skeletal myocytes. *J Gen Physiol.* 154(11):e202213136. Nov, 2022
- 16) **Ohsawa Y**, Ohtsubo H, Saito Y, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Murakami T, **Nishino I**, Sunada Y: Caveolin 3 suppresses phosphorylation-dependent activation of sarcolemmal nNOS. *Biochem Biophys Res Commun.* 628:84-90. Nov, 2022
- 17) Kakinuma Y, Amano R, Ishida A, **Nishino I**, Taki K: Muscle magnetic resonance imaging abnormality in neuroleptic malignant syndrome: a case report. *BMC Neurol.* 22(1):396. Oct, 2022
- 18) Saito Y, Takeshita E, Komaki H, **Nishino I**, Sasaki M: Determining neurodevelopmental manifestations in Duchenne muscular dystrophy using a battery of brief tests. *J Neurol Sci.* 440:120340. Sep, 2022
- 19) Sehara Y, Tsuchiya K, **Nishino I**, Sato H, Ando Y: Resection of Gastric Cancer Remitted Anti-signal Recognition Particle Myopathy. *Intern Med.* 61(16):2509-2515, Aug, 2022
- 20) 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.* 269(8):4129-4140. Aug, 2022
- 21) Nagamori T, Ishibazawa E, Yoshida Y, Izumi K, Sato M, Ichimura Y, Okiyama N, **Nishino I**, Azuma H: A Continuous Increase in CXC-Motif Chemokine Ligand 10 in a Case of Anti-Nuclear Matrix Protein-2-Positive Juvenile Dermatomyositis. *J Med Cases.* 13(6):290-296. Jun, 2022
- 22) Ito M, Shima S, Nagao R, 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.* 61(12):1897-1901. Jun, 2022
- 23) Hama Y, Mori-Yoshimura M, Aizawa K, Oya Y, Nakamura H, Inoue M, **Iida A**, Sato N, Nonaka I, **Nishino I**, Takahashi Y: Myoglobinopathy affecting facial and oropharyngeal muscles. *Neuromuscul Disord.* 32(6):516-520. Jun, 2022
- 24) 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).* 61(6):e143-e145. May, 2022
- 25) 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.* 32(5):436-440. May, 2022
- 26) Kim HJ, Mohassel P, Donkervoort S, Guo L, O'Donovan K, Coughlin M, Lornage X, Foulds N, Hammans SR, Foley AR, Fare CM, Ford AF, Ogasawara M, Sato A, **Iida A**, Munot P, Ambegaonkar G, Phadke R, O'Donovan DG, Buchert R, Grimmel M, Töpf A, Zaharieva IT, Brady L, Hu Y, Lloyd TE, Klein A, Steinlin M, Kuster A, Mercier S, Marcorelles P, Péréon Y, Fleurence E, Manzur A, Ennis S, Upstill-Goddard R, Bello L, Bertolin C, Pegoraro E, Salviati L, French CE, Shatillo A, Raymond FL, Haack TB, Quijano-Roy S, Böhm J, Nelson I, Stojkovic T, Evangelista T, Straub V, Romero NB, Laporte J, Muntoni F, **Nishino I**, Tarnopolsky MA, Shorter J, Bönnemann CG, Taylor JP: Heterozygous frameshift variants in HNRNPA2B1 cause early-onset oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Commun.* 13(1):2306. Apr, 2022
- 27) 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.* 61(8):1241-1245. Apr, 2022
- 28) Sano T, Kawazoe T, Shioya A, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Maruo K, **Nishino I**, Hoshino M, Murayama S, Saito Y: Unique Lewy pathology in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathology.* 42(2):104-116. Apr, 2022
- 29) Ogasawara M, Eura N, Nagaoka U, Sato T, Arahata H, Hayashi T, Okamoto T, Takahashi Y, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Nakamura A, Shimazaki R, Sano T, Kumutpongpanich T, Minami N, **Hayashi S**, Noguchi S, **Iida A**, Takao M, **Nishino I**: Intranuclear inclusions in skin biopsies are not limited to neuronal intranuclear inclusion disease but can also be seen in oculopharyngodistal myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 48(3):e12787. Apr, 2022
- 30) 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).* 61(6): e143-e145. May, 2022
- 31) 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
- 32) 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

- 33) Inoue M, Noguchi S, Inoue YU, **Iida A**, Ogawa M, Bengoechea R, Pittman SK, **Hayashi S**, Watanabe K, Hosoi Y, Sano T, Takao M, Oya Y, Takahashi Y, Miyajima H, Weihl CC, Inoue T, **Nishino I**: Distinctive chaperonopathy in skeletal muscle associated with the dominant variant in DNAJB4. *Acta Neuropathol.* 145(2):235-255. Feb, 2022
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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

- 46) 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 Antititin Antibodies. *Intern Med.* 60(16):2671-2675. Aug, 2021
- 47) 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
- 48) 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
- 49) Matsuzono K, Kumutpongpanich 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
- 50) 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
- 51) 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
- 52) 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
- 53) 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
- 54) 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
- 55) 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
- 56) 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
- 57) Taira K, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Sajima K, Takizawa H, Shinmi J, Oya Y, Nito T, **Nishino I**, Takahashi Y: More prominent fibrosis of the cricopharyngeal muscle in inclusion body myositis. *J Neurol Sci.* 422:117327. Mar, 2021.
- 58) Taira K, Yamamoto T, Mori-Yoshimura M, Sajima K, Takizawa H, Shinmi J, Oya Y, **Nishino**

- I, Takahashi Y:** Cricopharyngeal bar on videofluoroscopy: high specificity for inclusion body myositis. *J Neurol.* 268(3):1016-1024. Mar, 2021.
- 59) Ono E, Ishii A, Higashi Y, Koita N, Ayaki T, Tanigaki K, Takayanagi S, Kondo N, Sakai K, Endo S, Yokoi H, Matsubara T, Minamiguchi S, **Nishino I**, Takahashi R, Yanagita M: Monoclonal gammopathy of renal significance (MGRS)-related AL amyloidosis complicated by amyloid myopathy: a case report. *BMC Nephrol.* 22(1):74. Feb, 2021.
- 60) Tanboon J, Inoue M, Hirakawa S, Tachimori H, **Hayashi S**, Noguchi S, Suzuki S, Okiyama N, Fujimoto M, **Nishino I**: Pathological features of anti-Mi-2 dermatomyositis. *Neurology.* 96(3):e448-e459. Jan, 2021.
- 61) Fukazawa R, Cho M, Hidaka Y, Takezawa H, Ogasawara M, **Nishino I**, Fujii A: A case of sporadic late-onset nemaline myopathy without monoclonal gammopathy of unknown significance/human immunodeficiency virus successfully treated with intravenous gamma globulin. *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* Online. Dec, 2020.
- 62) Matsukawa T, Eguchi K, **Nishino I**, Okada K, Oshimi K, Miyagishima T: Light-chain amyloid myopathy isolated to skeletal muscles: A case report. *Clin Case Rep.* 8(12):2869-2873. eCollection. Dec, 2020.
- 63) Ohara M, Saito Y, Watanabe M, Mizutani S, Kobayashi M, **Iida A**, **Nishino I**, Fujigasaki H: An adult nemaline myopathy patient with respiratory and heart failure harboring a novel *NEB* variant. *eNeurologicalSci.* 2020 Aug 26;21:100268. eCollection. Dec, 2020.
- 64) Ikeda T, Takeuchi H, Takahashi K, Nakamura H, Kunii M, Katsumoto A, Tada M, Higashiyama Y, Hibiya T, Suzuki S, **Nishino I**, Koyano S, Doi H, Tanaka F: Tonsillectomy Improved Therapeutic Response in Anti-SRP Myopathy With Chronic Tonsillitis. *Front Immunol.* 11:595480. eCollection 2020. Nov, 2020.
- 65) Ogasawara M, **Iida A**, Kumutpongpanich T, Ozaki A, Oya Y, Konishi H, Nakamura A, Abe R, Takai H, Hanajima R, Doi H, Tanaka F, Nakamura H, Nonaka I, Wang Z, **Hayashi S**, Noguchi S, **Nishino I**: CGG expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations. *Acta Neuropathol Commun.* 8(1):204. Nov, 2020.
- 66) Fuseya Y, Sakurai T, Miyahara JI, Sato K, Kaji S, Saito Y, Takahashi M, **Nishino I**, Fukuda T, Sugie H, Yamashita H: A Case of Adult-onset Repeat Rhabdomyolysis with a Very Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Due to Compound Heterozygous ACADVL Mutations. *Intern Med.* 59(21):2729-2732. Nov, 2020.
- 67) Sugihara H, Teramoto N, Nakamura K, Shiga T, Shirakawa T, Matsuo M, Ogasawara M, **Nishino I**, Matsuwaki T, Nishihara M, Yamanouchi K: Cellular senescence-mediated exacerbation of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep.* 10(1):16385. Oct, 2020.
- 68) Matsukawa T, Eguchi K, **Nishino I**, Okada K, Oshimi K, Miyagishima T: Light-chain amyloid myopathy isolated to skeletal muscles: A case report. *Clin Case Rep.* 2020;00:1–5. Online. Sep, 2020.
- 69) Mori-Yoshimura M, Oya Y, Komaki H, Segawa K, Minami N, Saito Y, **Nishino I**, Takahashi Y: Respiratory Dysfunction in Becker Muscular Dystrophy Patients: A Case Series and Autopsy Report. *J Neuromuscul Dis.* 2020;7(4):425-431. Sep, 2020.
- 70) Saito Y, Nishikawa A, **Iida A**, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Ishiyama A, Komaki H, Nakamura S, Fujikawa S, Kanda T, Yamadera M, Sakiyama H, **Hayashi S**, Nonaka I, Noguchi S, **Nishino I**: ADSSL1 Myopathy Is the Most Common Nemaline Myopathy in Japan With Variable

- Clinical Features. *Neurology*. 95(11):e1500-e1511. Sep, 2020.
- 71) Yoshioka W, Miyasaka N, Okubo R, Shimizu R, Takahashi Y, Oda Y, **Nishino I**, Nakamura H, Mori-Yoshimura M: Pregnancy in GNE myopathy patients: a nationwide repository survey in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 15(1):245. Sep, 2020.
- 72) Indrawati LA, **Iida A**, Tanaka Y, Honma Y, Mizoguchi K, Yamaguchi T, Ikawa M, **Hayashi S**, Noguchi S, **Nishino I**: Two Japanese LGMDR25 patients with a biallelic recurrent nonsense variant of BVES. *Neuromuscul Disord*. 30(8):674-679. Aug, 2020.
- 73) Oyama M, Ohnuki Y, Inoue M, Uruha A, Yamashita S, Yutani S, Tanboon J, Nakahara J, Suzuki S, Shiina T, **Nishino I**, Suzuki S: HLA-DRB1 allele and autoantibody profiles in Japanese patients with inclusion body myositis. *PLoS One*. 15(8):e0237890. eCollection 2020. Aug, 2020.
- 74) Samukawa M, Nakamura N, Hirano M, Morikawa M, Sakata H, **Nishino I**, Izumi R, Suzuki N, Kuroda H, Shiga K, Saigoh K, Aoki M, Kusunoki S: Neutral Lipid Storage Disease Associated With the PNPLA2 Gene: Case Report and Literature Review. *Eur Neurol*. 83(3):317-322. Aug, 2020.
- 75) Sasaki R, Ohta Y, Tadokoro K, Matsumoto N, Nomura E, Omote Y, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Kumutponpanich T, **Nishino I**, Abe K: TTN missense variants in two siblings with asymmetric facial and limb weakness. *J Neurol Sci*. 415:116885. Aug, 2020.
- 76) Cotta A, Carvalho E, da-Cunha-Junior AL, Navarro MM, Menezes MM, Paim JF, Valicek J, Lima MI, Velloso-Filho R, Freire-Lyra MH, Takata RI, Inoue M, Okubo M, **Iida A**, **Nishino I**: Clinical, imaging, morphologic, and molecular features of X-linked *VMA21*-related myopathy in two unrelated Brazilian families. *J Neurol Sci*. 415:116977. Aug, 2020.
- 77) Moulay G, Lainé J, Lemaître M, Nakamori M, **Nishino I**, Caillol G, Mamchaoui K, Julien L, Dingli F, Loew D, Bitoun M, Leterrier C, Furling D, Vassilopoulos S: Alternative Splicing of Clathrin Heavy Chain Contributes to the Switch From Coated Pits to Plaques. *J Cell Biol*. 219(9):e201912061. Jul, 2020.
- 78) Inoue M, Tanboon J, Hirakawa S, Komaki H, Fukushima T, Awano H, Tajima T, Yamazaki K, Hayashi R, Mori T, Shibuya K, Yamanoi T, Yoshimura H, Ogawa T, Katayama A, Sugai F, Nakayama Y, Yamaguchi S, **Hayashi S**, Noguchi S, Tachimori H, Okiyama N, Fujimoto M, **Nishino I**: Association of Dermatomyositis Sine Dermatitis With Anti-Nuclear Matrix Protein 2 Autoantibodies. *JAMA Neurol*. 77(7):872-877. Jul, 2020.
- 79) Yokota Y, Hara M, Akimoto T, Mizoguchi T, Goto YI, **Nishino I**, Kamei S, Nakajima H: Late-onset MELAS syndrome with mtDNA 14453G→A mutation masquerading as an acute encephalitis: a case report. *BMC Neurol*. 20(1):247. Jun, 2020.
- 80) Deng J, Yu J, Li P, Luan X, Cao L, Zhao J, Yu M, Zhang W, Lv H, Xie Z, Meng L, Zheng Y, Zhao Y, Gang Q, Wang Q, Liu J, Zhu M, Guo X, Su Y, Liang Y, Liang F, Hayashi T, Maeda MH, Sato T, Ura S, Oya Y, Ogasawara M, **Iida A**, **Nishino I**, Zhou C, Yan C, Yuan Y, Hong D, Wang Z: Expansion of GGC Repeat in GIPC1 Is Associated with Oculopharyngodistal Myopathy. *Am J Hum Genet*. 106(6):793-804. Jun, 2020.
- 81) Hamanaka K, Šikrová D, Mitsuhashi S, Masuda H, Sekiguchi Y, Sugiyama A, Shibuya K, Lemmers RJLF, Goossens R, Ogawa M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Kuwabara S, Balog J, **Nishino I**, van der Maarel SM: Homozygous nonsense variant in *LRIF1* associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 9;94(23):e2441-e2447. Jun, 2020.

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他、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も機能している。筋鞘膜には、そのアイソフォームであるカベオリン-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 が著明に増加し、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シグナル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 分子であるマイオスタチンの I 型膜受容体を抑制し筋萎縮を抑制する、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・解析によってカベオリン-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 を取得・ペプチドによる disease modifying therapy の基盤を確立する。③ LGMD1C 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・解析した。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：全身投与によって、ジストロフィー変化が改善するか否かについて解析した。③nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構の解析：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。④長寿蛋白質 α -Klotho と TGF- β シグナルの相関について解析した。

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は軽減した(未発表)。②マイオスタチン阻害ペプチド医薬の DMD モデルマウスへの投与解析：本研究開始時のプロトタイプであるマイオスタチンプロドメイン阻害活性中心 (IC) ペプチド (Ohsawa, PLoS One 10, e0133713, 2015, 特許出願 PCT/JP2014/052345) と比較して、1,000 倍の阻害活性を示し、かつより高い血中安定性 (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 mg/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 DMD に対する非臨床 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進めている (未発表)。

③nNOS 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。骨格筋のノザンブロット解析によりトランスジーン発現を確認し、骨格筋解析を開始した (未発表)。

④ α -Klotho/TGF- β シグナル相関解析: 血中に存在する分泌型 α -Klotho は、年齢依存性に減少する。この分泌型 α -Klotho が、マイオスタチンや関連する筋萎縮性 TGF- β シグナルを阻害することを証明した。さらに、マイオスタチンの I 型膜受容体阻害化合物の経口投与により、 α -Klotho 欠損マウスと超高齢野生型マウスの骨格筋 TGF- β シグナルを抑制しサルコペニアを改善することを明らかとした。また遅筋から速筋への筋線維スイッチを惹起し、筋力が改善、 α -Klotho 欠損マウスの寿命を延長することを示した。

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未だに開発されていない (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。本研究でカベオリン-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想定され、その裏付けとなる分子機構を探っている。

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) の条件を設定できた。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し、2023 年度の PMDA RS 対面助言に申し込んだ。

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、骨格筋解析を開始した。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。

本研究によって、長寿蛋白質 α -Klotho が筋萎縮性 TGF- β シグナルを抑制すること、その減少による TGF- β 依存性のサルコペニアの分子機構が明らかとなった。最近、筋ジストロフィーにおいても、老化分子機構が、その病態進展に関与していることが報告され、興味深い。

本研究では、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および nNOS を介した、筋ジストロフィー病態解明を目標とする。病態の解明から、その介入治療を実用化したい。

結論

本研究は、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 年度には、モデルマウス解析を進め、将来のペプチド上市に向けた非臨床パッケージ策定を達成し、PMDA RS 対

面助言を申し込んだ。

参考文献

1. **Ohsawa Y**, Ohtsubo H, Munekane A, Ohkubo K, Murakami T, Fujino M, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Nishimura H, Kaneko R, Suzuki T, Tatsumi R, Mizunoya W, Hinohara A, Fukunaga M, Sunada Y. Circulating α -Klotho Counteracts Transforming Growth Factor- β -Induced Sarcopenia. *Am J Pathol.* 193(5):591-607, May, 2023
2. **Ohsawa Y**, Ohtsubo H, Saito Y, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Murakami T, Nishino I, Sunada Y. Caveolin 3 suppresses phosphorylation-dependent activation of sarcolemmal nNOS. *Biochem Biophys Res Commun.* 628:84-90, Nov, 2022
3. 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.* 61(8):1241-1245, Apr, 2022
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
5. **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

6. 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

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 神経内科学

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)、川原玄理 8)、林 由起子 8)

所属

- 1) 東北大学 神経内科学
- 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および直接塩基配列決定法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、2020年に発表している(Ono H, et al., Mol Ther 2020)。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おり、新たな結合蛋白質としてあるキナーゼを同定している。レーザー膜損傷実験で dysferlin との共局在を見出しており、今後生化学的実験等で膜修復のメカニズムの解明を進める。また

dysferlin 結合蛋白の解析についても特に日本人に多い p.W999C 変異に着目し、AMPK 以外の分子の解析、さらには dysferlin の蛋白質安定化機構に関する解析も進めてきている。

臨床遺伝学的解析については、2020 年の臨床遺伝学的解析をまとめた論文を発表 (Izumi R, et al., Hum Mutat 2020) して以後、2022 年度も順調に症例の収集を継続しており、2022 年 11 月時点で 229 家系に 92 種以上の変異を見出している。

考察

AMPK 複合体をはじめとした新規結合蛋白について、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。今後も筋細胞膜修復機構に関わる dysferlin 結合蛋白複合体の全容を明らかにするとともに、dysferlin 蛋白自体の安定化・分子制御機構も明らかにすることで膜修復機能に基づく治療開発を検討していく。

参考文献

1. Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Katsuno M, Takahashi MP, Yamashita S, Oya Y, Hashizume A, Yamada S, Nakamori M, Izumi R, Kato M, Warita H, Tateyama M, Kuroda H, Asada R, Yamaguchi T,

Nishino I, **Aoki M**: Phase II/III Study of Aceneuramic Acid Administration for GNE Myopathy in Japan. J Neuromuscular Dis. 2023 (in press)

2. Takahashi T, Li Y, Chen W, Nyasha MR, Ogawa K, Suzuki K, Koide M, Hagiwara Y, Itoi E, Aizawa T, Tsuchiya M, Suzuki N, **Aoki M**, Kanzaki M. RSPO3 is a novel contraction-inducible factor identified in an "in vitro exercise model" using primary human myotubes. Sci Rep. 12(1):14291, 2022.
3. Ishigakii K, Ikeda R, Suzuki J, Hirano-Kawamoto A, Ohta J, Kato K, Izumi R, Suzuki N, **Aoki M**, Kawase T, Katori Y: Patulous Eustachian Tube Patients with Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. Otol Neurotol. 43(4):e442-e445, 2022.
4. Izumi R, Takahashi T, Suzuki N, Niihori T, Ono H, Nakamura N, Katada S, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki Y, **Aoki M**: The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. Hum Mutat. 41(9):1540-1554, 2020.
5. Ono H, Suzuki N, Kanno SI, Kawahara G, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S, Nakamura N, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Nagatomi R, Araki N, Yasui A, Warita H, Hayashi YK, Miyake K, **Aoki M**: AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy. Mol Ther. 28(4):1133-1153, 2020.

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

(福山型先天性筋ジストロフィーに対するアンチセンス核酸治療薬 NS-035 の医師主導治験)

分担研究者

戸田 達史 1)

研究協力者

藤野悟央 1)、北村明日香 1)、高橋朗子 1)、前田明子 1)、久保田暁 1)、徳山友希乃 2)、和田育江 2)、小林千浩 3)、小牧宏文 4)、池田真理子 5)、石垣景子 6)

所属

- 1) 東京大学大学院 医学系研究科 神経内科学
- 2) 東京大学医学部附属病院 臨床研究推進センター
- 3) 神戸大学大学院 医学研究科 分子脳科学
- 4) 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター
- 5) 藤田医科大学病院 臨床遺伝科
- 6) 東京女子医科大学医学部 小児科

緒言

福山型筋ジストロフィー (Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: FCMD) は、骨格筋、脳、眼が主に障害され、筋力低下や関節拘縮が進行し 20 歳代で死亡する、常染色体潜性 (劣性) 遺伝性の先天性筋疾患である。1960 年に本邦で初めて報告され⁽¹⁾、その後、我々は疾患責任遺伝子としてフクチン遺伝子を同定し⁽²⁾、フクチンが α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾酵素として機能することを明らかにした⁽³⁾。また、フクチン遺伝子の 3' 非翻訳領域に SVA 型レトロトランスポゾンの挿入変異が生じることにより、異常なスプライシング (エクソン・トラッピング) をきたし、不完全なフクチンが産生されることが、本疾患の病態であることを明らかにした⁽⁴⁾。FCMD は、小児期筋ジストロフィーでは Duchenne 型に次いで二番目に患者数が多く、予後不良な疾患であるにもかかわらず、治療法が無い点が問題であり、有効な治療法の確立が喫緊の課題となっている。

我々は、患者のフクチン遺伝子から転写される pre-mRNA に作用することで、FCMD でみられる異常スプライシングを是正して正常なフクチン蛋白質を発現させる、3 種類のアンチセンス核酸の混合カクテルを発見し、FCMD モデルマウスや患者由来細胞で有効であることを報告した⁽⁴⁾。さらに、日本新薬株式会社との共同研究により、有効性を示す 1

種類のアンチセンス核酸 NS-035 を発見した。FCMD に対する新規治療薬として NS-035 の薬事承認を目指し、GLP 基準に基づいた非臨床試験を進め、FCMD 患者を対象とした NS-035 の医師主導治験 (第 I 相試験) を実施する計画に至った。

方法

日本新薬株式会社との共同研究による非臨床試験において、NS-035 の有効性を検討するため、FCMD モデルマウス及び患者由来細胞に NS-035 を投与し、RT-PCR 法にてエクソン・トラッピング阻害による異常スプライシングの正常化、ウエスタンブロッティング法にて正常型フクチン蛋白質の発現、 α -DG の糖鎖回復、ラミニンの α -DG への結合増加の有無を確認した。また、治験 (第 I 相試験) の開始に必要な、他の非臨床試験 (薬理試験、毒性試験、薬物動態試験など) を実施した。

治験の開始に向けて、治験実施体制の構築や、治験実施計画書・手順書などの各種書類の作成を行った。また、非臨床試験の適切性や治験実施計画書の妥当性について、医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency: PMDA) の事前面談・対面助言で協議し、治験の準備を進めた。研究倫理審査委員会 (Institutional Review Board: IRB) での審査、PMDA への治験実施届の提出、臨床研究等提出・公開システム (Japan Registry of Clinical Trials: jRCT) への登録を経て、治験を開始した。

本治験は第 I 相試験であり、主要評価項目は安全性に関連した評価項目 (有害事象及び副作用、理学的検査、バイタルサイン、臨床検査、心電図、超音波検査など) とし、副次評価項目は有効性及び薬物動態に関連した項目 (α -DG の糖鎖修飾率、糖鎖修飾 α -DG の発現、エクソン・トラッピング阻害効率、改定版 GMFM、血漿中 NS-035 濃度、尿中 NS-035 濃度など) とした。治験のデザインは、多施設共同 (東京大学医学部附属病院と東京女子医科大学病院)、非盲検、非対照、用量漸増試験 (NS-035 をコホート 1 からコホート 4 まで漸増し、各々 1.6 mg/kg、6.0 mg/kg、20 mg/kg 及び 40 mg/kg を投与、NS-035 と同時に投与する D-マンニトールはいずれのコホートにおいても 500 mg/kg に固定) とした。対象は、5 歳以上 10 歳以下の、補助なしで座位保持可能な患者 (上田分類 2 以上) の FCMD 患者とした。

結果

NS-035 の有効性を検討する非臨床試験 (薬理試験) では、FCMD モデルマウス及び患者由来細胞へ

の NS-035 の投与により、異常スプライシングの正常化、正常型フクチン蛋白質の発現回復、 α -DG の糖鎖修飾とラミニン結合能の回復がみられ、NS-035 の有効性が確認された。他の非臨床試験の結果も含め、非臨床試験の適切性や治験実施計画書案の妥当性を PMDA に確認し、2021 年 7 月に IRB での承認を得た。同年 8 月より、FCMD 患者を対象としたアンチセンス核酸 NS-035 の多施設共同第 I 相臨床試験を医師主導治験として開始した。現在、治験は順調に進んでおり、治験の完遂後に解析結果の公表が可能となる予定である。

考察

これまでの先行研究において、我々は FCMD の病態を分子レベルで解明し、病態機序に基づき、アンチセンス核酸（3 種類のアンチセンス核酸の混合カクテル）が FCMD モデルマウスや患者由来細胞において有効性を示すことを報告してきた。本研究では、日本新薬株式会社との共同研究により、強力な効果を持つ高活性配列の 1 本のアンチセンス核酸 NS-035 を発見し、FCMD モデルマウス及び患者由来細胞で有効性を示すことを確認した。医薬品開発を進める上で、3 種類のアンチセンス核酸の混合カクテルでは複数の非臨床試験や多額の開発費を要することが問題であったが、NS-035 の発見により、FCMD 治療薬として NS-035 の開発を進めることに成功した。そして、薬事承認を目指し、非臨床試験（GLP 試験）を実施し、FCMD 患者を対象とした NS-035 の多施設共同第 I 相臨床試験を医師主導治験として開始した。本治験は、非臨床試験を実施したアンチセンス核酸（NS-035）をヒトで初めて投与する First-in-human（FIH）試験であり、治験参加者の安全に細心の注意を払いながら進める必要がある。現在、治験は順調に進んでおり、2023 年度（令和 5 年度）内に完遂する予定である。

本研究が完遂した後は、第 2 相以降の治験を継続し、NS-035 の薬事承認を目指す。将来的に FCMD 治療薬として NS-035 の承認が得られれば、現時点で治療法が無い FCMD に対し、有効な治療薬を提供することが可能となり、患者、家族、社会に大きく貢献できるものと期待される。

結論

FCMD 患者のフクチン遺伝子から転写される pre-mRNA に作用することで異常スプライシングを是正し、正常なフクチン蛋白質を発現することが可能な 1 本のアンチセンス核酸 NS-035 を発見した。薬事承認を目指し、非臨床試験（GLP 試験）を実施

し、FCMD 患者を対象とした NS-035 の多施設共同第 I 相臨床試験を医師主導治験として開始した。現在、治験は順調に進んでいる。

参考文献

- (1) Fukuyama *et al. Brain Dev.* **3**, 1–29 (1981)
- (2) Kobayashi *et al. Nature.* **394**, 388–392 (1998)
- (3) Kanagawa *et al. Cell Report.* **14**, 2209–2223 (2016)
- (4) Taniguchi-Ikeda *et al. Nature.* **478**, 127–131 (2011)

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 中田智彦^{1,2)}、水野誠司³⁾、井本逸勢⁴⁾、Xin-Ming Shen⁵⁾、Andrew G. Engel⁵⁾

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学；²⁾名古屋大学大学院医学系研究科・小児科学；³⁾愛知県医療療育総合センター中央病院；⁴⁾愛知県がんセンター研究所；⁵⁾Department of Neurology, Mayo Clinic

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、35種類の遺伝子における原因遺伝子変異が同定されてきおり14の病型に分類が可能である。

胎児型AChRのみに含まれる γ サブユニット遺伝子(*CHRNA3*)の機能喪失遺伝子バリエーションは先天性多発性関節拘縮症(arthrogryposis multiplex congenita)と翼状片(ptyerygium)を特徴とし、非進行性で良性の経過の経過を辿るEscobar症候群(Escobar variant of multiple pterygium syndrome, EVMPS)と致死的多発性翼

状片症候群(lethal form of multiple pterygium syndrome, LMPS)を惹き起こす⁸⁻¹⁰⁾。AChR γ サブユニットは出生後にAChR ϵ サブユニットに置換されるため出生後は筋力低下・筋無力症状を認めず、Escobar症候群も致死的多発性翼状片症候群もCMSとは臨床病型が異なるがCMSの亜型に分類される⁹⁾。いずれも胎生期の無動が多発性関節拘縮症と翼状片の原因と考えられる。

手指関節拘縮のみで翼状片を認めない不全型Escobar症候群が存在し^{10, 11)}、軽度的手指関節拘縮の小児の中に未診断の本症が存在すると思われる。先天性多発性関節拘縮症は220以上の原因遺伝子が知られているが*CHRNA3*の病的バリエーションが最も多く17家系中6家系に認められる¹¹⁾。スペインの遺伝子解析で病的バリエーションが同定できた64名のCMS患者のうち5名が*CHRNA3*バリエーションによるEscobar症候群であったと報告されている¹²⁾。Escobar症候群は72家系101名の報告がされているが病的 γ サブユニットバリエーションの機能解析はされていない。本研究において3例の本邦Escobar症候群患者で同定された γ P121Tバリエーションの機能解析を行った。

方法

HEK293細胞に胎児型正常(wt.)-AChRと3名のEscobar症候群でheterozygousに同定された病的バリエーションを有する γ P121T-AChRを発現させ、細胞表面のAChR発現量定量、単一イオンチャンネル記録、AChRチャンネル動態解析を行った。

結果

3名のEscobar症候群はいずれも中等度的手指関節拘縮を認めたが翼状片を認めなかった。患者は*CHRNA3*遺伝子に2つの病的バリエーションをヘテロで有しており、 γ P121Tが共通で認められた。もう一方のバリエーションはtruncation variantsでありナルバリエーションであった。

HEK293細胞表面発現を調べたところ γ P121T-AChRはwt-AChRの80%の発現が認められた。

単一イオンチャンネル記録ではバースト持続時間が γ P121T-AChRはwt-AChRの28%まで短縮していた。AChRイオンチャンネル動態解析では γ P121T-AChRはwt-AChRに比べてア

セチルコリンの解離定数は 2.0 倍増大していただけであるがイオンチャンネルゲート定数は 44 倍減弱していた。つまり、アセチルコリンは γ P121T-AChR に結合できるもののイオンチャンネルの開口が障害されることが明らかになった。AChR チャンネル開口のアセチルコリン濃度依存性のシミュレーションにより γ P121T は AChR 開口確率を顕著に減少させることが明らかになり、単一イオンチャンネル記録の結果と AChR イオンチャンネル動態解析から予測される結果がほぼ一致していた。

考察

AChR チャンネル開口確率は AChR イオンチャンネル動態解析と単一イオンチャンネル記録が一致しており AChR イオンチャンネル動態解析が正しく行われたと想定した。

γ P121T はアセチルコリンが AChR に結合する部位に存在する。他の AChR サブユニットの病的ミスセンスバリエーションによる fast channel syndrome においても、アセチルコリン結合部位のミスセンスバリエーションがアセチルコリン解離定数ではなくイオンチャンネルゲート定数に大きな影響を与えており、 γ P121T はアセチルコリンの結合をチャンネルゲートに伝える機構の構造変化を起こすことが想定される。アセチルコリン解離定数に影響を与えるミスセンスバリエーションとは胎生致死となり患者として認識されない可能性が示唆される。

結論

Escobar 症候群において同定したミスセンスバリエーションの病態生理学機構を初めて明らかにした¹³。fast channel syndrome は 3,4-diaminopyridine, cholinesterase inhibitor, albuterol が有効であり、治療胎児型重症筋無力症と同様に出生前治療が可能となることが期待される。

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. Ohno K, Ohkawara B, Shen XM, et al.: Clinical and Pathologic Features of Congenital Myasthenic Syndromes Caused by 35 Genes-A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 24:3730, 2023
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. Morgan NV, Bructon LA, Cox P, et al.: Mutations in the embryonal subunit of the acetylcholine receptor (CHRNA) cause lethal and Escobar variants of multiple pterygium syndrome. Am J Hum Genet. 79:390-395, 2006
9. Hoffmann K, Muller JS, Stricker S, et al.: Escobar syndrome is a prenatal myasthenia caused by disruption of the acetylcholine receptor fetal gamma subunit. Am J Hum Genet. 79:303-312, 2006
10. Seo J, Choi IH, Lee JS, et al.: Rare cases of congenital arthrogryposis multiplex caused by novel recurrent CHRNA mutations. J Hum Genet. 60:213-215, 2015
11. Bayram Y, Karaca E, Coban Akdemir Z, et al.: Molecular etiology of arthrogryposis in multiple families of mostly Turkish origin. J Clin Invest. 126:762-778, 2016
12. Natera-de Benito D, Topf A, Vilchez JJ, et al.: Molecular characterization of congenital myasthenic syndromes in Spain. Neuromuscul Disord. 27:1087-1098, 2017
13. Shen XM, Nakata T, Mizuno S, et al.: Impaired gating of gamma- and epsilon-AChR respectively causes Escobar syndrome and fast-channel myasthenia. Ann Clin Transl Neurol. 2023

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3種の EDMD モデルマウスにおける心筋障害の比較を行ったので報告する。

方法

エメリン欠損マウス(Emd)、*Lmna* 変異導入マウス(H222P)、およびそれらの重複変異マウス(EH)の心機能の経時的变化を心臓超音波検査、および病理学的、分子生物学的解析により比較した。

結果

いずれのモデルマウスも 12 週齢では心障害は認められなかったが、18 週、30 週では H222P、EH マウスともに心エコー上での機能低下、心筋の線維化が経時的に増悪し、線維化や心筋障害に関連する遺伝子やシグナル伝達関連分子の発現に異常が認められた。興味深いことに、いずれの心筋障害の指標においても、H222P と EH で差異は認められなかった。Emd は 30 週齢まで野生型と差がなかった。

考察

EH マウスは H222P マウスと比較し顕著な骨格筋障害を早期から示すのに対し、心筋障害

の程度には両者に差が認められなかったことから、同じ横紋筋であっても、心筋ではエメリンの欠損が H222P マウスの心筋障害を重篤化しないことが明らかとなった。

結論

同じ横紋筋であっても、骨格筋と心筋では、エメリン欠損の影響が異なることが明らかとなった。今後、エメリンの組織間機能の差異を検討していく必要がある。

参考文献

なし

メカノトランスダクション機構解明による筋疾患治療方法開発

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。3年の研究期間を通じて、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し、運動と筋について検証を進めた。

特に今年度は、筋量だけではなく筋質維持機構についても検討することを目的に、PGC-1 α isoform を介した筋恒常性維持機構について検証した。

方法

14-16 週の野生型マウスに尾部懸垂ないしトレッドミル運動を施行し、運動免荷/負荷後の骨格筋（大腿四頭筋）内 PGC1- α 遺伝子発現量について解析した。

筋採取は、尾部懸垂施行 2 週間後、トレッドミル運動単回施行直後、単回施行 3 時間後、2 週間施行 1.5 日後に行った。

PGC-1 α 遺伝子発現量に関しては、近位プロモーター由来の PGC1- α -a と NT-PGC1- α -a を認識するプライマーセット①、代替プロモーターエクソン 1b 由来の PGC-1 α -b、PGC-1 α 2、NT-PGC-aa-b を認識するプライマーセット②、代替プロモーターエクソン 1b' 由来の PGC-1 α -c、PGC-1 α 3、NT-PGC-1 α -c を認識するプライマーセット③、特に機能が異なるといわれている N 末端が残された NT-PGC-1 α -a, b, c を認識するプライマーセット④を用いて、qPCR を行った。

また、我々の研究室では、基底膜-ジストロフィン-糖タンパク質複合体に関わるパールカン分子がメカノトランスダクション調整を行っている可能性を報告してきていることから、パールカンコンディショナルノックアウトマウス（軟骨のみパールカンを発現したマウス）においても同様の解析を行った。

結果

運動免荷群に関しては、尾部懸垂 2 週間後のみの評価となったこともあり、野生型、パールカンコンディショナルノックアウトマウスともに、いずれの PGC-1 α isoform も発現量変化はなかった。一方、運動負荷群に関しては、近位プロモーター由来の PGC1- α isoform の発現量変化は得られなかったが、代替プロモーター由来の PGC1- α isoform に関しては単回運動後の発現量上昇を認め、特にパールカン欠損骨格筋で更なる発現量上昇を得た。また、NT-PGC-1 α (NT-PGC-1 α -a, b, c) に関しては、野生型マウスでは明らかな発現量変化はみられなかったが、パールカン欠損骨格筋では単回運動 3 時間後に発現量上昇がみられた。

考察

運動強度条件の適正化は今後検討する必要があるが、本運動刺激による PGC-1 α 発現量の変化は代替プロモーター由来の isoform が主であった。パールカン欠損骨格筋では近位

プロモーター由来の isoform を除いたほぼすべての *PGC-1 α* isoform の発現量亢進が確認され、パールカン欠損による運動増強を反映しているものと推察された。特に、パールカン欠損筋で NT-*PGC-1 α* の発現量上昇が優位であったことから、パールカンが IGF-1、myostatin シグナルに関与するとされる NT-*PGC-1 α -b* を含む NT-*PGC-1 α* -IGF1-MSTN 経路に関与している可能性が示唆された。

結論

細胞外マトリックス分子を介した骨格筋維持機構について検討した。これら *in vivo* 運動モデルから探索される筋量および筋質の維持に関わるターゲット分子と、これまでの研究班で報告した脱細胞シートを用いた疾患筋によるメカニカルストレスセットポイント評価ツールを合わせることで、筋疾患におけるメカノトランスダクション機構の解明を目指す。

参考文献

- 1 Nakada S, Yamashita Y, Akiba S, Shima T, **Arikawa-Hirasawa E**: Myocyte Culture with Decellularized Skeletal Muscle Sheet with Observable Interaction with the Extracellular Matrix. *Bioengineering (Basel)*. 2022 Jul 12;9(7):309.
- 2 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
- 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. doi10.1038/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 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.
- 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 **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

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 医科学研究センター
難病治療学

研究協力者 常陸圭介 1), 中谷直史 2), 上田洋司 1), 永岡唯宏 1), 西野一三 3)

所属

1) 藤田医科大学医科学研究センター難病治療学

2) 星城大学リハビリテーション学部

3) 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、MyoD などの HLH 型の筋特異的転写制御因子やサイトカイン・マイオカインの秩序だった発現調節により形成される。旺盛な再生能力を有している。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、非活発な生活、老化、慢性炎症や悪液質で萎縮し、運動負荷で肥大する。運動や薬剤負荷により生じた筋肥大の記憶・痕跡を筋衛星細胞が記憶する機構の存在も注目されている。超高齢社会を迎えた本邦では、サルコペニア・フレイルの増加とその対策が大きな社会問題となっている。本研究班での研究では、骨格筋分化と筋萎縮機構に着目した解析を遂行した。ミオシン重鎖は骨格筋の収縮に必要なタンパク質複合体であり筋形成にも重要な役割を示す 1)。アクチンとの相互作用しスライディングにより円滑な筋収縮と弛緩に参与している。速筋型、遅筋型などサブタイプが知られている。速筋型としては、type IIx, IIa, IIb を構成する *Myh1,2,4* にコードされた

3 種類の速筋型ミオシン重鎖(MyHC)が存在する。*Myh1,4* にフレームシフト変異を導入することで、MyHC-IIx と IIb を同時に欠損したダブルノックアウトマウスを作製し、詳細な解析を行った。ミオスタチン阻害で上昇するタンパク質メチル化酵素を見出し、速筋型ミオシンを標的とすることを見出した。二分脊椎は、神経管が閉鎖不全をおこす疾患で脊髄神経とともに骨格筋機能にも影響を与える。平面内細胞極性の要となる Vangl2 は N-カドヘリンは相互作用を示す。両分子の二重ヘテロ体が高頻度で尾部解放型の二分脊椎を呈することがわかり詳細に解析を行なった。

方法

CRISPR/Cas9 法を用いて、一種類のガイド RNA でミオシンの *Myh 1,4* 遺伝子に同時にフレームシフト変異を導入した二重変異モデル(dKO)を作成した。骨格筋の変化、筋の繊維化を組織学的に解析した。筋力、血清マーカーの変動を精査した。ミオシン重鎖のサブタイプの発現を免疫染色で調べた。骨格変化をマイクロ CT を用いて解析した。筋衛星細胞や FAP 細胞の数的な変化を調べた。質量分析装置を用いて網羅的なタンパク質の変動を調査した。

新たな神経管閉鎖不全による二分脊椎モデルに関しては、平面内細胞極性に中心的役割を果たしている Vangl2 に着目し、N-カドヘリンとの相互作用を解析した。両分子の二重ヘテロ変異体を解析し発症する二分脊椎を形態変化、局在変化により調べた。初代培養神経細胞を用いて代培養神経細胞を用いて関与するシグナル系の解析を行った。

結果

Myh1,4 遺伝子の二重変異体は、生後 3 週になるとサルコペニア構造の崩壊を伴う重度の筋萎縮

を示し、生後4週目までに死亡した。脊椎の彎曲は示さなかった。体重、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋は萎縮し、筋力も低下が見られた。マッソントリクローム染色陽性の筋肉内繊維化が見られた。申請者らが2010年にNature Cell Biol 2)で報告した繊維化の源となる間葉系前駆細胞(FAP)細胞は数的な増加が見られた。筋萎縮系のシグナルであるミオスタチン・アクチビンの下流分子であるSmadのリン酸化は増加していた。MuRF-1, Atrogin-1のユビキチンシグナルも増加していた。代償性と思われるが、mTOR/Akt系シグナルに上昇が見られた。MyhIIa陽性繊維は増加していたが、筋萎縮を回復させるほどの上昇ではなかった。胎児型ミオシン繊維が観察された。サルコメア構造に乱れが生じていた3)。

平面内細胞極性の中心分子であるVangl2とその相互作用接着因子であるN-カドヘリンのホモノックアウトマウスは胎生致死である。二重ヘテロ変異体を解析したところ、高頻度に尾部の神経管閉鎖障害を起こすことが観察された。下流で作用するシグナルとしてはRhoAやJNKシグナルは変化がなかった4)。

考察

Myh1,4遺伝子の二重変異体は高度な筋萎縮を示し、筋萎縮の良好なモデルとなることが解析された。Myh1単独の遺伝子破壊では筋萎縮は20%程度であり、Myh4単独では筋量の低下はおほとんど見られないが、二重変異体では60%の筋萎縮を示した。血清解析ではクレアチンキナーゼには変化がなかったが、低グルコースと高コレステロール値が観察され、栄養障害が示唆された。筋繊維化が見られ、FAP細胞数の増加、TGF- β の発現上昇が確認された。Pax7陽性の筋衛星細胞数は増加していた。興味ある骨格系モデルと考えている。

結論

ミオシン重鎖の二重変異体を作製し、高度な筋萎縮モデルとなることが示された。Myh7の変異は筋疾患や心筋障害をきたすことが知られている。Myh1の変異による筋疾患は報告がないが、Myh4が代償している可能性がある。がんによる悪液質に起因する筋萎縮でもミオシンの低下や分解が関与している。新たな筋萎縮モデルとして有用であると考えている。速筋型ミオシン重鎖に関しては、ミオスタチン阻害による筋肥大でメチル化修飾されることを示し、現在解析を進捗させている。二分脊椎は神経管閉鎖不全により生じる。二次的に骨格筋にも影響が及び歩行にも影響する。小児の難病であるが今回、新たなモデルを作成することができた。平面内細胞極性解析で頻用される内耳の上皮の配列異常も同時に示された。

参考文献

1. Agarwal M, Sharma A, Kumar P, Kumar A, Bharadwaj A, Saini M, Kardon G, Mathew SJ: Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development. Development 147(7):dev184507, Apr, 2020.
2. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. Nature Cell Biol.12(2):143-152, Feb, 2010.
3. Hitachi K, Kiyofuji Y, Yamaguchi H, Nakatani M, Inui M, Tsuchida K: Simultaneous loss of skeletal muscle myosin heavy chain Iix and Iib causes severe skeletal muscle hypoplasia in postnatal mice. FASEB J. 37(1):e22692, Jan, 2023.
4. Nagaoka T, Katuno T, Fujimura K, Tsuchida K, Kishi M: Functional interaction between Vangl2 and N-cadherin regulates planar cell polarization of the developing neural tube and cochlear sensory epithelium. Sci. Rep. 13(1), 3905, March, 2023.

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) や合成誘導体 TCP-112 が良好な活性を示すことを見出した^{1,2}。

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た。そこで TCP-107 の β -アミノ酸構造に着目し、炭素鎖の回転を立体的に制限するため左翼にシクロプロパン構造を導入した。その結果、シクロプロパンを導入した誘導体 4 種のうち *down-cis* 配座を有する TCP-304 において、強力なリードスルー活性を示すアミノグリコシド系抗生物質 G418 と比較し、同等の活性値を示した³。本研究では、TCP-304 をリード化合物とし、脂溶性の向上とプロドラッグ機能の付与を目的とした新たな誘導体の創製に着手した。具体的には、エステル化により化合物の脂溶性を向上させることで細胞内移行性を改善し、エステラーゼ代謝により細胞内で TCP-304 が再生され、リードスルーを発揮できるプロドラッグの創製を目指した。

方法、結果、考察

誘導体 TCP-304 のカルボキシ基に対し、4 種の異なるエステル構造 (メチルエステル、ベンジルエステル、オルト-ブロモベンジルエステル、およびメタ-クロロベンジルエステル) を導入したプロドラッグ TCP-307~310 をそれぞれ設計

し、それらの機能評価を実施した。

まずは、プロドラッグの脂溶性を調べるため、ClogP 値を算出した。その結果、プロドラッグ 4 種の ClogP 値は -1.36~1.22 と、リード化合物 TCP-304 の 3.64 と比較し、高値であることから脂溶性の向上が図れたと考えられる。

次に、プロドラッグのリードスルー活性を、 β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼの間に PTC として TGA 配列を挿入したデュアルレポータープラスミドを用いて評価を行った。尚、当該 PTC の前後配列は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスに由来する。本プラスミドをトランスフェクションした COS-7 細胞に、合成プロドラッグ (200 μ M) を処理し、リードスルー活性を評価した。その結果、プロドラッグ 4 種の活性は、4.93~6.80 であり、TCP-304 の活性 8.94 よりも低いことがわかった。ClogP 値とリードスルー活性値から、単に化合物の脂溶性を増加させただけではリードスルー活性の向上は見られないことが明らかとなった。

そこで、プロドラッグのエステル部位の分解がリードスルー活性発現に寄与しているかを調べるため、エステラーゼを用いたエステル加水分解実験を実施した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にプロドラッグ TCP-307~310 をそれぞれ溶解した後、ブタ肝臓エステラーゼを添加し 37°C にてインキュベートした。時間経過における代謝物を HPLC にて分析し、プロドラッグの半減期 ($t_{1/2}$) を算出することにより、エステラーゼによる加水分解の反応性を確認した。その結果、いずれのプロドラッグにおいても加水分解により親化合物 TCP-304 の再生が確認された。また、プロドラッグの $t_{1/2}$ は約 7~24 時間であった。効率的にリードスルー活性を発揮するには、より短時間で親化合物を再生できるプロドラッグの創製が重要と考えられる。

結論

本研究では、*down-cis* 配座を有するシクロプロパンを有する TCP-304 をリード化合物とし、脂溶性を付与したプロドラッグの創製を行なった。今後、より効率的にリードスルー活性を発揮できるプロドラッグを見出すことで、ナン

センス変異に起因する DMD におけるリードスルー薬創製に貢献できると期待される。

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*-deoxynegamycin 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

骨格筋線維は絶え間ない物理的刺激によりたえず負荷を受けている。骨格筋線維の恒常性維持のため、内在的な保護機構が存在する。骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）は、筋芽細胞の生成および融合により、筋管と呼ばれる長大な多核細胞の形成を経て、筋線維の新生がもたらされる。また筋線維膜の損傷は小胞融合を介して修復されるが、膜修復の破綻は筋疾患発症をもたらすことが知られている。これらの機構に共通する現象である細胞膜の構造維持機構のうち「脂質の局在変化、膜融合後の脂質再配置がいかに膜構造・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、未だその分子機構および意義は明らかではない。本年度はこれまでの知見のもと（文献1）、脂質分子動態により制御され、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) 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。

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 の機能解明を試みてきた。PIEZO1 の全身性欠損は胎生致死をもたらすことから、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、以下の実験を行った。①タンパク質レベルでの PIEZO1 の発現、局在を検討するため、内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato が融合した形で発現する *Piezo1*-tdTomato マウスを用いたところ、PIEZO1 は幹細胞の分裂過程にて分裂溝に強く集積すること、PIEZO1 は未分化の幹細胞にて特に強く発現し、分化進行とともにその発現が減少することをそれぞれ見出した。②PIEZO1 下流経路の同定のため、単離筋衛星細胞にて RNA-seq 解析を行ったところ、*Piezo1* 欠損マウスでは、細胞骨格 (アクトミオシン) の形成に関わる因子群の著しい減少が認められた。これらの結果より PIEZO1 の下流にて低分子量 G タンパク質 RhoA 経路が作用すると仮定した。実際、*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（文献3にて報告）。

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。また TRPM7 は mTOR 経路の活性化に関わることを見出した。

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、物理的な力を感じ取る機構として、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。本研究にて明らかにしたとおり、PIEZO1 の局在は幹細胞の分化・増殖状態で著しく変化したことから、幹細胞に掛かる物理的な力を感じ取っ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

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にて RhoA 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 が機械刺激を感じ取るメカニズムは、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、一方で筋線維にわずかに発現する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との相関を明らかにしていきたい。さらに細胞膜脂質の動態についても、脂質ラベル化法などを用いて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. 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. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca^{2+} fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. *Sci Signal.* 2019 Apr 9;12(576):eaaw4847.
3. Hirano K, Tsuchiya M, Shiomi A, Takabayashi S, Suzuki M, Ishikawa Y, Kawano Y, Takabayashi Y, Nishikawa K, Nagao K, Umemoto E, Kitajima Y, Ono Y, Nonomura K, Shintaku H, Mori Y, Umeda M, Hara Y. The mechanosensitive ion channel PIEZO1 promotes satellite cell function in muscle regeneration. *Life Sci Alliance.* 6(2):e202201783 (2022).

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。RyR1 は T 管膜のジヒドロピリジン受容体 (Cav1.1) と相互作用して、膜の脱分極により活性化する (脱分極誘発性 Ca^{2+} 遊離、DICR)。DICR は RyR1、Cav1.1 に加えて $\beta 1a$ 、Stac3、Junctophilin が形成した複合体で起こる。最近の研究から、構成因子の遺伝子変異が種々のミオパチーの原因になることが分かってきた。しかし、それらの疾患に対する治療法は未だ確立していない。申請者は最近、非筋細胞に DICR 構成因子を導入することで DICR を効率よく再現する系の開発に成功した。本研究では、DICR 再現系を利用して薬物スクリーニングプラットフォームを構築し、DICR 活性化薬のスクリーニングを行った。

方法

RyR1 と小胞体内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) インジケータの R-CEPIA1er を安定発現した HEK293 細胞に DICR 構成因子 (Cav1.1、 $\beta 1a$ 、Stac3、JP2) 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導入した。DICR 活性は細胞に高カリウム (K^+) 溶液で脱分極刺激を行ない、蛍光プレートリーダーで $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ を測定した。機能既知化合物ライブラリは東京医科歯科大学から供与していただいた。

結果

DICR 活性は K^+ 濃度依存性を示し、 EC_{50} 値は 10-15 mM K^+ であった。DICR 活性化薬を探索するため、15 mM K^+ により DICR を部分的に起こしておき、化合物を添加して $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ の変化を測定した。既知の DICR 促進薬である過塩素酸は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ を低下させ、DICR 阻害薬の Cpd1 は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ を上昇させた。化合物ライブラリの約 1,500 化合物のスクリーニングを行った結果、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ を有意に低下させる候補化合物が数十個得られた。このうち、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) を促進するものを除き、数個のヒット化合物を得ることに成功した。

考察

今回得られた化合物は DICR 促進薬として、ミオパチーの治療薬開発の元になる可能性がある。今後、骨格筋細胞やモデル動物を使用して、有用性についての検討を行なっていく。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。

結論

今回開発したスクリーニング系は 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. **Murayama T**, Kurebayashi N, Numaga-Tomita T, Kobayashi T, Okazaki S, Yamashiro K, Nakada T, Mori S, Ishida R, Kagechika H, Yamada M, Sakurai T. A reconstituted depolarization-induced Ca^{2+} release platform for validation of skeletal muscle disease mutations and drug discovery. *J Gen Physiol*, 154: e202213230, 2022
2. **Murayama T**, Kurebayashi N, Ishida R, Kagechika H. Drug development for the treatment of RyR1-related skeletal muscle diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 69: 102356, 2023

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 東海大学工学部生物工学科

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症が早く、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4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、ノックダウンにより正常型ラミンAの発現量を抑制した時の表現型と、変異型ラミンAの発現が筋線維に与える影響について解析した。

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)の受精卵に対し、内在性ラミンAをノックダウンするアンチセンスモルフォリノをインジェクションし、外来性の野生型ラミンAおよび外来性の変異型ラミンAのみを発現するモデルを作製し、核の形態をEGFP蛍光によって観察した。また、ファロイジン染色によって骨格筋アクチンを染色し、上記のノックダウンモデルにおける筋変性の有無について調べた。また、RNA-seqにより2倍以上の発現量増加が見られたGADD45ab, GADD45ba, MAPK12bを中心に、DNA損傷経路、細胞老化経

路、細胞死・炎症経路に関するマーカー遺伝子の発現を定量PCRで調べた。

結果

内在性ラミンAをノックダウンしたモデルでは、変異型EGFP-ラミンAを発現するゼブラフィッシュで核から複数の突起が生じる形態異常が見られ、これを protrusion と呼ぶこととした。核の protrusion は内在性ラミンAをノックダウンした変異型EGFP-ラミンAゼブラフィッシュでのみ見られ、さらに運動によって約40%の核が protrusion を示すようになった。また、核と核が糸状の構造で繋がった”nuclear bridge”と呼ぶ形態異常も内在性ラミンAのノックダウンによって変異型EGFP-ラミンAゼブラフィッシュで約15%の核で見られるようになった。こうした核の形態異常に関連して、ノックダウンモデルでは骨格筋アクチンの変性も顕著に見られた。遺伝子発現解析では、DNA損傷応答に関わるGADD45ファミリーおよびMAPK12bが変異型EGFP-ラミンAゼブラフィッシュで約2倍の発現増加を示した。慢性的なDNA損傷応答は細胞老化を引き起こすことが知られているが、細胞老化マーカーであるp21, p16の発現も変異型EGFP-ラミンAゼブラフィッシュで約2倍の発現増加を示した。また、細胞死に関わるカスパーゼ6の発現が約1.5倍に増加し、炎症に関わるSOCS1aの発現が約3倍に増加していた。DNA損傷と細胞老化については、免疫染色によってもそれぞれのマーカーである γ H2AX, p16陽性の形態異常核が多く確認された。

考察

内在性のラミンAをノックダウンすることにより、外来性の変異型EGFP-ラミンAを発現するゼブラフィッシュでラミンAミオパチー様の

表現型が亢進したことから、核膜に局在する正常型ラミンAの量が核の形態と骨格筋の健全性を保つために重要であることが示唆された。このことから、ラミンAミオパチーは常染色体優性遺伝形式で遺伝するものの、その発症機序は正常ラミンAの量が減少することによるハプロ不全の可能性が考えられる。実際、ラミンミオパチーの患者でQ6Xなどのtruncation変異をヘテロで持つ患者が見つかっており、ハプロ不全での発症が推測される。核膜が脆弱になり、核膜の破綻が生じると、核内のゲノムDNAにも損傷が及ぶことが予想され、本研究結果からは、タンパク質およびRNAの両方のレベルでDNA損傷マーカーの増加が示唆された。また細胞老化マーカーの増加も認められ、細胞老化現象がラミンAミオパチーに見られる繊維化や筋炎様の症状に関与する可能性も推測された。これらの点に関して、さらなる研究が必要と考えられた。

結論

ラミンAミオパチー患者に見出された変異はラミンAの機能を損ない、核膜の脆弱化を引き起こすことが明らかになった。核膜の完全性の損失によりDNA損傷応答や細胞老化経路の活性化が起こることがわかった。これらのことから、我々のゼブラフィッシュモデルがラミンAミオパチーの病態解明に有用であることが示唆された。

参考文献

なし

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 とともに異常に伸長したリピーターをもつ 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 阻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。一方、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治療薬シーズの開発も進める。

方法

DM1 において病態の中核となる、異常伸長 CUG リピーターを持つ 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異常 RNA を発現させることが可能な 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、ウエスタンブロット法により細胞周期を制御する蛋白や細胞老化関連分泌形質 (SASP) 蛋白の発現を評価した。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。

また異常 RNA の毒性を軽減する分子として、CUG リピーター RNA に結合するペンタトリコリピーターペプチド (PPR) を合成し、DM1 細胞モデルで FISH により異常 RNA 凝集抑制効果を、RT-PCR によりスプライシング異常改善効果を検証した。さらに DM1 マウスモデルへ AAV 搭載型 CUG リピーター結合性 PPR を投与し、real time PCR 法やウエスタンブロット法により全身での PPR 発現を定量したほか、骨格筋でのスプライシング異常改善効果や異常 RNA 凝集抑制効果、筋強直症状改善効果を検証した。

結果

われわれが構築した DM1 モデル細胞において、異常 RNA の発現によりテロメア長非依存的な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。また遺伝子発現解析の結果から、ミトコンドリア関連遺伝子、p16, p21, p51 などの細胞周期制御因子、IGFBP3 や PAI-I など SASP の発現亢進が同定され、蛋白レベルでもこれら変化が裏付けられた。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や、Mito-SOX assay によりミトコンドリア機能の障害が確認された。

また、CUG RNA 結合性 PPR は、DM1 細胞モデルで異常 RNA 凝集を抑制し、ATP2A1 スプライシング異常の改善効果を示した。AAV

搭載型 PPR のマウス尾静脈投与により、DM の治療標的臓器である骨格筋、心筋、脳などで良好な PPR 蛋白発現も確認された。PPR 投与により、マウス骨格筋でも異常 RNA の凝集抑制効果とスプライシング異常改善効果が確認された。さらに、モデルマウスの臨床症状として、PPR 投与後に筋強直症状の改善も実証できた。

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、DN 障害および DNA ダメージ応答反応を介して細胞周期制御因子や SASP 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、CUG RNA 結合性 PPR により、異常 RNA によるスプライシング制御因子凝集を防ぎ、異常 RNA の毒性を低減できることが、*in vitro*, *in vivo* で証明された。

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。また異常 RNA の毒性を低減する新たな治療薬モダリティとして、CUG RNA 結合性 PPR の有効性が示された。

参考文献

1. Hasuike Y, Mochizuki H, **Nakamori M**. Expanded CUG Repeat RNA Induces Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Model Cells. *Front Genet.* 13:865811.2022

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)
生化学分野

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。先天性ミオパチーの一つである中心核ミオパチー (Centronuclear Myopathy; CNM) は、T 管や 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。先行研究で、膜リモデリング分子である BIN1 (Amphiphysin 2) と Dynamin 2 をコードする *BIN1*、*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より CNM が発症するメカニズムは不明であった。

方法

本研究では、CNM 変異型 BIN1 と Dynamin 2 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 発症機序をマルチスケールでの解明を目指した。

結果

分担研究者は現在までに、(1) BIN1 と Dynamin 2 の膜リモデリング機能を定量的に解析することができる *in vitro* および *in cellulo* の T 管様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 Dynamin 2 が膜リモデリング機能異常を示すこと、(3) Dynamin 2 の膜切断機能に必要な GTP アーゼ活性が、CNM 変異型 Dynamin 2 では恒常的に亢進し、T 管様構造が過度に切断されるこ

とを明らかにした。これらの研究成果は、主任研究者と共著で、原著論文 2 報に発表した (Fujise et al., *Journal of Biological Chemistry* 2021; Fujise et al., *Human Mutation* 2021)。また、関連する総説 1 報 (Fujise et al., *IJMS* 2022) と著書 1 報 (竹田、*医学のあゆみ* 2022) を今年度発表した。さらにモデル生物である線虫を用い、(4) 線虫ダイナミン変異体の表現型がヒト Dynamin 2 によってレスキューされること、(5) CNM 変異型 Dynamin 2 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 (投稿中)。

考察

今後は、CNM 変異型 BIN1 や Dynamin 2 によって膜リモデリング異常が誘導されるメカニズムを、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で明らかにする。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、その表現型解析により、CNM の発症機序を個体レベルで解明する。さらに変異型 Dynamin 2 を発現する CNM モデルマウスを複製し、*in vivo* での CNM 発症機序について解析を進めていく。

結論

本研究で用いたマルチスケールの解析アプローチは、CNM 発症機序を分子・細胞・個体レベルでの解明、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. **Tetsuya Takeda**, Hiroshi Yamada, Kohji Takei (2022) Dynamin: molecular scissors for membrane fission. In “*Plasma Membrane*

Shaping: Molecular Mechanisms, Theories, and Research Methods” ed. S. Suetsugu. 77-90.

2. 竹田 哲也 (2022) 「中心核ミオパチーとミオチューブラーミオパチーの発症機序：T管形成における膜ダイナミクス制御異常からの視点」 *遺伝性神経・筋疾患診療と研究の最前線, 医学のあゆみ* **283**(10): 1000-1005.
3. Kenshiro Fujise, Satoru Noguchi, *Tetsuya Tetsuya Takeda (2022) Centronuclear myopathy caused by defective membrane remodelling of dynamin 2 and BIN1 variants. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(11): 6274-6287.

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。本研究では、NCNP 筋レポジトリーで管理される疾患検体を用いて統合的ゲノム解析を行ない、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 から病因性バリエーションを検索する。眼咽頭遠位型ミオパチーのゲノム解析については、サザンブロット法、repeat primed PCR 法、フラグメント解析法などで解析をする。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。疾患遺伝子の確認が取れ次第、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 では遺伝性筋疾患症例を対象に

2014 年から筋病理診断に加え、オリジナル筋疾患遺伝子パネルと次世代シーケンサーを組み合わせた方法（パネル解析）で遺伝子診断を行なってきた。フォローアップシーケンシングとして 300 例を解析した。診断結果は適時、臨床現場に還元している。

2. 眼咽頭遠位型ミオパチー (OPDM)のゲノム解析

我々は、これまで OPDM の原因遺伝子として *GIPCI* と *NOTCH2NLC* を報告してきた。そして、最近、OPDM の第四の原因遺伝子として *RILPL1* が中国の研究者より報告された。そこで、日本人 OPDM に於ける *RILPL1* のリピート伸張について解析した。既知の OPDM 原因遺伝子に変異をもつ症例を除外して 159 例について解析した。結果、全ての症例で *RILPL1* のリピート伸張は認めなかった。中国の症例でも現在、僅か 13 家系のみ報告であり、創始者効果が考えられた。

3. 眼咽頭筋ジストロフィー (OPMD)のゲノム解析

小児期発症型 OPMD について、国際共同研究からヘテロ核リボ核タンパク質をコードする遺伝子 *HNRNPA2B1* を原因遺伝子として報告した。病因性バリエーションは、c.1001_1002dupGT p.(Y335Vfs*25)で、同遺伝子産物の核移行シグナルドメイン内に見出した。

4. 筋原線維性ミオパチーのゲノム解析

顕性（優性）遺伝形式を呈する遠位型ミオパチーの一家系のエクソームシーケンシングから分子シャペロンをコードする遺伝子 *DNAJB4* にヘテロ接合性のミスセンスバリエーション c.270T>A (p.Phe90Leu) を発見した。*Dnajb4F90L* ノックイン、ノックアウトマウスを作製し、筋力低下と患者の筋病理像を再現した。

考察

主な成果は、神経研究所、国内外の研究機関の研究者らとともに遺伝性筋疾患の新規原因遺伝子を発見したことである。臨床像との関連性、機能解析、モデル動物を用いた病態解析の結果を共有することで筋疾患研究分野に貢献した。

結論

NCNP 筋レポジトリーで管理される検体を用いて新規の原因遺伝子、病理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. Inoue M, Noguchi S, Inoue YU, **Iida A**, Ogawa M, Bengoechea R, Pittman SK, Hayashi S, Watanabe K, Hosoi Y, Sano T, Takao M, Oya Y, Takahashi Y, Miyajima H, Wehl CC, Inoue T, Nishino I: Distinctive chaperonopathy in skeletal muscle associated with the dominant variant in DNAJB4. *Acta Neuropathologica*. 145(2):235-255, Feb, 2023.
2. Ogasawara M, Eura N, **Iida A**, Kumutponpanich T, Minami N, Nonaka I, Hayashi S, Noguchi S, Nishino I: Intranuclear inclusions in muscle biopsy can differentiate oculopharyngodistal myopathy and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica Communication*. 10(1):176, Dec, 2022.
3. Eura N, **Iida A**, Ogasawara M, Hayashi S, Noguchi S and Nishino I: RILPL1-related OPDM is absent in a Japanese cohort, *American Journal of Human Genetics*. 109(11):2088-2089, Nov. 2022.
4. Ogasawara M, Saitoh S, Nishimori Y, Hayashi S, **Iida A**, Noguchi S, Nishino I: Malignant hyperthermia and cylindrical spirals in a 4-year-old boy. *Neuromuscular Disorders*. 32(10):845-846, Oct, 2022.
5. Hama Y, Mori-Yoshimura M, Aizawa K, Oya Y, Nakamura H, Inoue M, **Iida A**, Sato N, Nonaka I, **Nishino I**: Takahashi Y. Myoglobinopathy affecting facial and oropharyngeal muscles. *Neuromuscular Disorders*. 32(6):516-520, Jun, 2022.
6. Kim HJ, Mohassel P, Donkervoort S, Guo L, O'Donovan K, Coughlin M, Lornage X, Foulds N, Hammans SR, Foley AR, Fare CM, Ford AF, Ogasawara M, Sato A, **Iida A**, Munot P, Ambegaonkar G, Phadke R, O'Donovan DG, Buchert R, Grimm M, Töpf A, Zaharieva IT, Brady L, Hu Y, Lloyd TE, Klein A, Steinlin M, Kuster A, Mercier S, Marcorelles P, Péréon Y, Fleurence E, Manzur A, Ennis S, Upstill-Goddard R, Bello L, Bertolin C, Pegoraro E, Salviati L, French CE, Shatillo A, Raymond FL, Haack TB, Quijano-Roy S, Böhm J, Nelson I, Stojkovic T, Evangelista T, Straub V, Romero NB, Laporte J, Muntoni F, Nishino I, Tarnopolsky MA, Shorter J, Bönnemann CG, Taylor JP: Heterozygous frameshift variants in HNRNPA2B1 cause early-onset oculopharyngeal muscular dystrophy *Nature Communications*. 13(1):2306, Apr, 2022.
7. Ogasawara M, Eura N, Nagaoka U, Sato T, Arahata H, Hayashi T, Okamoto T, Takahashi Y, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Nakamura A, Shimazaki R, Sano T, Kumutponpanich T, Minami N, Hayashi S, Noguchi S, **Iida A**, Takao M, Nishino I: Intranuclear inclusions in skin biopsies are not limited to neuronal intranuclear inclusion disease but can also be seen in oculopharyngodistal myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 48(3):e12787, Apr, 2022.

分担研究課題名 「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 国立研究開発法人 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

筋ジストロフィーは筋線維の壊死・再生を主病変とする遺伝性筋疾患である。アンチセンス核酸によるエクソン・スキップ治療など開発は進んでいるものの、根治療法は現在まで存在せず新たな治療法の開発が待たれている。

本研究課題では、幹細胞を用いた新規治療法開発の為に基盤研究として、筋再生の中心的役割を担うサテライト細胞に着目した。Pax7はサテライト細胞の機能維持に必須の転写因子であるが、Pax7の転写共役因子、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。この理由として、市販の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-シーケンシングによる標的因子の同定が困難であることが挙げられる。そこで本研究では、Pax7にタグを付加したノックインマウス (Pax7-HAKI マウス) を作製し、発生期の筋前駆細胞および成体のサテライト細胞における 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サテライト細胞の機能調節・機能維持メカニズムを明らかにする。

骨格筋は多様な細胞が混在する組織というだけでなく、筋線維自体がサテライト細胞の融合により形成された多核の細胞である。トランスクリプトーム解析は病態発症のメカニズムを理解する上で有効であるが、bulk RNA-seq では全ての細胞の遺伝子発現の総和を見ている

にすぎず、上記の理由から骨格筋においては個々の細胞・核での遺伝子発現を解析し、病態を理解する必要がある。そこで、本研究では近年急速に進化を遂げているシングル核トランスクリプトーム解析を用いて、皮膚筋炎を始めとする筋疾患の病態解明を目指す。

方法

1. Pax7 の C 末端に PA タグ x2 を付加した Pax7-HAKI マウスを作製し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降-質量分析法により Pax7 と結合するタンパク質を同定した。
2. 患者凍結筋組織 (正常筋および抗 NXP2 陽性皮膚筋炎患者罹患筋) からセルソーターにより細胞核を単離し、10x Genomics 社 Chromium Controller およびライブラリ作製キットを用いてシングル核 RNAseq ライブラリを作製した。その後 R パッケージ Seurat により各細胞クラスターの同定と、罹患筋特異的に発現変動のある遺伝子を解析した。

結果

Pax7-HAKI マウスは野生型マウスと同等の成長曲線を示し、前頸骨筋へのカルジオトキシン投与後も正常な筋再生を示した。また、HA は Pax7 と共局在を示した。E12.5 日齢胚およびサテライト細胞を用いた免疫沈降-質量分析法により、Pax7-HA/HA 胚および筋サテライト細胞で野生型と比較して2倍以上有意に検出された Pax7 結合タンパク質を 36 種同定した。Gene Ontology 解析の結果、eIF2 および eIF3 サブユニットを中心とした翻訳開始関連因子やクロマチン制御因子が多く見出された。

凍結筋組織を用いたシングル核 RNA-seq 解析を確立し、抗 NXP-2 抗体陽性の皮膚筋炎患者由来凍結筋サンプルを解析した。筋線維核 (Fast, Slow, Regeneration)、マクロファージ、血管内皮細胞、筋サテライト細胞、周皮細胞、リンパ球、

平滑筋細胞の9つの細胞クラスターを同定した。I型インターフェロン (IFN) のカスケードをMX1 および ISG15 の発現により解析した結果、筋線維やマクロファージのみならず全ての細胞種でその発現が見られ、I型 IFN 経路が筋組織内の全ての細胞で活性化していることが明らかとなった。また、bulk RNA-seq でI型 IFN のリガンドの発現は IFN- β 1 のみ患者筋で有意な上昇が見られたが、シングル核解析でも同様に IFN- β 1 のみ発現が確認された。しかしながら、IFN- β 1 はマクロファージや筋核クラスターで発現が見られるものの、その発現細胞はわずかであり、主たる IFN- β 1 発現細胞集団は確認できなかった。また、IFN- β 1 を発現すると過去に報告のあった形質細胞様樹状細胞 (pDC) では IFN- β 1 の発現は見られなかった。

さらに、抗 NXP2 陽性筋の筋核のクラスターにおいて、低酸素化で発現誘導される HIF1 陽性の病態特異的な集団を見出した。

考察

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 の翻訳制御が筋サテライト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サテライト細胞の再生寄与率を上げることができると報告している (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による確認が必要である。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。一方、Pax7 と結合する転写共役因子および Pax7 の標的遺伝子は世界的にも殆ど明らかにされておらず、同マウスを用いた解析は有用であると考えられる。

今回、患者由来凍結筋組織を用いたシングル核トランスクリプトーム解析法を確立した。抗 NXP2 陽性抗体陽性罹患筋においては、IFN- β 1 発現細胞を強く産生する細胞集団は発見できなかった。今後、免疫蛍光染色法および *in situ* hybridization 法により解析し同細胞を同定する必要がある。我々が確立した骨格筋のシングル核トランスクリプトーム解析は、これまで凍結筋組織を用いた報告は無く、筋疾患の検体を用いた報告もない。その強みを活かし、皮膚筋炎だけでなくその他の筋疾患についても同手法を用いて解析していく予定である。

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。また、シングル核トランスクリプトーム解析により抗 NXP2 陽性罹患筋特異的な細胞集団を発見した。本研究の進展に伴い、骨格筋幹細胞の増殖・分化制御、筋形成の全容および筋疾患病態発症機序が解明されるとともに、その成果が筋疾患治療へと応用されることが強く期待される。

参考文献

1. Zismanov V, Chichkov V, Colangelo V, Jamet S, Wang S, Syme A, Koromilas AE, Crist C.: Phosphorylation of eIF2 α Is a Translational Control Mechanism Regulating Muscle Stem Cell Quiescence and Self-Renewal. Cell Stem Cell . 2016 Jan 7;18(1):79-90.

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分解経路も見いだした。これまでに、リソソーム膜タンパク質SIDT2は、この経路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、この経路の破綻がneuropathy and distal myopathy with rimmed vacuolesを引き起こすことを見だし、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。

今回、リソソームがタンパク質を直接取り込み分解する分解経路に関与する、SIDT2以外の分子を探索した。

方法

リソソームにおける局在とインタラクトームの情報から、分子Cに着目した。培養細胞で分

子Cをneuro2a細胞に過剰発現させ、 α -synucleinやTauを基質としたTet-offシステムによる分解実験を行ない、タンパク質分解への影響を解析した。また、共焦点顕微鏡解析により、 α -synucleinがC依存的にリソソームに取り込まれるか検討した。さらに、マクロオートファジーの起こらないAtg13ノックアウト(KO) neuro2a細胞を用いて、本研究の分解経路がマクロオートファジーか異なる経路かを決定した。

結果

Tet-offシステムによる分解実験の結果、分子Cの過剰発現により、 α -synucleinやTauのタンパク質分解が促進された。共焦点顕微鏡解析の結果、分子Cの過剰発現により、 α -synucleinのリソソームへの移行が促進された。Atg13 KO neuro2a細胞においても、分子Cの過剰発現により、 α -synucleinのタンパク質分解が促進された。また、Cの過剰発現時には、マクロオートファジーの活性マーカーであるLC-3IIの量に変化はなかった。以上の結果から、分子Cはマクロオートファジーではないオートファジー経路を活性化することが明らかとなった。

考察

マクロオートファジー以外の経路であることから、リソソームによる直接的なタンパク質取り込み経路であることが示唆された。また、分子Cはリソソーム膜に存在することから、タンパク質取り込みに関与している可能性がある。

結論

分子Cはマクロオートファジー以外のオートファジー経路を活性化する。

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と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有する。一方で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、特に筋幹細胞数の減少は重度傷害後の再生遅延が寝たきりを惹起する要因となる事から、筋機能あるいは筋幹細胞数の維持は必須である²。興味深い事に、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が、その原因は不明である³⁻⁵。特に筋萎縮・筋幹細胞数減少の程度の少ない骨格筋には、加齢・疾患に対する保護因子が含まれ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、遅筋由来筋幹細胞は高い自己複製能を持つ事で、加齢による筋幹細胞数減少に対する抵抗性を示す可能性を見出してきた⁶。特に、ミトコンドリア複合体構成タンパク質の一つである *Ndufs8* は、その制御の中心にいる可能性が考えられ、この機能解析を目的としてこれまで研究を行ってきた。

<方法・結果>

1. 骨格筋における筋線維タイプと筋幹細胞機能の関連性を明らかにする為、正常腓腹筋および除神経処置を行なった腓腹筋よりそれぞれ筋幹細胞を単離し、機能解析を行なった。

除神経を行うと、腓腹筋を構成する筋線維タイプは速筋線維優位から遅筋線維優位へと移行する。正常筋および除神経した筋より筋幹細胞を単離・培養し、筋管細胞を形成させ、筋線維タイプの解析を行なった結果、正常筋および除神経筋から単離した筋幹細胞は、同様の筋線維タイプで構成された筋管を形成する事が明らかとなった。すなわち、筋幹細胞の機能は、それらが存在する筋線維タイプに依存しない可能性が示唆された。

2. 筋線維タイプと筋幹細胞機能の関連性をさらに明らかにする為、異なる部位よりそれぞれ筋幹細胞を単離・培養し、網羅的遺伝子発現解析を行なった。

筋幹細胞は、速筋である大腿四頭筋、前脛骨筋、遅筋であるヒラメ筋、さらに速筋・遅筋が混在する横隔膜および外眼筋より単離を行なった。解析の結果、各筋細胞に発現する遺伝子発現パターンはそれぞれ大きく異なる事が明らかとなった。すなわち筋幹細胞が存在する筋線維タイプと遺伝子発現の関連性は低く、筋幹細胞の機能的特徴は骨格筋部位毎に大きく異なる可能性が示された。

3. ヒラメ筋(遅筋)由来筋幹細胞は、前脛骨筋(速筋)由来細胞に比べて高い自己複製能を持つ事をこれまで見出してきたが⁶、その違いを決定する分子を同定する為にプロテオミクス解析を行なった。その結果、ヒラメ筋由来の培養筋芽細胞では、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となった。さらにその発現は加齢と共に減少し、サルコペニアとの関連性が疑われた。

4. *Ndufs8* 過剰発現および発現抑制実験により、*Ndufs8* は筋細胞の自己複製能、アポトーシス耐性能、さらにミトコンドリア形態、および代謝機能に影響する事が明らかとなった。

5. shRNA による *Ndufs8* 発現抑制は、細胞内

NAD/NADH 比は低下し、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 活性が低下している事が予想された⁷。Sirtuin の標的分子であるアセチル化 p53 タンパク質は *Ndufs8* 発現抑制により増加していた。

6. *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) を添加すると、細胞内 NAD/NADH 比が上昇し、さらにアセチル化 p53 タンパク質量が低下した。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。

7. NMN を添加して培養した筋細胞を骨格筋に移植した結果、通常の筋細胞に比べより多くの筋線維および筋幹細胞の形成に寄与する事が確認され、さらに筋細胞に対する NMN 添加は、自己複製能を亢進させる可能性を生体内で示す事ができた。

<考察および結論>

本研究結果から、骨格筋幹細胞機能は、その細胞が存在する筋線維タイプではなく、むしろ骨格筋部位によって異なる事が明らかとなった。一方で、これら細胞によって形成される筋管細胞の違いについては明らかにしておらず、今後検討が必要である。

高い自己複製能を有するヒラメ筋由来筋細胞の解析は、加齢や疾患に対する耐性因子を含む事が期待された。ヒラメ筋由来筋細胞において発現の高い *Ndufs8* は、NAD⁺/NADH 比の上昇と、それに伴うアセチル化 p53 発現の低下に関与し、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、ミトコンドリアが加齢や疾患による筋細胞機能低下に対する治療ターゲットになる可能性を示す事ができた。今後筋ジストロフィーを含む筋萎縮を呈する様々な疾患に対する NMN の治療効

果が期待される。

<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**, 50 (2006).
2. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
3. 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**, 330–343 (2010).
4. Verdijk, L. B. *et al.* Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age (Dordr)* **36**, 545–557 (2014).
5. Yoshioka, K. *et al.* Hoxa10 mediates positional memory to govern stem cell function in adult skeletal muscle. *Sci Adv* **7**, (2021).
6. Motohashi, N. *et al.* Tbx1 regulates inherited metabolic and myogenic abilities of progenitor cells derived from slow- and fast-type muscle. *Cell Death Differ* **26**, 1024–1036 (2019).
7. Chen, D. *et al.* Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev* **22**, 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 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 2017-2022. As a result, the total number of frozen and cultured muscle samples has reached 23465 and 2216, respectively, by the end of 2022, which constitute the world-leading muscle repository. Using this muscle repository, we have made a number of achievements including: 1) identification of a novel dominantly-inherited DNAJB4 myopathy; 2) prospective comprehensive screening of frozen muscle biopsy sections for Pompe disease from July 2015 to January 2018, resulting in no patient identification; 3) development of novel method to differentiate between oculopharyngeal muscular dystrophy and oculopharyngodistal myopathy on muscle pathology; 4) characterization of pathological phenotype of antisynthetase syndrome according to positive autoantibodies; and 5) identification of several new causative genes for muscle disease through international collaboration, including HNRNPA2B1.