

2-6 疾患モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター

青木 吉嗣

総括研究報告

1. 研究目的

希少神経・筋難病の Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、全身の骨格筋と心筋のみならず、末梢および中枢神経系も障害される疾患であり、全身的な治療法を開発することが最も重要である。DMD を対象に、エクソン 53 スキップ薬 (NS-065/NCNP-01) に続く、エクソン 44 スキップ薬 (NS-089/NCNP-02) の開発を、精神・神経疾患研究開発費を財源に整備した NCNP の治験実施基盤を活用し推進した。R3 年度中に NS-089/NCNP-02 の医師主導治験パート 2 の投与と解析は完了し、協力製薬企業による継続試験が進行中である。今後は心筋も治療可能な次世代エクソン・スキップ薬の開発に加えて、ウイルスベクターや、RNA あるいはゲノム編集治療等の遺伝子治療の有効性と安全性を検証し、治験のプロトコルやマニュアルの準備を進めて、社会的、倫理的問題についても十分な検証を進めながら、新規治療モダリティーを臨床応用することを目標とする。さらに、エクソン・スキップ薬の開発技術を、DMD 以外の遺伝性神経・筋疾患に応用することを目的に、エクソン・スキップのデータベースおよび機械学習モデルに基づいた予測システムである eSkip-Finder を世界で初めて開発のうえ、ウェブ上で公開した (<https://eskip-finder.org/cgi-bin/input.cgi>)。

また、筋前駆細胞への分化誘導法を確立する必要がある尿由来細胞や間葉系幹細胞を用いた幹細胞移植治療ならびに筋ジストロフィーの病態解明に基づく薬物治療についても、これまで研究班で開発したモデル動物を駆使して研究を進め、臨床に展開することを目標に、以下の構成で研究を進めた。

1. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発

- a. エクソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など遺伝子発現制御法の開発 (青木、宮田、越後谷、堀田、岡田、中村、千葉)
- b. 骨格筋の幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立 (林、深田、上住、鈴木)
- c. 新たな発想、技術に基づく分子病態、薬剤開発、バイオマーカー開発研究 (野口、村松、関、川内、

金川、山田、進藤、森)

2. 筋ジストロフィーモデル動物の維持 (保田)

3. 新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究 (貝谷)

2. 研究組織

主任研究者

青木 吉嗣

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

分担研究者

野口 悟

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

村松 里衣子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

関 和彦

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

川内 大輔

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

林 晋一郎

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

森 まどか

国立精神・神経医療研究センター病院

鈴木 友子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所

上住 聡芳

九州大学 生体防御医学研究所

深田 宗一郎

大阪大学 大学院薬学研究科

宮田 完二郎

東京大学大学院工学系研究科

稲田 全規

東京農工大学大学院工学研究院

岡田 尚巳

東京大学 医科学研究所

越後谷 祐介

日本大学生物資源科学部

金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科

山田 崇史

札幌医科大学保健医療学部理学療法学科

中村 昭則

国立病院機構まつもと医療センター

進藤 英雄

国立国際医療研究センター研究所

千葉 峻太郎

理化学研究所計算科学研究センター

保田 昌彦

実験動物中央研究所

貝谷 久宣

日本筋ジストロフィー協会

3. 研究成果

2022年度開発費研究班会議を12月6日~7日にかけてハイブリッド開催(教育研修棟およびZoom)し、参加登録者数は約240名であった。当班班会議の特徴であるが、多数のアカデミアに加えて製薬系企業人、患者会、官からの参加があった。同カンファレンスは、希少神経筋難病の克服に向けて、非臨床・非競合領域での連携を強化する取組みであると共に、国民との科学・技術対話に対する取組みでもある。創薬エコシステムや、研究への患者・市民参画等の重要なテーマについて活発な意見交換を行った。

1. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発

a. エクソン・スキップ、遺伝子治療、ゲノム編集技術など遺伝子発現制御法の開発(青木、千葉、横田、堀田、宮田、越後谷、岡田)

- ① mdx52マウスを対象にDp140 mRNAを扁桃体に直接投与しDp140を発現させると、興奮性シナプス応答や社会性行動異常が改善した。さらに、エクソン53スキップ薬を脳室内に投与すると、扁桃体でDp140が回復し、これらの異常も同様に改善した(Prog Neurobiol. 2022)。(橋本、青木)
- ② アンチセンス核酸配列データベース・配列予測のための機械学習モデルであるeSkip-Finderの作成およびウェブ一般公開・運用を実現した(Nucleic Acids Res. 2021:gkab442)(千葉班員)。
- ③ 新規CRISPRシステムとして、DNA二本鎖切断を誘導せずに標的の一塩基を変換可能な一塩基編集システム(Base Editor)の開発を進めた。ウイルス様粒子送達システムNanoMEDICに各種Base Editorを搭載し、エクソンスキップレポーターを用いてエク

ソン45スキップ誘導活性を測定した(堀田班員)(Nat Commun. 2020)。

- ④ 2分岐型ポリエチレングリコールとポリリシンから成るY字型高分子を合成し、1分子の核酸医薬を封入する最小スケール(約18nm径)のナノ医薬(ユニットポリイオンコンプレックス:uPIC)を創製した。マウスへ静脈内投与されたuPICは核酸医薬単体と比して、10倍以上の高い筋組織集積効率を示すこと、筋肉内投与されたuPICは2倍のエクソン・スキップ効率を示すことを確認した(宮田班員)(J Control Release. 2022)。
 - ⑤ DG9ペプチド付加モルフォリノ核酸を用いた心筋治療およびマルチエクソン・スキップ治療の可能性を、ヒト細胞およびマウスを対象に実証した(越後谷班員、横田協力班員)(Proc Natl Acad Sci U S A. 2022)。
 - ⑥ AAVを用いたμDys補充療法の実用化に向けて、固相支持担体を用いたAAV発現培養系の構築、同発現系で作製したAAVベクターの精製方法の検討および純度解析系構築を行った。間葉系幹細胞治療について、臨床試験に向けた準備を行った(Mol Ther Methods Clin Dev. 2021)。
- b. 骨格筋の幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立(青木、川内、深田、上住、鈴木、林、若月、稲田)
- ① 尿由来細胞から運動ニューロンを分化させる手法を確立した。健常ヒト尿由来細胞を用いた大脳オルガノイドの作製に成功した(Front Physiol. 2022)。(邦武、青木)
 - ② CRISPR-Cas9と電気穿孔法を組み合わせた生体内ゲノム編集法を用いて小児脳腫瘍に特異的に発現する融合遺伝子の発がん能を検証した。結果として、小児悪性脳腫瘍である上衣腫においてZFTA型融合遺伝子の発がん能と腫瘍進展に関わる下流遺伝子を同定した(Cancer Discov. 2021(川内班員))。
 - ③ 運動に依存的な筋サテライト細胞増殖メカニズムとして、Yap1/Taz依存的な間葉系前駆細胞由来因子が筋サテライト細胞を増殖し、その中の一つThrombospondin-1アゴニストはCalcitonin receptorの発現低下した全身の筋サテライト細胞を増殖可能であることを示した(深田班員)(Cell Stem Cell, 2022)。
 - ④ レチノイン酸(RA)は間葉系前駆細胞で産生され、間葉系前駆細胞自信にシグナル伝達するとともに

筋幹細胞にもシグナルを伝えることを明らかにした(上住班員)(*J Clin Invest*, 2021)。

- ⑤ ヒト iPS 細胞から誘導した間葉系前駆細胞が分泌する uPAR がヒト筋前駆細胞の DMD モデルマウスへの移植効率を上げることを明らかにした(*Stem Cell Res Ther.*12:532, 2021)(鈴木班員)。
- ⑥ シングル核 RNA-seq 解析により、DMD では健常者と比較して筋幹細胞の割合が増加したが、増殖期の筋幹細胞は殆ど存在せず、その多くは休止期にあることが明らかとなった(林班員)。
- ⑦ ヒト iPS 細胞を分化させた運動ニューロン、骨格筋細胞の共培養系を確立した。60 日間に渡る長期培養過程での神経筋接合部の成熟化過程を調べた(若月班員)。
- ⑧ ヒト骨格筋を対象に質量分析計によるジストロフィン高度定量法を確立した(稲田班員)。

c. 新たな発想、技術に基づく分子病態、薬剤開発、バイオマーカー開発研究(山田、村松、中村、越後谷、横田、野口、進藤、関、森、金川)

- ① 九州大学医学研究院と静岡県畜産技術研究所との共同研究として、ゲノム編集により新規作出した DMD マイクロプタの病理解析と論文作成を進め、NCNP への個体導入を完了した(論文準備中)。
- ② イヌ用およびマウス用の下肢筋トルク測定のための刺激・評価系を2種類新たに開発した。DMD マウスにおいて、伸張性収縮に対する損傷感受性の亢進が高感度に検出できること、そのメカニズムに、Ca²⁺依存性の三つ組み構造タンパク質の分解が関与することを明らかにした(*Am J Physiol Cell Physiol.* 2022)(山田班員)。
- ③ ALS モデルマウス(SOD1G93A)で認める血中脂肪酸量の低下は、オリゴデンドロサイトの細胞死を誘導することで ALS 症状の発症や悪化に寄与する可能性を見出した(村松班員)。
- ④ ベッカー型筋ジストロフィーの自然歴を踏まえ、ゲノム編集により、exon 45-49 欠失(ヒトでは重症)、exon 45-47 欠失(ヒトでは中等症)、exon 45-48 欠失(ヒトでは軽症)を有するマウスを作製した(中村班員)。
- ⑤ Rogers 博士らと共に、エクソン 52 欠失変異を有する DMD ミニプタを作製し、エクソン 51 または 53 スキップの検証に有用であることを示した(越後谷班員、横田協力班員)(*Int. J. Mol. Sci.* 2021)。
- ⑥ PolyQ 病トランスジェニックマーマセットの骨格筋力低下は、脱神経、核内及び筋線維内の封入体形

成により、主に速筋の萎縮を介して、引き起こされることが判明した(野口班員)。

- ⑦ リン脂質生合成酵素であるリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 2 の構造予測を行い、阻害剤開発への道筋をつけた(進藤班員)(*FASEB J.* 2021、*J Biol Chem.* 2022)。
- ⑧ 齧歯類の下肢筋群にワイヤー電極を植え込み、無線で自由行動下の筋電図活動を記録する実験系を構築し、歩行だけでなく、跳躍運動時においても安定的な記録が可能であることを確認した(関班員)。
- ⑨ 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ことを示した(*Nat Commun.* 2022)(金川班員)。
- ⑩ DMD 患者脳を対象に、MRI、CT、血流 SPECT 画像所見を調査したところ、DMD 患者の過半数に前頭葉優位の脳萎縮・脳血流低下が見られ、進行性である可能性が示唆された(森班員)。

4. 筋ジストロフィーモデル動物の維持(保田)

筋ジストロフィー関連モデルマウスを継続的に高品質で維持し、班内外の研究機関に供給した。令和 4 年の供給実績は、国内 40 機関に 80 回供給し、B10-mdx を 1219 匹、そのコントロール系統 B10Jic を 44 匹、D2-mdx を 183 匹の累計 1446 匹を分与・供給した(保田班員)。

5. 新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究(貝谷)

遺伝子治療をはじめとする本研究班の成果が実現するための社会的環境を作る事を目的に、筋ジストロフィー患者・家族を対象に、日常生活における精神的な負担についての現状を把握するための調査を実施した。

今後の研究の進め方

NCNP が誇るマウス、イヌ、マイクロプタ等の神経筋疾患モデル動物を対象に、引き続き以下を検討する。

- ① モデル動物の作出/維持(マウス、イヌ、マイクロミニプタ等)と評価系の作成
- ② 治療効果および組織標的性向上のための遺伝子・核酸医薬のデリバリー研究
- ③ 骨格筋幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立
- ④ 骨格筋、心筋、神経筋接合部、脳等の 3D 組織モデルを用いた疾患病態研究
- ⑤ 実験モデル動物の安定供給と、研究成果の臨床展開のための社会環境整備

最後に、学際性、国際性、公平性、倫理性、公開性を原則として、筋ジストロフィーに対して治療を開発するための伝統ある開発費研究班（武田伸一班）を引き継ぐ機会を頂いたことに深く感謝したい。

Development of Molecular Therapies for Muscular Dystrophy using cellular and animal models

Principal Investigator: Yoshitsugu Aoki, MD, PhD

Director, Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology and Psychiatry

Project period: FY2020-FY2022

Human genetic therapies have come of age in curing rare neuromuscular diseases. The nationwide research group aims to better understand and improve the treatment of fatal and currently untreatable muscular dystrophies, including Duchenne muscular dystrophy (DMD). We are dedicated to elucidating the molecular pathogenesis of muscular dystrophies, especially Duchenne muscular dystrophy, and the development of advanced gene- and stem cell-based therapeutics for the diseases. For this purpose, we integrate molecular, pharmacologic, proteomic, and genomic methodologies using various types of unique animal models, including dystrophic dogs, mice, rats, and common marmosets. We are combating these diseases through research aimed at implementing promising novel therapeutic strategies, including oligonucleotide-based exon-skipping therapy and mesenchymal stem cell therapy, into clinical practice. One of the significant achievements of our research group is a successful completion of our antisense oligonucleotide-based exon 44-skipping drug, NS-089/NCNP-02, for DMD in Japan. In the trial, we succeeded first in the world in recovering the expression of human dystrophin protein over on average 15%, and attained results suggesting sufficient efficacy for motor function. Moreover, we have published an online resource eSkip-Finder (<https://eskip-finder.org/cgi-bin/input.cgi>) for helping researchers identify optimal sequences of antisense oligonucleotides for exon skipping (Nucleic Acids Res. 2021;49:W193-W198.).

RESEARCH & RELATED Senior/Key Person Profile

- Principal Investigator

National Center for Neurology and Psychiatry
Yoshitsugu Aoki, Director

- Co-Investigators

National Center for Neurology and Psychiatry
Satoru Noguchi, Section Chief
Rieko Muramatsu, Director
Kazuhiko Seki, Director
Daisuke Kawauchi, Section Chief
Shin'ichiro Hayashi, Section Chief
Madoka Mori, Section Chief
Yuko Suzuki, Section Chief

Kyoto University

Akitsu Hotta, Lecturer

Tokyo Metropolitan Health and Longevity Medical Center

Akiyoshi Uezumi, Associate Director

Osaka University
Soichiro Fukada, Associate Professor

Tokyo University
Kanjiro Miyata, Associate Professor

IMSUT, Tokyo University
Takashi Okada, Professor

Tokyo University of Agriculture and Technology
Masaki Inada, Associate Professor

Nihon University
Yusuke Echigoya, Lecturer

Ehime University Graduate School of Medicine
Motoi Kanagawa, Professor

Sapporo Medical University
Takashi Yamada, Associate Professor

National Hospital Organization Matsumoto Medical Center
Akinori Nakamura, Director

National Center for Global Health and Medicine
Hideo Shindo, Associate Professor

RIKEN
Shuntaro Chiba, PhD

Central Institute for Experimental Animals
Masahiko Yasuda, PhD

Japan Muscular Dystrophy Association
Hisanobu Kaiya, President

Tohoku University
Naoki Suzuki, Assistant Professor

Alberta University
Toshifumi Yokota, Professor

STATEMENT OF WORK

Specific Aim 1

Development of new therapeutic interventions using animal models of neuromuscular diseases

- a. Development of genetic therapies for muscular dystrophies
Investigators: Aoki, Miyata, Echigoya, Hotta, Okada, Nakamura, Chiba, Yokota
- b. Development of stem cell-based therapies for muscular dystrophies
Investigators: Hayashi, Fukada, Uezumi
- c. Discovery of new pathological mechanisms in neuromuscular diseases
Investigators: Noguchi, Muramatsu, Seki, Kawauchi, Kanagawa, Yamada, Shindo, Mori, Suzuki N

Specific Aim 2

Quality Control of Experimental Animals

Investigator: Yasuda

Specific Aim 3

Ethical and social studies to develop new treatments for muscular dystrophies

Investigator: Kaiya

DNAJB4 ミオパチーモデルマウスの病態解析

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

野口 悟

緒言

分子シャペロンは、ミスフォールドタンパク質のリフォールディングを助けたり、または分解に導いたりするタンパク質の総称である。骨格筋では分子シャペロンとその補因子が多く発現している。これまでに、低分子シャペロンタンパク質 *CRYAB*, *HSPB8*, *DNAJB6* 遺伝子やヌクレオチド交換因子をコードする *BAG3*, 及び *SIL1* 遺伝子などの変異が骨格筋疾患を引き起こすことが見出されており、疾患病態として変性タンパク質の蓄積による筋線維の変性が提唱されているが、蓄積タンパク質の種類とその性質、毒性については、十分に解明されているとは言い難い。我々は、筋原線維性ミオパチー患者家系で低分子熱ショックタンパク質 HSP40 ファミリータンパク質をコードする *DNAJB4* 遺伝子に片アリル性のミスセンス変異を認めた。本研究では、この変異を導入した遺伝子組み換えマウスの作製し、表現型を解析することで、変異病因性を評価するとともに、疾患モデルマウスを樹立し、病態の解明に迫った。

方法

マウスと筋力測定

ヒト患者変異を再現した *Dnajb4* 遺伝子変異ノックインマウス (KI)、1塩基欠失をもつノックアウトマウス (KO) を、ゲノム編集によって作製した。骨格筋の筋力測定、組織染色は定法に基づいて行った。

細胞実験

Hela 細胞に、野生型および変異 DNAJB4 を、伸長ポリグルタミンタンパク質、変異デスミンともに HEK 細胞で発現させ、変異タンパク質集合体形成に対する変異 DNAJB4 の効果を測定した。また、野生型および変異 DNAJB4 を正常型 TDP-43 とともに Hela 細胞で発現し、熱ショック処理によって誘導される TDP43 の核内凝集物形成への遺伝子変異の効果を解析した。

結果

ヒト変異 DNAJB4 は、ポリグルタミン伸長タンパク質および変異デスミンの細胞質集合体の形成を抑制した。一方、変異 DNAJB4 は正常 TDP-43 による核内凝集形成を促進させた。この効果は変異 DNAJB4 の HSP70 結合能を抑制することで、キャンセルされた。*Dnajb4* 遺伝子変異疾患モデルマウス (KI ヘテロ、KO ホモマウスともに) は、若齢においては全く異常を示さなかった。高齢マウスでは握力の低下が認められ、ヒラメ筋の筋力も有意に低下していた。KI ヘテロマウスのヒラメ筋の組織染色では、萎縮筋線維が認められるとともに、ヒト患者筋で観察されたのと同様の細胞内凝集物の蓄積が観察された。この蓄積物の中心は p62、フィラミン C 陽性であり、それを取り囲むようにデスミン、HSP70 が染色された。電子顕微鏡観察では、筋原線維の変性が広範囲に観察され、Z 線と同様の電子密度をもつ沈着物がそれを取り囲むように配置されていた。自己貪食空胞は観察されなかった。

考察

細胞実験では、変異 DNAJB4 は TDP-43 の核内凝集物の生成を促進し、機能獲得変異のように考えられた。しかし、*Dnajb4* 遺伝子変異マウスは、KI、KO とともに同様な表現型が観察され、むしろヒト変異はドミナントネガティブ効果をもつと考えられた。この骨格筋の表現型は高齢マウスに見られたことから、老化に伴う骨格筋のタンパク質恒常性維持システムがだんだん低下していく中で、*DNAJB4* 変異により HSP70 システムが機能喪失し、基質タンパク質のリフォールディングまたは分解の低下により、細胞質でのタンパク質の蓄積、そして筋原線維の変性が生じたものと考えられた。

結論

DNAJB4 遺伝子変異は、ヒト及びマウスで高齢発症筋原線維性ミオパチーを引き起こす。

参考文献

Inoue M et al. *Acta Neuropathologica* 145: 235-255, 2023

神経筋疾患の臓器間ネットワーク解明ならびに低分子薬開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 神経薬理研究部
村松 里衣子

緒言

筋萎縮性側索硬化症は致死性の神経難病であるが、現時点で顕著な治療効果を発揮する薬剤はない。症状の発症や悪化に関わる神経系の変性のメカニズムにも不明な点が多く、メカニズムの解明とそれに立脚する治療薬の開発は喫緊の課題である。一方、近年、臓器間ネットワークという概念により、神経系の機能が他の臓器により制御される仕組みが生体内に備わることがわかってきた。その制御方法の一つに循環を介した液性因子の寄与が存在するが、筋萎縮性側索硬化症において液性因子を介した病態制御機構が存在するかは明らかではない。しかし、筋萎縮性側索硬化症患者および同モデルマウスを用いた検討から、対象群と比較し血中での様々な分子発現が変動していることが示されており、また変動する分子の一部に対してはその受容体が神経系細胞に発現する。これらのことから、血中で発現する分子が筋萎縮性側索硬化症における神経変性に影響を及ぼす可能性を着想した。

昨年度までに、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの発症前、発症後ならびに対象群のマウスから採血を行い、血中分子量を網羅的に検出した（メタボロミクス、サイトカインアレイ）ところ、顕著に発現変動する脂肪酸が複数存在した。またそれらに対する受容体の神経系での発現を検討したところ、オリゴデンドロサイトにおいて豊富に受容体発現が認められた。筋萎縮性側索硬化症においてもオリゴデンドロサイトの細胞死が病態形成に寄与すると推察されていることから、オリゴデンドロサイトの細胞死に対する同定した受容体の効果を検討した。その結果、Ffar1 受容体がグルタミン酸興奮毒性によるオリゴデンドロサイトの細胞死に寄与することが示唆された。そこで本年度は、オリゴデンドロサイトの細胞死に対するメカニズ

ムに関して、特にアポトーシス経路によるものか検討した。

方法

マウスのオリゴデンドロサイト培養は、哺乳1日齢のマウス全脳から混合グリア細胞培養から採取する方法と、platelet-derived growth factor (PDGFR) α 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞を単離する方法を用いた。いずれの細胞も細胞播種後に T3 含有培地により成熟細胞へと分化させて実験に用いた。細胞死の検出は、Propidium iodide (PI)の取り込みと cleaved caspase 3 の染色により評価した。Ffar1 の発現抑制のため Ffar1 siRNA を培養オリゴデンドロサイトに導入した。

結果

グルタミン酸興奮毒性により培養オリゴデンドロサイトにおける PI 陽性細胞および cleaved caspase 3 陽性細胞の数が増加し、それが脂肪酸暴露により抑制された。Ffar の発現を抑制させた培養オリゴデンドロサイトでは、コントロール群と同様にグルタミン酸により細胞死は誘導されるものの、脂肪酸暴露による細胞死保護効果が阻害された。

考察

正常状態では血液に含まれる脂肪酸がオリゴデンドロサイトの細胞生存を維持しているが、筋萎縮性側索硬化症などで血中の脂肪酸量が低下すると、オリゴデンドロサイトの細胞死が誘導しやすいことが推察された。また、その機序には脂肪酸の細胞内への取り込みに関わる Ffar1 が関与することが示唆された。

結論

オリゴデンドロサイトに発現する Ffar1 は筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける変性誘導を制御する分子である。

参考文献

なし

2-6「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」

(分担課題名) ラットやマウスを対象とした筋電図記録や神経刺激の技術供与

分担研究者 関 和彦

(所属) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所モデル動物開発研究部

緒言

本研究班では筋疾患の病態解明や治療法解明が主目的であるが、筋機能の発現や維持は中枢神経系からの持続的な制御、及び運動感覚連関によって実現している。従って、上記の包括的な理解のためには、骨格筋だけでなく、骨格筋活動を左右する中枢神経系機能の評価が必要となる。そこで本研究では、筋電図計測・誘発電位計測などヒト患者においても行われている電気生理学的診断技術をモデル動物においても確立することを目的とする。確立された技術を、本研究班で用いられる様々な動物モデルにおいて適用することにより、筋疾患病態やその遺伝子治療戦略について、より広い視点からの理解が得られる。

方法と結果

マーモセットを対象に、下肢運動時の骨格筋活動の慢性記録方法、およびそれらを人工的に誘発するための神経刺激方法を確立した。前年度より継続している技術開発を継続し、ステンレスワイヤー(cooner wire)を外科的手術によって慢性的に埋め込み、電極中枢端についているコネクタをラット頭部に固定した。特に今年度は、両側の下肢及び前肢からも同時記録できる技術を確立した。頭部コネクタに Multichannel Systems 社の無線記録装置のトランスミッターを頭部に接続し、歩行時の筋活動を非拘束下で記録した。前肢と後肢の筋に四足歩行典型的な連続的な交代性の活動が認められた。

また、昨年度から継続している、ラットの末梢感覚神経に慢性的にカフ電極を設置する実験技術に加えて、同技術をマーモセットに適用するための技術開発を新たに開始した。具体的には、マーモセット前肢用のマイクロカフ電極を新たに設計し、それを慢性留置する手術及び個体管理方法を開発した。そして、

前年度確立した筋電図記録と同様、刺激一記録をすべてオンラインで行うことができる実験系を確立した。現在、これらを覚醒動物で適用するための開発をおこなっている。

このような技術開発と並行して、これらの技術を慢性行動実験に応用するための行動課題開発とその検証を行なった。まず、樹上性というマーモセットの特徴を利用して梯子上り課題を開発した。そして、機械学習を用いて、マーカースレスに登り運動時の四肢や体幹の動きを計測する技術を開発した。その結果、運動失調症モデルマーモセットでは登り運動の速度が顕著に低下し、マーモセットにおける運動失調症の発症と進行を反映するバイオマーカーになり得る事が明らかになった。

考察

本研究によって確立された筋電図記録や神経刺激システムは広く感覚運動時の神経系の活動評価に利用可能である。そこで今後は、ラット及びマーモセットの皮質上に ECoG 電極を埋め込む技術を確認し、感覚誘発反応や皮質運動出力の運動中の変化を評価できる実験系を確立する。

結論

げっ歯類やマーモセットを対象とした、慢性的筋電図記録と同時に、末梢神経を刺激する実験技術が確立された。またそれらを適用する行動課題として、ラットのジャンプ課題とマーモセットの梯子上り課題を開発した。そして、機械学習を用いて、マーカースレスに登り運動時やジャンプ運動時の四肢や体幹の動きを計測する技術を開発した。

今後の展望

筋疾患病態などの評価のためには、歩行だけでなく、より多くの部分を用いるタスクが必要である。また、筋萎縮などの形態面の評価との相関を確認するためには、最大筋力に近い筋力発揮様式(ジャンプ)や、低重力下での計測(tail suspension)などが筋病態研究では用いられているので、そのようなタスク下でも筋活動記録が可能のように、技術を発展させる。さらに筋疾患に並行した中枢神経系の変性評価に、運動出力と直接連関するような末梢神経刺激に対する応答は有用である。同技術は、運動系の異常

をもたらす多くの疾患モデル動物の表現系解析に有効なので、本研究班の他研究者との共同研究によって同技術の供与を行なってゆく。

研究発表

1. Akito Kosugi, Yosuke Saga, Moeko Kudo, Masashi Koizumi, Tatsuya Umeda and Kazuhiko Seki (2023). Time course of recovery of different motor functions following a reproducible cortical infarction in non-human primates. *Front Neurol.* 2023; 14: 1094774. Published online 2023 Feb 9. doi: 10.3389/fneur.2023.1094774
2. Tetsuro Funato, Noriaki Hattori, Arito Yozu, Qi An, Tomomichi Oya, Shouhei Shirafuji, Akihiro Jino, Kyoichi Miura, Giovanni Martino, Denise Berger, Ichiro Miyai, Jun Ota, Yury Ivanenko, Andrea d'Avella, Kazuhiko Seki (2022). Muscle synergy analysis yields an efficient and physiologically relevant method of assessing stroke. *Brain Communications*, Volume 4, Issue 4, 2022, fcac200, 09 August 2022, <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac200>

知的所有権の出願・取得状況

なし。

モデル動物を基盤とした脳腫瘍の新しい治療法開発に関する研究

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所・病態生化学研究部
川内大輔

緒言

小児脳腫瘍は小児がんのうち、致死率が最も高い疾患であり、腫瘍発生部位と分子解析データを元に分類されている。大脳皮質に生じるテント上上衣腫のうち約7割を占める RELA 型上衣腫は、上衣腫の中でも悪性度が高く、効果的な治療法がなく、主に外科的手術の成功率に依存する形になっている。そこで RELA 型上衣腫の腫瘍形成メカニズムを理解することにより、腫瘍増殖シグナルを見出し、それらを基盤とした新規の治療法の確立を目指す。

方法

RELA 型上衣腫では腫瘍特異的な融合遺伝子が発現することが知られている。これらの腫瘍における共通のがんシグナルを同定するために、まずヒトテント上上衣腫>1000 検体から融合遺伝子 ZFTA-RELA を同定し、同定されたがん融合遺伝子をマウス脳内に誘導することに成功した。次の研究段階として、融合遺伝子の下流で機能する遺伝子を抽出し、最終的にヒト・マウスで共通して働くシグナルを絞り込む。特に今年度は ZFTA-RELA により直接発言が誘導される LICAM に着目し、研究を推進している。

結果

昨年度までに我々は国際的な共同研究により、ヒト上衣腫検体の RNAseq より>10 の新規融合遺伝子が同定し、その多くの融合遺伝子が ZFTA/C11orf95 遺伝子との融合したタンパク質を発現するものであることを報告した。さらにこれらの遺伝子の発がん性をマウス胎仔脳に発現させることにより検証したところ、ZFTA-RELA, ZFTA-MAML2, ZFTA-MAML3, ZFTA-NCOA2 とこれら全ての遺伝子発現により脳腫瘍が誘導された。次に、生じたこれらの腫瘍の RNAseq を行うことにより、腫瘍に共通した細胞増殖を担うことが知られる分子群が同定され、ヒト検体の遺伝子発現と比較することで、LICAM 遺伝子

が腫瘍標的候補遺伝子として同定された。また ChIP-seq 解析により ZFTA-RELA タンパクは LICAM の遺伝子座に結合し、直接遺伝子を活性化することが明らかになった。本年度は、LICAM 遺伝子の shRNA による遺伝子発現阻害がヒト上衣腫培養細胞株で腫瘍細胞の増殖を阻害したことを発見し、LICAM が RELA 型テント上上衣腫の増殖阻害に効果的であることを見出した。現在その分子と相互作用する分子、さらにはその下流のがんシグナルの候補を突き止めており、検証中である。

考察

現存する治療に使用可能な LICAM 阻害剤は中和抗体が一般的で脳内への輸送が難しい。そこで下流のがんシグナルを同定することで上衣腫の治療につなげることが可能になると思われる。

結論

悪性度の高い RELA 型テント上上衣種において新規の腫瘍標的分子 LICAM の細胞増殖への寄与を明らかにした。

参考文献

- Youn YH, Hou S, Wu CC, [Kawauchi D](#), Orr BA, Robinson GW, Finkelstein D, Taketo MM, Gilbertson RJ, Roussel MF, Han YG. Primary cilia control translation and the cell cycle in medulloblastoma. *Genes Dev.* 36(11-12):737-751. (2022) (IF:12.89)
- Kilian M, Friedrich M, Sanghvi K, Green E, Pusch S, [Kawauchi D](#), Löwer M, Sonner JK, Krämer C, Zaman J, Jung S, Breckwoldt MO, Willimksy G, Eichmüller SB, von Deimling A, Wick W, Sahm F, Platten M, Bunse L. T-cell Receptor Therapy Targeting Mutant Capicua Transcriptional Repressor in Experimental Gliomas. *Clin Cancer Res.* 28(2):378-389. (2022) (IF:13.801)
- Wang W, Shiraishi R, [Kawauchi D*](#). Shh signalling in cerebellar development and cancer. *Front Cell Dev Biol.* 10:864035 (IF:6.081)
- Feng W, [Kawauchi D*](#), Wan F. Editorial: Molecular characteristics and personalized treatment for pediatric brain tumors. *Front Oncol.* 2022 Dec 29;12:1114280 (IF:5.738).

R4 開発費青木班 報告書

分担研究課題名

骨格筋幹細胞の未分化性維持機構の解明と筋ジストロフィー治療への応用

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

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) では筋サテライト細胞数の増加することが報告されている (1)。しかしながら DMD 患者の骨格筋では筋再生不全が見られ、筋サテライト細胞が増加するにも関わらず筋再生能が低下する理由は明らかではない。一方、C57BL/10 や C57/BL6 をバックグラウンドとする mdx マウスの筋サテライト細胞は活発な増殖能を持ち、野生型と変わらない増殖能・筋再生能を有しており、ヒトで見られるような再生不全は起こらない (2)。これらのような理由から、DMD 筋において、サテライト細胞が DMD の病態にどのように関与しているかは一定の見解が得られておらず、不明である。そこで、本研究では、ヒト DMD および DBA/2 バックグラウンドを持つ D2-mdx マウス (3) 筋を用いてシングル核トランスクリプトームにより筋サテライト細胞の性状を解析した。

方法

ヒト DMD および正常凍結筋組織からセルソーターで細胞核のみを単離し、10X genomics 社のマニュアルに従いシングル核 RNA-seq ライブラリを作製した。シークエンス後、Seurat R パッケージにより筋サテライト細胞集団について解析を行った。また、D2-mdx 大腿四頭筋

からシングル核 RNA-seq ライブラリを作製し、同様に解析した。

結果

新鮮凍結筋組織より細胞核のみを単離し、シングル核 RNA-seq ライブラリを作製する手法を確立した。Seurat パッケージにより解析した結果、DMD の骨格筋では、筋細胞核の割合は正常コントロール筋と比較して減少する一方で、再生筋の筋核、マクロファージなどが増加した。筋サテライト細胞は成人のコントロールと比較すると数は増加したが、小児のコントロールと比較した場合には殆ど数は変化しなかった。興味深いことに、DMD の筋サテライト細胞は殆どが MKI67 や PCNA といった細胞増殖マーカーを発現しておらず、休止状態のマーカーである CALCR を発現しており、休止状態にあると考えられた。また、MyoD1 や Myogenin を発現する活性化および分化途中にある筋細胞も殆ど存在しないことが明らかとなった。さらに、これら DMD の筋サテライト細胞では、遺伝子 X の発現が高いことが明らかとなった。D2-mdx の筋サテライト細胞においても、X の発現が野生型のサテライト細胞と比較して高く、ヒト DMD と共通であった。

考察

シングル核 RNA-seq を用いた解析により、DMD 患者筋における筋サテライト細胞では、同年齢のコントロールと比較した場合、数は変わらず、その殆どが休止状態にあることが明らかとなった。これまで mdx マウスなどを用いた研究から DMD 病態では筋サテライト細胞はマクロファージなどの炎症性細胞が産生するサイトカインなどに応答し、活発に増殖するものと考えられてきた。しかしながら今回の結果では炎症性細胞数が増加している環境においても筋サテライト細胞は増殖せず、筋再生に寄与しないということが明らかとな

った。この発見は、幹細胞治療を考える上で非常に重要な発見である。また、これらの筋サテライト細胞では X の発現が上昇していることを見出した。X は筋サテライト細胞においては休止状態を維持する重要な転写因子であることが近年報告されている。どのようなシグナルが DMD の病態において X を活性化しているかは今の所不明であるが、X が重要な治療ターゲットになり得るため、今後さらに詳細に解析を進める計画である。

結論

DMD 患者筋における筋サテライト細胞は殆どが休止状態にあることが明らかとなった。これらのサテライト細胞では遺伝子 X の発現が高く、モデルマウスである D2-mdx マウスでも同様に発現が亢進されており、重要な治療ターゲットとなり得ることが考えられた。

参考文献

1. Michael Kottlors, Janbernd Kirschner. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res*. 2010 Jun;340(3):541-8.
2. Boldrin L, Zammit PS, Morgana JE. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res*. 2015 Jan; 14(1): 20–29.
3. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. *Am J Pathol*. 2010 May;176(5):2414-24.

新規治療開発に有用な臨床情報の抽出

国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科 森まどか

緒言

Dystrophinopathy は筋骨格を担う dystrophin 遺伝子変異によって生じる筋疾患で、重症な Duchenne 型 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) と軽症な Becker 型 (Becker Muscular Dystrophy, BMD)、および中間型 (Intermediate Muscular Dystrophy, IMD) とそれぞれの保因者から成る。近年、DMD の骨格筋・心筋障害に対する新規および既存集学的治療が導入され、筋障害に対する予後は改善していくことが期待出来る。しかし、dystrophinopathy は中枢神経障害も伴っておりこちらも治療が必要な可能性があるが、病態・病状や自然歴が十分解明されているとは言えない。Dystrophinopathy の中枢神経障害について現状・背景因子を調査することを目的とした。また、dystrophinopathy は DMD のみならず軽症型の Becker muscular dystrophy (BMD)、女性ジストロフィン異常症の表現型も知られるが、DMD とこれらの表現型の連続性も検討した。

方法

1. DMD 患者について、頭部画像検査を行ったことのある当院脳神経内科患者を抽出し、偶発症を除外した頭部画像所見の特徴と臨床像との関連を探った。歩行喪失年齢・人工呼吸器装着年齢、遺伝子診断、発達障害歴、IQ が利用出来る患者についてはこれらの臨床情報との関連を検討した。
2. 女性ジストロフィン異常症患者について、当院脳神経内科患者のうち①心理検査研究 (JART (Japanese Adult Reading Test) 、WAIS (Wechsler Adult Intelligence Scale) 、CES-D (The Center for Epidemiologic Studies Depression Scale) 、STAI (State-Trait Anxiety Inventory) 、SF36 (MOS short form 36 health survey))、IQ や抑うつ傾向、不安、精神状態について検討し、精神疾患やいじめ被害も評価した。②カルテ調査による画像の後ろ向きデータを収集した。

結果

1. 当院脳神経内科受診歴のある dystrophinopathy 患者のうち 12 歳以下で歩行喪失した 92 名のうち、画像検査が行われたのは 41 名、うち脳血管障害

の合併があった 2 名を除外し 39 名だった。画像検査の平均年齢 24.9 ± 76.6 (13-38, median 24)、歩行喪失年齢 9.8 ± 1.6 (7-12, 10) 歳、37 名が人工呼吸器利用しており導入年齢 19.9 ± 4.8 (12-32, 19) であった。

検査人数は頭部 MRI 13 名、頭部 Single Photon Emission CT (SPECT) 17 名、頭部 CT 32 名、SPECT は全例 CT と同時撮影されていた。MRI では 13 名中 7 名、CT では 32 名中 20 名に前頭葉優位の脳萎縮が見られたが、萎縮と IQ や発達障害の間に有意な関連は見られなかった。12 例で 3 年以上の間隔を開けて CT が撮像され、6 名で萎縮の悪化が見られた。SPECT では全例に局所の血流低下を認め、18 例中 17 名は前頭葉だった。同時撮像 CT では血流低下部位主体の軽度の脳萎縮を 18 例中 9 例に認めた。CT と MRI の間に所見の乖離は見られなかった。1 名のみ経時的に SPECT が検索され、17 歳から 22 歳の間で血流低下の増悪が見られた。

遺伝子変異との関係で、dystrophin の isoform である Dp140 を欠くことが想定される変異を持っている患者は、CT で有意に萎縮を呈した。

2. 女性ジストロフィン異常症について、① 8 名 (平均年齢 37.5 歳)、平均病前推定 IQ は 87.8 ± 15.4 (68.2-107.1)、平均全検査 IQ は 70.8 ± 7.6 (58-78)、7 人中 3 人に抑うつ傾向、7 人中 6 人が状態不安・特性不安とも高く、SF36 では身体的、精神的、役割/社会的側面の QOL サマリースコアである PCS、MCS、RCS の全てにおいて、7 人中 4 人以上が国民平均以下の点数であった。精神疾患の既往ないし罹患のある患者は 5 名 (パニック障害 2 名、うつ病 1 名、不安障害 1 名、自閉症スペクトラム 1 名) であった。② 後ろ向き研究では 56 名中 21 人の中枢神経画像を得ることが出来た。対象の平均年齢は 44.6 ± 14.1 歳、genotype は in-frame 4、out-of-frame 10、不明 7 であった。MRI では 1 名のみ前頭葉萎縮を認めた一方、脳血流 SPECT には検査した 6 名全員何らかの異常を認め、1 例に全脳血流の、5 例に前頭葉血流の低下が見られた。

考察

DMD 患者の SPECT 検査では全例、CT 検査では 32 例中 20 例、MRI では 13 名中 7 例に脳萎縮を認め、進行性が示唆された。Dp140 は CT 萎縮例で発現していない割合が高かったが、全例ではなく萎縮を説明する要因は他にも存在する。

DMD に対する画像検査は通常の T1、T2 画像等では異常を認めず、拡散テンソル MRI [Doorenweerd 2014] や MRI 脳血流画像 [Doorenweerd 2017]、PET [Lee 2002] など臨床の間では使用しにくい方法だった。過去に DMD に対し保険収載されているこれらの検査方法で異常を検出した研究はない。本研究で異常の頻度が高かった理由として、対象患者が成人であり年齢が高かった可能性がある。今後は機能との関係や経時的变化を精査する予定である。

今回、SPECT が前頭葉優位の脳血流低下を呈し、脳萎縮に先行したことから、SPECT が最も鋭敏かつ早期に DMD の中枢神経障害を抽出できると考える。

女性ジストロフィン異常症の結果も、基本的には DMD や我々が報告した BMD [Mori-Yoshimura 2019] の結果に類似した萎縮・血流低下を呈していた。特筆すべきは、はるかに身体障害が軽症な女性ジストロフィン異常症患者においても、重篤な心理的・精神的な問題が生じていることである。これらが、女性ジストロフィン異常症特有の分子病態にもとづく器質的な異常であるか、環境因子がもたらす二次的なものであるかどうか、さらなる精査と背景因子の解明、DMD、BMD 患者との比較検討を行う必要がある。

研究の限界として、検査バイアス、高次機能評価が不十分であること、DMD では進行につれ MRI や SPECT 検査が困難になることから再検が難しいことがある。CT は比較的拘束時間が短く人工呼吸器を利用しながら検査できるため継続検査法として有用と考えた。

結論

DMD 患者の過半数に前頭葉優位の脳萎縮・脳血流低下が見られ、進行性である可能性がある。女性ジストロフィン異常症でも男性患者同様の画像異常が見られるが、精神的な影響が男性患者より大きい傾向があることに配慮を要する。

参考文献

1. Doorenweerd N, Straathof CS, Dumas EM, Spitali P, Ginjaar IB, Wokke BH, et al. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2014;76:403-11.
2. Doorenweerd N, Dumas EM, Ghariq E, et al. Decreased cerebral perfusion in Duchenne muscular

dystrophy patients. *Neuromuscul Disord.* 2017 ;27:29-37.

3. Lee JS, Pfund Z, Juhász C, et al. Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. *Muscle Nerve.* 2002 26:506-12

4. Mori-Yoshimura M, Mizuno Y, Yoshida S, et al. Psychiatric and neurodevelopmental aspects of Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2019;29:930-939.

疾患 iPS 細胞を利活用した神経筋疾患の病態解明

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第五部

若月 修二

緒言

神経筋接合部 (Neuromuscular junction, NMJ) は運動ニューロンの神経終末と骨格筋細胞をつなぐシナプスである。NMJ 形成メカニズムを明らかにする研究は、これまで主にマウスなどの実験動物モデルを用いて進められ、さまざまな有用な知見が得られてきた。そのなかで見つかった NMJ 形成に関わる分子群はヒトにおいても極めて重要であり、遺伝子変異によるそれら分子群の機能の変容・喪失は先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes, CMS) などの筋疾患の発症と強く関連することも明らかにされている一方、NMJ の形態や分子構成を詳細に比較検討した研究報告では、ヒトとマウスとの間に明確な違いがあることが示唆されている。これらのことから、ヒト細胞を用いた NMJ モデルを開発することはヒトの NMJ 形成メカニズムを扱えるという点で、CMS などの病態解明ならびに治療法開発において極めて有用であると考えられる。本研究では、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) を分化させた運動ニューロン、骨格筋細胞の共培養により、形態的・組織化学的に NMJ と判断される構造を作出し、NMJ 構造作出の再現性、ならびに運動ニューロン側の電気的興奮による筋管側の応答性を有する、構造的・機能的評価に資するヒト NMJ モデルの確立を目指した。

方法と結果

ヒト iPS 細胞を分化させた運動ニューロン、骨格筋細胞を個別に誘導し共培養した。共培養には Campenot チャンバーを用いた区画化培養法を採用し、運動ニューロン、骨格筋細胞を個別の培地で栄養することにより、従来と比べて長期の培養

期間を実現した。本培養モデルを用い、NMJ 構造作出、運動ニューロン側の電気的興奮による骨格筋細胞 (筋管) 側の応答を検討した。本年度は論文発表に向けた培養技術の精度向上に取り組み、NMJ 構造作出の再現性、ならびに運動ニューロン側の電気的興奮による筋管側の応答性を有する、構造的・機能的評価に資するヒト NMJ モデルの確立した

考察

本研究で開発したヒト細胞を用いた NMJ モデルは、NMJ 構造作出の再現性、ならびに運動ニューロン側の電気的興奮による筋管側の応答性を有しており、構造的・機能的評価に資すると期待できる。CMS などの患者由来細胞に本モデルを適用することは十分可能である。このように本培養モデルは、神経筋疾患の病態生理の理解、ならびに治療法の探索に極めて有用なツールとなると考えている。

結論

NMJ 構造作出の再現性、ならびに運動ニューロン側の電気的興奮による筋管側の応答性を有する、構造的・機能的評価に資するヒト NMJ モデルの確立した

参考文献 (業績)

1. [Wakatsuki S.](#), Takahashi Y., Shibata M., [Araki T.](#) Selective phosphorylation of serine 345 on p47-phox serves as a priming signal of ROS mediated axonal degeneration. *Exp Neurol.* 352: 114024. (2022)
2. Numata-Uematsu Y., [Wakatsuki S.](#), Sakai K., Ichinohe N., [Araki T.](#) In vitro myelination using explant culture of dorsal root ganglia: an efficient tool for analyzing peripheral nerve differentiation and disease modeling. *PLoS One.* in press.
3. [Wakatsuki S.](#) and [Araki T.](#) Novel insights into the mechanism of reactive oxygen species-mediated neurodegeneration *Neural Regen Res.* 4: 746–749. (2022)

筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の開発

鈴木 友子

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

筋幹細胞は、筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の細胞源として期待されている。骨格筋幹細胞である筋衛星細胞（サテライトセル）の自己複製や静止期の維持がどのように制御されているかを理解することは、細胞移植法の確立のために重要である。我々は既にプロスタグランジン E2 受容体の一つ EP2 がヒト前駆細胞の自己複製を制御することを報告している（文献 1）。そこで令和 4 年度は、プロスタグランジン受容体 EP2 の筋衛星細胞における役割を、EP2 遺伝子のコンディショナル・ノックアウト (cKO) を作出して解析した。

方法

1. EP2 を筋衛星細胞特異的に欠損するマウスの作成
EP2 flox マウスと Pax7^{CreERT2} マウスを交配し、Pax7^{CreERT2/+}; EP2^{flox/flox} マウスを作出した。Pax7^{CreERT2/+}; EP2^{+/+} マウスをコントロールとした。タモキシフェンを腹腔内投与し筋衛星細胞特異的に EP2 遺伝子を不活化した。
2. 筋衛星細胞数の測定
マウス骨格筋から単核細胞を調整し、筋衛星細胞のフラクションを FACS で解析した。また長趾伸筋からコラゲナーゼで単離した筋線維を 4%PFA で固定し、Pax7 抗体で染色し、筋線維あたりの筋衛星細胞の数を調べた。更に前脛骨筋の横断切片を M-カドヘリン抗体と抗ラミニン $\alpha 2$ 鎖抗体で二重染色し、Keyence 蛍光顕微鏡で撮像し、単位面積当たりの筋衛星細胞を計測した。
3. 筋衛星細胞の増殖能と分化能の解析
FACS を用いてマウスの骨格筋から筋衛星細胞を単離し、培養した。増殖能は EdU の取込みで判定した。また、細胞数をそろえて播種し、分化培地で培養して fusion index を計測した。
4. EP2 KO マウスの筋再生能の検討
EP2 cKO 及びコントロールマウスの前脛骨筋に BaCl₂ を注射して、筋壊死を引き起こし、筋再生を比較した。
5. 筋衛星細胞の活性化の *ex vivo* 評価
単離した筋線維を増殖培地中で 30 時間浮遊培養した後、PFA で固定し、Ki67 抗体と Pax7 抗体で二重染色し、セルサイクルに入った筋衛星細胞の割合を計測した。

結果

1. タモキシフェンを投与した EP2 cKO とコントロールマウスの体重や後肢筋（大腿四頭筋、腓腹筋、前脛骨筋）の重量には差がなかった。
2. 筋衛星細胞の数を 3 つの異なる方法で計測したが、いずれの評価法でも EP2 cKO マウスにおいて、約 30% の減少が確認された。
3. EP2 を欠損する筋衛星細胞とコントロールの筋衛星細胞の間に増殖能の差は認められなかった。Fusion index は EP2 cKO マウスでやや高く筋前駆細胞の融合が促進していた。
4. EP2 cKO マウスとコントロールマウスの前脛骨筋を BaCl₂ で傷害すると、単回の傷害では差がなかったが、2 回の筋傷害では EP2 cKO マウスの筋線維径が有意に減少し、筋再生が障害されていることが示唆された。
5. EP2 を欠損する筋衛星細胞は、単離された筋線維上で、コントロールよりも早くセルサイクルに入ることが明らかになった。PGE2 を培地に添加すると、筋衛星細胞の活性化を抑制した。EP2 cKO マウスでは PGE2 の効果は認められなかった。

考察

筋衛星細胞は、通常は静止期 (Go) に維持されることでその数や stemness を維持している。我々は Notch によって発現が増強する EP2 が、筋衛星細胞の活性化を抑制していること、EP2 欠損で筋衛星細胞の数が減少することを明らかにした。EP2 により、筋衛星細胞の活性化がどのように抑制されるのか、その分子機構は明らかではないが、Notch による筋衛星細胞の維持機構の一端が明らかとなった。今後は筋衛星細胞の維持に関与すると報告されている他の分子やシグナルと EP2 シグナルの関連を解析する必要がある。30% 程度の筋衛星細胞の減少では、筋重量には変化がなかったが、筋再生過程は障害されていた。筋ジストロフィーは繰り返す筋壊死・筋再生を特徴とする。そこで今後は EP2 cKO マウスと mdx マウスとの交配を行い、EP2 が減少すると、筋ジストロフィーの病態に対してどのような影響があるかを検討する予定である。

結論

プロスタグランジン E2 受容体の一つである EP2 が骨格筋幹細胞である筋衛星細胞の静止期の維持に重要な働きを持っていることが明らかになった（論文準備中）。

参考文献

1. Sakai-Takemura F, et al., *Commu. Biol.* 3, 182. 2020.

筋ジストロフィーに対する汎用性の高いゲノム編集修復技術の開発研究

堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異が原因となって引き起こされる。したがって、この原因たる遺伝子変異を修復できれば根治に繋がると期待される。しかしながら、ジストロフィン遺伝子は巨大で、従来の遺伝子治療用ベクターでは導入することは困難であった。一方、アンチセンスオリゴを利用してジストロフィン遺伝子の特定のエクソンをスキッピングさせることによりジストロフィンの蛋白質読み枠を回復できることが知られており、世界中で研究開発と臨床研究が進められている。しかしながら、アンチセンスオリゴは mRNA に作用するため、効果は一過性であり、治療効果を生涯にわたって継続させるためには、頻回繰り返し投与が必要となる。そこで我々は、新たに登場した CRISPR ゲノム編集技術に注目し、ゲノムレベルでエクソンスキッピングを誘導する事を目指す。

我々は以前、DMD 患者由来 iPS 細胞において、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いたエクソンスキッピングによってジストロフィンの遺伝子変異を修復できることを報告した[Li HL et al., Stem Cell Reports, 2014]。また、我々の報告と前後して、他の複数の研究チームもゲノム編集技術を利用したジストロフィンのエクソンスキッピングを mdx マウスやイヌ、ブタモデルで報告している。

しかし、DMD 患者においては変異エクソンがジストロフィン遺伝子上の広範囲に分布しており、単一のエクソンを標的としたエクソンスキッピングでは、最大でも十数%程度の患者にしか適応できない。この狭い適応範囲を拡大するためには、変異エクソンが集積するエクソン 45 からエクソン 55 の領域を一度にスキップさせる“マルチエクソンスキッピング”が有効であることが示されている[Aoki Y., et al., PNAS, 2012 | Young, C. S. et al. Cell Stem Cell, 2016]。しかしながら、CRISPR-Cas9 を用いた微小 DNA 欠失誘導では、340 kb もの巨大領域に跨る複数のエクソンを同時に欠失させることは難しい。

この問題に対し我々は、数 kb から数十 kb の DNA

切断誘導が可能である CRISPR-Cas3 [Morisaka et al., Nat Commun, 2020]に着目し、ゲノム上で巨大欠失を誘導することで、多数の DMD 患者に適応可能なマルチエクソンスキッピング誘導方法を開発に取り組んだ。

方法

ヒトジストロフィン遺伝子の標的エクソンにてエクソンスキッピングが誘導された場合に発光するルシフェラーゼを用いたレポーターベクターを構築し、高効率でエクソンスキッピングを誘導しジストロフィンタンパク質を修復可能な CRISPR-Cas3 の crRNA 配列を検討した。また、複数の構成員子からなる CRISPR-Cas3 システムを標的細胞へ導入して適切に発現させるために、6 つの構成タンパク質と crRNA を適切に発現させる発現ベクターを構築した。これら CRISPR-Cas3 の crRNA を 2 つ組み合わせた Dual-Cas3 システムを試すことで、340 kb のゲノム DNA を切断可能か、DMD 患者由来 iPS 細胞を用いて検証を行った。

結果

ジストロフィン遺伝子領域の切断を効率的にモニターできる ddPCR 系を用いて、細胞ベースでのゲノム切断効率および切断領域の定量的検証を行った。CRISPR-Cas3 を搭載し発現するベクターを、3名の DMD 患者由来 iPS 細胞株に導入し、ゲノムレベルでの切断効率を測定した後、筋繊維へと分化誘導することで、エクソンスキッピング効率およびジストロフィン蛋白質の回復効率を検証した。その結果、目的のマルチエクソンスキッピングが誘導できた iPS 細胞株において、ジストロフィンタンパク質の回復を確認することが出来た。

考察

3名の異なる変異を持つ DMD 患者由来 iPS 細胞において、単一の crRNA ペアでジストロフィンタンパク質を回復させることに成功し、汎用性の高い遺伝子変異修復方法になると考えられる。

結論

Dual-Cas3 システムを利用することにより、340kb もの巨大なゲノム DNA 領域を欠失させ、マ

ルチエクソンスキッピングによる汎用性の高いジストロフィンタンパク質修復方法の開発に成功した。現在、論文執筆を準備中である。

参考文献

Li HL et al., Stem Cell Reports, 2014

Aoki Y., et al., PNAS, 2012

Young, C. S. et al. Cell Stem Cell, 2016

Morisaka et al., Nat Commun, 2020

筋ジストロフィー治療のための間葉系前駆細胞制御法開発

上住聡芳
九州大学

緒言

骨格筋の主たる構成細胞は筋線維で、収縮することにより筋力の発生源となっている。筋ジストロフィーなどの筋疾患では、骨格筋内に脂肪細胞や線維性結合織が形成されるが、これらには収縮能がないため筋力低下の要因となり、病態をさらに進行させる。また、脂肪化・線維化は、開発中の筋ジストロフィーに対する治療法（細胞移植治療や遺伝子治療）の効率を低下させることにもつながるため問題となる。分担研究者らは、骨格筋の脂肪化・線維化が、筋間質に存在する間葉系前駆細胞に起因することを明らかにしてきた^{1, 2)}。間葉系前駆細胞を標的として脂肪化・線維化を抑制することは、筋力・筋機能の改善をもたらすと考えられる。病態に寄与するだけでなく、間葉系前駆細胞は筋衛星細胞の機能を支持し、筋再生を促進する性質も併せ持つことがわかっている。そこで本研究では、間葉系前駆細胞を制御することにより脂肪化・線維化病態を抑制、および、筋衛星細胞による筋再生を促進し、筋ジストロフィーに対する新たな治療法へと発展させることを目的とする。

方法

本研究では、間葉系前駆細胞を制御することで脂肪化・線維化を抑制し、筋再生を促進する筋ジストロフィーの治療法開発を目指す。

すでに、間葉系前駆細胞の二面性の解析、および、ヒト骨格筋由来の高品質な間葉系前駆細胞を利用した薬剤スクリーニングから、レチノイン酸シグナルが間葉系前駆細胞の病的表現型を抑制することを見出している。そこで、間葉系前駆細胞特異的なレチノイン酸シグナル阻害マウスを作製し、その表現型を精査することで、筋再生におけるレチノイン酸シグナルの機能的意義を明らかにし、本シグナル経路を利用した、筋ジストロフィーに対する新たな治療法開発を目指す。

結果

間葉系前駆細胞特異的レチノイン酸シグナル阻害マウスに筋損傷を誘導すると、筋再生に不全を来した。間葉系前駆細胞におけるレチノイン酸シグナルの機能的意義を明らかにするため、RNA-seqによって間葉系前駆細胞特異的レチノイン酸シグナル阻害マウスの間葉系前駆細胞で発現変動する遺伝子を絞り込んだ。その結果、レチノイン酸シグナルが阻害された間葉系前駆細胞では、炎症関連遺伝子が高発現していた。これらのことから、間葉系前駆細胞はレチノイン酸シグナル依存的に炎症を収束させる機能を果たしていると示唆された。

考察

分担研究者らは、独自の着眼点から間葉系前駆細胞におけるレチノイン酸シグナルの重要性を見出し研究を進めてきたが、海外のグループから、間葉系前駆細胞におけるレチノイン酸シグナルが正常な筋再生に必要ということを示す論文が発表されてしまった³⁾。しかし、間葉系前駆細胞におけるレチノイン酸シグナルがどのようにして筋再生に寄与しているのか、そのメカニズムは依然として不明であったため、分担研究者らは本シグナル経路について、さらに研究を進めた。その結果、間葉系前駆細胞が炎症の収束を担うという新機能を見出した。

結論

間葉系前駆細胞におけるレチノイン酸シグナルは炎症の収束に重要となることが明らかとなった。

参考文献

- 1) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12(2):143-52. 2010.
- 2) Uezumi A, Ito T, Morikawa D et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124(Pt 21):3654-64. 2011.
- 3) Zhao L et al., Retinoic acid signalling in fibro/adipogenic progenitors robustly enhances muscle regeneration. *EBioMedicine* 60:103020. 2020.

筋サテライト細胞を用いた筋ジストロフィー治療開発の基盤研究

一筋ジストロフィーが進行性の病態を示すメカニズム解明にむけた取り組み

深田 宗一郎

大阪大学大学院薬学研究科

再生適応学分野

中村 彩沙*, 岩森歌奈子*

上住 聡芳**

*大阪大学大学院薬学研究科

再生適応学分野

**徳島大学医歯薬研究部

緒言

骨格筋は繰り返し損傷を受けても再生する驚異的な能力を持っている。この能力を可能にしているのが、骨格筋固有の組織幹細胞である Pax7 陽性のサテライト細胞 (MuSC) の存在である[1]。骨格筋が損傷すると、MuSC が速やかに活性化・増殖・分化し筋線維を再構築と同時に、MuSC が自己複製する[2]。一方、筋ジストロフィー患者では、病態の進行に伴い、再構築される筋線維数が減少する。これは MuSC の自己複製能力を含む再生能力の低下によるものだと考えられている。しかし、筋ジストロフィーの病態進行において、どのように再生能力が低下するのかは長年の課題であった。

再生能力の低下した筋ジストロフィー患者では、進行性の脂肪化・線維化領域が増大、筋線維領域の減少がみられ、結果的に筋機能を果たすことが困難となる。核酸医薬や遺伝子治療は筋線維の存在により始めてその治療効果を発揮するため、病態進行の抑制法開発は切望されている。

骨格筋の線維化・脂肪化の原因細胞は、Pdgfra (Platelet-derived growth factor receptor alpha) 陽性の間葉系前駆細胞である[3,4]。また、TGF- β は線維化促進、脂肪化抑制に働く事が予想される多能性のサイトカインであるが、間葉系前駆細胞における TGF- β の生理的な作用は理解されていない。本年度は、間葉系前駆細胞特異的な TGF- β の受容体阻害マウスを作製し、解析を行った。

方法

マウス

Pdgfra^{CreERT}, Tgfb2^{lox}, Rosa^{DTA} マウスを当該施設の倫理規定に従い飼育、交配、実験を行なった。

筋再生モデル

三種混合麻酔下で、*Naja pallida* 由来の Cardiotoxin (CTX) を 50-100 μ L 右前脛骨筋に投与した。Cardiotoxin は PBS に溶解して最終濃度 10 μ M で使用した。対側の左前脛骨筋は非再生のコントロールとして用いた。

免疫組織化学染色

厚さ 6 μ m で作製し風乾させた薄切切片を 4% PFA/PBS にて 10 分間インキュベートし固定した。0.1% Triton-X/PBS で 3 回洗浄後、0.5% Triton-X/PBS にてインキュベートし可溶化を行った。PBS で 3 回洗浄した後、5% スキムミルク/PBS を 37°C 条件下にて 1 時間インキュベートし Blocking を実施した後、一次抗体希釈液を滴下し 4°C 条件下で一晩インキュベートした。翌日、洗浄後、二次抗体を反応させ、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 にて観察・撮影を実施した。

定量的・統計解析

Hybrid Cell count や Image J などを用いて、取得した画像解析を実施した。2 群間の統計的有意性は Student's *t*-test により評価した。2 群以上の比較では、*non-repeated measures analysis of variance (ANOVA)* の Tukey's multiple comparisons test を用いた。有意水準を 5% ($p < 0.05$) とした。統計解析とグラフ化はいずれも GraphPad Prism8 (GraphPad Software) を用いて行った。

結果

1. α -cKO マウスの 1 度の再生能力の検討

間葉系前駆細胞特異的 Tgfb2 変異マウス (α -cKO; *Pdgfra^{CreERT}::Tgfb2^{lox/lox}*) に CTX を用いて 1 回の再生を誘導した場合、コントロールと同等の数・サイズの筋線維が再構築された。最も顕著な差は、 α -cKO では再生後の Pax7 陽性 MuSC の数がコントロールの約半分になっていた。

2. α -cKO マウスの繰り返し再生能力の検討

α -cKO に CTX を用いて 3 度の再生を誘導した場合、コントロールと比較して、 α -cKO では顕著

な筋線維数・サイズの減少などの劇的な再生不全が観察された。P α -cKO では3度の再生後の Pax7 陽性 MuSC がほとんど存在しないことも明らかとなった。

3. P α -DTA マウスの繰り返し再生能力の検討

間葉系前駆細胞は病態形成に関与するだけでなく、通常の筋再生などにおいては MuSC の増殖を促進するなどの正の機能も有している[5,6]。P α -cKO の結果がこの間葉系前駆細胞の再生促進作用の欠如によるものかを検証するために、間葉系前駆細胞欠損マウス(P α -DTA; *Pdgfra*^{CreERT}::*Rosa*^{DTA}) に CTX を用いて3度の再生を誘導した場合、コントロールと比較して、若干の再生不全は観察されたが、P α -cKO と比較して、その表現型はマイルドであった。

4. P α -cKO における脂肪細胞の蓄積

TGF- β シグナルは、脂肪分化抑制、線維化促進に働くことが知られているため、P α -cKO マウスの再生不全での脂肪細胞の蓄積に着目した。脂肪細胞のマーカである Perilipin に対する抗体で、CTX1, CTX3 のサンプルを解析したところ、コントロールでは、どちらのサンプルも Perilipin 陽性領域は存在しないが、P α -cKO では再生を誘導するたびに、劇的に Perilipin 陽性領域が増加することがあきらかとなった。

考察

本年度の成果により、TGF- β シグナルは間葉系前駆細胞の脂肪分化を抑制する生理的な因子であることが明らかとなった。また、本研究より、間葉系前駆細胞における TGF- β シグナルの欠損が、遺伝的に正常である MuSC の自己複製を顕著に阻害することが明らかになった。今回の結果は、筋ジストロフィー患者でみられる進行性の再生能力低下は、脂肪細胞などの再生を阻害する環境 (Pathological niche) の出現により、MuSC の自己複製能が抑制され、さらなる Pathological niche の出現を生み出している可能性が示唆された。Pathological niche 出現に寄与するメカニズム解明さらには、その抑制法の開発により、筋ジストロフィーの病態進行を抑制する薬剤開発につながる事が強く期待された。

結論

- TGF- β シグナルは間葉系前駆細胞の脂肪分化を抑制する生理的なシグナル経路である。
- 間葉系前駆細胞の TGF- β シグナル欠損により、MuSC の自己複製能が低下する。
- MuSC の自己複製能低下は、間葉系前駆細胞由来脂肪細胞などが原因である。

参考文献

- 1 Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000;102(6):777-786.
- 2 Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M et al. Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development* 2015;142(1):51-61.
- 3 Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010;12(2):143-152.
- 4 Uezumi A, Ito T, Morikawa D et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 21):3654-3664.
- 5 Kaneshige A, Kaji T, Zhang L et al. Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load. *Cell Stem Cell* 2022;29(2):265-280 e266.
- 6 Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H et al. Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J Clin Invest* 2021;131(1):e139617.

筋組織を標的化する核酸医薬デリバリーシステムの開発

宮田 完二郎、内藤 瑞
東京大学大学院工学系研究科

マテリアル工学専攻/バイオエンジニアリング専攻

緒言

筋ジストロフィーに代表される難治性筋疾患治療に向けては、疾患原因遺伝子の発現を選択的に調節することができる核酸医薬に大きな注目が集まっている。一方で、核酸医薬などの中分子医薬は、血流を通じて腎臓から速やかに排泄されるため、筋組織への集積効率が非常に低いことが課題として挙げられる。

本研究では、核酸医薬を効率良く筋組織に集積させることを目指し、核酸医薬デリバリーシステム(モデル)の開発に取り組んだ。前年度までに、サイズが10–20 nmの高分子材料(高分子ナノルーラーと命名)は全身投与を介して効率良く筋組織に集積することを明らかにした^[1]。そこで本年度は、その集積効率をさらに改善すべく高分子ナノルーラーヘリガンド分子を導入し、体内動態への寄与を評価した。

方法

高分子ナノルーラーの合成

10–20 nm 径にサイズが制御された「高分子ナノルーラー」として、ポリエチレングリコール(PEG)がポリアスパラギン酸(PAsp)の側鎖に導入されたグラフト共重合体 PAsp-g-PEG を合成した。この際、PEGの先端にリガンド分子Xを導入することで、「リガンド搭載高分子ナノルーラー(PAsp-g-PEG-X)」を合成した。また、各 PAsp-g-PEG-X を蛍光標識することで、体内動態評価を可能とする設計とした。

臓器分布

各種蛍光標識 PAsp-g-PEG-X を健常マウスの尾静脈より投与し、一定時間経過した後に、各種臓器を摘出・ホモジナイズし、組織懸濁液の蛍光強度を測定した。得られた各時間の蛍光強度値に基づいて臓器分布(dose %/g tissue)を算出した。

筋組織切片観察

蛍光標識 PAsp-g-PEG-X を健常マウス尾静脈より投与し、一定時間後に組織を摘出・切片を作成し、核および細胞膜を染色した後に蛍光顕微鏡観察を行った。

結果と考察

¹H NMRによる解析から、狙った組成のリガンド導入高分子ナノルーラー(PAsp-g-PEG-X)が得られたことを確認した。次いで、得られた PAsp-g-PEG-X の臓器分布を評価したところ、Xとして糖分子リガンドを有する PAsp-g-PEG-X1 は、リガンド導入率に依存して骨格筋組織への集積量を増加させる傾向が認められた。具体的には、導入率25%において最大値を示し、0%(リガンドなし)と比較して約2倍高い骨格筋組織集積量となった。

一方、糖鎖を認識するリガンドを導入した PAsp-g-PEG-X2 においては、骨格筋への集積量は0%と比して2倍程度であったが、興味深いことに心臓に対して6倍近い増加が認められた。そこで、PAsp-g-PEG-X2 の心臓への集積挙動を組織切片観察により調べたところ、心臓の組織全体に均一に分布している様子が観察された。X2 リガンドが心臓への組織集積量を大きく改善したメカニズムに関しては現在調査中である。

以上、本研究を通じて、10–20 nm サイズの高分子ナノルーラーにリガンド分子を導入することで、筋組織などへの集積性を有意に改善できることが明らかになった。

参考文献

[1] M. Naito, K. Miyata, et al., Size-tunable PEG-grafted copolymers as a polymeric nanoruler for passive targeting muscle tissues. *J. Control. Release* 347 607–614 (2022).

研究課題名：疾患モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

分担研究課題名：筋量制御におけるプロスタグランジンの関与

東京農工大学 工学研究院 稲田 全規

緒言

本研究の目的は、筋量制御におけるプロスタグランジンファミリー因子の機能を解析し、廃用性筋萎縮、筋ジストロフィー、サルコペニアなどの筋萎縮性疾患の治療法の開発につなげることである。プロスタグランジンであるPGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α の産生動態と機能解析を行い、筋萎縮の主因となっているプロスタグランジンを解析し、標的となるそれぞれのプロスタグランジンの産生阻害剤を用い、筋萎縮性疾患の治療薬開発を目指して進めた。

検討項目：

筋組織におけるプロスタグランジン検出

プロスタグランジン(PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α)の検出法について、プロスタグランジンのイオン化最適条件の決定と質量分析イメージングへの適用条件を決定した。この測定方法を用いて、筋組織におけるプロスタグランジンの分布を解析するため、筋サンプルの最適化を実施した。液体クロマトグラフィーを用いた分子カラムワークの後に、質量分析装置を用い、筋組織において産生されるプロスタグランジンとして、PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α の産生を解析した。

筋萎縮モデルマウスにおけるプロスタグランジンの産生動態

筋萎縮モデルマウスとして、尾部懸垂マウスを用い、筋組織サンプルとして下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を作製した。また、これまでに確立した質量分析法を用いた定量解析法を用い、筋組織におけるプロスタグランジン産生を検出・同定した。さらに、RNA-seq解析を行い、プロスタグランジン産生に関わる各種酵素、受容体、筋形成遺伝子、筋分解遺伝子などの遺伝子発現解析を合わせて行った。その結果、

プロスタグランジンの関連遺伝子は筋萎縮とともに変動することが明らかとなった。

結論

本研究課題では、筋組織におけるPGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α ファミリー因子の産生動態を質量分析を駆使して、その検出法の予備検討と測定を行った。これらの結果、下腿三頭筋および大腿四頭筋の切片を用い、筋組織において産生されるプロスタグランジンとして、PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α の産生を解析した。また、筋萎縮におけるプロスタグランジンの産生解析では、尾部懸垂マウスにおける筋萎縮の進展に伴って、PGE2とPGD2が産生されることを見出し、質量分析によりPGE2とPGD2産生細胞での共発現が認められた。そこで、詳細な検討を進め、RNA-seq解析により、筋萎縮や筋形成に関わるプロスタグランジン合成酵素の遺伝子発現が変動することを明らかとした。

また、今後に向けて、筋萎縮モデルマウスにおけるプロスタグランジン阻害剤の効果の予備的試験を行った。標的プロスタグランジン候補の産生阻害剤を尾部懸垂マウスに投与し、筋萎縮への効果解析を進めている。

最終的には、筋萎縮や筋形成に関わるプロスタグランジン合成酵素関連の遺伝子発現の解析を進め、筋萎縮性疾患治療薬の創薬起点へとつなげたい。

参考文献

1. Tominari T, Akita M, Matsumoto C, Hirata M, Yoshinouchi S, Tanaka Y, Karouji K, Itoh Y, Maruyama T, Miyaura C, Numabe Y, Inada M. Endosomal TLR3 signaling in stromal osteoblasts induces prostaglandin E2-mediated inflammatory periodontal resorption. (2022) *J. Biol. Chem.* 298:101603.
2. Tominari T, Ichimaru R, Taniguchi K, Yumoto A, Shirakawa M, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Itoh Y, Shiba D, Miyaura C and Inada M. Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass mice. (2019) *Sci. Rep.* 9: 6614.

分担研究課題名：DMD に対する遺伝子細胞治療の基盤技術開発

岡田 尚巳
東京大医科学研究所
遺伝子・細胞治療センター
分子遺伝医学分野

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対する根治療法は未だ開発段階で薬物治療による対症療法が主であるが、AAV を用いた遺伝子治療の開発が期待される。本研究では、*mdx* マウスや筋ジストロフィー犬 CXMD₁ に対しマイクロ・ジストロフィン発現 AAV ベクター (AAV- μ Dys) を用いたマイクロ・ジストロフィン補充療法の開発を進めることを目的とする。AAV を用いた遺伝子治療において、transgene に対する免疫応答が問題となっている。この課題を克服するために、1) 固相支持担体を用いた AAV 発現培養系の構築、2) 治療遺伝子の配列最適化、3) カニクイザルでの検討、4) Exosome-AAV (Vexosome) を用いた検討を行った。

方法

1. 固相支持担体を用いて AAV 発現培養系の構築と大量精製法の開発を行った。
2. ヒトおよびイヌマイクロ・ジストロフィン配列の最適化を検討した。
3. カニクイザルに対して体性幹細胞と AAV8-LacZ を併用投与を行うため、AAV ベクターの大量精製を行った。
4. MSC 由来 Vexosome による無細胞系免疫寛容誘導の技術開発を行った。

結果

1. 接着細胞系で大量に細胞を培養し、AAV を作製する手段として、日本ポール株式会社の iCELLis Nano バイオリアクターおよび WAVE25 を用いて AAV の作製を行った。また、培養上清から AAV を精製する方法の開発を行った²⁾。
2. 臨床用ベクターの規格決定に向けた取り組みとして、これまで検討を行ってきた SPc5-12³⁾ に加え、CK7, 8, 9 プロモーター⁴⁾ を検討した。マイクロ・ジストロフィン配列についても、ループ構造を取りにくい配列に最適化し、発現ベクターを構築、大量精製を行い、投与実験を行う準備が整った。
3. カニクイザル成体に MSCs と AAV-LacZ を併用投与し免疫寛容を誘導する実験を行うため、AAV-LacZ を大量精製した。また、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所で飼育中のカニクイザルの血清について、AAV 中和抗体価のスクリーニングを行い、投与個体を決定した。
4. 前年度まで CXMD₁ に対し MSC と AAV の併用投与方法を用いて免疫寛容誘導の検討を行っていた項目について、MSC 由来のエクソソームを介した miRNAs、サイトカインによる免疫寛容誘導

が可能かどうかについて実験系の構築、MSC 由来エクソソームおよびベクソソームの形態をクライオ電子顕微鏡法を用いて観察した^{5), 6)}。

考察

1. ヒトおよびイヌにおける発現を最適化した AAV- μ Dys を作製し、投与実験を行うための準備が整った。
2. カニクイザルにおいて MSCs と AAV を併用投与する実験の準備が整った。
3. エクソソーム封入・結合 AAV ベクターについて、分離と定量、形態の観察を行った。

結論

ヒトおよびイヌ AAV- μ Dys の規格について検討を行い、構築、精製した。今後、これらのベクターを用いて *in vitro*, *in vivo* における発現および機能を確認し、治療用ベクターの規格を決定する。AAV ベクター投与時の免疫寛容誘導法についてはカニクイザルを用いた検討を行うが、さらに発展して MSC 由来ベクソソームを用いた無細胞系で同様の効果があるかどうかについて今後検討を行う。

参考文献

- 1) Nitahara-Kasahara Y, Nakayama S, Kimura K, Yamaguchi S, Kakiuchi Y, Nito C, Hayashi M, Nakaishi T, Ueda Y, Okada T. Immunomodulatory amnion mesenchymal stem cells preserve muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Stem Cell Research & Therapy*. in press.
- 2) Wada M, Uchida N, Posadas-Herrera G, Kinoh H, Tsunekawa Y, Hirai Y, Okada T. Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor. *Gene Therapy* 2023 Mar 28. doi: 10.1038/s41434-023-00398-x.
- 3) Li X., Eastman E. M., Schwartz R. J., et al: Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences, *Nature Biotech.*, 17:241-245, 1999
- 4) Hauser M. A., Robinson A., Hartigan-O'Connor D., et al: Analysis of Muscle Creatine Kinase Regulatory Elements in Recombinant Adenoviral Vectors, *Mol. Ther.*, 2:16-25, 2000
- 5) Matsuzaka Y., Tanihata J., Ooshima Y., Yamada D., Sekiguchi M., Miyatake S., Aoki Y., Terumitsu M., Yashiro R., Komaki H., Ishiyama A., Oya Y., U-Inoue Y., Inoue T., Takeda S., Hashido: The nSMase2/Smpd3 gene modulates the severity of muscular dystrophy and the emotional stress response in *mdx* mice, *BMC Medicine*, 18:343, 2020
- 6) Matsuzaka Y, Hirai Y, Hashido K, Okada T. Therapeutic Application of Extracellular Vesicles-Capsulated Adeno-Associated Virus Vector via nSMase2/Smpd3, Satellite, and Immune Cells in Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 23(3):1551, 2022

筋ジストロフィーモデル動物の病態に基づいたアンチセンス療法の開発

越後谷 裕介

日本大学生物資源科学部 獣医学科

緒言

RNA のスプライシング制御または分解を誘導できるアンチセンス人工核酸(ASO)は、様々な遺伝性疾患において病態の改善および進行予防を誘導する有効な手段として実用化に向けた開発が進められている¹。スプライシング制御型 ASO においては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の原因遺伝子であるジストロフィン(DMD)遺伝子のアミノ酸の読み枠修正(エクソン・スキッピング)を目的とした核酸医薬が既に上市されている。現在では DMD 遺伝子の変異ホットスポットのみならず、希少変異を標的とした ASO 開発技術が発展しており、ASO の N-of-1 医薬としての期待が高まっている^{2,3}。一方、RNA 分解作用を利用した核酸医薬については、筋強直性ジストロフィー1 型(DM1)に対して、これまでに三剤の臨床試験が実施されているが、製剤化には至っていない。

ASO の実用化促進には、効果的な修飾核酸の開発と共に、ASO の配列特異的な効果を効率的かつ正確に評価できるスクリーニング系の開発や、ASO の効果を適切に評価できる動物モデルとその詳細な特徴づけが必要とされる。有効性に関わる ASO の細胞への取り込み効率は、骨格筋細胞の状態によって異なる⁴。すなわち、より効果的な ASO 療法の開発には、加齢と共に変化する筋ジストロフィー骨格筋の分子・組織病態を正確に理解する必要がある⁵。特に、DM1 では筋肉疲労をはじめ様々な症状が老化による身体的変化と共通性が高いことが報告されているが⁶、加齢と病態メカニズムの関連性については不明な点が多い。そこで本分担研究では、DM1 モデル動物の加齢に伴う病態変化を特徴づけ、ASO 療法の開発を促進する基盤情報を得ることを目的とした。

方法

DM1 モデルマウスとして、異常 CTG リポート変異が付加された変異ヒト骨格筋アクチン遺伝子(HSALR)をホモ接合体として持つ HSALR マ

ウスを用意し、若齢期(2-6 ヶ月齢)、高齢期(12 ヶ月齢)および老齢期(18 ヶ月齢)における CTG リポートと加齢が骨格筋へ及ぼす影響について解析した。健常群には同月齢の FVB/N マウス(日本クレア)を使用した。DM1 骨格筋の損傷を非侵襲的に診断できる新たなバイオマーカーとして各月齢のモデルマウスにおける尿中タイチンを、Mouse Titin N-Fragment Assay Kit(免疫生物研究所)を用いて測定した。加齢による筋強直病態を調べるため、針筋電図検査により前脛骨筋、腓腹筋および大腿四頭筋のミオトニー放電(刺入時異常活動)を評価した。また、四肢握力を指標として、モデルマウスにおける筋強直症状の新たな評価法の確立を試みた。なお、当該動物実験は、研究実施機関に設置された動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した。

結果

HSALR マウスはメスの若齢期において健常群より低い体重曲線を示したが、オスの HSALR マウスにおいては全ての月齢において健常群マウスとの顕著な差は認められなかった。尿中タイチンは、健常群と比較して若齢期の HSALR マウスメスおよびオスにおいて、それぞれ6倍および16倍と有意に高い値を示した。本マウスにおける尿中タイチンの値は、メスおよびオス共に12ヶ月齢で最も高く、老齢群18ヶ月齢では低下した。一方、代表的な骨格筋損傷マーカーである血清クレアチンキナーゼ(CK)では、HSALR マウスと健常群マウスにおいて有意差は認められず、また若齢群、高齢群、および老齢群の HSALR マウス間においても有意な変化は認められなかった。

針筋電図検査では、2 から 18 ヶ月齢いずれの HSALR マウスの前脛骨筋、腓腹筋、および大腿四頭筋において筋強直の指標であるミオトニー放電が顕著に観察された。最も顕著なミオトニー放電は腓腹筋において観察された。握力測定による DM1 モデルマウスの筋強直症状を評価したところ、最大握力では健常群との差は認められなかった。一方、最大筋力差による解析では、HSALR マウスは健常群と比べて有意な筋力差を示した。筋力差で示される連続的な収縮ができ

ない HSALR マウス骨格筋の機能不全は、全ての月齢において観察された。

考察

HSALR マウスの血清 CK 値は健常群と比べて有意な変化は認められなかった。一方で、HSALR マウスの尿中タイチンは、健常群マウスに比べて、いずれの月齢においても高い値を示したことから、尿中タイチンが異常伸長 CTG リピートによる骨格筋損傷を鋭敏に検出できるバイオマーカーである可能性が示された。また、HSALR マウスの尿中タイチンは老齢期の 18 ヶ月齢に比べて、活動量が大きい 12 ヶ月齢において高い値を示したことから、異常伸長 CTG リピートの骨格筋損傷への影響は、加齢のみならず、骨格筋負荷の程度など複数の要因が関与している可能性が考えられた。組織標本の解析からも加齢に伴う筋損傷マーカーの変化が観察されていることから、今後は CTG リピートと加齢の骨格筋に対する相乗的な影響を分子メカニズムの観点から解析する必要がある。

HSALR マウスいずれの月齢においてもミオトニー放電が観察されたことから、本 HSALR マウスが老化骨格筋における筋強直発生メカニズムを解析する上で有望なモデルであることが示された。また、本研究で確立した筋力差解析は、随意的な筋収縮後に筋弛緩が困難となる筋強直の特徴を考慮した手法であることから、従来の最大筋力による解析と比べて、明瞭に筋強直を評価できることが明らかとなった。すなわち、本法は核酸医薬をはじめとする開発医薬品のマウスモデルを用いた非臨床試験において、骨格筋機能に対する改善効果のより正確な評価を可能にするものと考えられる。

結論

本研究では、代表的な DM1 モデルである HSALR マウスを用いて、異常伸長 CTG リピートが発現している骨格筋の加齢病態を解析するために有用な非侵襲的骨格筋損傷マーカー、ならびにモデルマウスにおける筋強直の新たな評価法を確立した。

参考文献

1. Duan, D, Goemans, N, Takeda, S,

- Mercuri, E, and Aartsma-Rus, A (2021). Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers* **7**: 13.
2. Echigoya, Y, and Yokota, T (2023). Restoring Dystrophin Expression with Exon 44 and 53 Skipping in the DMD Gene in Immortalized Myotubes. *Methods Mol Biol* **2587**: 125-139.
3. Chiba, S, Lim, KRQ, Sheri, N, Anwar, S, Erkut, E, Shah, MNA, *et al.* (2021). eSkip-Finder: a machine learning-based web application and database to identify the optimal sequences of antisense oligonucleotides for exon skipping. *Nucleic Acids Res* **49**: W193-w198.
4. Aoki, Y, Nagata, T, Yokota, T, Nakamura, A, Wood, MJ, Partridge, T, *et al.* (2013). Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin-alpha2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet* **22**: 4914-4928.
5. Echigoya, Y, Lee, J, Rodrigues, M, Nagata, T, Tanihata, J, Nozohourmehrabad, A, *et al.* (2013). Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic mdx and mdx52 mice. *PLoS One* **8**: e69194.
6. Hasuike, Y, Mochizuki, H, and Nakamori, M (2022). Cellular Senescence and Aging in Myotonic Dystrophy. *Int J Mol Sci* **23**.

糖鎖の修飾機序の解明と生理活性の治療応用

金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科

緒言

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、重度の筋ジストロフィーに加え、脳奇形や精神発達遅滞等の中枢神経障害、心筋症を伴う常染色体性劣性遺伝性疾患で、フクチン遺伝子の変異によって発症する。FCMD では基底膜ラミニンの受容体であるジストログリカン (DG) の糖鎖に異常が生じている。同様の糖鎖異常を示す筋ジストロフィーも世界的にみられ、DG 異常症と総称される。分担者らは、DG 糖鎖にはリビトールリン酸という修飾体が含まれており、フクチンは糖鎖にリビトールリン酸を組み込む酵素、DG 異常症遺伝子のひとつ ISPD はリビトールリン酸の糖鎖前駆体 CDP-リビトールの合成酵素であることを解明した(1)。つまり、リビトールリン酸糖鎖の欠落によって、ラミニン結合性の糖鎖が伸長できず、基底膜-細胞膜の連携が破綻することが発症要因となる。本分担課題においては、糖鎖修飾の分子機序に着目し、糖鎖異常の解消を基盤とする DG 異常症の治療法を開発する。

方法

DG 異常症、特に ISPD 欠損型に対する治療法の開発を目指し、ISPD 酵素反応に基づく糖鎖補充療法の基礎研究を実施する。具体的には、①ISPD 欠損および点変異マウスを作出し、②CDP-リビトール補充療法およびリビトール補充療法の有効性を明らかにする。ISPD はリビトール 5 リン酸から CDP-リビトールを合成する酵素である。従って、ISPD 欠損型には CDP-リビトールの補充が有効と考えられる。また、リビトール 5 リン酸への親和性が低下するような病原性変異体では、リビトール 5 リン酸の投与も有効と考えられる。本計画では、ISPD の骨格筋特異的 conditional KO (cKO) マウスと点変異のゲノム編集マウスを作出し、その病態を解析する。次いで、これらのマウスへの CDP-リビトールやリビトール 5 リン酸の投与で治療効果が認められるか検証する。

結果

これまで骨格筋選択的な ISPD-cKO マウスを用い

てプロドラッグ化 CDP-リビトール補充療法の有効性を提唱してきた(2)。現在プロドラッグ化合物の更なる改良を進めている。また、ISPD 点変異マウスの作出を終え、病態解析とリビトール投与を開始したところである。予備的データからはリビトール投与によって筋力が改善していることが示唆される。

本年度は種々の DG 異常症モデルマウスを用いた病態解明も行った。基底膜と細胞骨格の連携は筋細胞膜の物理的維持に重要であり、筋線維においては主に DG が糖鎖依存的にその役割を担っている。DG 異常症モデルマウスにおいて、膜貫通型タンパク質 CD239 (ルテラン) とそのマトリクスリガンドであるラミニン 511 の発現上昇が検出された(3)。これらの発現上昇は再生筋においても観察された。CD239 は細胞内でスペクトリンと結合すること、スペクトリンはアクチンと結合することから、DG 異常症の筋線維においては、ラミニン 211-ジストログリカン-ジストロフィン軸の機能破綻を部分的に代償している可能性が示唆された。

考察

CDP-リビトール補充療法はどのような ISPD 変異でも適応可能であり、フクチン (福山型) や FKRP (肢帯型 2I) など CDP-リビトールを基質として用いる酵素に対しても、変異の種によっては残存酵素活性を増強させ治療につながる事が考えられる。ただし、プロドラッグとしては更なる改良を加え、低用量で治療効果を発揮する誘導体を開発する必要がある。一方で、CDP-リビトールの材料となるリビトールの補充療法は ISPD 点変異の症例にくわえ、FKRP 変異型の DG 異常症でも有効であることが示唆されており、今後の臨床研究の展開に興味もたれる。

インシリコ解析からラミニン 511-CD239-スペクトリンの発現上昇とステロイド療法の相関が示唆されたが、DG 異常症の病態、特にラミニン 211-ジストログリカン-ジストロフィン軸を機能的に代償しているか否かについては注意深く考察する必要がある。DG 糖鎖と CD239 の二重変異マウスを用いた解析等が必要である。

結論

ISPD 欠損型筋ジストロフィーに対するプロドラッグ化 CDP-リビトール補充療法の有効性を実証し

た。DG 異常症の分子病態の機序としてラミニン 511-CD239-スペクトリン軸の発現上昇を見出した。

参考文献

- (1) Kanagawa, M., et al. Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.* 14, 2209-2223 (2016).
- (2) Tokuoka, et al. CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates ISPD-deficient muscular dystrophy mouse model. *Nat Commun.* 13, 1847 (2022)
- (3) Kikkawa, et al. Elucidation of the mechanism of glycosylation related to dystroglycanopathy and its therapeutic application: Laminin α 5_CD239_Spectrin is a compensatory linkage between the basement membrane and cytoskeleton. *Matrix Biol Plus.* 15, 100118 (2022)

骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現は伸張性収縮後の筋損傷を防止する

山田 崇史
札幌医科大学

緒言

伸張性収縮 (eccentric contraction; ECC) は、他の収縮様式と比べ骨格筋の肥大適応に有益である (Ashida *et al.*, 2018). 一方, ECC は、筋損傷を引き起こしやすいことが広く知られており、過度の ECC が負荷されると、筋力の低下は数日から数週間継続する (Lavender & Nosaka, 2006; Yamada *et al.*, 2018; Ashida *et al.*, 2021). ECC 後には、筋細胞内酵素であるクレアチンキナーゼ (creatine kinase; CK) が血中で検出されることから、ECC に伴う力学的負荷の増大が、直接的に筋細胞膜の損傷を引き起こす、いわゆる「Membrane tear 説」が支持されてきた (Moens *et al.*, 1993; Petrof *et al.*, 1993). しかしながら、ECC 負荷直後には組織学的な筋細胞膜の損傷がほとんど観察されないこと (Komulainen *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 2018), また、血中 CK 値が筋損傷の程度と必ずしも相関しないこと (Mair *et al.*, 1995; Fridén & Lieber, 2001) が明らかとなり、この説は否定されつつある。一方、近年、筋細胞膜のストレッチ活性化型チャネル (Allen *et al.*, 2016) や筋小胞体の Ca²⁺ 放出チャネル (Witherspoon & Meilleur, 2016) を介した細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が、ECC による筋損傷の起点となることが報告され注目を集めている (Zhang *et al.*, 2012).

先行研究において、ECC に対する易損傷性は筋線維タイプによって大きく異なることが示されている (Fridén *et al.*, 1983; Lieber & Fridén, 1988; Choi & Widrick, 2010). 筋線維タイプは、含まれるミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MyHC) のアイソフォームによって決定され、ヒトでは、速筋型の Type IIb および IIa 線維と遅筋型の Type I 線維が、一方、げっ歯類では、これらに加え速筋型の Type IIc 線維が発現している。これまでに、Type IIb 線維は、他の筋線維タイプと比べ、ECC による損傷を受け易いことがヒト (Fridén *et al.*, 1983; Choi & Widrick, 2010) および実験動物 (Lieber & Fridén, 1988) において報告されている。しかしながら、筋線維タイプ特異的な ECC に対する感受性の違いが、何によって決定され

るかは不明である。

ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子 -1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; PGC-1 α) は、骨格筋においてミトコンドリアの量や機能を制御する転写因子として知られており、その発現量は、有酸素性能力の高い Type I 線維と比較して、有酸素性能力の低い Type IIb 線維では低い (Lin *et al.*, 2002). また、PGC-1 α は、細胞膜タンパク質であるユートロフィンの発現量を増加させるため (Angus *et al.*, 2005), 遅筋線維に比べ、速筋線維においてユートロフィンの発現量が低い (Lindsay *et al.*, 2019) .

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy; DMD) 患者の骨格筋では、ジストロフィンの欠損により、ECC に対する易損傷性が著しく亢進する (Blaauw *et al.*, 2010). 興味深いことに、DMD モデル動物の骨格筋において PGC-1 α を過剰発現させると、ECC に対する易損傷性が改善することが報告されている (Handschin *et al.*, 2007b; Hollinger *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014). これらの報告では、筋線維タイプを識別していないが、ジストロフィン欠損筋では速筋線維が損傷を受けやすいことから (Webster *et al.*, 1988), PGC-1 α の発現量増大は、Type IIb 線維の損傷耐性を向上させると考えられる。一方、そのメカニズムに関しては、ユートロフィンの発現量増大が関与するとする報告と (Handschin *et al.*, 2007b; Selsby *et al.*, 2012; Hollinger *et al.*, 2013), 関与しないとする報告 (Chan *et al.*, 2014; Hollinger & Selsby, 2015) が存在する。

そこで本研究では、ECC に対する筋線維の損傷耐性における PGC-1 α の役割を明らかにするために、骨格筋特異的な PGC-1 α の過剰発現が、速筋型の Type IIb 線維の易損傷性を改善するかどうかを検討した。また、その場合、ユートロフィンの発現量増大が、効果のメカニズムに関与するかについても併せて検討した。

方法

1. 倫理的配慮

実験動物の生命を尊重し、最小限の動物数を使用した。また、麻酔 (インフルラン 1.5%, 1.5 L/min) により実験中の除痛を行うとともに、実験終了後には苦痛の遮断として、頸椎脱臼により安楽死処置を行った。なお、本研究は、札幌医科大学動物実験委

員会の承認を受け実施した（承認番号：20-108_21-060）。

2. 実験動物および実験プロトコール

実験には、17-18 週齢の C57BL/6N 野生型 (wild type; WT) マウスと骨格筋特異的に PGC-1 α -b を過剰発現させた PGC-1 α transgenic (Tg) マウスを用いた。Tg マウスは、ヒト α アクチンプロモーターにより骨格筋特異的に PGC-1 α -b mRNA を過剰発現する遺伝子導入マウスであり (Tadaishi *et al.*, 2011), 開発者である静岡県立大学の三浦進司教授よりご提供頂いた。水および試料は自由摂取とし、12 時間の明暗サイクルの照明下で室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ を常時維持した飼育室においてマウスを飼育した。すべてのマウスの左後肢は損傷性の伸張性収縮負荷 (ECC) 側とした。一方、右後肢は無処置の対照 (control; CNT) 側とした。下腿三頭筋に対し損傷性 ECC を負荷した直後 (recovery 0 day; REC0, 各群 $n=7$) および 3 日後 (recovery 3 days; REC3, 各群 $n=7$) に下腿三頭筋の大部分を占める腓腹筋を採取し、その後の実験に供した。

3. 伸張性収縮負荷プロトコール

Ashida ら (Ashida *et al.*, 2021) の方法に準じ、マウスの足関節底屈筋に ECC を負荷した。実験を通して持続的に麻酔を供給するため、実験動物用全身麻酔器 (Bio machinery 社製) に接続したフェイスマスクをマウスの頭部に装着し、イソフルラン (1.5 %, 1.5 L/min) を吸引させた。電気刺激に対する皮膚抵抗を軽減するため、マウスの下腿を剃毛した。マウスをプラットホーム上に背臥位で置き、足部を小動物用トルク測定器 (竹井機器社製) に連結した足底板に足関節底背屈 0° となるよう固定した。電気刺激により誘発される足関節運動に伴う体動を防ぐため、体幹をプラットホームにテーピングで固定した。電極は、表面電極を下腿前面と下腿後面に貼付し、電気刺激を刺激頻度 50 Hz, パルス幅 0.5 ms, 刺激強度 45 V で与えると同時に、足底板と連結したモーターによって、マウスの足関節を底背屈 0° から背屈 40° まで、角速度 $150^\circ/\text{s}$ で背屈させ、ECC を惹起した。ECC の負荷回数は、4 秒に 1 回の収縮を 1 サイクルとし、100 回とした。

4. トルクの測定

損傷性 ECC 負荷直前, REC0, REC1, REC3 に、最大 (100 Hz) および最大下 (50 Hz) の等尺性足関節底屈トルクを測定した。ECC 負荷時と同様にマウスを背臥位でプラットホーム上に固定し、足関節を底背屈 0° に固定したまま下腿後面に電気刺激を加え、筋収縮を惹起した。刺激条件は、パルス幅 0.5 ms, 刺激強度 45 V, 持続時間 0.6 s とした。

5. 組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin; HE) 染色およびエバンスブルー染色液 (evans blue dye; EBD) 投与を用い、REC0 および REC3 の腓腹筋において組織学的観察を行った。筋を採取する 9 時間前に、リン酸緩衝生理食塩水に 1% の濃度で溶かした EBD をマウス腹腔内に投与した (0.1 ml/10 g body weight)。なお、EBD は、細胞膜が損傷すると細胞内に浸潤するため、EBD 陽性線維は、筋細胞膜が損傷された筋線維を示す。実験期間終了後、腓腹筋中間部からサンプルを採取した。採取した筋は横断面が水平になるようトラガントゴムを用いてコルク片の上に保定し、液体窒素で冷却したイソペンタンで急速凍結後、分析まで -80°C で保管した。その後、クライオスタットを用いて厚さ $10 \mu\text{m}$ の連続切片を作成し、HE 染色を施した。EBD の観察には、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE 社製) を用いた。EBD 組織像は、励起波長 620 nm, 吸収波長 700 nm の蛍光フィルタ (BZ フィルタ Cy5, KEYENCE 社製) を使用し、露光時間 1/2.3 s の条件で撮像した。HE 染色像は明視野にて撮像した。EBD 組織像および HE 染色像の定量には解析ソフトウェア (BZ-X analyzer, KEYENCE 社) を用いた。EBD 陽性面積は、 $350 \mu\text{m}^2$ 以上の面積にあたる蛍光面積を抽出するとともに、明らかに細胞間質であると判別できるものは選択除去し、残った EBD 陽性面積を、HE 染色像より得られた全筋横断面積で補正した値 (EBD 陽性面積 / 全筋横断面積) で表した。

6. 免疫組織化学的検討

本研究では、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現によって、ECC 負荷後の Type IIb 線維における筋細胞膜損傷が軽減するかを検討するために、EBD 陽性線維の観察に加え、免疫組織化学染色によって Type IIb 線維を染め分けた。腓腹筋の凍結標本から、厚さ $10 \mu\text{m}$ の切片を作成し、on ice にて 4%PFA/PBS で

10 分間固定した。PBS にて 5 分間 3 回洗浄を行い、0.3% Triton in PBS にて透過処理を行った。その後再び PBS にて 5 分間洗浄を行い、ブロッキング液 (5% normal goat serum in PBS) にてブロッキングを行った。その後、ブロッキング液にて 150 倍に希釈した抗 MyHC IIb 抗体 (BF-F3, DSHB) をスライドガラスに 180 μ l ずつ乗せ、4°C で一晩保管した。その後、PBS にて 5 分間 2 回洗浄を行い、ブロッキング液にて 200 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-Mouse IgM, Alexa 488) を、スライドガラスに 180 μ l ずつアプライし、室温で 1 時間保管した。終了後、氷上にて 4% PFA/PBS で 2 分間固定し、PBS にて 5 分間 2 回洗浄し DAPI 入りの封入剤で封入した。観察には、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE 社製) を用い、励起波長 470 nm, 吸収波長 525 nm の蛍光フィルタ (BZ フィルタ GFP, KEYENCE 社製) を使用し撮像した。

7. MyHC アイソフォームの分布

MyHC のアイソフォームを分離するために、先行研究に準じ (Wada *et al.*, 1996), 5 μ g の筋ホモジネイトを 7% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて、4°C, 160V で 24 時間泳動した。その後、Coomassie brilliant blue 染色により可視化した MyHC アイソフォームを、画像解析ソフト ImageJ で解析し分布を算出した。

8. カルパイン 1 の自己分解

採取した腓腹筋 20 mg 程度を、ホモジナイザーにて 30 倍のホモジナイズ溶液 (EDTA, 5; EGTA, 5; Tris/HCl, 20 (pH 7.4); 10 μ g/ml 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBF); phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5; dithiothreitol (DTT), 1; 10 μ g/ml pepstatin A) 内で均質化した。タンパク濃度の定量化は Bradford 法により行った (Bradford, 1976)。Kanzaki ら (Kanzaki *et al.*, 2014) の先行研究に準じ、20 μ g のタンパク質を 7% SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し、anti-calpain 1 抗体 (1000 倍希釈) を用いてウェスタンブロッティングを行った。カルパイン 1 の自己分解の割合は、総カルパイン 1 量に対する自己分解型カルパイン 1 の量で表した。

9. ウェスタンブロッティング

採取した腓腹筋 20 mg 程度を、ホモジナイザーにて 30 倍のトリス溶液 (10 mM Tris Maleate, 35 mM

NaF, 1 mM NaVO₄, 1% Triton X 100, 1 tablet of Protease Inhibitor/50 ml) 内で均質化した。全筋のタンパク濃度を、Bradford 法により定量化した (Bradford, 1976)。全筋タンパク質を、ゲル (4-15% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free™ Gels, BIO-RAD 社製) に、1 レーンあたり 5 μ g ずつのせ、150 V で 45 分間泳動した。泳動後、ChemiDoc MP イメージシステム (BIO-RAD 社製) によりゲルからタンパク質バンドを検出した。その後、セル (Mini PROTEAN II Cell, BIO-RAD 社製) を用い、100 V で 180 分間通電し、タンパク質をゲルからメンブレン上に転写した。メンブレンは、3% (w/v) スキムミルク中にて 1 時間ブロッキングした後、標的タンパク質の一次抗体と 4°C に保った冷蔵庫内で一晩〜二晩反応させた。一次抗体は下記のものを用いた。PGC-1 α (anti-PGC-1 α : 1000 倍希釈, abcam 社製), ユートロフィン (anti-utrophin antibody (UT-2), 1000 倍希釈, 国立精神・神経医療研究センターの今村道博博士より分譲)。洗浄後、10000 倍に希釈した 2 次抗体 (goat anti-rabbit 抗体, BIO-RAD 社製) と室温で 1 時間反応させ、さらに洗浄を行った。タンパクの可視化には Immobilon (Millipore 社製) を用い、ChemiDoc MP (BIO-RAD 社製) によりバンドの検出及び定量を行った。なお、各タンパク質の発現量は、全タンパク質の発現量に対する相対値で表した。

10. リアルタイム定量 PCR

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて腓腹筋から total RNA を抽出し、RNA 逆転写酵素 (Prime Script RT Master Mix, TaKaRa 社製) を使用して cDNA を合成した。その後、Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems 社製) にて、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製) を用い SYBR Green 遺伝子発現アッセイを行った。プライマーは以下のものを使用した : PGC-1 α (forward 5'-CGGAAATCATATCCAACCAG-3', reverse 5'-TGAGGACCGCTAGCAAGTTTG-3'), PGC-1 β (forward 5'-CAGCTGTGTGCTGACTTGCC-3', reverse 5'-TCAAAGTCACTGGCGTCCAG-3'), 36B4 (forward 5'-GGCCCTGCACTCTCGCTTTC-3', reverse 5'-TGCCAGGACGCGCTTGT-3')。なお、それぞれの mRNA 発現量は、まず 36B4 の mRNA 発現量に対する相対値を算出し、その後比較 Ct 法 (Livak &

Schmittgen, 2001)を用い、WT群に対する相対値にて表した。

11. 統計学的処理

統計分析は、統計ソフト SigmaPlot を用いて行い、各データは、平均 ± 標準偏差で示した。各群の等尺性足関節底屈トルクの比較には、二元配置反復測定分散分析を用いた。また、カルパイン1の自己分解、細胞膜関連蛋白質の発現量の比較には二元配置分散分析を用いた。有意差が認められた場合は Post-hoc test として Tukey 法を適用した。一方、組織学的分析、MyHC アイソフォームの分布、PGC-1 α と PGC-1 β の mRNA 発現量、PGC-1 α のタンパク質発現量の群間比較には、対応のない t 検定を用いた。なお、有意水準は 5%とした。

結果

1. PGC-1 α 過剰発現マウスの表現型

WT マウスと比較して、Tg マウスの腓腹筋では PGC-1 α の mRNA 発現量が高値を示した (WT : 108 ± 44 arbitrary unit (a.u.), Tg : 1020 ± 379 a.u.) ($P < 0.05$)。一方、PGC-1 β の mRNA 発現量に両群間で差異は認められなかった (WT : 127 ± 51 a.u., Tg : 168 ± 63 a.u.)。WT マウスと比較して、Tg マウスの腓腹筋では PGC-1 α の発現量は高値を示した (WT : 106 ± 44 a.u., Tg : 1012 ± 366 a.u.) ($P < 0.05$)。また、WT マウスと比較して、Tg マウスの腓腹筋では Type IIb 線維の割合が減少し (WT : 90 ± 5%, Tg : 62 ± 10%) ($P < 0.05$)、Type IIa/d 線維の割合が増加した (WT : 9 ± 5%, Tg : 36 ± 9%) ($P < 0.05$)。一方で Type I 線維の割合に変化は無かった (WT : 1 ± 0.5%, Tg : 2 ± 1%)。

2. 等尺性足関節底屈トルク

WT+ECC 群の発揮トルクは、損傷前に比べ、REC0 (50 Hz : 33 ± 4%, 100 Hz : 50 ± 6%), REC1 (50 Hz : 32 ± 11%, 100 Hz : 63 ± 6%), REC3 (50 Hz : 24 ± 12%, 100 Hz : 42 ± 8%) のいずれにおいても低下した ($P < 0.05$)。一方、Tg+ECC 群では、WT+ECC 群と比較して、REC0, REC1, REC3 のいずれにおいても 50 Hz および 100 Hz の発揮トルクが高値を示した ([REC0] 50 Hz : 51 ± 4%, 100 Hz : 69 ± 8%, [REC1] 50 Hz : 77 ± 22%, 100 Hz : 96 ± 6%, [REC3] 50 Hz : 75 ± 15%, 100 Hz : 92 ± 8%) ($P < 0.05$)。

3. 組織学的検討

REC0 では両群ともにほとんど EBD 陽性線維は認められなかった。一方、REC3 において、WT+ECC 群では、EBD 陽性線維が数多く認められ、その総面積は全筋横断面積の 44 ± 8% を占めた。これに対し、Tg+ECC 群では、EBD 陽性線維がほぼ観察されなかった (0.2 ± 0.2%)。

4. 免疫組織学的検討

WT+ECC 群において、REC3 で観察された EBD 陽性線維は、全て Type IIb 線維であった。一方、Tg+ECC 群では、Type IIb 線維であっても、EBD 陽性となる筋線維はほとんど観察されなかった。

5. ユートロフィンの発現

安静状態において、WT 群と比較して Tg 群では、ユートロフィンの発現量が高値を示した (WT : 109 ± 43 a.u., Tg : 220 ± 48 a.u.) ($P < 0.05$)。REC0 では、WT+ECC および Tg+ECC とともに、WT+CNT 群および Tg+CNT 群と比べユートロフィンの発現量に変化は無かった (WT : 109 ± 43 a.u., WT+ECC : 111 ± 43 a.u., Tg : 220 ± 108 a.u., Tg+ECC : 208 ± 90 a.u.)。REC3 において、WT+ECC 群では、WT+CNT 群と比較してユートロフィンの発現量が増加した (WT : 100 ± 45 a.u., WT+ECC : 184 ± 72 a.u.) ($P < 0.05$)。一方、Tg+ECC 群では、これらの変化は生じなかった (Tg : 201 ± 68 a.u., Tg+ECC : 190 ± 50 a.u.)。

6. カルパイン1の自己分解

REC0 において、カルパイン1の自己分解の割合はすべての群間で差異が認められなかった (WT : 12 ± 2%, WT+ECC : 14 ± 4%, Tg : 10 ± 1%, Tg+ECC : 10 ± 2%)。一方、REC3 におけるカルパインの自己分解の割合は、WT+ECC 群で、WT+CNT 群および Tg+ECC 群と比較して高値を示した (WT : 13 ± 3%, WT+ECC : 24 ± 8%, Tg+ECC : 8 ± 2%) ($P < 0.05$)。また、Tg+CNT 群と Tg+ECC 群との間に差異は認められなかった (Tg : 10 ± 4%, Tg+ECC : 8 ± 2%)。

考察

本研究では、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現 (Tg) マウスを用い、筋線維の損傷耐性における PGC-1 α の役割を検討した。本研究の結果、主に Type

IIB 線維で構成されるマウス腓腹筋において、損傷性 ECC 後の長期的な発揮トルクの低下が、PGC-1 α の過剰発現により防止された。また、ECC により損傷を受けた Type IIB 線維の割合は、WT マウスの腓腹筋では著しく増加したが、Tg マウスではほとんど観察されなかった。さらに、Tg マウスで認められたこれらの有益な作用は、筋細胞膜の安定性に寄与するユートロフィンの発現量増加を伴っていた。

従来、過度の ECC による筋損傷は、ECC 負荷中の力学的ストレス増大による細胞膜損傷に起因すると考えられてきた(Moens *et al.*, 1993; Petrof *et al.*, 1993)。もし、この考えが正しいとすれば、ECC 負荷直後に、筋細胞膜の損傷が観察されるはずである。しかしながら、先行研究と一致して(Komulainen *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 2018)、本研究においても、組織学的な細胞膜損傷は ECC 負荷直後にはほとんど認められず、3 日後において顕著に観察された。この遅発性の筋損傷がどのようなメカニズムで生じるかに関しては未だ不明な点が多いが、以下の 1~4) に示す Ca²⁺仮説が有力視されている：1) 筋細胞膜のストレッチ活性化型チャネル(Allen *et al.*, 2016) や筋小胞体の Ca²⁺放出チャネル(Witherspoon & Meilleur, 2016)を介した細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、2) Ca²⁺依存性のタンパク質分解酵素であるカルパインの活性化による筋タンパク質の分解(Kanzaki *et al.*, 2017)、3) Ca²⁺依存性のリン脂質分解酵素である PLA2 の活性化による筋細胞膜融解と炎症細胞走化性因子の産生(Willems & Stauber, 2003)。4) 浸潤した炎症細胞からの ROS 放出による二次的な細胞膜損傷の拡大(Tidball, 2011)。

本研究の結果、PGC-1 α の過発現により、ECC による損傷を受けやすい速筋型の Type IIB 線維において、細胞膜損傷がほぼ完全に抑制された。加えて先行研究において、骨格筋特異的な PGC-1 α 欠損動物では、野生型動物と比較して、上り坂走行後の筋細胞膜損傷が生じやすいことが示されている(Handschin *et al.*, 2007a)。したがって、骨格筋線維の ECC に対する損傷耐性には、PGC-1 α 経路の活性化が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

先行研究において、PGC-1 α は、コスタメアタンパク質であるユートロフィンのプロモーター領域に存在する N-box を介して、ユートロフィン発現を誘導することが示されている(Angus *et al.*, 2005)。また、PGC-1 α の過発現は、ジストロフィン欠損筋の易損

傷性を改善し、それはユートロフィンの発現量増大と関連することが報告されている(Handschin *et al.*, 2007b; Selsby *et al.*, 2012; Hollinger *et al.*, 2013)。本研究においても、PGC-1 α 過発現マウスの筋では、ユートロフィン発現量が増大したことから、PGC-1 α の有益な作用には、ユートロフィン発現を介した細胞膜構造の強化が関与するかもしれない。しかしながら、前述の通り、ECC による細胞膜損傷は、ECC 負荷直後には観察されなかった。したがって、PGC-1 α によるユートロフィン発現量の増大が、外的ストレスによる細胞膜損傷を防止するとは考えにくく、PGC-1 α がユートロフィンとは異なる経路を介して作用する可能性が高い。この考えを支持するように、Chan ら(Chan *et al.*, 2014)は、ジストロフィンとともにユートロフィンが欠損したマウスにおいても、PGC-1 α の過剰発現が病態を改善することを報告している。また、近年、ジストロフィン-糖タンパク質複合体などのコスタメアタンパク質が、遅筋線維に比べ速筋線維においてより多く発現することが明らかとなり、細胞膜の強度はそもそも速筋線維において高いことが指摘されている(Murgia *et al.*, 2021)。

この点に関して、PGC-1 α の過発現は、ECC による細胞膜損傷とともに、Ca²⁺依存性タンパク質分解酵素であるカルパイン 1 の活性化を防止した。したがって、PGC-1 α の過発現により、ECC に伴う筋細胞膜のストレッチ活性化型チャネル(Allen *et al.*, 2016) や筋小胞体の Ca²⁺放出チャネル(Witherspoon & Meilleur, 2016)を介した細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が抑えられた可能性がある。そのメカニズムは不明だが、これらのチャネルの活性化には酸化ストレスが関与すること(Whitehead *et al.*, 2008; Shkryl *et al.*, 2009)、一方、PGC-1 α は酸化ストレスに拮抗して働く抗酸化酵素の発現を誘導することから(St-Pierre *et al.*, 2006)、PGC-1 α による酸化ストレスの抑制が、チャネル活性化による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を防止したのかもしれない。

また、ミトコンドリアは Ca²⁺を取り込む能力を有しているため、PGC-1 α 過剰発現によるミトコンドリア量の増加が細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制した可能性がある。しかしながら、近年、ミトコンドリアが取り込むことができる Ca²⁺は限定的であることが報告されたことから(Lamboley *et al.*, 2021)、PGC-1 α 過剰発現によるミトコンドリア量の増加が、伸張性収縮に対する損傷耐性の獲得に与える影響は小さい

考えられる。

本研究では、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現によって損傷性 ECC 後の長期的な発揮トルクの低下が防止されることが明らかにされた。ECC による張力低下は、興奮収縮連関の機能不全が主たる原因であると考えられており (Warren *et al.*, 2001, 2002), そのメカニズムには、カルパインによるジャンクトフィリンや STAC3 などの Ca²⁺調節タンパク質の分解が関与すると考えられている (Powers *et al.*, 2005; Ashida *et al.*, 2021)。前述したとおり、PGC-1 α の過剰発現は、カルパイン 1 の活性化を防止した。そのため、Tg マウスの腓腹筋では、ECC に伴うカルパイン 1 の活性化による興奮収縮連関の障害が生じなかった可能性が高い。

ECC に伴う速筋線維の損傷は、競技者において高い頻度で認められ、その回復には長期間を要する (Lavender & Nosaka, 2008)。また、DMD 患者では、細胞膜タンパク質であるジストロフィンの欠損により、ECC に対する速筋線維の脆弱性が著しく亢進する (Blaauw *et al.*, 2010)。一方、PGC-1 α の発現量は、運動や電気刺激トレーニングによって効果的に増大することが広く知られている (Granata *et al.*, 2018; Yamada *et al.*, 2021)。さらに近年、人工的に合成したメッセンジャー RNA (mRNA) を体内に投与し、治療薬やワクチンとして用いる mRNA 医薬・ワクチンが注目されている。本研究ならびに先行研究 (Handschin *et al.*, 2007b; Selsby *et al.*, 2012; Hollinger *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014) において、正常筋およびジストロフィン欠損筋における PGC-1 α 発現量の増大が、速筋線維の易損傷性を改善することが示されたことから、PGC-1 α を分子標的とした適切なトレーニングの処方や治療法が開発されることで、競技者ならびに DMD 患者における筋損傷予防に寄与することが期待される。

結論

骨格筋線維の ECC に対する損傷耐性には、PGC-1 α の活性化が関与することが明らかとなった。また、PGC-1 α によるこの有益な作用は、ユートロフィン発現とは異なる経路を介して獲得されることが示唆された。本研究で得られた知見は競技者や DMD 患者において頻繁に生じる、ECC による筋損傷に対する効果的な予防プログラムの確立に寄与すると考えられる。

参考文献

- Allen DG, Whitehead NP & Froehner SC. (2016). Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* **96**, 253-305.
- Angus LM, Chakkalakal JV, Méjat A, Eibl JK, Bélanger G, Megeney LA, Chin ER, Schaeffer L, Michel RN & Jasmin BJ. (2005). Calcineurin-NFAT signaling, together with GABP and peroxisome PGC-1{alpha}, drives utrophin gene expression at the neuromuscular junction. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C908-917.
- Ashida Y, Himori K, Tamai K, Kimura I & Yamada T. (2021). Preconditioning contractions prevent prolonged force depression and Ca(2+)-dependent proteolysis of STAC3 after damaging eccentric contractions. *J Appl Physiol (1985)* **131**, 1399-1407.
- Ashida Y, Himori K, Tatebayashi D, Yamada R, Ogasawara R & Yamada T. (2018). Effects of contraction mode and stimulation frequency on electrical stimulation-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol (1985)* **124**, 341-348.
- Blaauw B, Agatea L, Toniolo L, Canato M, Quarta M, Dyar KA, Danieli-Betto D, Betto R, Schiaffino S & Reggiani C. (2010). Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J Appl Physiol (1985)* **108**, 105-111.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive

- method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Chan MC, Rowe GC, Raghuram S, Patten IS, Farrell C & Arany Z. (2014). Post-natal induction of PGC-1 α protects against severe muscle dystrophy independently of utrophin. *Skelet Muscle* **4**, 2.
- Choi SJ & Widrick JJ. (2010). Calcium-activated force of human muscle fibers following a standardized eccentric contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C1409-1417.
- Fridén J & Lieber RL. (2001). Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. *Scand J Med Sci Sports* **11**, 126-127.
- Fridén J, Sjöström M & Ekblom B. (1983). Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med* **4**, 170-176.
- Granata C, Jamnick NA & Bishop DJ. (2018). Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle. *Sports Med* **48**, 1809-1828.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, LeBrasseur NK, Yan Z & Spiegelman BM. (2007a). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 30014-30021.
- Handschin C, Kobayashi YM, Chin S, Seale P, Campbell KP & Spiegelman BM. (2007b). PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev* **21**, 770-783.
- Hollinger K, Gardan-Salmon D, Santana C, Rice D, Snella E & Selsby JT. (2013). Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves restored expression of dystrophin-associated protein complex components and satellite cell signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, R13-23.
- Hollinger K & Selsby JT. (2015). PGC-1 α gene transfer improves muscle function in dystrophic muscle following prolonged disease progress. *Exp Physiol* **100**, 1145-1158.
- Kanzaki K, Kuratani M, Matsunaga S, Yanaka N & Wada M. (2014). Three calpain isoforms are autolyzed in rat fast-twitch muscle after eccentric contractions. *J Muscle Res Cell Motil* **35**, 179-189.
- Kanzaki K, Watanabe D, Kuratani M, Yamada T, Matsunaga S & Wada M. (2017). Role of calpain in eccentric contraction-induced proteolysis of Ca(2+)-regulatory proteins and force depression in rat fast-twitch skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **122**, 396-405.
- Komulainen J, Kytölä J & Vihko V. (1994). Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats. *J Appl Physiol (1985)* **77**, 2299-2304.

- Lamboley CR, Pearce L, Seng C, Meizoso-Huesca A, Singh DP, Frankish BP, Kaura V, Lo HP, Ferguson C, Allen PD, Hopkins PM, Parton RG, Murphy RM, van der Poel C, Barclay CJ & Launikonis BS. (2021). Ryanodine receptor leak triggers fiber Ca(2+) redistribution to preserve force and elevate basal metabolism in skeletal muscle. *Sci Adv* **7**, eabi7166.
- Lavender AP & Nosaka K. (2006). Changes in fluctuation of isometric force following eccentric and concentric exercise of the elbow flexors. *Eur J Appl Physiol* **96**, 235-240.
- Lavender AP & Nosaka K. (2008). A light load eccentric exercise confers protection against a subsequent bout of more demanding eccentric exercise. *J Sci Med Sport* **11**, 291-298.
- Lieber RL & Fridén J. (1988). Selective damage of fast glycolytic muscle fibres with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. *Acta Physiol Scand* **133**, 587-588.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R & Spiegelman BM. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.
- Lindsay A, Southern WM, McCourt PM, Larson AA, Hodges JS, Lowe DA & Ervasti JM. (2019). Variable cytoplasmic actin expression impacts the sensitivity of different dystrophin-deficient mdx skeletal muscles to eccentric contraction. *Febs j* **286**, 2562-2576.
- Livak KJ & Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Mair J, Mayr M, Müller E, Koller A, Haid C, Artner-Dworzak E, Calzolari C, Larue C & Puschendorf B. (1995). Rapid adaptation to eccentric exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* **16**, 352-356.
- Moens P, Baatsen PH & Maréchal G. (1993). Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil* **14**, 446-451.
- Murgia M, Nogara L, Baraldo M, Reggiani C, Mann M & Schiaffino S. (2021). Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study. *Skelet Muscle* **11**, 24.
- Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM & Sweeney HL. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3710-3714.
- Powers SK, Kavazis AN & DeRuisseau KC. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

Physiol **288**, R337-344.

Selsby JT, Morine KJ, Pendrak K, Barton ER & Sweeney HL. (2012). Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse. *PLoS One* **7**, e30063.

Shkryl VM, Martins AS, Ullrich ND, Nowycky MC, Niggli E & Shirokova N. (2009). Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch* **458**, 915-928.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R & Spiegelman BM. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**, 397-408.

Tadaishi M, Miura S, Kai Y, Kano Y, Oishi Y & Ezaki O. (2011). Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS ONE* **6**.

Tidball JG. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* **1**, 2029-2062.

Wada M, Okumoto T, Toro K, Masuda K, Fukubayashi T, Kikuchi K, Niihata S & Katsuta S. (1996). Expression of hybrid isomyosins in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **271**,

C1250-1255.

Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA & Armstrong RB. (2001). Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev* **29**, 82-87.

Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA & Armstrong RB. (2002). What mechanisms contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal muscle injury? *J Orthop Sports Phys Ther* **32**, 58-64.

Webster C, Silberstein L, Hays AP & Blau HM. (1988). Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **52**, 503-513.

Whitehead NP, Pham C, Gervasio OL & Allen DG. (2008). N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J Physiol* **586**, 2003-2014.

Willems ME & Stauber WT. (2003). Attenuation of stretch-induced histopathologic changes of skeletal muscles by quinacrine. *Muscle Nerve* **27**, 65-71.

Witherspoon JW & Meilleur KG. (2016). Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 121.

Yamada R, Himori K, Tatebayashi D, Ashida Y, Ikezaki K, Miyata H, Kanzaki K, Wada M,

Westerblad H & Yamada T. (2018). Preconditioning contractions prevent the delayed onset of myofibrillar dysfunction after damaging eccentric contractions. *J Physiol* **596**, 4427-4442.

Yamada T, Kimura I, Ashida Y, Tamai K, Fusagawa H, Tohse N, Westerblad H, Andersson DC & Sato T. (2021). Larger improvements in fatigue resistance and mitochondrial function with high- than with low-intensity contractions during interval training of mouse skeletal muscle. *Faseb j* **35**, e21988.

Zhang BT, Whitehead NP, Gervasio OL, Reardon TF, Vale M, Fatkin D, Dietrich A, Yeung EW & Allen DG. (2012). Pathways of Ca²⁺ entry and cytoskeletal damage following eccentric contractions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **112**, 2077-2086. es utrophin gene expression at the neuromuscular junction. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C908-917.

ABD1 領域の変異による DMD 筋症に対する exon skip 治療の開発

中村 昭則

国立病院機構まつもと医療センター
臨床研究部、脳神経内科

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子変異によりジストロフィンが欠損する致死性筋疾患である。DMD 遺伝子変異の約 10%が exon 3~7 の領域に集積している。我々は以前に exon 3-9 欠失が無症候性または非常に軽度の臨床症状を示すことを報告していった。¹そこで exon 3~7 の領域内に変異を有する DMD に対しては exon 3-9 skip 治療が有望となる可能性について提案してきた。一方、DMD 遺伝子の機能喪失変異により進行性筋症を引き起こし早期に死亡する DMD に対してアンチセンス核酸 (AO) をによる exon skip 治療がどの程度有効であるかの検証は十分には行われていない。

そこで、アクチン結合ドメイン 1 (ABD1) を標的とした exon skip 治療の目標として exon 3-9 欠失型への変換が DMD 筋症に対しても治療効果が得られるかについて明らかにするため必要があると考えた。具体的には野生型、exon 3-9 欠失型、フレームシフトを引き起こす exon 3-7 欠失型の 3 種類の isogenic なヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CMs) を作製し、遺伝子発現および電気生理学的に検討することと、exon 3-7 欠失型に対して AO (モルフォリノ: PMO) により exon 8 を skip させることで治療効果が得られかについて検討した。

方法

理研 BRD から入手した健常者の iPS 細胞を用いゲノム編集により DMD の表現型を示す exon 3-7 欠失型及び exon 3-9 欠失型 iPS 細胞を作製し、これらの iPS 細胞から心筋細胞を誘導して、につて①RNAseq による網羅的遺伝子発現解析、②exon 3-7 欠失型細胞に対して AO (ペプチド結合型モルフォリノ: PPMO) およびゲノム編集による exon 8, 9 skip 治療の治療効果の比較および exon 3-9 skip 治療の有効性について、ジストロフィンおよび関

連タンパク質の発現、電気生理学的検討として action potentia、Ca²⁺ transient を測定し比較検討を行った。

結果

RNA-Seq による網羅的遺伝子解析による exon 3-7 欠失 (DMD 型) と exon 3-9 欠失 (BMD 型) の比較では、exon 3-9 欠失型と野生型 hiPSC-CM の類似性が高く、exon 3-7 欠失 hiPSC-CM では特にメカノトランスダクションに関連するシグナル伝達が損なわれていた。さらに、exon 3-7 欠失 hiPSC-CM では、exon 3-9 欠失型および野生型 hiPSC-CM と比較して CaMKII の活性化が促進され、電気生理学的変化が観察された。

一方、exon 3-9 欠失 Dp427m は安定した発現を示し、F-アクチンへの結合とデスミンの保持が維持されていることを見出した。また、今回用いた exon 8 単独を標的とした AO は、exon 8 および exon 9 の skip を効率的に誘導し、短期間で Dp427m の発現および機能回復と Δ3-7 hiPSC-CM の電気生理学的特性の改善をもたらした。

考察

従来、モルフォリノの心筋細胞への導入は限定的であり、ペプチド結合型モルフォリノがより高い導入効率を示すとされてきた。我々は ABD1 を標的とした PPMO により exon 3-9 欠失型に変換することで DMD 筋症に対して有効であることを示すことができた。Exon skip 治療では良い標的とする exon を見出すことと、より安全かつ高効率の AO の開発が必要と考えられる。

参考文献

1. Nakamura A., et al. Deletion of exons 3-9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. *J Hum Genet* 2016; 61:663-7.
2. Kyrychenko V., et al. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing *JCI Insight* 2017; 2:e95918.
3. Fletcher, S., et al. Targeted exon skipping to address "leaky" mutations in the dystrophin gene. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012;1:e48.

筋ジストロフィー関連モデルマウスの生産・供給システムの検討

保田 昌彦
公益財団法人実験動物中央研究所

緒言

筋ジストロフィーの要因究明や治療研究のために、我々は継続して、筋ジストロフィー関連モデルマウスならびにそのコントロール系統を微生物学および遺伝学的統御のもとで維持し、研究班をはじめとする多くの研究グループに供給してきた。また、筋ジストロフィー研究に適したモデルマウスの育成を目的に育種繁殖技術ならびに生殖工学技術の開発に努め、これらの技術を応用した実験動物学的改良を行ってきた。

1として、より高い精度と再現性を得られる動物実験のために維持動物の品質管理を継続的に実施してきた。2として、モデルマウスおよびコントロール系統マウスを永続的に維持し、国内研究機関へ継続的な供給を行った。3として、既存モデルマウスの背景系統の改良ならびに置換、新規モデルマウスの作出を行った。

方法・結果

1. 維持動物の品質管理

維持動物の品質管理のため、ビニールインレーター (VI) 装置内で管理している維持動物の定期的な微生物学および遺伝学的なモニタリング検査を定期的に継続的に実施している。令和3年度も微生物モニタリングは、VIあたり1ヶ月もしくは3ヶ月に1回の頻度で、実中研 ICLAS モニタリングセンターの全検査項目の検査を実施し、全項目陰性であることを確認した。遺伝モニタリングは、年1回もしくは2-3世代に1回の頻度で、STR マーカーによる遺伝的プロファイルを作成し、遺伝学的品質が守られていることを確認した。

2. 筋ジストロフィーモデルマウスの維持とタネ動物の供給

我々は、筋ジストロフィー関連モデルマウスの C57BL/6J-dy、C57BL/10ScSn-mdx (B10-mdx)、B10-mdx. utrophin KO、NOG-mdx、DBA/2N (D2)-mdx およびこれらのコントロール系統マウスを VI 内での交配ならびに胚の凍結保存によって維持し、原則として繁殖用タネ動物を当

班員もしくは外部研究者の要望に応じて供給してきた。令和4年の供給実績は、国内40機関に80回供給し、B10-mdx を1219匹、そのコントロール系統 B10Jic を44匹、D2-mdx を183匹の累計1446匹を分与・供給した。

3. 筋ジストロフィーモデルマウスの管理・供給体制の確立と新規モデルマウスの作出

モデルマウス供給数増加に対応するため、B10-mdx マウスの生産を実験中研から日本クレア株式会社に移管した。また B10-mdx のコントロール系統の改良のため、C57BL/10ScN と B10 (C57BL/10ScSn)-mdx との戻し交配を8回実施し、*Tlr4* 変異および mdx を排除した B10-mdx の背景コントロール系統として C57BL/10ScSnJic (B10Jic) を樹立した。加えて、B10-mdx の背景系統を B10Jic から C57BL/6Jc1 に置き換えた C57BL/6J-mdx/Jic を新たに樹立し、これらの供給体制を整えた。さらに、再生医療研究により有用な筋ジストロフィー・モデル動物を作出することを目的として、筋ジストロフィーの免疫不全モデルである NOG-mdx [1] に加え、筋力低下を呈する D2-mdx を背景とした免疫不全モデルを作製し、DBA/2N-mdx-IL-2RgKO, RAG2KO 系統を樹立、供給体制を整えた。

考察・結論

筋ジストロフィーモデル動物の品質管理については、高い水準の微生物・遺伝モニタリング検査を定期的な実施することで、再現性あるモデル動物を研究班の班員を含めた筋ジストロフィー研究者に継続的に供給し、再生医療を含めた筋ジストロフィー治療の基礎研究に寄与することができた。その供給実績は、機関数および匹数ともに過去最多であった。近年の特徴として国内製薬メーカーへの供給数の増加が挙げられる。維持しているモデル動物について、既存の B10-mdx の背景コントロール系統 B19Jic の再整備ならびに B10 系統よりも汎用性の高い C57BL/6J 系統への置換を実施し、モデルマウスの遺伝的な信頼性の強化に努めるとともに、代替系統モデルの構築を実施した。また新規免疫不全モデルである DBA/2N-mdx-IL-2RgKO, RAG2KO 系統を樹立し、筋ジストロフィーの再生医療等研究に寄与するための供給体制を構築した。今後、この体制の中で筋ジストロフィーモデルマウスの胚バンクセンターとしての役割を充実・発展させる。

参考文献

1. Nalbandian M, Zhao M, Sasaki-Honda M, Jonouchi T, Lucena-Cacace A, Mizusawa T, Yasuda M, Yoshida Y, Hotta A, Sakurai H. Characterization of hiPSC-derived muscle progenitors reveals distinctive markers for myogenic cell purification toward cell therapy. *Stem Cell Reports*, 16: 1-16, 2021.

慢性疾患患者の日常生活における精神的負担について

貝谷 久宣

一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会

石川 悠香²⁾、矢澤 健司¹⁾、竹田 保¹⁾、貝谷 嘉洋³⁾、池上 香織¹⁾、川崎 奈緒子⁴⁾、松元 智美⁴⁾、三塚 志歩子⁴⁾

1) 一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会

2) 北海道医療センター

3) NPO 法人 日本バリアフリー協会

4) 医療法人和楽会 心療内科・神経科 赤坂クリニック

【緒言】

(社)日本筋ジストロフィー協会は、「一日も早く」をスローガンとして、筋ジストロフィーの根治療法の実現を願い活動している。本研究班における我々の主な任務は、遺伝子治療をはじめとする本研究班の成果が実現するための社会的環境を作ることである。本年は、よりニーズに適合した筋ジストロフィー医療の実現に向け、当事者・家族対象に日常生活における精神的な負担についての現状を把握することを目的とし、調査を実施した。

【方法】

入所中または外来通院中の当事者・家族に対して、質問紙および面接調査を実施し、日常生活における困り感を聴取。本研究は日本筋ジストロフィー協会および調査医療機関の倫理委員会において、審査・承認を得て実施している。

対象：筋ジストロフィー当事者または家族で、研究説明書・同意書にて同意を得た者

調査機関：北海道医療センター

調査日：令和4年11月19日(土)、20日(日)

実施方法：質問紙+心理師による個別面接 50分

質問紙内容：

・主観的幸福尺度（島井ら, 2005）4項目7件法

・MDQoL-6（川井ら, 2005）6項目5件法

・DAMS（Depression and Anxiety Mood Scale：福井, 1997）9項目7件法

・自由記述：日常生活上の困り感について

【結果と考察】

本調査では、当事者13名（平均年齢38±10歳、デュシェンヌ型9名、脊髄性筋萎縮症2名、上記以外の先天性筋疾患1名、無効回答1名）、家族2名（平均年齢44±5歳、2名ともデュシェンヌ型患者の母親）からの回答が得られた。

本調査の結果、主観的幸福度尺度、MDQoLにおいては、平均が中等度以上となり、幸福度が高い傾向が認められた。DAMSでは、福井ら(2002)の調査での一般成人平均値と比較すると、本研究の参加者は肯定的気分が高く、抑うつ気分・不安気分は低い結果となった。日常生活上の困り感について（項目は以下参照）、当事者で最も多かった意見としてはコミュニケーション不足や、気分転換やストレス対処に関するコーピング不足である。家族からの意見では、仕事と介助の両立、体力的な不安、情報不足への懸念がみられた。一方で、当事者・家族ともに、現状に対する前向きな意見も挙げられた。

当事者（男性12名、女性1名）	
困り感	<ul style="list-style-type: none"> ・コミュニケーション不足（対人交流機会の少なさ、COVID-19による面会制限、人的資源の限界、自身の対人過敏性などが関連） ・コーピング不足（レパトリーの少なさ、身体的制限、食事制限、施設特有の事情による制限） ・病気への不安 ・家族の心配 ・心理支援の少なさ
肯定的意見	<ul style="list-style-type: none"> ・病気との向き合い方（人と比較しない、出来ることに目を向けるなど） ・コーピングの活用 ・技術進歩による社会参加/施設入所のメリット
家族（女性2名）	
困り感	<ul style="list-style-type: none"> ・仕事と介助の両立

	<ul style="list-style-type: none"> ・自分の身体・体力の限界 ・コーピング不足 ・情報不足 ・入所への不安（本人の性格特性を考慮）
肯定的意見	<ul style="list-style-type: none"> ・前向きな考え方（自分の健康・ストレス対処も重視）

【結論】

本調査結果から、当事者の幸福度は高い傾向が認められ、これには入所施設のサポートの手厚さが見受けられた。困り感の内容は、入所特有のものもあれば、病気の進行状況または性格特性起因のものもみられた。一方で、現状に対する肯定的意見や、施設へ入所していることのメリットも挙げられた。

COVID-19の影響もあり、特に人との繋がりを求める声が多かったため、面会時間や面会方法の検討により、困り感は改善される可能性がある。また、心理的支援への需要も高く感じられた。スタッフや心理師など人的資源不足の声も挙がったため、今後はニーズに応じた役割分担・人員補充などの検討が必要と考えられる。さらに、家族の心理的支援、福祉的なサポート資源も含めた情報提供の場、家族交流の場の提供が必要であり、啓蒙活動の重要性も示唆された。

今後も引き続き、筋ジストロフィーの治療発展のため、定期的な調査によって患者・家族の意見や動向、ニーズを調査する必要があると考える。さらにピアカウンセラー養成講座や教育講義のように、専門の医師から最新の情報を得る機会や、筋ジストロフィーの当事者やその家族が集まり、生活の様子について情報を共有し、意見を交わす場を設けることは、各個人が症状や治療にどのように向き合っていけばいいのか考えるきっかけとなる上、患者や家族が今後の選択・意思決定をする際の考慮に入れる材料を得る機会となり、有効な取り組みであると考えられる。

【参考文献】

なし

脂肪酸代謝物の一斉測定

進藤 英雄

国立国際医療研究センター

緒言

生体膜リン脂質はグリセロール骨格の一つの極性基と二種の脂肪酸が結合している。脂肪酸は結合様式や炭素数、二重結合数が様々で組み合わせから1000種程度のリン脂質が存在する。これらは各組織機能に影響すると考えられているが、分子レベルでの研究は未解決である。また、膜成分だけでなくリン脂質メディエーター、その貯蔵、他にも肺サーファクタント成分など様々な役割がある。

骨格筋においてもリン脂質への脂肪酸貯蔵は膜物性や脂質メディエーター産生に影響する。今回、神経障害時の脂質メディエーター測定を行った。脂質メディエーター前駆体である多価不飽和脂肪酸には、アラキドン酸やリノール酸などの ω 6系脂肪酸、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などの ω 3系脂肪酸に分類できる。また、脂肪酸を代謝する酵素は主に①プロスタグランジンやトロンボキサンなどの合成に関わるシクロオキシゲナーゼ(COX)、②ロイコトリエンなどの合成に関わるリポキシゲナーゼ(LOX)、③エポキシ脂肪酸などの合成に関わるシトクロムP450(CYP)の3種類に分類できる。

方法

マウスL4神経切断時の後根神経節(DRG)の152種の脂肪酸代謝物一斉分析を行った。

結果

末梢神経損傷後、 ω 6系脂肪酸由来の代謝物に関しては、ほとんどのCOX代謝物が7-14日目に増加した。しかし、LOX代謝物やCYP代謝物に顕著な変動は認められなかった。また、 ω 3系脂肪酸由来のCOX代謝

物は、 ω 6系と同様に7-14日目に増加した。一方、 ω 6系と異なり、 ω 3系脂肪酸由来のLOX代謝物およびCYP代謝物は3-7日目をピークに一過性に増加することが明らかになった

考察

末梢神経損傷後のDRG組織中では、損傷からの経過日数や脂肪酸の種類、代謝酵素の種類によってそれぞれが全く異なるパターンで変動していることが分かった。本プロファイリングデータをもとに、変動が認められた脂肪酸代謝産物のそれぞれが担う病態生理的な役割について今後解明が進めば、神経損傷に伴う疾患のメカニズム解明や革新的な治療薬の開発へとつながることが期待できる。

結論

ω 6系脂肪酸由来はCOX代謝物が増加し、LOX代謝物やCYP代謝物に顕著な変動は認められなかった。 ω 3系脂肪酸由来の代謝物は増えるがピークは異なった。脂肪酸代謝物の時間的制御メカニズムが観察された。

参考文献

Yamamoto, S., Hashidate-Yoshida, T., Shimizu, T., Shindou, H.(corresponding author). Profiling of fatty acid metabolism in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *Frontiers in Pain Research* Jul 29;3:948689. (2022) doi: 10.3389/fpain.2022.948689. eCollection 2022.

エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースの構築およびスキッピング予測に関する研究

千葉 峻太郎
理化学研究所

緒言

スプライシング制御（エクソンスキッピング）を利用した疾患の治療のためのアンチセンス核酸は、新しい創薬モダリティとして期待されている。スキップの対象とする mRNA 前駆体上のエクソンを、効率よくスキップさせるアンチセンス核酸の標的部位や長さは、通常、網羅的な実験によって決定されている。そこで、本研究では、この網羅的な実験による開発期間とコストの増大を抑制するため、高効率アンチセンス核酸のデザインを補助する計算ツールおよびデータベースを構築し、予測モデルとデータベースをウェブサーバーに実装・公開 (<https://eskip-finder.org>) するとともに、論文としても公開した (参考文献 1)。

結果

研究期間を通して論文及び特許などの文献からエクソンスキッピングに関連する情報を収集およびマニュアルキュレーションを実施した。配列情報、スキップ効率、実験条件などのデータベースを公表した (表)。

このデータベースを利用して、スキップ効率を予測するモデル作成した。まず、phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) および 2'-O-Methyl oligonucleotides (2OMe) によるスキップ効率のデータを、遺伝子 (DMD) 及び実験条件がある程度揃うように抽出し、標的エクソンおよびアンチセンス核酸の配列情報から、標的とアンチセンス核酸の予測結合スコアや GC 含有率などの記述子を作成した。予測モデルは support vector regressor によって構築した。学習データに含まれないテストデータを利用し

た評価により、予測値と実験値に相関が確認できた (図)。この予測モデルをウェブサーバーに実装した。

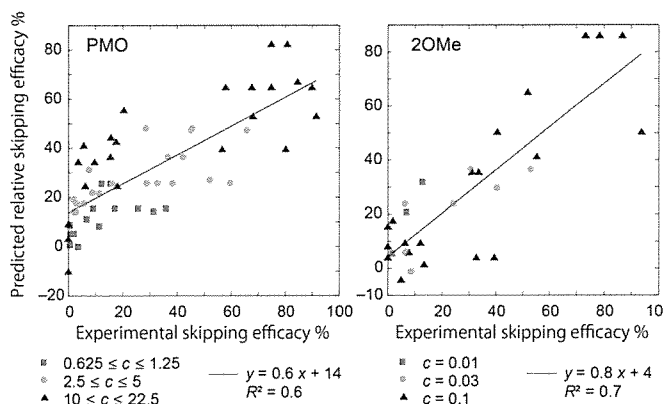


図. スキップ効率の予測値と測定値の相関図。シンボルは実験濃度 (μmol/L) を表す。参考文献より一部改変して転載
Licensed under CC BY 4.0.

結論

本研究では、エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースおよびアンチセンス核酸デザインのための予測ツールを公開した。現在もデータベースに収載すべき特許などの文献からの情報抽出を継続しており、より多様な遺伝子、スキップデータを今後公開する予定である。また、予測モデルに関しても、現在複数の遺伝子の情報を学習に取り込む試みを継続しており、予測モデルの多様な遺伝子への適用可能性の拡大を目指している。

参考文献

1. S. Chiba, K. Lim, N. Sheri, S. Anwar, E. Erkut, M.N.A. Shah, T. Aslesh, S. Woo, O. Sheikh, R. Maruyama, H. Takano, K. Kunitake, B. Duddy, Y. Okuno, Y. Aoki, T. Yokota, eSkip-Finder: a machine learning-based web application and database to identify the optimal sequences of antisense oligonucleotides for exon skipping, *Nucleic Acids Res* (2021) 49, W193.

表. 公開したデータベースの遺伝子名、スキップ効率のデータ数、固有配列数 (カッコ内) (2021年11月25日)

DMD	MSTN	DYSF	SCN1	COL7A1	LAMA2
10076 (3829)	795 (276)	112 (69)	143 (49)	42 (14)	25 (23)
MAPT	USH2A	DMPK	MS4A2	ATM	ALK2/ACVR1
18 (13)	10 (3)	48 (21)	4 (2)	4 (4)	4 (1)
NF1	PMM2	NPC1	NF2	MLC1	MFSD8
3 (3)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)