

5-6 筋レポジトリの拡充と筋ジストロフィー関連疾患の病態解明

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

国立精神・神経医療研究センターでは過去 45 年に亘り筋病理診断を中心とする診断サービスを全国の医療機関に向けて提供し、本邦の筋疾患医療を後方支援してきた。その結果として本邦筋生検の7割以上が集まる、名実ともに国内の筋疾患診断支援センターとして機能するに至っている。特に 2017 年以降のこの 5 年間は年間解析検体数（凍結筋）が毎年 1000 を超え、その結果として構築された筋レポジトリは、総検体数（凍結筋）が23000を超えて、名実ともに世界最高水準のものとなっている。本申請研究においては、下記の3課題を柱として研究を進める。

(1) 筋疾患診断後方支援による筋レポジトリの拡充

過去 45 年に亘り筋病理診断を中心とする筋疾患診断後方支援を行うことで、国立精神・神経医療研究センターは筋疾患分野における揺るぎない国内診断拠点として機能するに至っている。この筋疾患診断後方支援を継続するとともにさらに発展させる。その結果として構築される筋レポジトリをさらに充実させる。さらには、その筋レポジトリ検体を有効に活用することにより、筋疾患の病態解明・治療法開発研究を積極的に推進する。また、海外の筋疾患医療発展途上地域からの検体も一部受け入れて診断支援を行うとともに、筋病理セミナーを開催するなどして国内外の医師に対して教育機会の提供も行う。このことにより、国内のみならず、全世界的な筋疾患医療水準向上に寄与し、国際的な筋疾患診断・研究拠点として機能することを目指す。

(2) 病因・病態解明研究

筋疾患には依然として原因や病態が不明のものが多い。(1)の筋レポジトリに集積された検体を有効活用しつつ、本邦の筋学研究者の力を結集して、筋ジストロフィーおよび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・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診断

法を開発する。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し、筋疾患診断体制をさらに充実させる。また、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、筋線維肥大薬、ならびに低分子医薬品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
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
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	山口大学大学院医学系研究科 臨床神経学
竹田哲也	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
久保田暁	東京大学医学部附属病院 神経内科
栗屋智就	京都大学医学系研究科
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
株田智弘	国立精神・神経医療研究センター

本橋紀夫

神経研究所 疾病研究第四部

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

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

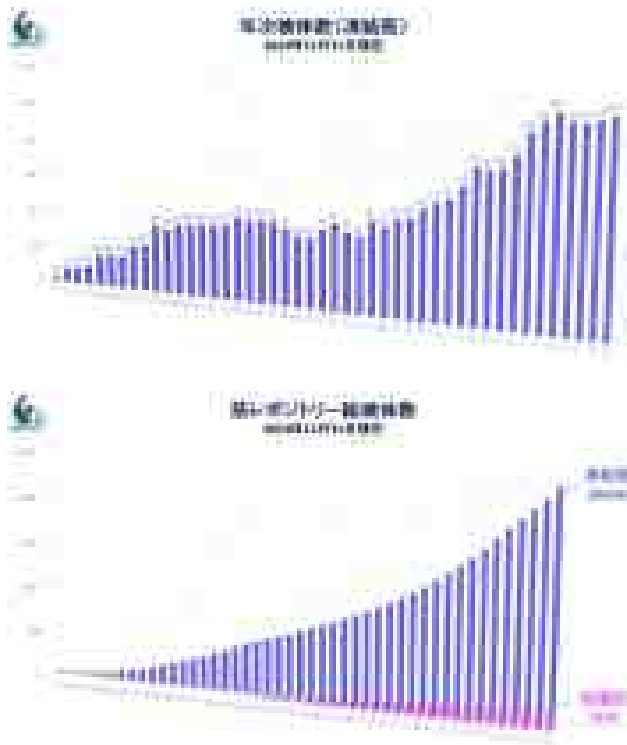
3.研究成果

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) 筋疾患診断後方支援による筋レポジトリの拡充、(2) 病因・病態解明研究、(3) 診断法・治療法開発、の3つを柱として研究を進めた。

1) 筋疾患診断後方支援による筋レポジトリの拡充

a) 筋病理診断と検体数

2023 年（暦年）の総筋病理診断件数（凍結筋年次検体数）は、過去最高の 1147 件を記録した。総検体数は、2023 年末で 24644 検体となった。また培養筋も 2270 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

2023 年 11 月に、タイ・マヒドン大学シリラート病院との共同で第3回国際筋病理セミナーをバンコクで

開催し、好評を博した。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、Google Analytics 旧バージョン（2023 年 7 月終了）では 2018 年 1 月の公開開始以来 2023 年 7 月までに世界 139 カ国のアクセスがあった。その後バージョンが更新され、データが確認できる 2022 年 8 月～2024 年 3 月の期間では世界 115 カ国からのアクセスを集めている。

2) 病因・病態解明研究

a) 眼咽頭遠位型ミオパチー

2019 年、東京大学の石浦らとの共同研究で、これまで原因が不明であった眼咽頭遠位型ミオパチーが *LRP12* 遺伝子の 5'非翻訳領域の CGG リピートの異常伸長によることを明らかにした (Ishiura H, et al. Nat Genet. 2019 Aug;51(8):1222-1232)。この発見を元に、更に *GIPCI* 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。また中国から報告された第 4 の原因遺伝子 *RILPL1* については、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ている (Eura N, et al. Am J Hum Genet. 2022 Nov 3;109(11):2088-2089)。さらには、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)。今回は、白質脳症を伴う眼咽頭ミオパチーの原因として当初報告された LOC642361/NUTM2B-AS1 非翻訳領域の CGG リピート伸長が眼咽頭遠位型ミオパチーを引き起こすこと、むしろ、白質脳症を伴う眼咽頭ミオパチーではなく、眼咽頭遠位型ミオパチーこそが典型的な表現型であることを明らかにした (Pongpakdee et al. Neurol Genet, in press)。また眼咽頭遠位型ミオパチーの典型的画像所見を明らかにした (Eura et al. J Neurol. 2023 Dec;270(12):5988-5998)。

b) SRPK3/TTN の二遺伝子病

共同研究により、*SRPK3* 遺伝子のバリエントと *TTN* の特定のバリエントの組合せでミオパチーを来しうることを初めて明らかにした (Ana Töpf et al. Nat Genet. 2024 Mar;56(3):395-407)。

c) Ullrich 型先天性筋ジストロフィー

COL6A2 の canonical な polyadenylation site を含む領域の欠失を原因とする Ullrich 型先天性筋ジストロフィー例を世界で初めて同定した (El Sherif et al. Neurol

Genet. 2024 Mar 25;10(2):e200137)。

d) VCP ミオパチー

国際共同研究により、VCP 遺伝子バリエーションと臨床病型の分類に関する報告 (Schiava et al. Neurol Genet. 2023 Aug 15;9(5):e200093) を行うとともに、VCP ミオパチーの骨格筋 MRI 上の特徴を明らかにした (Esteller et al. J Neurol. 2023 Dec;270(12):5849-5865)。

e) その他

大野班員らは iPS 細胞を用いて DOK7 による先天性筋無力症候群の病態を明らかにした (Hum Mol Genet. 2023)。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・治療法開発

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)。今回更に、抗合成酵素症候群において陽性自己抗体ごとの病理所見の違いがあることを明らかにするとともに (Brain Pathol. 2023 Jul;33(4):e13155)、り免疫介在性壊死性ミオパチーが特定の HLA 遺伝子多型と相関があることを見いだした (Ohnuki et al. HLA. 2023 May;101(5):449-457)。さらには共同研究により、マウスでの cN1A ペプチドの免疫感作により IBM 病態における抗 cN1A 抗体の病原性を明らかにした (Yamashita et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2023 Dec;94(12):1018-1024)。また、炎症性筋疾患の国際ガイドライン作成にも寄与した (Oldroyd et al. Nat Rev Rheumatol. 2023 Dec;19(12):805-817)。

b) 変異検索と治療標的

栗屋班員らとともに、FKTN 遺伝子 c.647+2084G>T のスプライシング反応に必須な branchpoint が治療標的となり得ることを見出した。フクチン (FKTN) の c.647+2084G>T は、早期停止コドンを持つ偽エキソンを作る。c.647+2084G>T スプライシングレポーターを用いてスプライシング制御に着目した化合物をスクリーニングし、スプライシング反応に必須な branchpoint (BP) が治療標的となり得ることを明らかにした。エキソンスキッピングの標的としての BP の有効性を確認するため、BP を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチド (BP-AON) を設計した。この結果、FCMD 患者の筋管細胞において、FKTN の mRNA とタンパク質の産生が正常に回復した。スプライシング中間体を検出し、FKTN レポーター遺伝子

に BP 変異を作ることにより、機能的 BP を同定した。この BP は、BP-AON によって十分にブロックされた。次に、FCMD を引き起こす別の変異体について BP-AON を設計した。この変異体は、共通の SINE-VNTR-Alu 型レトロトランスポゾンによって病的なエクソンのトラッピングを誘導する。注目すべきことに、この BP-AON は FCMD 患者の筋管細胞における FKTN の mRNA とタンパク質の産生を正常に回復させた。この結果は、BP が遺伝性疾患のエクソンスキッピング治療戦略における潜在的な標的となりうることを示唆している (Ohara et al. Mol Ther Nucleic Acids. 2023 Jul 17;33:404-412)。

c) GNE ミオパチーの治療法開発

2009 年のモデルマウスでの有効性証明以来継続的に支援してきた GNE ミオパチーに対するシアル酸補充療法の第 2/3 相試験 (Suzuki et al. J Neuromuscul Dis. 2023;10(4):555-566, Mori-Yoshimura et al. Orphanet J Rare Dis. 2023 Aug 11;18(1):241) および追加第 3 相試験 (Suzuki et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry, in revision) で有効性を示し、その結果を受けて、シアル酸徐放剤であるアセノベルが 2023 年 3 月正式に薬事承認を受けるに至った。

4. 研究成果刊行一覧

- 1) Komaki S, Kubota A, Katsuse K, Kitamura A, Maeda M, Matsukawa T, Eura N, Saito Y, Nishino I, Toda T: A Case of a Patient with Calpainopathy Carrying Compound Heterozygous Mutations of a de novo Pathogenic Variant of c.1333G>A and a Novel Variant of c.1331C>T in CAPN3. Intern Med. 2024 Mar 18.
- 2) Hamaguchi T, Nishino I, Hirano Y, Uchida N, Fujita-Nakata M, Nakanishi M, Sakai T, Asahina M: Sporadic Late-onset Nemaline Myopathy Associated with Sjögren's Syndrome: A Case Report. Intern Med. 2024 Mar 4.
- 3) Izumi R, Warita H, Niihori T, Furusawa Y, Nakano M, Oya Y, Kato K, Shiga T, Ikeda K, Suzuki N, Nishino I, Aoki Y, Aoki M: Comprehensive Analysis of a Japanese Pedigree with Biallelic ACAGG Expansions in RFC1 Manifesting Motor Neuronopathy with Painful Muscle Cramps. Cerebellum. 2024 Feb 7.

- 4) Saito M, Uchiyama A, Kim J, Endo Y, Yasuda M, Aoki S, Ikeda Y, [Nishino I](#), Motegi SI: Case report of anti-survival motor neuron complex antibody-positive overlap syndrome of diffuse cutaneous systemic sclerosis and idiopathic inflammatory myopathies. *J Dermatol.* 2023 Dec 27.
- 5) Fukushima K, Yoshida T, Yamazaki H, Takamatsu N, Nagai T, Osaki Y, Harada M, [Nishino I](#), Okiyama N, Sugie K, Izumi Y: A Case of Anti-NXP2 Antibody-positive Juvenile Dermatomyositis with Characteristic Fascial Thickening on Muscle Ultrasound and Improvement with Immunotherapy. *Intern Med.* 2023 Nov 6.
- 6) Umemoto D, Kanzawa Y, Nakamura T, [Nishino I](#), Mizuki S, Ohnishi J, Nakajima T, Ishimaru N, Kinami S: Immune-mediated Necrotizing Myopathy in a Patient with Microscopic Polyangiitis: A Case Report. *Intern Med.* 2023 Oct 6.
- 7) El Sherif R, Saito Y, Awaya T, Noguchi S, [Nishino I](#): Splicing Switching of Alternative Last Exons Due to a Deletion Including Canonical Polyadenylation Site in COL6A2 Gene Causes Recessive UCMD. *Neurol Genet.* 10(2):e200137. Mar, 2024. eCollection 2024 Apr.
- 8) Töpf A, Cox D, Zaharieva IT, Di Leo V, Sarparanta J, Jonson PH, Sealy IM, Smolnikov A, White RJ, Vihola A, Savarese M, Merteroglu M, Wali N, Laricchia KM, Venturini C, Vroiling B, Stenton SL, Cummings BB, Harris E, Marini-Bettolo C, Diaz-Manera J, Henderson M, Barresi R, Duff J, England EM, Patrick J, Al-Husayni S, Biancalana V, Beggs AH, Bodi I, Bommireddipalli S, Bönnemann CG, Cairns A, Chiew MT, Claeys KG, Cooper ST, Davis MR, Donkervoort S, Erasmus CE, Fassad MR, Genetti CA, Grossmann C, Jungbluth H, Kamsteeg EJ, Lornage X, Löscher WN, Malfatti E, Manzur A, Martí P, Mongini TE, Muelas N, Nishikawa A, O'Donnell-Luria A, Ogonuki N, O'Grady GL, O'Heir E, Paquay S, Phadke R, Pletcher BA, Romero NB, Schouten M, Shah S, Smuts I, Sznajer Y, Tasca G, Taylor RW, Tuite A, Van den Bergh P, VanNoy G, Voermans NC, Wanschitz JV, Wraige E, Yoshimura K, Oates EC, Nakagawa O, [Nishino I](#), Laporte J, Vilchez JJ, MacArthur DG, Sarkozy A, Cordell HJ, Udd B, Busch-Nentwich EM, Muntoni F, Straub V: Digenic inheritance involving a muscle-specific protein kinase and the giant titin protein causes a skeletal muscle myopathy. *Nat Genet.* 56(3):395-407. Mar, 2024
- 9) Eura N, Noguchi S, Ogasawara M, Kumutpongpanich T, [Hayashi S](#), [Nishino I](#): OPDM/OPMD Image Study Group: Characteristics of the muscle involvement along the disease progression in a large cohort of oculopharyngodistal myopathy compared to oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol.* 270(12):5988-5998. Dec, 2023
- 10) 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.* 62(20):3027-3031. Oct, 2023
- 11) Maruo Y, Saito Y, [Nishino I](#), Takeda A: Successful treatment of frequent premature ventricular contractions and non-sustained ventricular tachycardia with verapamil and flecainide in *RYR1*-related myopathy: a case report. *Eur Heart J Case Rep.* 7(10):ytad509. Oct, 2023. eCollection 2023 Oct.
- 12) Nomiya H, Hamano T, Takaku N, Sasaki H, Usui K, Sanada S, Yamaguchi T, Kitazaki Y, Endo Y, Kamisawa T, Enomoto S, Shirafuji N, Matsunaga A, Ueno A, Ikawa M, Yamamura O, Hasegawa M, Kimura H, [Nishino I](#), Nakamoto Y: Magnetic resonance imaging findings of the lower limb

muscles in anti-mitochondrial M2 antibody-positive myositis. *Neuromuscul Disord.* 33(9):74-80. Sep, 2023

- 13) Tanboon J, El Sherif R, Inoue M, Okubo M, Malfatti E, Nishino I: A 53-year-old man with a 16-year history of asymmetrical proximal muscle weakness, facial muscle weakness, and scapular winging. *Brain Pathol.* 33(5):e13171. Sep, 2023
- 14) 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.* 62(15):2261-2266. Aug, 2023
- 15) Ohara H, Hosokawa M, Awaya T, Hagiwara A, Kurosawa R, Sako Y, Ogawa M, Ogasawara M, Noguchi S, Goto Y, Takahashi R, Nishino I, Hagiwara M: Branchpoints as potential targets of exon-skipping therapies for genetic disorders. *Mol Ther Nucleic Acids.* 33:404-412, Jul, 2023. eCollection 2023 Sep 12.
- 16) 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.* 33(4):e13155. Jul, 2023
- 17) Haji S, Miyamoto R, Morino H, Osaki Y, Tsuji S, Nishino I, Abe M, Izumi Y: Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia Type 9 With a Response to Phosphate Repletion: A Case Report. *Neurol Genet.* 9(3):e200070. May, 2023. eCollection 2023 Jun.
- 18) Ohnuki Y, Suzuki S, Uruha A, Oyama M, Suzuki S, Kulski JK, Nishino I, Shiina T: Association of immune-mediated necrotizing myopathy with HLA polymorphisms. *HLA.* 101(5):449-457. May, 2023

カベオリン-3 を起点とする筋ジストロフィーの病態治療研究

分担研究者 大澤 裕

所属 川崎医科大学神経内科学

緒言

カベオリンは、細胞膜の特殊陥入構造物であるカベオラの構成蛋白質で、その形態形成を司る。さらに、興味深いことに、nNOS, Ras, Src, EGFR など様々なシグナル分子とも直接結合し、その活性を制御するシグナル伝達の足場蛋白質として機能していることが知られている。筋鞘膜には、アイソフォームであるカベオリン-3 が発現しているが、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、カベオリン-3 著減する。すなわち、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未だ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 型膜受容体と結合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。

本研究では、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 を代表とする筋ジストロフィー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 モデルマウスおよびサルコペニアモデルマウスに全身投与し、その有効性についての非臨床 POC 取得を目指す。すなわち、ペプチドによる disease modifying therapy の基盤を確立する。

2023 年度マイルストーン:①モデルマウス作出、

②DMD マウスのジストロフィー変化改善。

2024 年度マイルストーン:①モデルマウス解析、

②サルコペニアマウス筋力低下改善。2025 年

度マイルストーン:①カベオリン-3 の DMD 病態

シグナル制御機構解明、②DMD マウスおよびサルコペニアへの有効性確立。

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:筋特異的プロモーター下に、カベオリン-3 を欠損する LGMD1C 型変異カベオリン-3 (P104L)、および野性型のカベオリン-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、またその基盤となる分子機構についての解析に着手した。

③マイオスタチン阻害ペプチド医薬のサルコペニアモデルマウス投与解析:全身投与によって、寿命、筋萎縮、および遅筋化が改善するか否かについて解析を予定している。

結果

①カベオリン-3 高発現及び欠損 DMD モデルマウス作出・解析:

筋特異的プロモーター (MCK promoter/enhancer) 下に、野生型カベオリン-3 cDNA と常染色体潜性肢帯型筋ジストロフィー 1C (LGMD1)1C 型変異 CAV3^{P104L} 相補 DNA と SV40 ポリ A 付加配列を組み込んだトランスジーンを、それぞれ作成した。最重症型 DMD モデルマウス (DBA/2-*mdx*) 受精卵に注入、前者で 4 系統、後者で 6 系統のマウスが誕生した。ウエスタンブロット解析では、骨格筋・心筋のカベオリン-3 蛋白質量の増加、減少が確認できた。(2023 年度マイルストーン:達成)

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:

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

プチドを同定できた。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 に対する有効性について非臨床 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。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を策定した (未発表)。現在、このペプチドの筋線維壊死抑制の分子機構について、筋組織染色と培養細胞を用いて検討中である。(2023 年度マイルストーン：達成)

③マイオスタチン阻害ペプチド医薬のサルコペニアモデルマウス投与解析：

サルコペニアモデル α -Klotho マウス (Ohsawa Y, Am J Pathol. 193(5):591-607, 2023) に対する全身投与解析を準備している。

考察

ジストロフィンの発見から現在までに多く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 修復治療などのテラ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、共通して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、「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を想定することが可能である。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、できればシグナル阻害の立場か

ら治療介入への突破口を開きたい。

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 2023 年 6 月に実施した PMDA RS 戦略相談によって、毒性試験を中心とした非臨床試験内容について合意が得られ、現在その実施について検討している。一方、我々は既に長寿蛋白質 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を報告している (Ohsawa Y, Am J Pathol. 193(5):591-607, 2023)。マイオスタチン阻害戦略のサルコペニアへの有効性を α -Klotho 欠損マウスを用いて検証する予定である。

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を、それぞれ達成できた。2024 年度には、①モデルマウス解析を進め、②将来のペプチド上市に向けた非臨床試験を実施とサルコペニアモデルマウスへの投与を予定している。

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

中村尚子 1)、鈴木直輝 1)、井泉瑠美子 1)、小野洋也 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

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下と筋萎縮を呈する遺伝性の筋疾患であり、骨格筋の壊死・再生を主病態とする。Dysferlinopathy は dysferlin 遺伝子の変異により筋細胞膜タンパク dysferlin が欠損することで引き起こされる常染色体潜性(劣性) 遺伝の成人発症の筋ジストロフィーで、治療は対症療法のみで根治療法はおろか進行を抑制する治療法すら未だに開発されていない。Dysferlin の主な機能は細胞膜修復であり、常に機械的ストレスにさらされている骨格筋にとって、筋幹細胞による筋再生とともに筋損傷に対抗する本質的で重要な機能である。細胞膜損傷によって引き起こされる細胞膜修復過程におい

ては、Ca²⁺の細胞内への流入をトリガーとし、小胞が損傷部位に集まりシールのように損傷部位を埋める「パッチ形成」が行われると言われており、mitsugumin 53 (MG-53) や annexins など dysferlin と結合し細胞膜修復に関わるタンパクもいくつか発見されている。しかし、シグナル経路やタンパク同士の相互作用については未解明な部分が多く全容解明には至っていない。dysferlin 遺伝子の変異は遺伝子全長にわたって見られるものの、頻度別に見ると膜結合ドメインである C2 ドメインの 3、4 番目に挟まれた領域(第 II 領域) に集中している。第 II 領域には機能ドメインの多くが存在しているが、その機能は明らかになっていない。以上の背景を踏まえ、この第 II 領域に注目し、新たな dysferlin 結合タンパクの探索と同定したタンパクと細胞膜修復機能との関係を解明することを目的に研究を行った。

方法

Dysferlin のドメイン構造に着目し、C2 ドメインの間に挟まれた第 II 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した。

結果

はじめに、質量分析により第 II 領域に結合するタンパク候補を探索し、セリン・スレオニキナーゼ蛋白 X に注目した。実際にレーザーにより骨格筋細胞膜に損傷を起こすと損傷部位に X が集積し、dysferlin と共局在することを確認した。X を Knock Out (KO)したマウス筋芽細胞(C2C12)ではレーザー膜損傷実験で細胞膜

修復機能が低下しており、また、シリンジローディングによる膜損傷時に漏出した ATP を測定すると、X 欠損筋芽細胞では野生型よりも有意に漏出量が多く、細胞膜修復率が低下していた。そして、dysferlin 欠損 Bla/J マウスにおいて同様のレーザー膜損傷実験を行うと、X の過剰発現により、細胞膜修復機能の改善がみられた。さらに阻害剤により X のキナーゼ活性を阻害すると膜修復率が低下していた。以上から X が細胞膜修復機能を正に制御することが明らかになった。

次に、X のリン酸化基質を同定するため KO 筋芽細胞と野生型筋芽細胞を用いてリン酸化プロテオミクス解析を行ったところ、X 欠損細胞においてリン酸化が減少しているタンパクとして dysferlin と共に細胞膜修復機能に関わることが報告されている annexin A1 が見出された。annexin A1 は Ca^{2+} イオンの流入を契機に膜損傷部位に速やかに動員され、dysferlin と結合し、特に前述した“パッチ形成”に関わることが報告されており、リン酸化 annexin A1 と細胞膜修復との関連の報告はないものの、annexin A1 のリン酸化により膜局在や小胞集簇が起こるという報告はあり X が annexin A1 のをリン酸化に関与することで細胞膜修復機能を制御している可能性が示唆された。

考察

本研究結果より、細胞膜損傷が生じた際に dysferlin と共に X と annexin A1 が損傷部位に動員され、X による annexin A1 のリン酸化を介して、“パッチ形成”が起こることが想定された。dysferlin-蛋白 X-リン酸化 annexin A1 の分子連関は細胞膜修復機能を改善させる治療標的候補であり、dysferlinopathy 以外の筋ジストロフィーの筋再生にも広く重要な役割を担っていることが予想される。

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. Izumi R, Ikeda K, Niihori T, Suzuki N, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Warita H, Tateyama M, Aoki Y, Aoki M. Nuclear pore pathology underlying multisystem proteinopathy type 3-related inclusion body myopathy. *Ann Clin Transl Neurol* 11, 577-592, 2024.
2. 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 Neuromuscul Dis* 10, 555-566, 2023.
3. Mori-Yoshimura M, Suzuki N, 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. Efficacy confirmation study of aceneuramic acid administration for GNE myopathy in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 18, 241, 2023.

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 Paniz Farshadyeganeh¹⁾、大河原美静¹⁾、Mohammad Nazim¹⁾、増田章男¹⁾

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学

緒言

先天性筋無力症候群(CMS)は神経筋接合部(NMJ)に発現する遺伝子の先天的な遺伝子変異によって神経筋接合部信号伝達が障害される疾患群であり、原因遺伝子によって臨床症状と治療方法が大きく異なる¹⁻⁴。CMSの臨床症状として、筋の易疲労性・持続的な筋力低下・筋萎縮・筋低形成に加えて、耳介低位・高口蓋などの顔面小奇形が時に認められる。自己免疫機序による重症筋無力症と異なり日内変動や易疲労性が明らかでなく、日差変動を呈する症例がある。CMSの多くは、2歳以下に発症するが、出生直後の数日間のみ認められた筋力低下が軽快し思春期・成人期に再増悪し成人発症と判断される例や、新生児期に全く症状がない成人発症例も存在する。特に常染色体顕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、SNAP25B-CMS⁷、PURA-CMS⁸の3型も常染色体顕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潜性遺伝形式を示す。

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、37種類の遺伝子における原因遺伝子変異が同定されており14の病型に分類が可能である。

GFPT1はヘキソサミン生合成経路(hexosamine biosynthesis pathway, HBP)の最終産物uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)の律速酵素である。GFPT1遺伝子の病的バリエーションが糖化酵素欠損によるCMSを惹き起こす。GFPT1のエクソン9は骨格筋・心筋特異的に選択的スプライシングを受け長いGFPT1-Lが生成される。GFPT1-Lのスプライシング制御と生理的意義は未解明である。

方法

ヒトGFPT1エクソン9の選択的スプライシングを制御する分子機構の解析を、splicing cis-elementへの変異導入、RNA結合タンパク質のartificial tethering、ならびにearly spliceosomal complexの単離により行った。骨格筋におけるGFPT1-Lの役割を解明するために、Gfpt1エク

ソン9ノックアウト(KO)マウスを作成し、メタボローム解析、経口ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験、運動能評価、免疫蛍光顕微鏡法、電子顕微鏡による微細構造解析により行った。

結果

RNA結合タンパク質のsiRNAによる解析により、SRSF1、Rbfox1/2がスプライシングエンハンサーとして機能し、hnRNPH/Fがスプライシングサイレンサーとして機能することを明らかにした。次に、ヒトGFPT1エクソン9のミニ遺伝子を構築し、splicing cis-elementsに変異を導入した。その結果、SRSF1とRbfoxの結合モチーフの破壊はスプライシングを阻害し、hnRNPH/F結合モチーフの破壊はスプライシングを増強した。RNA probeのSRSF1およびRbfox1/2の結合部位に変異を導入することによりU1 snRNPとRNAプローブとの結合が阻害され、hnRNPH/Fの結合部位に変異を導入することによりこの結合が亢進した。さらに核抽出液からこれらのRNA結合タンパク質を除去してU1 snRNPプルダウンを行ったところ、ΔSRSF1およびΔRbfox1/2核抽出液ではU1 snRNP分子の結合が減少し、ΔhnRNPH/F抽出液ではU1 snRNP分子の結合が亢進した(図1)。

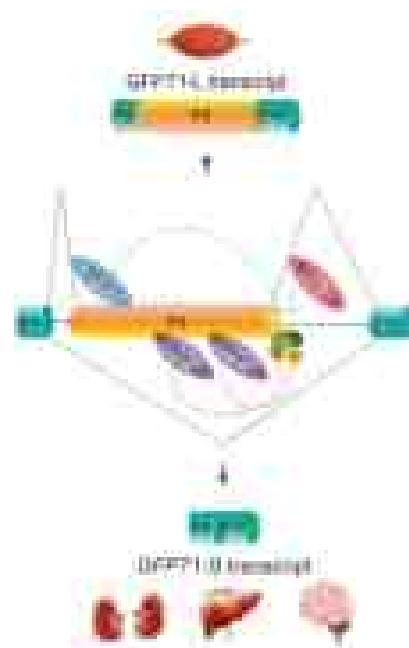


図 1. SRSF1 と Rbfox1/2 が協調して U1 snRNP の 5' splice site への動員を促進することにより GFPT1 エクソン 9 のスプライシングを増強する。逆に hnRNPH/F は U1 snRNP の 5' splice site への動員を阻害することによってこのスプライシングを抑制する。

次に、*Gfpt1* エクソン 9 の骨格筋における機能を解析するため、CRISPR/Cas9 システムにより *Gfpt1* エクソン 9 欠損(KO)マウス系統を作製した。KO マウスの上腕三頭筋では、総 *Gfpt1* mRNA 量が 1.3 倍に増加し、総 *Gfpt1* タンパク質が 4.5 倍に増加した。同様に、KO マウスでは上腕三頭筋の UDP-HexNAc (UDP-GlcNAc + UDP-GalNAc) が 2.8 倍に増加した。さらに、ドットプロット解析では、KO マウスの骨格筋では O-および N-グリコシル化タンパク質が約 2 倍増加していた。メタボローム解析では KO マウスにおける解糖経路と TCA サイクルの抑制が示された。また、KO マウスではアスパラギン酸とその下流の代謝物が著しく減少していた。OGT と ITT テストでは、加齢 KO マウスでは、インスリンに対するグルコース取り込みが障害されていた。

次に KO マウスの運動機能と NMJ 構造を解

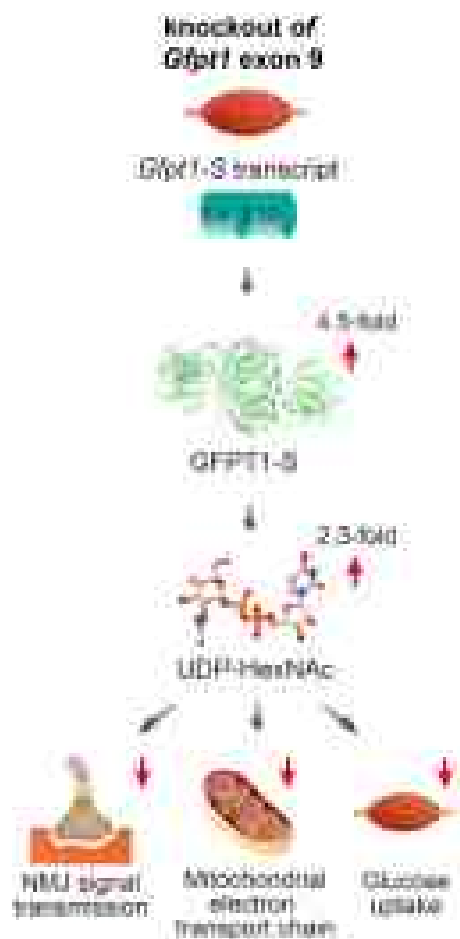


図 2. 骨格筋特異的に GFPT1-L を欠損する KO マウスでは、骨格筋における GFPT1-S と UDP-HexNAc が顕著に増加し、グルコースの細胞取り込み、ミトコンドリア電子伝達系、神経筋接合部構築が抑制された。

析した。ロタロッド試験とぶら下がり試験の両者において KO マウスの運動能力は加齢とともに徐々に低下した。次に、12~14 ヶ月齢の KO マウスの上腕三頭筋、腓腹筋、大腿直筋におけるアセチルコリン受容体 (AChR) クラスターの定量的解析を行ったところ、AChR クラスター面積は有意に減少し、断片化した AChR クラスター数は有意に増加していた。生後 12 ヶ月から 14 ヶ月の NMJ の超微細構造では、神経筋接合部終板構造の単純化と神経末端の矮小化が観察された。高齢の *Gfpt1* エクソン 9 KO マウスは、*GFPT1*-CMS 患者で観察されるような異常な NMJ 構造を示した。KO マウスの表現系は、*GFPT1* の機能欠損変異を持つ CMS 患者に認められる肢帯型筋無力症に合致した(図 2)。

考察

SRSF1 と Rbfox1/2 が協調的に U1 snRNP の 5' splice site への動員を促進することによってヒト *GFPT1* エクソン 9 のスプライシングを増強し、逆に hnRNP H/F は U1 snRNP の 5' splice site への動員を阻害することによってこのスプライシングを抑制することを明らかにした。さらに、骨格筋特異的に *GFPT1*-L を欠損する KO マウスを作出し、骨格筋における *GFPT1*-L 欠損は *GFPT1*-S と UDP-HexNAc の量を顕著に増加させ、グルコースの細胞取り込み、ミトコンドリア電子伝達系、神経筋接合部構築を抑制することを明らかにした。その結果、高齢 KO マウスは、筋力低下と易疲労性を示し、*GFPT1*-CMS と類似の表現系を示した。

結論

GFPT1 エクソン 9 のスプライシングによる骨格筋特異的な *GFPT1*-L の発現は HBP への glucose flux を抑制し、骨格筋エネルギー産生への glucose の効率的な活用を目的とすることが示唆された⁹。

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. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 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. Qashqari H, McNiven V, Gonorazky H, et al.: PURA syndrome: neuromuscular junction manifestations with potential therapeutic implications. *Neuromuscul Disord.* 32:842-844, 2022
 9. Farshadyeganeh P, Nazim M, Zhang R, et al.: Splicing regulation of GFPT1 muscle-specific isoform and its roles in glucose metabolisms and neuromuscular junction. *iScience.* 26:107746, 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 (EDMD) を中心に、モデルマウスを用いた解析を進めている。また、小型魚類を用いて各種筋疾患モデルを作製し、病態解明と治療法開発を進めている。

エメリー・ドレイフス筋ジストロフィー (EDMD) をはじめとする核膜関連筋疾患について、エメリン欠損マウス (Emd)、Lmna H222P ノックインマウス (H222P)、Emd と H222P の重複変異マウス (EH) の 3 種の核膜病モデル動物や初代骨格筋培養細胞や患者由来 iPS 細胞を用いて、核膜病における筋障害機序の解明を推進することを目的とする。

各種筋疾患モデルを作製し、病態解明と治療法開発を進める。

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

EDMD モデルマウスである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) について、骨格筋と心筋の症状の経過を組織学的、生理学的に解析した。

一方、ゼブラフィッシュを活用した研究では、麻酔薬による骨格筋障害の病態解明と治療法

開発に関する研究を進めた。また、Jagged 1 の発現を可視化可能なゼブラフィッシュを作製し、筋変性を改善する化合物スクリーニングを行った。

うことによって、

結果

H222P と EH はいずれも 18 週、30 週で心機能低下、心筋の線維化が経時的に増悪したが、両者に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。

Jagged 1 の発現を可視化できるモデルフィッシュの作製に成功し、化合物スクリーニングによって DMD モデルフィッシュの表現系を改善する薬剤を見出した。

考察

エメリンの欠損は H222P の骨格筋症状を増悪させるが、心筋では差が認められず、同じ横紋筋であってもエメリンの機能が異なる可能性が示唆された。

Jagged 1 の発現を促進する薬剤は、筋再生能を活性化する可能性がある。

結論

核膜タンパク質は同じ横紋筋であっても、組織特異的な機能を有している可能性を明らかにした。

ゼブラフィッシュモデルを用いて DMD フィッシュの筋変性を抑制する薬剤を見出すことができた。

参考文献

1. Wada E, Matsumoto K, Susumu N, Kato M, Hayashi YK. Emerin deficiency does not exacerbate cardiomyopathy in a murine model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by an *LMNA*

gene mutation. J Physiol Sci
2023;73:27. DOI:10.1186/s12576-023-
00886-0

2. Wongkitikamjorn W, Wada E,
Hosomichi J, Maeda H, Satrawaha S,
Hong H, Yoshida K, Ono T, Hayashi
YK. Metabolic dysregulation and
decreased capillarization in
skeletal muscles of male
adolescent offspring rats exposed
to gestational intermittent
hypoxia. Front. Physiol.
2023;14:1067683.
3. 林由起子. 成人で見られる先天性ミオ
パチーの診断と治療. 脳神経内科
2023; 99(2): 195-200.
4. 林由起子. Emery-Dreifuss 型筋ジス
トロフィー. 小児内科
2023;55(12):1937-1940.

細胞外環境を標的とした筋疾患の病態解明と治療方法開発

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

研究期間全体を通じて、細胞外環境に着目した病態を解明し治療に繋げていく。細胞外環境には骨格筋の基底膜とこれが制御するメカニカルストレスとその下流シグナルを広く定義して研究の標的としていく。これまでに、3次元の筋培養の開発を通じて、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てきた。健常筋は、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。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を視野に入れる。メカニカルストレスを定性、定量的に負荷する培養システムを用いて形態学的、生化学的に解析し、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を開発する基礎とする。

方法

疾患 iPS 細胞由来筋細胞を使った3次元培養を確立し、一軸伸展を用いた機械的刺激による変化を検証する。特に Duchenne 型筋ジストロフィー筋を使ってモデル系の確立を行い、機械

的刺激前後の培養上清中 CK、培養上清中 microRNA を測定した。

結果

細胞生存率アッセイの結果、健常筋管では機械的刺激後の細胞生存率は 72.4%なのに対して、ジストロフィン変異筋管は 21.9%となっていた。細胞外に漏出する miR に関しては、miR-22, -95a, -206 はジストロフィン変異を持つ筋管でのみ機械的刺激後に培養上清中に漏出した。また、miR-1, -30a, -133a, 133b, -193b, 208b, 378a, -499a は健常筋管、ジストロフィン変異筋管どちらも機械的刺激後に培養上清中に漏出したが、ジストロフィン変異は漏出を助長した。

考察

今年度の結果から、神経や血管支配にかかわらない、骨格筋自身のメカニカルストレスへの応答の分子機構が一部明らかになった。本モデルの優越性としては、免疫応答等生体の総合的反応から切り外して骨格筋細胞をはじめとする特定の細胞へのメカニカルストレスへの反応を抽出できる点である。また、細胞外マトリックス構造を残した培養系であることから、播種する細胞種やスカホールドの質を変えることで、細胞外環境を標的とした筋疾患の病態解明と治療方法開発に貢献するものと考ええる。また、別途、運動などのメカニカルストレスによる血管構築の可変性などの検討も行っており、将来的には、本モデルに共培養技術をくわえることで、組織全体のメカニカルストレス応答性の変化について検証を加える必要がある。

結論

骨格筋自身の細胞外環境、メカニカルストレスへの応答の分子機構が一部明らかになった。

参考文献

- 1 Dyssegmental dysplasia Rolland-Desbuquois type is caused by pathogenic variants in HSPG2 - a founder haplotype shared in five patients Paniz Farshadyeganeh, Takahiro Yamada, Hirofumi Ohashi, Gen Nishimura, Hiroki Fujita, Yuriko Oishi, Misa Nunode, Shuku Ishikawa, Jun Murotsuki, Yuri Yamashita, Shiro Ikegawa, Tomoo Ogi, Eri Arikawa-Hirasawa & Kinji Ohno *Journal of Human Genetics* 2024
- 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 平澤 恵理、山下 由莉 難治性疾患(難病)を学ぶ シュワルツ・ヤンペル症候群 遺伝子医学 10(3) 98 - 100 2020 年 7 月
- 4 Yamashita Y, Nakada S, Yoshihara T, Nara T, Furuya N, Miida T, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle. *Sci Rep*. 2018 May 17;8(1):7766. doi:10.1038/s41598-018-25635-x.
- 5 *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.
- 6 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
- 7 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).
- 8 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.
- 9 Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva JA Trejo, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N and Ueno T, PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to the proteasome 2 activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* 2014 Apr;10(4):631-41.

分担研究課題名 骨格筋の萎縮・肥大の分子機構と筋疾患の病態解明に関する研究

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 難病治療学研究部門

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

所属

1) 藤田医科大学 医科学研究センター 難病治療学

2) 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

筋ジストロフィーと関連難治性神経筋疾患については、多くの原因遺伝子の変異が明らかになり患者登録・診断・治療応用が展開されている。しかし、治療法はいまだに限定的であり、萎縮・肥大・変性・細胞浸潤といった病態の詳細な解明は重要課題である。サルコペニアにおいても筋ジストロフィーと類似の病態・病理が観察され、その分子病態の把握は重要である。骨格筋は可塑性の高い組織である。本研究では、筋収縮を担う骨格筋構成分子の翻訳後修飾の詳細解析、筋量・筋質の制御機構、筋萎縮制御解析を推進した。筋萎縮・筋分化の破綻に関与する機構を多角的な手法で解析した。

方法

骨格筋構成分子の要であるミオシンに着目した研究を展開している。ミオシンには速筋型、遅筋型、胎児型、心筋型のサブタイプが存在する。速筋型ミオシン重鎖をコードする *Myh1, 4* のダブルノックアウト(dKO)を遺伝子改変で作成し詳細な解析を進捗させた。

速筋型ミオシンがモノメチル化翻訳後修飾を示すという新知見を明らかにしている。ミオスタチン抑制による筋肥大モデルでは骨格筋

のミオシンのメチル化酵素が上昇しモノメチル化が増加するという興味ある現象を見いだした。メチル化抗体による解析、網羅的解析手法を駆使して研究を進捗させた。さらに、筋レポジトリーに保存されている各種の筋ジストロフィー試料を解析し、メチル化の増減を調査した。

平面内細胞極性を担う分子の4回膜貫通型分子 Vangl2 と接着分子 N-cadherin は分子間相互作用する。両者の二重ヘテロ変異体を解析したところ尾部の二分脊椎をきたすことを示し詳細な組織学的解析、結合解析、局在解析を行なった。N-cadherin と同様にクラシックカドヘリンである M-cadherin は筋衛星細胞の静止期のマーカーとして解析が進んでいる。M-cadherin と Vangl2 との筋衛星細胞と筋線維近傍組織における相互作用研究を3次元的な蛍光染色解析を取り入れて着手した。

結果

Myh1, 4 の dKO は生後3週齢程度から顕著な筋萎縮を示し、4週齢までにすべての個体が死亡する。筋力低下、体重低下、サルコメア構造の破綻、ミトコンドリアの形態異常が解析され新たな筋萎縮モデルとなることが示された。骨格筋での高感度の一分子レベルでの mRNA を解析する in situ hybridization chain reaction 法を応用した解析から *Myh4* 発現筋線維での萎縮が顕著であることがわかった。腓腹筋では、筋萎縮に関連した Smad シグナルやユビキチン系の上昇のみならず、代償性に mTOR などの筋肥大シグナルの変化が観察された。さらに、生後2~3週齢の時点での筋組織の解析を行なったところ、野生型マウスと比べて dKO マウスは早期から著しい筋萎縮を示した。筋衛星細胞や間葉系間質細胞の数的な変動が観察された。 μ CT 解析から頭蓋骨を含めた全身の骨組織の形成不全・希薄化が観察された。

ミオシン重鎖がメチル化修飾されることを示し、その酵素 (Mett12le) を同定した。ヒトやマウスの骨格筋でのモノメチル化が確認された。

種々の筋疾患の筋試料を用いてミオシンのメチル化を精査したところ、筋硬直性ジストロフィーで低下が見られた段階である。データベース解析でメチル化酵素ファミリーの中で *Mettl12le* のみが低下することが確認された。*Mettl12le* の KO マウスの解析を進め、筋量・筋張力の低下、アクトミオシンの動態の変化が示された。筋衛星細胞の表面マーカーとして Pax7 と共に M-cadherin が知られている。M-cadherin と細胞の極性決定分子である Vangl2 が相互作用することを示した。足底筋組織全体を用いた whole mount immunofluorescence 染色法を取り入れ解析し、両者が筋衛星細胞で共局在することを 3 次元解析で示すことができた。筋衛星細胞と筋線維との相互作用について解析を進めている。

考察

速筋型ミオシンの中で Myh4 (MyHC-IIb) は最も強い瞬発力を示すが、ヒトでの発現は定常状態では少ないとされており筋疾患での変異の報告はまだない。点変異により軽度の筋萎縮を呈する可能性が示唆され解析を進めている。

骨格筋収縮の要であるミオシン分子の制御にメチル化が関与することを示した。酵素系を明らかにし、筋疾患との関連についての理解を深める研究を遂行した。筋ジストロフィーの一種ではミオシンのメチル化が低下することを認めた。今後は、その機序や生理学的意義についての理解を深める研究を行う予定である。筋衛星細胞のマーカーとして頻用されている M-cadherin の相互作用分子として平面内細胞極性因子を見いだしたので、さらに詳細な解析を行う計画である。

結論

骨格筋は可塑性の高い組織でありこれまでに様々な手法を駆使して筋肥大・萎縮についての解析を行ってきた。本研究では、骨格筋の収縮系タンパク質であるアクトミオシン系、特にミオシンについての解析を行なった。ミオシン

重鎖の二重変異モデルが早期から重度の筋萎縮を示すことを明らかにした。速筋型ミオシンがモノメチル化修飾を受けることを生化学および細胞生物学的に解析し筋ジストロフィー病態との関連を示唆することを示した。筋衛星細胞のマーカーである M-cadherin と細胞極性決定因子との相互作用についての解析を開始した。衛星細胞が筋線維と基底膜側では極性が異なる可能性があり引き続き詳細な解析を行う予定である。

参考文献

1. 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.
2. 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.

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。さらに、膜脂質分子の性質の違いによる細胞膜物性の変化についても着目し、特に脂肪酸鎖の不飽和化をもたらす酵素群の役割解明を目指した。

方法

Piezo1 欠損マウス (*Piezo1^{tm1c(KOMP)Wisi}*) 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、FACS を用いた筋幹細胞の単離を行い、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 *Piezo1-tdTomato* マウスを用いて、

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。これらの原因として、*Piezo1-tdTomato* マウスを用いた解析により、PIEZO1 チャネルが幹細胞の分裂時に分裂溝に強く集積することを明らかにした。同欠損マウスの解析により細胞分裂の遅延が認められたことから、PIEZO1 は幹細胞の秩序だった分裂の促進に係ることが示された（文献 2 にて報告）。

一方、PIEZO1 は物理的な力を感知しカルシウムイオンなどのカチオン流入をもたらすことから、種々の役割を有することが想定された。明らかになりつつある。実際、同欠損マウスの解析により、休止状態の筋幹細胞では Pax7 陽性細胞数の減少が認められた。すなわち筋幹細胞プールの維持に関わることが示唆される。また、単離筋幹細胞の解析により、PIEZO1 の発現量は幹細胞ごとで異なる現象が認められた。筋幹細胞ではそれぞれの細胞群にて性質がことなるいわゆる「不均一性」が幹細胞プールの維持、継続的な筋再生に重要であることが明らかになりつつある（文献 3）。そこで我々は PIEZO1 の発現量の高低に基づき細胞を分取し、Pax7 の発現強度を免疫染色法により検討したところ、PIEZO1 高発現細胞群では Pax7 発現量が高く、PIEZO1 低発現細胞では Pax7 発現量が有意に低

いことが示された。これらの結果から、PIEZO1 が筋幹細胞の幹細胞性を制御する可能性が示唆された（論文準備中）。

また、PIEZO1 以外の機械受容イオンチャネルとして、高発現する因子について、それらの遺伝子欠損マウスの作出ならびに解析を試みた。興味深いことに TRP チャネルのひとつの欠損マウスでは、*Piezo1* 欠損と比較してより強い表現型が認められた。

機械受容イオンチャネルは、脂質分子により活性制御されることが明らかになりつつある。また脂質分子の組成とくに疎水性部分の脂肪酸鎖については、不飽和化（二重結合の導入）により膜の流動性が変動することで、膜物性に大きな影響をもたらす。そこで今年度は脂肪酸鎖の不飽和度を導入する酵素に着目し、筋芽細胞株 C2C12 ならびに単離筋衛星細胞に対して RNA 干渉法を用いて解析を行った。その結果、脂肪酸鎖不飽和化をもたらす酵素の発現減少により、筋管形成不全とともに幹細胞の性質の変動が認められた（論文準備中）。

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、幹細胞に掛かる物理的な力を感じて自身の局在を変化させ、幹細胞の活性化、分裂、増殖など適切な機能をもたらすと考えられる。また PIEZO1 の発現は、各幹細胞にて不均一であった。すなわち PIEZO1 が発現変動することで、筋幹細胞としての幹細胞性を規定する最上流因子のひとつであることが示唆された。PIEZO1 と複数の TRP チャネルは機能的なすみわけをもって機能することが示唆された。現在、これらの複数のチャネル群がどのような下流経路を活性制御し、筋再生をもたらすか、オミクス解析を行うことで詳細な検討を行う予定である。

細胞膜物性は筋幹細胞の機能に重要な役割

を果たすことが想定されてきたが、その詳細は以前不明である。我々は脂質分子の不飽和化をもたらす酵素について、その発現ノックダウンにより筋管形成不全などが認められた。興味深いことに筋芽細胞の融合に係る因子(Myomaker など) の発現も減少したことから、脂質分子の性質が変化することで、遺伝子発現変動をきたすものと考えられる。今後、その分子機構の解明を遺伝子欠損マウスの解析等により明らかにする予定である。

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群は、チャネル間の機能的なすみわけをもって、骨格筋再生能に重要な役割を果たすことが示された。また膜脂質分子の組成は、筋管形成等に重要であることが示唆された。今後、更なる分子機構解明により、筋幹細胞の活性化メカニズムや幹細胞性の維持機構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. 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).
3. Tierney MT, Sacco A. Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. *Trends Cell Biol*. 26(6):434-444 (2016).

骨格筋興奮収縮連関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、遠藤 ゆかり

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、T管膜の脱分極によって開口する (脱分極誘発性 Ca^{2+} 遊離、DICR)。DICRはRyR1の他にCav1.1、 $\beta 1a$ 、Stac3、JP2の4因子が必須であるが、それらの因子の突然変異が悪性高熱症 (MH) や種々のミオパチー等の先天性筋疾患を引き起こすことがわかってきた。Cav1.1の遺伝子変異はMH患者から見つかっているが、なぜCav1.1変異が悪性高熱症を引き起こすのかは不明である。本研究では、申請者らが最近開発したDICR再構成系を利用して、Cav1.1の遺伝子変異によるMHの発症機構を解明することを目的とした。

方法

DICR再構成系はRyR1発現HEK293細胞に4因子とKir2.1遺伝子をバキュロウイルスで導入することにより構築した。小胞体内 Ca^{2+} 測定を行うためR-CEPIA1er遺伝子も併せて導入した。96ウェルプレートに細胞を播種して、翌日にバキュロウイルス溶液を添加した。ウイルス感染24-28時間後にFlexStation3プレートリーダーを用いて小胞体内 Ca^{2+} 濃度を経時的に測定した。

結果

広島大学で悪性高熱症疑い患者から同定された4種類の新規Cav1.1変異 (A560T、S879P、F1161L、D1382V) についてDICR再構成系を

用いて機能評価を行なった。4種類の変異のうち、S879PとF1161LはDICRのカリウム濃度依存性が野生型に比べて亢進していた。Cav1.1ゲーティング電流を測定したところ、両変異では電位依存性が負電位側にシフトしていた。以上の結果から、Cav1.1活性化の膜電位依存性が亢進していることがわかった。興味深いことに、両変異を発現する再構成細胞ではカフェイン依存性が野生型発現細胞に比べて亢進していた。この亢進は溶液のカリウム濃度の低下 (5 mM から 1 mM) またはDICR構成因子 ($\beta 1a$ 、Stac3) の除去で消失した。

考察

今回異常が見られた変異 (S879P、F1161L) はいずれも膜貫通ドメインに存在し、電位センサーであるS4セグメントに近接している。そのため、S4セグメントの構造変化に影響を与えて電位依存性を更新した可能性が考えられる。

一方、異常が見られなかった変異 (A560T、D1382V) も別々の家系で報告されていることから、MHに関連する可能性がある。DICR再構成系は興奮収縮連関の最小単位でのアッセイ系であり、他の収縮因子を含んでいない。したがって、他の因子を介する何らかの制御機構がある可能性もある。筋系細胞を用いて検証する必要がある。

S879PとF1161Lではカフェイン依存性が亢進していた。カフェイン依存性はRyR1の Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) を反映しているため、両変異体発現細胞ではRyR1のCICRが亢進していることを意味する。両変異では静止状態でのDICR活性が持続的に高まっていて、これが何らかのメカニズムでCICR活性を亢進しているものと考えられるが、詳細な機構については今後の検討が必要である。

結論

Cav1.1 の遺伝子変異は DICR の亢進を起こして MH を発症する可能性が示唆された。今後は、Cav1.1 変異導入マウス等のモデル動物を用いて、疾患発症機構を検討していく予定である。

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, November, 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, April, 2023
3. Matsukawa H, Murayama T. Development of ryanodine receptor (RyR) inhibitors for skeletal muscle and heart diseases. *Juntendo Med J*, **69**: 180-187, April, 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生が早く、多個体の飼育が可能なゼブラフィッシュを筋ジストロフィー関連疾患のモデルとして活用することを目指している。令和5年度は劣性遺伝形式の筋疾患のモデルフィッシュの開発手法と解析手法の構築を目指し、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いた肢帯型筋ジストロフィー(LGMDR6)モデルの開発をおこなった。

方法

劣性遺伝形式の筋ジストロフィーとして *sgcd* 遺伝子(δ サルコグリカン遺伝子)の機能喪失変異によって生じる LGMDR6 を選んだ。その理由として、これまでにジストロフィン、ジストログリカン、ラミニンに機能喪失変異を持つゼブラフィッシュが単離されており、いずれも顕著な筋ジストロフィー症状を示したため、ゼブラフィッシュでもジストロフィン-糖タンパク質複合体(DGC)の機能は保存されていると考えたためである。その上で、サルコグリカン変異を持つゼブラフィッシュはまだ報告されていないため、新規なモデル開発でもあった。

ゼブラフィッシュの *sgcd* 遺伝子のエキソン2とエキソン5に対する gRNA 合計3種を設計し、Cas9 タンパク質とともにゼブラフィッシュ

受精卵にインジェクションした。受精卵を成魚まで育て、野生型と交配して F1 世代を獲得した。F1 世代の尾からゲノム DNA を抽出し、ヘテロ二本鎖移動度解析(HMA)及びサンガーシーケンスによってゲノム編集個体を選別した。F1 世代どうしを掛け合わせ、*sgcd* 変異をホモで持つ個体を作出し、顕微鏡で表現型を観察した。筋ジストロフィー症状の評価のため、生後24時間における自発的なコイリング運動と生後5日目における自発的な水泳距離を計測した。また、病理像を調べるため、骨格筋アクチン線維及び、 δ -サルコグリカンと複合体を形成するジストロフィン、 β -ジストログリカン、 β -サルコグリカン、 γ -サルコグリカンを免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

結果

3種類の gRNA を設計したが効率よく *sgcd* のゲノム編集が起きたのはそのうちの1つのみであった。ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集の効率は gRNA の配列に大きく依存することがわかった。F1 世代では高い確率でゲノム編集個体が得られた。ゲノム編集個体のジェノタイピングについて、PCR と電気泳動のみで判別がquick迅速な HMA 法を確立した。得られた系統では *sgcd* のエキソン2内に14塩基の欠失が確認できた。また、mRNA の配列においても同じ欠失が確認された。この欠失により、フレームシフトが起こるため、正常な δ -サルコグリカタンパク質が欠損することが推定された。F1 世代の *sgcd* 変異をヘテロで持つ個体どうしの掛け合わせでは、メンデルの法則通り、約3:1の割合で正常個体と異常個体が生まれ、異常個体では心臓の肥大と体幹の筋肉の複屈折の低下が見られた。複屈折の低下はゼブラフィッシュで簡単に筋変性を検出する方法で筋ジストロフィー症状のマーカーとなる。

運動機能については、受精後 24 時間の段階では正常な個体と異常な表現型を示す個体間でコイリング運動に有意差はなかったが、受精後 5 日目では異常な表現型を示す個体において、総水泳距離が減少していた。ファロイジン染色では、変異体において筋変性が観察され、特に筋節中隔（ヒトの腱に相当する部位）から筋線維が脱離する観察像が見られた。免疫染色の結果、 β -サルコグリカンと γ -サルコグリカンの筋節中隔への局在が減少していたが、ジストロフィンと β -ジストログリカンでは正常であった。

考察

ゲノム編集個体の *sgcd* 遺伝子の DNA 及び mRNA の塩基配列解読の結果から δ -サルコグリカンの機能欠損に成功したと考えられた。 δ -サルコグリカン変異は拡張型心筋症の原因遺伝子としても報告されており、本研究のモデルでは心症状も示したものと考えられる。 δ -サルコグリカンノックアウト個体の運動能力について、受精後 24 時間では正常であったが、受精後 5 日目では有意に低下しており、これは筋ジストロフィーが進行性の疾患であることを再現する結果となったと考察できる。また、 β -サルコグリカン及び γ -サルコグリカンの筋節中隔上への局在が減少していたのは、 δ -サルコグリカンがノックアウトされたことで、ジストロフィン-糖タンパク質複合体が不安定となったためと考えられ、その結果、筋細胞膜を裏打ちが脆弱になり筋ジストロフィーを発症するという DGC 欠損によるヒト筋ジストロフィーの発症機序がゼブラフィッシュで再現されたものと考えられた。

結論

本研究により、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

によって劣性遺伝形式の筋ジストロフィーのモデルゼブラフィッシュが作製可能であることが示されたため、今後、原因不明の筋ジストロフィー関連疾患の候補遺伝子についても、同手法で病原性の確認やモデル作製をおこなうことができると期待される。

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 山口大学 医学系研究科 臨床神経学

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トをもつ RNA が、MBNL 蛋白をはじめとする核内のスプライシング制御因子を障害する。このため DM は、さまざまな選択的スプライシング調節機構の破たんをきたすスプライシング異常症とされている。DM では多くのスプライシング異常が報告され、症状との関連が示唆されているが、ADL 障害要因となる進行性筋萎縮や心伝導障害・心筋症、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。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 患者ではしばしば拡張型心筋症 (DCM) 様の心不全症状がみられ、死因となることも多いが、その原因はわかっていない。一方、先行研究より、DM1 心筋ではマイクロ RNA のプロセッシング異常のため miR-1 が低下することが判明している。DM1 における miR-1 の意義について検証するため、心筋特異的 miR-1 ノックダウン *Drosophila* モデルを作成し、心内径や収縮能を評価した。また、*Drosophila* における miR-1 のターゲットを、in silico スクリーニングにより探索した。心筋特異的 Mp 発現

Drosophila モデルでの心機能を評価するとともに、*Drosophila* モデルおよび DM1 患者由来心筋での Multiplexin (Mp) /Col15A1 mRNA 発現を qPCR により、また蛋白発現をウェスタンブロットならびに蛍光免疫染色法により解析した。

結果

心筋特異的 miR-1 ノックダウン *Drosophila* モデルでは、心内径の拡大と心室内径短縮率の低下といった DCM 様の症状がみられた。一方、DM1 *Drosophila* モデルとしてすでに確立している (CUG)⁹⁶⁰ 発現モデル、CELF1 発現モデル、Mbl ノックダウンモデル心筋において、いずれも miR-1 発現が低下していた。In silico スクリーニングより、*Drosophila* における miR-1 ターゲットのなかから、Multiplexin (Mp) を同定した。実際に、miR-1 ノックダウン *Drosophila* モデル心筋では Mp 発現が上昇していた。さらに、心筋特異的 Mp 発現亢進 *Drosophila* モデルでは、心内径の拡大と心室内径短縮率の低下がみられた。

Mp のヒトオルソログである Col15A1 について、DM1 患者由来心筋で mRNA レベルおよび蛋白レベルで発現が亢進しており、特に心不全を合併している患者で発現レベルがより上昇していた。

さらに、Mp/Col15A1 発現亢進が DCM の原因となるかを検証するため、DM1 *Drosophila* モデルで RNA 干渉により Mp 発現を低下させた。その結果、DM1 *Drosophila* モデルで DCM 症状の改善がみられた。

考察

本研究の結果から、DM1 *Drosophila* モデル心筋において、miR-1 発現が低下しており、DCM 様の心不全症状を来すことが確認された。

また、miR-1 のターゲットとして Mp/Col15A1 を同定し、実際の DM1 *Drosophila* モデル心筋および DM1 患者心筋でこれら蛋白の発現レベルが上昇しており、DCM 様症状と関連することも確認された。

結論

DM1 心筋組織では、異常 RNA によるマイクロ RNA プロセシング障害のため miR-1 発現が低下し、その標的である Col15A1 の発現が亢進するため心筋症を引き起こすことが示唆された。

参考文献

1. Souidi A, Nakamori M, Zmojdzian M, Jagla T, Renaud Y, Jagla K: Deregulations of miR-1 and its target Multiplexin promote dilated cardiomyopathy associated with myotonic dystrophy type 1. *EMBO Rep.* 2023 Apr 5;24(4):e56616, Apr, 2023
2. Nakamori M, Nakatani D, Sato T, Hasuike Y, Kon S, Saito T, Nakamura H, Takahashi MP, Hida E, Komaki H, Matsumura T, Takada H, Mochizuki H: Erythromycin for myotonic dystrophy type 1: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *EClinicalMedicine.* 26:67:102390, Dec, 2023
3. Gall-Duncan T, Luo J, Jurkovic CM, Fischer LA, Fujita K, Deshmukh AL, Harding RJ, Tran S, Mehkary M, Li V, Leib DE, Chen R, Tanaka H, Mason AG, Lévesque D, Khan M, Razzaghi M, Prasolava T, Lanni S, Sato N, Caron MC, Panigrahi GB, Wang P, Lau R, Castel AL, Masson JY, Tippet L, Turner C, Spies M, La Spada AR, Campos EI, Curtis MA, Boisvert FM, Faull RLM, Davidson BL, Nakamori M,

Okazawa H, Wold MS, Pearson CE: Antagonistic roles of canonical and Alternative-RPA in disease-associated tandem CAG repeat instability. *Cell.* 186(22):4898-4919, Oct, 2023

「細胞膜リモデリング分子の機能異常に起因する先天性ミオパチーの病態解明」

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生化学分野

緒言

中心核ミオパチー (Centronuclear Myopathy: CNM) は、先天性ミオパチーの一つで、乳児期の発育の遅れ、近位筋優位の筋力低下、非進行性など、他の先天性ミオパチーと同様の臨床病態を示す。一方、骨格筋の筋病理は、中心核、T 管形成不全、ミトコンドリアなどのオルガネラ分布異常、コストメア構造異常、神経筋接合部の形成不全など多岐にわたる。しかし、どの病態が筋力低下を引き起こす主要因になっているかは明らかになっていない。

方法

細胞膜リモデリングに関わる *BIN1*、*DNM2* は、CNM の原因遺伝子として知られている。本研究では、*BIN1*、*DNM2* 変異による CNM を対象とし、*BIN1* および *DNM2* 遺伝子がコードする *BIN1* とダイナミン 2 の機能異常が、骨格筋病態を引き起こすメカニズムを、①*in vitro* 再構成系による分子レベルの解析、②骨格筋細胞を用いた細胞レベルの解析、③モデル生物を用いた個体レベルの解析を行い、CNM の発症機序をマルチスケールで解明し、新たな診断や治療法、創薬開発に向けた学術的基盤を創成する。

結果

研究分担者はこれまでに、(1) *in vitro* および細胞内の T 管様構造再構成系を用い、ダイナミン 2 の膜リモデリング機能を定量的に評価することに成功した。またこの解析系を用いて、(2) CNM 変異型ダイナミン 2 では、膜切断

に必要な GTP アーゼ活性が亢進していること、(3) NCNP の筋レポジトリから同定された CNM 患者由来の新規 *DNM2* バリエーションから、病因性バリエーションを同定することに成功した。これらの成果は、主任研究者と共著で、原著論文 2 報 (Fujise et al., *JBC* 2021 ; Fujise et al., *Human Mutation* 2021) と総説 1 報 (Fujise et al., *IJMS* 2022)、著書 1 報 (竹田、医学のあゆみ 2022) として発表した。

本年度は、T 管様構造の再構成系を用いて、(1) T 管様構造のメカニカルストレス耐性にダイナミン 2 が必要であること、(2) SH3 ドメインを部分的に欠失した CNM 変異型 *BIN1* が、異常に凝集した T 管様構造を形成することを明らかにした (論文準備中)。

考察

今後は、CNM 変異型 *BIN1* やダイナミン 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。さらに主任研究者のグループと共同で、新たな CNM モデルマウス (*Dnm2* E368K 変異を持つノックインマウス) を作成し、病態 (表現型) 解析を進めることにより、CNM 患者で起こる骨格筋病態の主要因を明らかにする。

結論

本研究で用いる解析アプローチは、CNM の発症機序を分子・細胞・個体レベルのマルチスケールで解明し、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を持つ。

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.

免疫介在性壊死性筋症におけるコレステロール代謝異常

分担研究者

久保田 暁 1)

研究協力者

小巻 奨吾 1)、北村 明日香 1)、前田 明子 1)、
戸田 達史 1)

所属

1) 東京大学大学院 医学系研究科 神経内科学

緒言

免疫介在性壊死性ミオパチー (Immune-mediated necrotizing myopathy, IMNM) は病態不明の炎症性筋疾患である。血清自己抗体として、抗 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 抗体、抗 signal recognition particle (SRP) 抗体が知られている⁽¹⁾⁽²⁾。HMGCR 抗体はスタチン内服後の患者に見いだされ、HMGCR がスタチンの標的であることから、コレステロール代謝が病態と関係があると疑われていたが明らかではない。また SRP 抗体がなぜ HMGCR 抗体と類似の病態を呈するか明らかではない。

我々は HMGCR-IMNM において相対的に高 HDL 血症があることを明らかにし⁽³⁾、コレステロール代謝の異常が病態に関与しているという仮説を立てた。

方法

急性期の血清 HDL 濃度の測定：HMGCR-IMNM、SRP-IMNM、皮膚筋炎 (DM)、抗合成酵素症候群 (ASS) の急性期の血清 HDL を比較した。また、HMGCR-IMNM と SRP-IMNM

については治療後の血清 HDL も比較した。

生検筋組織の RNA seq：HMGCR-IMNM 21 例、SRP-IMNM 20 例の生検筋の RNA seq のデータを解析し、血清 HDL 代謝に重要な役割を果たす ABCA1、ABCG1 の mRNA 発現を比較した。また HDL 代謝に関与しうる発現変動遺伝子を同定するために網羅的解析を行った。免疫組織学的検討：上記網羅的解析で明らかになった遺伝子の産物が組織学的にどのように産生されているか、免疫染色を行った。

結果

急性期の血清 HDL は HMGCR-IMNM において SRP-IMNM、DM、ASS に比較して有意に高かった。また、治療後の血清 HDL は HMGCR-IMNM、SRP-IMNM のいずれも有意に上昇し、差がなくなった。

生検筋組織の RNA seq では、ABCA1 mRNA 発現には差が無かったが、ABCG1 mRNA は HMGCR-IMNM において有意に発現が高かった。発現変動遺伝子では APOA4 mRNA が HMGCR-IMNM において有意に発現亢進し、特に病理学的変化が顕著な例でより発現亢進していることが明らかになった。

ApoA4 免疫染色では ApoA4 は筋線維ではなく筋組織に浸潤する炎症細胞に陽性になり、CD68 との共染色で共局在が明らかとなった。

考察

急性期の HMGCR-IMNM において血清 HDL が比較的高いことが明らかとなった。RNA seq の解析により HDL 代謝に関与する ABCG1 や APOA4 が HMGCR-IMNM において発現亢進しており、HMGCR-IMNM におけるコレステロール代謝異常が示唆された。ApoA4 は筋線維では産生されず、炎症細胞とくにマクロファージで産生されていることが明

らかとなったが、IMNM では一般的にリンパ球浸潤に乏しくマクロファージ浸潤が目立つことが知られている⁽⁴⁾。また、HMGCR-IMNM の方が SRP-IMNM に比較してマクロファージの浸潤が多いことが知られており、今回の RNA seq 解析で認められた差はマクロファージ浸潤の差も関与しているかもしれない。

ApoA4 は HDL 代謝に関与するリポ蛋白で、抗炎症作用を有していると報告されている⁽⁶⁾。また、HMGCR-IMNM では SRP-IMNM に比較して病理所見が軽いことが知られており⁽⁷⁾、HMGCR-IMNM において APOA4 mRNA 発現亢進がみられることは、筋保護的作用が働いている可能性がある。

結論

HMGCR-IMNM においてコレステロール代謝異常があることを明らかにした。HMGCR-IMNM におけるコレステロール代謝は筋病理像や臨床像に影響を与えている可能性がある。コレステロール代謝異常の病態解明は新たな治療法の開発につながる可能性が有る。

参考文献

1. Andrew L Mammen , Tae Chung, Lisa Christopher-Stine et al., Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011 Mar;63(3):713-21.
2. I N Targoff , A E Johnson, F W Miller, Antibody to signal recognition particle in polymyositis. *Arthritis Rheum.* 1990 Sep;33(9):1361-70.
3. **Akatsuki Kubota**, Jun Shimizu, Atsushi Unuma et al, Alanine transaminase is predominantly increased in the active phase of anti-HMGCR myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2022 Jan;32(1):25-32.
4. Tae Chung, Lisa Christopher-Stine, Julie J Paik et al., The composition of cellular infiltrates in anti-HMG-CoA reductase-associated myopathy. *Muscle Nerve.* 2015 Aug;52(2):189-95.
5. Anna Lia, Tiziana Annese, Marco Fornaro et al., Perivascular and endomysial macrophages expressing VEGF and CXCL12 promote angiogenesis in anti-HMGCR immune-mediated necrotizing myopathy. *Rheumatology (Oxford).* 2022 Aug 3;61(8):3448-3460.
6. David Roula, Anna Theiler, Petra Luschnig et al., Apolipoprotein A - IV acts as an endogenous anti - inflammatory protein and is reduced in treatment - naïve allergic patients and allergen - challenged mice. *Allergy.* 2020 Feb; 75(2): 392–402.
7. Yves Allenbach, Louiza Arouche-Delaperch, Corinna Preusse et al., Necrosis in anti-SRP+ and anti-HMGCR+myopathies: Role of autoantibodies and complement. *Neurology.* 2018 Feb 6;90(6):e507-e517.

遺伝性筋疾患レポジトリデータを用いた非コード領域の遺伝子変異の探索

分担研究者 栗屋 智就

所属 京都大学 総合解剖センター

緒言 次世代シーケンス技術の進歩、特にショートリード遺伝子解析技術の普及により、遺伝性筋疾患の遺伝子診断の精度は飛躍的に向上した。しかしながら、大規模な染色体構造異常はまだ検出が難しく、非コード領域の変化はその病的意義の推定が困難である。仮に臨床的に診断がついている場合であっても、責任遺伝子やその病原性変異が同定できていない場合には、遺伝カウンセリングにおいて遺伝学的再発リスクや家族計画等に必要な情報を提供することが出来なかった。病原性遺伝子変化が決定されることで、はじめて科学的な遺伝カウンセリングが実施可能となり、いままで遺伝学的に未診断であった患者やその家族にとって非常に重要な意味を持つ。また、非コード領域の病原性変化の情報が蓄積されれば、より簡便かつ正確に遺伝子変化の病原性について判定するシステムを構築出来る可能性が高まり、今後の遺伝子解析技術の向上に資する成果となる。

また、RNA スプライシングの異常を誘発する非コード領域のゲノム変化については、遺伝子産物のアミノ酸配列のコードには変化がないため、正規の RNA スプライシングパターンを回復させることが出来れば、基本的に野生型のタンパク質が回復することが期待出来る。このため、特に深部イントロンに新規のエクソン様構造が出現する偽エクソン生成型変異については、アンチセンスオリゴ核酸、低分子化合物等、スプライシング制御薬のよい標的となる。これまでに我々のグループでも、偽エクソン生成型変異に対する新たなアンチセンスオリゴ

核酸の設計法を開発してきた(参考文献 1)。非コード領域のゲノム変化を探索することで、筋疾患におけるこれらの新しい治療法の適用可能性を検証することが可能となる。

方法 筋疾患レポジトリの遺伝学的未診断患者データのうち、全ゲノムデータ (WGS)、および全トランスクリプトームデータ (WTS) を再解析し、特に RNA スプライシング異常により非コード領域のエクソン化を生じるような変化を探索する。新規に開発した深部イントロンの病原性変異の推定プログラム PDIVAS (Pathogenicity predictor for Deep-Intronic Variants causing Aberrant Splicing, 参考文献 2)、および既存のアノテーションプログラムを用いて、病原性変化と思われるゲノム変化を抽出する。また、予測された RNA スプライシング変化について、患者サンプルがある場合には骨格筋中の転写産物解析を行い、実際に mRNA レベルでの変化が検出されるかを確認する。

結果 国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリ症例のうち、片側アリルのみに病原性変異が推定されている常染色体潜性遺伝性疾患 11 例の WGS を再解析し、3 症例で病原性変異と推定されるゲノム変化を検出した (*SGCD* 遺伝子深部イントロン変異 1 件, *GAA* 遺伝子 20 塩基挿入欠失変異 1 件, *CAPN3* 遺伝子スプライスサイト 15 塩基重複変異)。また *DYSF* 遺伝子の深部イントロン領域に偽エクソン生成型変異と思われるゲノム変化を検出したが、これはアリル頻度が比較的高く、非病原性変化と考えられた。また、病理診断上サルコグリカノパチーが疑われる症例のうち、5 症例でイントロン領域のゲノム変化を検出し、全てのゲノム変化について高い確率で病原性が推定された。

考察 現時点で、新規に開発した深部イントロンの病原性変異の推定プログラム PDIVAS, および既存のアノテーションプログラムを用いて、表現型から責任遺伝子がある程度絞り込めているものについては、効率良く病原性変化と推定されるゲノム変化を抽出することが出来るようになった。しかしながら、表現型が未知、あるいは非常に多くの責任遺伝子が想定されるような場合について、どの程度の診断性能を発揮出来るかは今後の検討課題である。

欧州では WGS データと WTS データとの併用による解析プログラムが主として用いられつつあり、米国では Illumina 社や Google 社をはじめとしてゲノム解析プログラムが次々に更新されている。今後はこれらの新たな手法も取り入れつつ、得られた結果の細胞レベルでの検証を進めるとともに、表現型に頼らない unbiased なゲノム診断法の確立を目指す。また、RNA スプライシング異常が同定された患者で細胞試料が得られる場合には、診断研究と並行して、アンチセンス核酸や低分子化合物による異常 RNA スプライシングの是正を試みる。これにより、現在、明確な治療法のない様々な遺伝性筋疾患において、転写産物への介入という新たな視点での治療開発が期待出来る。

結論 新規に開発した深部イントロンの病原性変異の推定プログラム PDIVAS, および既存のアノテーションプログラムを用いて、表現型から責任遺伝子がある程度絞り込めているものについては、効率良く病原性変化と推定されるゲノム変化を抽出することが可能であり、遺伝子診断精度の向上が見込まれる。

参考文献

1. Ohara H, Hosokawa M, Awaya T, Hagiwara A, Kurosawa R, Sako Y, Ogawa M, Ogasawara M, Noguchi S, Goto Y, Takahashi R, Nishino I, Hagiwara M. Branchpoints as potential targets of exon-skipping therapies for genetic disorders. *Mol Ther Nucleic Acids*. 33:404-412, Jul, 2023
2. Kurosawa R, Iida K, Ajiro M, Awaya T, Yamada M, Kosaki K, Hagiwara M. PDIVAS: Pathogenicity predictor for Deep-Intronic Variants causing Aberrant Splicing. *BMC Genomics*. 24:601, Oct, 2023

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、遺伝学的に異質性が高い進行性の希少難病である。根本的な治療法は未だ確立されていない。本研究では、体系的、網羅的なゲノム解析から疾患の原因遺伝子を明らかにすると共に遺伝子診断により臨床の後方支援、ゲノム医療実装の基盤構築を目的とする。本年度は、特に眼咽頭遠位型ミオパチー (OPDM) に於ける *LOC642361/NUTM2B-AS* の CGG/CCG リピートの異常伸長について報告する。

方法

遺伝子診断では、パネル解析 (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)、エクソームシーケンス (exome seq)、全ゲノムシーケンス (WGS) を用いて病因性バリエーションを解析した。候補病因性バリエーションは、フォローアップシーケンスで確認した。OPDM のゲノム解析については、Nanopore ロングリード WGS、repeat primed PCR 法 (RP-PCR)、フラグメント解析、患者に於けるメチル化解析などを行った。

結果

1. 遺伝性筋疾患のパネル解析

NCNP では、2014 年から遺伝性筋疾患症例を対象に筋病理診断の結果を基に遺伝子診断 (パネル解析) を行ってきた。本年度も昨年度と同様に年間約 1,000 例を解析した。それぞれの症例について、臨床・病理学的表現型や公共データなどを参照しながら、病因性バリエーションと疾

患の関連性を解釈して、genotype-phenotype correlation を確立した。解析結果は、常にフォローアップシーケンスで確認し、適時、主治医に報告した。

2. OPDM のゲノム解析

OPDM は、進行性の遠位筋の筋力低下、眼瞼下垂、嚥下障害などを呈する遺伝性筋疾患である。一方、*LOC642361/NUTM2B-AS* は機能不明のノンコーディング RNA である。2019 年に白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー (OPML) の 1 家系 4 例の患者に於いて、同 RNA 遺伝子領域内の CGG/CCG リピートの異常伸長が報告された。本研究では、Nanopore ロングリード WGS を用いたタイ人 OPDM の解析により、*LOC642361/NUTM2B-AS* に於ける CGG/CCG リピートの異常伸長を発見した。RP-PCR、フラグメント解析により、最終的に、血縁のないタイ人 OPDM 3 家系 4 症例と日本人 1 例について同 RNA 遺伝子に於ける CGG/CCG リピートの異常伸長を明らかにした。更に Nanopore ロングリードのデータ解析から *LOC642361/NUTM2B-AS* の CGG/CCG リピート領域は脱メチル化していることを見出した (論文投稿中)。

考察

本年度は、*LOC642361/NUTM2B-AS* の CGG/CCG 異常伸長が OPML のみならず OPDM でも生じていることを明らかにした。特に調べたタイ人 OPDM 全症例で CGG/CCG リピートを認めた。

結論

NCNP 筋レポジトリに於ける解析システムは、遺伝性筋疾患の診断、発見に有用である。

参考文献
なし

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。我々は近年、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、RNautophagyにおいてリソソームによるRNA取り込みに関与するRNA helicaseを探索した。

方法

リソソーム膜タンパク質のプロテオミクスのデータから、リソソーム膜に存在するRNA helicaseを抽出した。候補のRNA helicaseを

siRNAを用いてノックダウンし、生化学・細胞生物学的によりその影響を解析した。

結果

Mouse embryonic fibroblast (MEF)においてsiRNAを用いて候補RNA helicaseそれぞれをノックダウンし、pulse-chase アッセイによって細胞内のRNA分解を測定した。その結果、候補D（ここではhelicase Dと呼ぶ）をノックダウンにより細胞内のRNA分解が顕著に抑制された。リソソーム内酵素を阻害するクロロキンで細胞を処理したところ、helicase Dを介したRNA分解が抑制されたことから、このRNA分解はリソソームを介したものであることがわかった。SIDT2 KO MEFではhelicase DノックダウンによるRNA分解抑制効果が観察されず、helicase DはRNautophagyによるRNA分解を仲介することが明らかとなった。これに対し、マクロオートファジー不全細胞であるATG5 KO MEFにおいてはhelicase DノックダウンによってRNA分解が抑制され、この分解がマクロオートファジーを介した分解ではないことを確認した。

考察・結論

RNA helicase DはRNautophagyによるRNA分解を仲介する。この機能にRNA helicase 活性が必要かどうかについて現在検討中である。またRNautophagyはCAGリピートRNAを分解することがわかっており、RNA helicase DのリピートRNA分解への影響も今後明らかにする予定である。

骨格筋代謝に着目した筋疾患病態解明と治療法開発

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>

遺伝性筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン・タンパク質欠損により筋線維は壊死・再生を繰り返し、次第に筋萎縮を呈する。DMDの治療薬開発は進み、エクソン・スキップを誘導するアンチセンス核酸医薬「ビルトラルセン」が治療薬として2020年に本邦で初めて承認販売された。一方、骨格筋・心筋への核酸導入効率が限定的であることから、筋萎縮予防の治療戦略と併用する必要があると考えられる。しかし筋萎縮機構は、炎症亢進や脂質代謝・ミトコンドリア異常など複合的要因が関与する為、詳細は未だ不明である。

これまで、高解像度プロテオミクス解析を用いて DMD マウス骨格筋の解析を行い、発現が変化するタンパク質を複数同定した¹。その中の一つ、Major vault protein(Mvp)は核-細胞質間で物質輸送を行う RNA 結合タンパク質であるが²、その本質的な機能は不明である。Mvp 発現は、野生型および DMD 筋において高く、年齢依存的に増加する。更に Mvp 発現は飢餓条件下において特に発現が上昇する事から、Mvp は代謝制御に関連する可能性を考えた。そこで本研究では、骨格筋における Mvp の機能を追究し、DMD 病態を明らかにする事を目的とした。

<方法・結果>

1. Mvp 発現抑制による DMD への影響

Mvp 発現が上昇している DMD モデル *mdx52* マウスに対して、siRNA を用いて Mvp 発現を抑制させた。その結果、マウスの移動距離、

および筋トルクが減少する事を見出した。また Sirius Red 染色による線維化領域を評価した結果、明らかな増加を認めた。更にミトコンドリア活性の指標である SDH (Succinate dehydrogenase)染色を行った結果、顕著な染色性の低下を認め、Mvp は DMD 病態進行に重要な役割を果たしている可能性を示した。

2. Mvp による脂質代謝制御

次に Mvp 発現抑制した骨格筋を用いて RNA シークエンス解析を行った結果、Mvp 発現抑制によって脂質代謝に関連する遺伝子が主に変動する事を認め、Mvp 発現は脂質代謝に関与する可能性を見出した。

そこで C2C12 筋芽細胞に対して Mvp を過剰発現させ、細胞外フラックスアナライザーを用いて脂質代謝能を評価した結果、明らかな上昇を認めた。一方、Mvp 発現を抑制すると顕著な脂質代謝能の低下を認め、Mvp 発現は脂質代謝に関与する事を見出した。

3. Mvp と結合する microRNA の同定

RNA 結合タンパク質である Mvp は、特に多くの microRNAs (miRNAs)と結合し、核などへ輸送して細胞機能に影響を与える事が報告される^{3,4}。そこで、Mvp と同様の発現パターンを示す miRNAs を探索した結果、Mvp 発現に呼応して変化する miRNA を複数同定した。そのうちの一つである miR-423 は、Mvp と結合する事を RNA 免疫沈降法によって明らかにした。

4. miR-423 による脂質代謝制御

次に筋芽細胞に対して miR-423 を過剰発現させ、細胞外フラックスアナライザーを用いて脂質代謝能を評価した結果、明らかな脂質代謝の上昇を認めた。更に高脂肪食を負荷した野生型マウスに対して、アデノ随伴ウイルス(AAV)を介して miR-423 を過剰発現させると、明らかな体重増加の抑制を認めた。重要な事に、筋芽細胞において Mvp を発現抑制させると、

miR-423 過剰発現による脂質代謝亢進効果は抑制され、以上の結果から、Mvp-miR-423 複合体形成が脂質代謝に重要である事が示唆された。

5. miR-423 の標的遺伝子の同定

miR-423 の標的遺伝子をアルゴリズム Target Scan を用いて解析した結果、Crtc2(CREB regulated transcription coactivator2)を候補遺伝子として見出した。Luciferase assay により miR-423 は Crtc2 に直接結合して発現抑制する事、更に miR-423 による Crtc2 発現抑制が脂質代謝亢進に必須である事を見出した。

6. miR-423 発現による DMD への影響

miR-423 発現による脂質代謝亢進が DMD 病態に影響するか否かを検証する為、mdx52 マウスに対して miR-423 を過剰発現させた。その結果、筋トルクの改善、線維化領域の減少、および SDH 活性化領域の増大を認め、miR-423 過剰発現による脂質代謝亢進が、DMD 病態進行抑制に有効である可能性を示した。

<考察および結論>

本研究の結果から、RNA 結合タンパク質 Mvp は DMD とサルコペニアに共通して生じる現象に対して応答するタンパク質である事が予想された。骨格筋における Mvp の詳細な機能は不明であった事が、本研究結果から脂質代謝に大きく関与する事が明らかとなった。特に Mvp-miR-423-Crtc2 経路は、脂質代謝を制御する新たな経路として、肥満メカニズムの解明や治療ターゲットになりうる可能性が期待される。また動物実験結果から、Mvp-miR-423 経路活性化による脂質代謝亢進が、DMD・サルコペニアと関連する可能性も示唆され、今後さらに有効性を検証する研究を行う予定である。

一方、本研究では Mvp 発現、あるいは miR-423 発現が何故 DMD・サルコペニアで上昇するかを未だ明らかにしていない。これらの発

現を制御するトリガーを明らかにできれば、サルコペニアの要因同定に繋がる事が期待され、将来的には治療薬開発に進展する事が期待される。

<参考文献>

1. van Westering, T. L. E. *et al.* Mutation-independent Proteomic Signatures of Pathological Progression in Murine Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular and Cellular Proteomics* **19**, 2047–2067 (2020).
2. Mikyas, Y. *et al.* Cryoelectron Microscopy Imaging of Recombinant and Tissue Derived Vaults: Localization of the MVP N Termini and VPARP. *J Mol Biol* **344**, 91–105 (2004).
3. Teng, Y. *et al.* MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun* **8**, (2017).
4. Statello, L. *et al.* Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. *PLoS One* **13**, (2018).

シングル核解析を用いた炎症性筋疾患の病態解明

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

自己免疫性筋炎は異なる病態を呈す一群の筋疾患の総称であり、その特徴的な臨床病理像から現在では皮膚筋 (dermatomyositis: DM)、抗合成酵素症候 (anti-synthetase syndrome: ASS)、免疫介在性壊死性ミオパチー (immune-mediated necrotizing myopathy: IMNM)、封入体筋炎 (inclusion body myositis: IBM) に分類される。さらに近年、いくつかの筋炎で特異的自己抗体の存在が報告され、陽性自己抗体ごとに筋病理像の異なることが明らかとなってきた。このことは陽性自己抗体ごとに疾患病態が異なる可能性を強く示唆するものの、それらの病態発症・進行メカニズムは未だ不明であり、筋炎サブタイプ間の違いを決定する因子等についても明らかではない。本研究の目的は、筋炎ごとに特異的に発現する因子および病態カスケードを同定し、その病態を解明することである。具体的には筋炎患者の凍結筋を用いてシングル核 RNA-Seq (snRNA-seq) を実施し、罹患筋に存在する種々の細胞の特徴的な遺伝子発現変化を特定し、筋炎病態メカニズムを明らかにする。本研究により、自己免疫性筋炎特異的なバイオマーカーの同定や治療法開発への基盤的知識が構築されると期待される。

方法

1. 患者凍結筋組織 (正常筋および各罹患筋) 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。

2. IBM 筋における PD-1 と PD-L1 の作用部位を特定するため、IBM 罹患筋を近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay: PLA) 法にて解析した。さらに、培養筋細胞株 C2C12 をインターフェロン (IFN) α , β , γ で刺激し、PD-L1 (Cd274) および PD-L2 (PDCD1LG2) の発現を解析した。

結果

本年度は特に IBM に着目して研究を進めた。IBM 症例 3 例と、病理学的に正常であるコントロール 2 例、さらにその他筋炎 36 例の計 41 例の罹患筋を用いて snRNA-seq を実施した。R パッケージ Seurat によって計 214,1638 細胞を解析した結果、マクロファージの増加は全ての罹患筋に認められたが、IBM において他の筋炎と比較して顕著な T 細胞の増加が認められた。同様の T 細胞の増加は抗 Jo-1 抗体陽性 ASS や肉芽腫が観察されるサルコイドーシスにおいても見られたが、これらの筋炎では同時に B 細胞数も増加していた。一方、IBM では B 細胞の増加は見られず、T 細胞が特異的に増加していた。IBM の筋病理では、リンパ球が非壊死性線維を囲み、さらに非壊死性線維内部への浸潤する特徴的な病理像が見られる。これらは CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞であり、疲弊マーカーの PD-1 を発現し、さらに KLRG1 を発現する終末分化した T 細胞であることが報告されている (参考文献 1)。これらの発現を snRNA-seq で解析した結果、PD-1(PDCD1)の発現が T 細胞で特異的に見られた。PLA 法により T 細胞で発現する PD-1 とそのリガンドである PD-L1 の作用部位

を解析した。その結果、興味深いことに PD-1 と PD-L1 のインタラクションは筋線維の膜上で見られ、T 細胞由来の PD-1 は主に筋線維で発現する PD-L1 と相互作用していることが示唆された。マクロファージなどでは IFN- γ の刺激により PD-L1 が誘導されることが知られている (参考文献 2)。そこで、C2C12 を IFN- α , β , γ で刺激したところ、IFN- γ でのみ C2C12 において PD-L1 が誘導された。一方、PD-L2 の発現には何れの IFN の刺激でも変化がなかった。

最後に、IBM 中の T 細胞で特異的に発現する遺伝子を探索した結果、遺伝子 X を同定した。遺伝子 X は T 細胞の活性化に重要とされ、IBM における細胞障害性 T 細胞の特徴はこの遺伝子 X によって規定されている可能性さらには IBM のマーカーとなる可能性が示された。

考察

snRNA-seq および PLA 法によって、IBM 筋においては、T 細胞に発現する PD-1 と IFN- γ の刺激により筋線維が発現する PD-L1 が相互作用し、T 細胞の活性を抑制方向へと制御することが明らかとなった。一方、IBM 中の T 細胞特異的な遺伝子 X を見出した。X は T 細胞の活性化に重要との報告があり、PD-1 と PD-L1 による T 細胞の障害抑制機構と因子 X による障害活性化機構のバランスが破綻したときに筋線維がより傷害されることが示唆された。CD8 陽性 T 細胞はナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、CD45RA 陽性の最終分化型エフェクター T 細胞に分類される。今後は snRNA-seq 中に見られる T 細胞をより詳細に分類し、遺伝子 X を発現する T 細胞の同定と、X の機能解析を進め、X が IBM の新たなマーカーとなり得るかを検証する。また、今回 IFN- γ により筋線維において PD-L1 の発現が誘導されることが明らかとなった。今後は snRNA-seq と合わせてウェスタンブロッ

ットによりそのシグナルカスケードの詳細を解明する。

結論

本研究により、IBM で T 細胞数が増加すること、これらの T 細胞の一部では PD-1 の発現が高く、筋線維において IFN- γ の刺激により誘導された PD-L1 と相互作用して T 細胞の細胞障害性を抑制していることが明らかとなった。また、T 細胞の一部では因子 X を高発現し、T 細胞の活性化を亢進していることが考えられた。本研究の進展により IBM における新たな病態機序の解明と、新規バイオマーカーの発見が強く期待される。

参考文献

1. Greenberg SA, Pinkus JL, Kong SW, Baecher-Allan C, Amato AA, Dorfman DM. Highly differentiated cytotoxic T cells in inclusion body myositis. *Brain*. 2019 Sep 1; 142(9):2590-2604. doi: 10.1093/brain/awz207.
2. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver

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 is therapy unavailable, but even the cause is unknown for many muscle diseases, including limb-girdle muscular dystrophy. To overcome this situation, we need to elucidate the mechanisms and develop therapies for muscle diseases by making maximum use of our muscle repository. In this project, we aim: 1) to maintain and further improve the diagnostic network system for muscle diseases and the muscle repository; 2) to elucidate the causes and mechanisms of muscle diseases; and 3) to develop diagnostic markers and therapies for muscle diseases. The number of muscle biopsy samples we receive has been steadily increasing over the last 10 years, with the annual number of frozen muscle samples reaching a historical high of 1,147 in 2023. As a result, by the end of December 2024, the total number of frozen and cultured muscle samples has reached 24,644 and 2,270, respectively, making this the world's leading muscle repository. Using this muscle repository and through national and international collaboration, we have made several significant achievements, including: 1) identifying CGG repeat expansion in the noncoding region of the LOC642361/NUTM2B-AS1 gene as a cause of oculopharyngodistal myopathy; 2) identifying a new myopathy with digenic inheritance involving the SPRK3 and TTN genes; 3) identifying a case of Ullrich congenital muscular dystrophy due to a deletion involving the canonical polyadenylation site; 4) characterizing VCP myopathy on muscle MRI; and 5) identifying the branch point for the c.647+2084G>C variant in FKTN as a therapeutic target.