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

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

西　野　一　三

総括研究報告

1. 研究目的

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

(1) 筋疾患診断ネットワークおよび筋レポジトリーの維持と発展 ： これまでに形成してきた筋病理診断を中心とする筋疾患診断ネットワークを国内のみならず、アジア諸国を中心とする海外拠点施設にも拡大して支援を行うことで、筋疾患診断体制をさらに充実させ国際的筋疾患診断拠点とする。またそのことにより、国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリーを更に充実させる。

(2) 病因・病態解明 ： 筋疾患には依然として原因不明のものが多い。本邦の基礎研究者および筋疾患研究者の力を結集して、筋炎など周辺疾患も含みつつ、筋ジストロフィー関連疾患の分子レベルの病因・病態を明らかにする。

(3) 診断法開発と活用 ： 病因・病態解明研究で得られた成果を活用して診断法を開発し、これまで確定診断が困難であった筋疾患の診断を可能にする。さらにその方法を活用して、国内外の臨床の現場を後方支援する。

(4) 治療法開発 ： 病因・病態解明研究で得られた成果を活用して、分子病態に基づく治療法開発を進める。特にこれまで研究開発費で研究が進められてきている本邦独自のリードスルー薬および筋線維肥大薬の実用化を推進する。

2. 研究組織

主任研究者

西野一三	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部

分担研究者

大澤　裕	川崎医科大学 医学部 神経内科学
青木正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科学
戸田達史	東京大学大学院医学系研究科 神経内科学
大野欽司	名古屋大学 大学院医学系 研究科 神経遺伝情報学分野
林由起子	東京医科大学医学部医学科 病態生理学分野
平澤恵理	順天堂大学大学院医学研究科
土田邦博	藤田医科大学　総合医科学研究所 難病治療学
林　良雄	東京薬科大学薬学部薬品化学教室
原　雄二	京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻生体認識化学分野
村山　尚	順天堂大学医学部
三橋弘明	東海大学工学部生命化学科
中森雅之	大阪大学大学院医学系研究科
竹田哲也	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
飯田有俊	国立精神・神経医療研究センター ﾒﾃﾞｨｶﾙ・ｹﾞﾉﾑｾﾝﾀｰ 臨床ｹﾞﾉﾑ解析部
林晋一郎	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部
株田智弘	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
今村道博	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
本橋紀夫	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所遺伝子疾患治療研究部
橋戸和夫	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 ﾗｼﾞｵｱｲｿﾄｰﾌﾟ管理室

3.研究成果

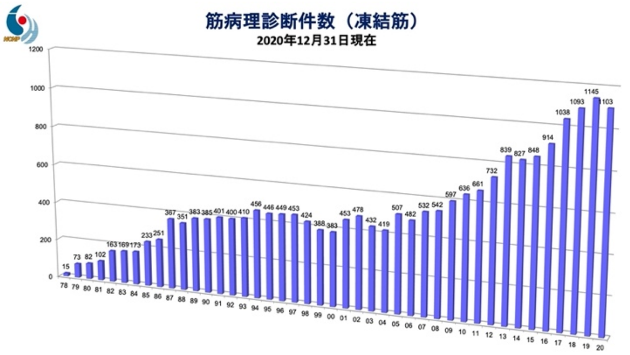
我々は、肢帯型筋ジストロフィー関連疾患の分子病態、次世代技術等を活用することにより、国立精

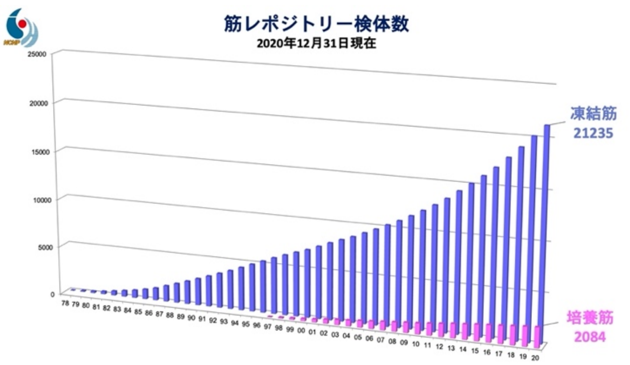
神・神経医療研究センターを初めとする機関に蓄積された患者検体を有効活用して解明し、さらに治療法開発の基盤を形成することを目指している。具体的には、1) 原因不明の各種遺伝性筋疾患の病因・病態解明研究、2) ハイスループット診断法開発研究、3) 分子病態に基づく治療法開発研究、4) 以上を可能にするための基盤的研究、の 4 つを柱として研究を進めた。

1) 筋疾患診断ネットワークおよび筋レポジトリーの維持と発展

a) 筋病理診断と検体数

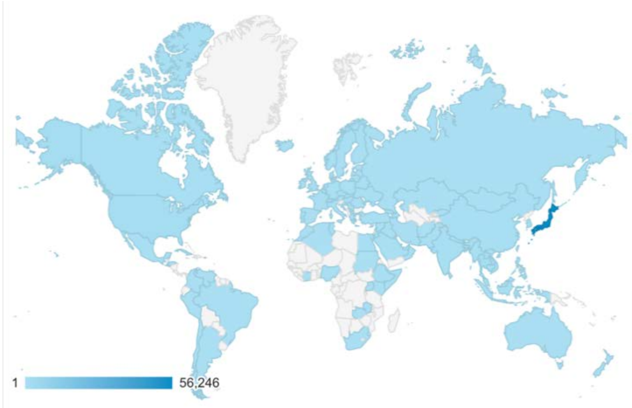
2020 年（暦年）の総筋病理診断件数は、1103 件であった。2019 年と比較すると 42 件の減少であったがこれは、コロナ禍により海外からの凍結筋運搬が困難になったためであり、国内例だけで見ると 2019 年の 1078 件から 2020 年は 1086 件と寧ろ増加していた。このことは、コロナ禍においても我々の筋病理診断が必要とされており、本邦筋疾患医療を下支えしている実態がより明らかとなった。総検体数は、2020 年末で 21235 検体となった。また培養筋も 2084 検体となり、世界最大規模の筋レポジトリーが更に充実した。神経・筋疾患研究支援基盤として各種研究活用されることで、筋疾患学の発展に寄与した。





b) 国際的均てん化と筋疾患教育

2018 年以来タイ・マヒドン大学との共同で開催している国際筋病理セミナーは、コロナ禍の影響で中止とした。また同病院と共同で作製した、筋生検および検体固定方法の解説ビデオ（日本語版・英語版・タイ語版）は、2018 年 1 月の疾病研究第一部 HP 上での公開以来世界 106 カ国／地域よりアクセスがあり、全世界の筋疾患医療均てん化に寄与している（図はアクセスがあった国）。



2) 病因・病態解明

a) 眼咽頭遠位型ミオパチー

2019 年、東京大学の石浦らとの共同研究で、これまで原因が不明であった眼咽頭遠位型ミオパチーが *LRP12* 遺伝子の 5'非翻訳領域の CGG リピートの異常伸長によることを明らかにした（Ishiura H, et al. Nat Genet. 2019 Aug;51(8):1222-1232）。この発見を元に、更に *GIPC1* 遺伝子（Deng J, et al. Am J Hum Genet. 2020 Jun 4;106(6):793-804）（中国との共同研究）および *NOTCH2NLC* 遺伝子（Acta Neuropathol Commun. 2020 Nov 25;8(1):204）の 5'非翻訳領域の CGG リピートの異常伸長によっても同様に眼咽頭遠位型ミオパチーを来すことを見いだした。更に、本邦では *LRP12* 遺伝子リピート伸長例が半数以上を占めること、また腓腹筋・ヒラメ筋が障害されやすいこと、左右差を伴う例が多いことを明らかにした（Kumutpongpanich T, et al. JAMA Neurol, *in press*）。

b) ADSSL1 ミオパチー

近年韓国から 7 家系 9 例の新たな遠位型ミオパチーとして ADSSL1 ミオパチーが報告されている。これまでに国立精神・神経医療研究センターで筋病理診

断を行った例を再検討したところ、これまでに 62 例（58家系）で ADSSL1 遺伝子の両アレル性の変異が同定された。何れの症例でもネマリン小体が認められ、病理学的にはネマリンミオパチーに分類されると考えられた。一方、脂肪滴を有する筋線維が少数認められるという特徴も認められた（Neurology. 2020 Sep 15;95(11):e1500-e1511）。本質的には代謝性疾患であることから、治療法開発を目指して、モデル動物作製を進めている。

c) 単一タイプ 1 線維を伴う先天性神経筋疾患（congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber: CNMDU1）の病態

これまでに、セントラルコア病のコア部分ではリアノジン受容体（RYR1）および triadin 蛋白質が蓄積しており、高感度にコア構造を捉えることを見いだしてきた。典型的なセントラルコア病の大部分は RYR1 遺伝子の C 端コード領域に優性変異を有している。一方、先天性ミオパチー様の臨床像を呈する一方で、組織学的には全ての筋線維がタイプ 1 線維であるということ以外に特徴的な所見を認めない「単一タイプ 1 線維を伴う先天性神経筋疾患」（congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber: CNMDU1）もその約 4 割の患者で、*RYR1* 遺伝子の C 端コード領域に優性変異が見いだされることに加えて、一部の患者では、セントラルコア病患者と全く同一の変異を共有している。そこで、CNMDU1 例でのコア構造の詳細を検討すべく、RYR1 および triadin による免疫染色を行ったところ、組織化学染色ではコア構造が認められないにも拘わらず、筋線維辺縁部に RYR1 および triadin の集積を認めた。更に、長期経過例では、その集積が筋変異中心部へと移動していくことが明らかとなった。このことは、CNMDU1 は事実上のコアミオパチーであり、コアは当初辺縁部に出現し、経過とともに中心部に移動してセントラルコア病の組織所見を呈するようになることを示している（Ogaswara M, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2020 Dec 4;79(12):1370-1375）。

d) 肢帯型筋ジストロフィーR25 型本邦例の同定

POPDC1 をコードする *BVES* 遺伝子のナンセンスバリアントを有する 肢帯型筋ジストロフィーR25 型（LGMDR25）の本邦例 2 例を同定した。小児期発症で、罹患筋には左右差が認められた（Indrawati LA, et al. Neuromuscul Disord. 2020 Aug;30(8): 674-679）。

g) GNE ミオパチー変異解析

本邦 GNE ミオパチー患者で認められる変異の中で 2 番目に多い p.D207V 変異は軽症変異であり、ホモ接合体では疾患を引き起こさない可能性が示唆された。

h) その他の新規原因遺伝子同定

次世代シークエンサーを使用するなどして、筋原線維性ミオパチー例、Marinesco-Sjogren 症候群様例で新規原因遺伝子を見いだし、培養細胞およびモデル動物作製を含む各種検証実験を実施中である。

i) その他

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

3) 診断法開発と活用

a) 筋炎マーカー開発

皮膚筋炎ではミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）が筋線維に発現し、皮膚筋炎の組織診断に有用であることを報告した。この成果を基に MxA 発現を確認し皮膚筋炎と病理診断された例が、2020 年末までに 256 例集積した。これは世界最大の病理学的に診断が確定した皮膚筋炎コホートである。この資料を用いることで、これまで存在について議論のあった皮膚症状を伴わない皮膚筋炎（dermatomyositis sine dermatitis: DMSD）が確かに存在すること、また、DMSD は抗 NXP-2 抗体と強く関連していることが明らかとなった（Inoue M, et al. JAMA Neurol. 2020 Jul 1;77(7):872-877）。また、抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎では、筋線維膜上への MAC 沈着を伴う perifascicular necrosis, 筋周鞘のアルカリホスファターゼ活性、筋周鞘結合組織断片化など、抗合成酵素症候群様の筋病理所見を呈することを、初めて明らかにした（Tanboon J, et al. Neurology. 2021 Jan 19;96(3):e448-e459）。更に現在、他の皮膚筋炎サブタイプについてもその特徴を明らかにすべく、解析を進めている。

b) 中心核ミオパチーのバリアント簡易スクリーニング

竹田班員らは、NCNP の筋レポジトリー検体を活用することで、中心核ミオパチーの原因遺伝子産物である BIN1 と dynamin 2 が複合体を形成して膜リモデリングを行っており、BIN1 に変異が導入されることで膜リモデンリング異常を来すことを見出した。また、ここで開発したシステムは、バリアントの病原性確認に有用であることを示した（Fujise K, et al. Biol Chem. 2020 Nov 13;296:100077）。

4)治療法開発

a) 悪性高熱症

村山班員らは、RYR1 変異体の CICR 簡易測定系を樹

立することにより、悪性高熱症素因の簡便な評価方法を確立した。
村山班員らは、悪性高熱症変異導入マウスにおいて、RyR1 チャネル活性を抑制する新規オキソリン酸誘導体に悪性高熱発症予防効果があることを明らかにした（Nat Commun, in press）。今後 RyR1 関連筋疾患に対する効果を in vivo および in vitro 実験において更に詳細に検討していく予定である。
b) その他
当班で開発されたアルベカシンによるリードスルー療法が医師主導型治験へと結びついている。その他の病態に基づく各種の治療法開発研究が班員によって行われた。

4. 研究成果刊行一覧

1) Tanboon J, Inoue M, Hirakawa S, Tachimori H, Hayashi S, Noguchi S, Suzuki S, Okiyama N, Fujimoto M, Nishino I: Pathological features of anti-Mi-2 dermatomyositis. ***Neurology,*** 96(3): e448-e459, Jan, 2021
2) Fuseya Y, Sakurai T, Miyahara JI, Sato K, Kaji S, Saito Y, Takahashi M, Nishino I, Fukuda T, Sugie H, Yamashita H: A Case of Adult-onset Repeat Rhabdomyolysis with a Very Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Due to Compound Heterozygous ACADVL Mutations. ***Intern Med.*** 59(21):2729-2732. Nov, 2020
3) Matsukawa T, Eguchi K, Nishino I, Okada K, Oshimi K, Miyagishima T: Light-chain amyloid myopathy isolated to skeletal muscles: A case report. ***Clin Case Rep.*** 8(12):2869-2873. eCollection. Dec, 2020
4) Ogasawara M, Iida A, Kumutpongpanich T, Ozaki A, Oya Y, Konishi H, Nakamura A, Abe R, Takai H, Hanajima R, Doi H, Tanaka F, Nakamura H, Nonaka I, Wang Z, Hayashi S, Noguchi S, Nishino I: CGG expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations. ***Acta Neuropathol Comun,*** 8(1): 204, Nov, 2020
5) Ikeda T, Takeuchi H, Takahashi K, Nakamura H, Kunii M, Katsumoto A, Tada M, Higashiyama Y, Hibiya T, Suzuki S, Nishino I, Koyano S, Doi H, Tanaka F: Tonsillectomy Improved Therapeutic Response in Anti-SRP Myopathy With Chronic Tonsillitis. ***Front Immunol.*** 11:595480. eCollection 2020. Nov, 2020
6) Sugihara H, Teramoto N, Nakamura K, Shiga T, Shirakawa T, Matsuo M, Ogasawara M, Nishino I, Matsuwaki T, Nishihara M, Yamanouchi K: Cellular senescence-mediated exacerbation of Duchenne muscular dystrophy. ***Sci Rep.*** 10(1):16385. Oct, 2020
7) Saito Y, Nishikawa A, Iida A, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Ishiyama A, Komaki H, Nakamura S, Fujikawa S, Kanda T, Yamadera M, Sakiyama H, Hayashi S, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: ADSSL1 Myopathy Is the Most Common Nemaline Myopathy in Japan With Variable Clinical Features. ***Neurology.*** 95(11):e1500-e1511. Sep, 2020
8) Yoshioka W, Miyasaka N, Okubo R, Shimizu R, Takahashi Y, Oda Y, Nishino I, Nakamura H, Mori-Yoshimura M: Pregnancy in GNE myopathy patients: a nationwide repository survey in Japan. Orphanet ***J Rare Dis.*** 15(1):245. Sep, 2020
9) Matsukawa T, Eguchi K, Nishino I, Okada K, Oshimi K, Miyagishima T: Light-chain amyloid myopathy isolated to skeletal muscles: A case report. ***Clin Case Rep.*** 2020;00:1–5. Online. Sep, 2020
10) Mori-Yoshimura M, Oya Y, Komaki H, Segawa K, Minami N, Saito Y, Nishino I, Takahashi Y: Respiratory Dysfunction in Becker Muscular Dystrophy Patients: A Case Series and Autopsy Report. ***J Neuromuscul Dis.*** 2020;7(4):425-431. Sep,

2020

11) Indrawati LA, Iida A, Tanaka Y, Honma Y, Mizoguchi K, Yamaguchi T, Ikawa M, Hayashi S, Noguchi S, Nishino I: Two Japanese LGMDR25 patients with a biallelic recurrent nonsense variant of BVES. ***Neuromuscul Disord.*** 30(8):674-679. Aug, 2020

12) Oyama M, Ohnuki Y, Inoue M, Uruha A, Yamashita S, Yutani S, Tanboon J, Nakahara J, Suzuki S, Shiina T, Nishino I, Suzuki S: HLA-DRB1 allele and autoantibody profiles in Japanese patients with inclusion body myositis. ***PLoS One.*** 15(8):e0237890. eCollection 2020. Aug, 2020

13) Samukawa M, Nakamura N, Hirano M, Morikawa M, Sakata H, Nishino I, Izumi R, Suzuki N, Kuroda H, Shiga K, Saigoh K, Aoki M, Kusunoki S: Neutral Lipid Storage Disease Associated With the PNPLA2 Gene: Case Report and Literature Review. ***Eur Neurol.*** 83(3):317-322. Aug, 2020

14) Sasaki R, Ohta Y, Tadokoro K, Matsumoto N, Nomura E, Omote Y, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Kumutpongpanich T, Nishino I, Abe K: TTN missense variants in two siblings with asymmetric facial and limb weakness. ***J Neurol Sci.*** 415:116885. Aug, 2020

15) Cotta A, Carvalho E, da-Cunha-Junior AL, Navarro MM, Menezes MM, Paim JF, Valicek J, Lima MI, Velloso-Filho R, Freire-Lyra MH, Takata RI, Inoue M, Okubo M, Iida A, Nishino I: Clinical, imaging, morphologic, and molecular features of X-linked *VMA21*-related myopathy in two unrelated Brazilian families. ***J Neurol Sci.*** 415:116977. Aug, 2020

16) Inoue M, Tanboon J, Hirakawa S, Komaki H, Fukushima T, Awano H, Tajima T, Yamazaki K, Hayashi R, Mori T, Shibuya K, Yamanoi T, Yoshimura H, Ogawa T, Katayama A, Sugai F, Nakayama Y, Yamaguchi S, Hayashi S, Noguchi S, Tachimori H, Okiyama N, Fujimoto M, Nishino I: Association of Dermatomyositis Sine Dermatitis With Anti-Nuclear Matrix Protein 2 Autoantibodies. ***JAMA Neurol***, 77(7):872-877. Jul, 2020.

17) Moulay G, Lainé J, Lemaître M, Nakamori M, Nishino I, Caillol G, Mamchaoui K, Julien L, Dingli F, Loew D, Bitoun M, Leterrier C, Furling D, Vassilopoulos S: Alternative Splicing of Clathrin Heavy Chain Contributes to the Switch From Coated Pits to Plaques. ***J Cell Biol.*** 219(9):e201912061. Jul, 2020

18) Hamanaka K, Šikrová D, Mitsuhashi S, Masuda H, Sekiguchi Y, Sugiyama A, Shibuya K, Lemmers RJLF, Goossens R, Ogawa M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Kuwabara S, Balog J, Nishino I, van der Maarel SM: Homozygous nonsense variant in *LRIF1* associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. ***Neurology***, 9;94(23):e2441-e2447. Jun, 2020.

19) Liang WC, Jong YJ, Wang CH, Wang CH, Tian X, Chen WZ, Kan TM, Minami N, Nishino I, Wong LC: Clinical, Pathological, Imaging, and Genetic Characterization in a Taiwanese Cohort With Limb-Girdle Muscular Dystrophy. ***Orphanet J Rare Dis.*** 15(1):160. Jun, 2020

20) Yokota Y, Hara M, Akimoto T, Mizoguchi T, Goto YI, Nishino I, Kamei S, Nakajima H: Late-onset MELAS syndrome with mtDNA 14453G→A mutation masquerading as an acute encephalitis: a case report. ***BMC Neurol.*** 20(1):247. Jun, 2020.

21) Deng J, Yu J, Li P, Luan X, Cao L, Zhao J, Yu M, Zhang W, Lv H, Xie Z, Meng L, Zheng Y, Zhao Y, Gang Q, Wang Q, Liu J, Zhu M,

Guo X, Su Y, Liang Y, Liang F, Hayashi T, Maeda MH, Sato T, Ura S, Oya Y, Ogasawara M, Iida A, Nishino I, Zhou C, Yan C, Yuan Y, Hong D, Wang Z: Expansion of GGC Repeat in GIPC1 Is Associated with Oculopharyngodistal Myopathy. ***Am J Hum Genet.*** 106(6):793-804. Jun, 2020

22) Ono H, Suzuki N, Kanno SI, Kawahara G, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S, Nakamura N, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Nagatomi R, Araki N, Yasui A, Warita H, Hayashi YK, Miyake K, Aoki M. AMPK complex activation promotes sarcolemmal repair in dysferlinopathy. ***Mol Ther,*** 28, 1133-1153, 2020
23) Izumi R, Takahashi T, Suzuki N, Niihori T, Ono H, Nakamura N, Katada S, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki Y, Aoki M. The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. ***Hum Mutat***, 41, 1540-1554, 2020
24) 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
25) 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
26) Iyer KA, Hu Y, Nayak AR, Kurebayashi N, Murayama T, Samsó M: Structural mechanism of two gain-of-function cardiac and skeletal RyR mutations at an equivalent site by cryo-EM. ***Sci Adv.*** 6: eabb2964, 2020
27) Moulay G, Lainé J, Lemaître M, Nakamori M, Nishino I, Caillol G, Mamchaoui K, Julien L, Dingli F, Loew D, Bitoun M, Leterrier C, Furling D, Vassilopoulos S.: Alternative splicing of clathrin heavy chain contributes to the switch from coated pits to plaques. ***J Cell Biol.*** 2020;219(9):e201912061
28) Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Noguchi, S., Takei, K., and Takeda, T. Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy. ***J. Biol. Chem.*** 296:100077, Jan, 2021

分担研究課題名　筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF-β シグナルの解明と分子標的医薬の開発
分担研究者　大澤　裕
所属　川崎医科大学神経内科学

緒言

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

われわれは、これまでにカベオリン-3 が、骨格筋量を負に制御する TGF-beta 分子マイオスタチンの膜受容体を抑制して筋萎縮を阻害する、反対に、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世界に先駆け明らかにしてきた。本研究は、①カベオリン-3 欠損および高発現 DMD モデルマウスの作出・解析によりカベオリン-3 が DMD 病態シグナルを促進するのか抑制するのかを解明する、②独自に同定したマイオスタチン阻害ペプチド医薬を、DMD モデルマウスに全身投与し、非臨床 POC 取得・ペプチドによる disease modifying therapy の基盤を確立する。③LGMD1C モデルマウスに nNOS を高発現させ nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構を解明する。

方法

①<u>カベオリン-3 欠損・高発現 DMD モデルマウス作出・解析</u>：骨格筋特異的プロモーター下に LGMD1C 型変異カベオリン-3（P104L)、および野性型カベオリン-3 を繋いだトランスジーンを最重症型 DMD モデル DBA/2-mdx マウス受精卵に注射し、トランスジェニックマウスを作出した。②<u>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</u>：全身投与（皮下）によるジストロフィー変化を解析した。③<u>nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構解析</u> ：LGMD1C モデルマウスに nNOS を高発現させ nNOS 活性化が LGMD1C 病態にどのように関与するかを検証した。

結果

①<u>カベオリン-3 欠損・高発現 DMD モデルマウス作出・解析</u>：それぞれのトランスジーンを作出して最重症型 DMD モデル DBA/2-*mdx* 受精卵への注射をおこなった。Genotyping では、いずれも 2-3 ストレインが得られており、それぞれの骨格筋ノザンブロット・ウエスタンブロット解析により、カベオリン-3 発現量を検討している。②<u>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</u>：研究開始時と比較して、1,000 倍の阻害活性を示し、高い血中安定性（ADME 試験、PK 試験）を示す、マイオスタチン阻害特殊ペプチドを同定した。このペプチドの週 3 回、合計 12 回の皮下投与（Vehicle, 1 mh/kg, 10 mg/kg）によって、用量依存性に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD）モデルマウス横隔膜のジストロフィー変化（壊死・線維化・脂肪化）が改善した。また、生理学的解析でも、握力・走力、および筋張力の改善が達成され、このペプチド医薬の非臨床 POC を取得できた、と考えて居る。現在、このペプチドに、さらに筋細胞透過型シグナルを付加した「筋組織移行型」マイオスタチン阻

害特殊ペプチドを合成して、その in vitro 試験（マイオスタチン阻害･ADME 試験･PK 試験）を実施している。③nNOS 活性化による LGMD1C 病態シグナル制御機構解析：トランスジーンを作出して LGMD1C モデルマウスの受精卵への注射をおこなった。Genotyping で陽性ストレインが得られた。現在、骨格筋のノザンブロット解析によりトランスジーン発現を確認中である。

考察

ジストロフィンの発見から、現在までに 30 種類以上の筋ジストロフィー原因遺伝子が同定され遺伝子修復治療､mRNA 修復治療などのテーラーメイド療法が世界的に盛んに研究されている。ところが、これまでに DMD 等への糖質ステロイド剤の部分的効果を除けば、この遺伝性難病に対して共通に有効性を示す薬剤は得られていない（Takeuchi, et al. J Neurol 260, 2013)。一方、DMD モデルマウス等の「ジストロフィー変化」を示す様々な骨格筋において、カベオリン-3 発現の上昇が認められることは、このシグナル伝達の足場蛋白質が各種筋ジストロフィー病態シグナルを共通に制御する機構が十分に想定できる。カベオリン-3 欠損、および高発現 DMD モデルマウスで、ジストロフィー変化が改善するか否かを検討することで、カベオリン-3 を起点とする筋ジストロフィー病態シグナルを解明するとともに、治療介入への糸口を探りたい。

カベオリン-3 は、骨格筋量を負に制御する TGF-beta 分子マイオスタチンの膜受容体を抑制して筋萎縮を阻害する。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。皮下試験により投与法を設定、次いで、用量漸増試験により、有効域・安全域を確定する予定としている。

世界的なミオスタチン阻害医薬の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 の作用が主体であり、血中のマイオスタチンリガンドを阻害する戦略が有効か否かについて、さらに検討する必要がある。

そこで､われわれは､2020 年度に得られたマイオスタチン阻害特殊ペプチドの非臨床 POC を基盤に､2021 年度は､ペプチドへの筋細胞移行型シグナル付加による筋組織移行型ペプチドの開発により、筋組織内での autocrine の作用阻害に取り組む予定とする

これまでの我々の検討では、カベオリン-3 は、神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）を抑制して、その筋肥大を阻害する。nNOS 高発現トランスジーンを導入したカベオリン-3 欠損 LGMD1C モデルマウスの筋萎縮が抑制されるかについて、2021 年度は骨格筋解析により検討する。これにより､nNOS による筋肥大機構、さらには、その治療介入の可能性について検討していきたい。

本研究は、骨格筋シグナル伝達の足場蛋白質カベオリン-3 と、その結合分子マイオスタチン膜受容体､nNOS を介する筋ジストロフィー病態の解明、治療介入を最終目標とする。

結論

本研究は、これまでに 2020 年度に設定したマイルストン:①カベオリン-3 欠損･高発現 DMD モデルマウスの作出、②マイオスタチン阻害特

殊ペプチドによるDMDマウスのジストロフィー変化の改善、③nNOS活性カベオリン-3欠損LGMD1Cモデルマウス作出を、それぞれ達成できた。2021年度は、モデルマウス解析、ペプチド強化に取り組む予定である。

参考文献

1. 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
2. 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
3. 3. Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y. Cleavage of β-dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle without MMP-2 and MMP-9. Biochem Biophys Res Commun, 492(2):199-205, Oct, 2017

Dysferlinopathy および類似疾患の次世代シークエ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

研究協力者

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

所属

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

緒言

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

方法

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

結果

細胞抽出物を dysferlin 特定領域のアフィニティカラムと反応させて相互作用するタンパク質を抽出した。SDS-PAGE により分離して、質量分析にかけることで、複数の dysferlin 結合タンパク質を同定した。同定した結合タンパク質の一つである AMPK 複合体に注目し、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行った。マウス骨格筋において AMPK 複合体がレーザーによる膜損傷部位に集積し、また培養細胞において AMPK 遺伝子発現抑制が筋細胞膜修復機能の低下に繋がることを発見した。さらに dysferlin 欠損マウス骨格筋のレーザー膜損傷で、AMPK 複合体の損傷部位への集積が遅延することから、膜修復機構において、dysferlin が AMPK 複合体の局在を規定している、すなわち dysferlin が足場タンパク質として機能していることを見出した。さらに AMPK 活性化剤の投与により、*dysferlin* 変異をもつ患者培養細胞において膜修復機能が改善することを明らかにするとともに、dysferlinopathy のモデル動物としてゼブラフィッシュおよびマウスにおいて骨格筋の障害が改善することを確認した。

考察

AMPK 複合体をはじめとした新規結合タンパク質について、筋細胞膜修復に関与する既報の分子との関連についても今後解析をすすめ、膜修復機構の全容解明と dysferlinopathy の病態解明につなげていく。

また、AMPK 活性化剤の dysferlinopathy モデル動物への投与実験として、今回はドラッグ・リポジショニングの観点から、糖尿病治療薬であるメトホルミンの経口投与を行った。骨格筋の AMPK リン酸化は限定的であり、その効果は筋病理の一部改善に留まった。AMPK は全身のエネルギー代謝に関す

る分子である。骨格筋特異的に、より強い AMPK リン酸化を目的として、ゲノム創薬など低分子薬以外のカテゴリーの薬剤や薬物送達法に関する検討も今後行っていく。

結論

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

参考文献

Ono H, Suzuki N, Kanno SI, Kawahara G, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S, Nakamura N, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Nagatomi R, Araki N, Yasui A, Warita H, Hayashi YK, Miyake K, Aoki M. AMPK complex activation promotes sarcolemmal repair in dysferlinopathy. Mol Ther, 28, 1133-1153, 2020

Izumi R, Takahashi T, Suzuki N, Niihori T, Ono H, Nakamura N, Katada S, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki Y, Aoki M. The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain.
Hum Mutat, 41, 1540-1554, 2020

Shioya A, Takuma H, Takahashi T, Ishii A, Aoki M, Tamaoka A. Radiological findings in siblings with dysferlin mutation with diverse phenotype. J Neurol Sci, 409, 116579, 2020

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の分子病態および治療に関する研究
（ジストログリカノパチーに合併する末梢蝸牛神経の髄鞘化障害による聴覚異常）

分担研究者
戸田　達史 1）

研究協力者
上山　健彦 2）

所属
1）東京大学大学院・医学系研究科・神経内科学
2）神戸大学バイオシグナル総合研究センター

緒言
筋ジストロフィー（MD）の原因遺伝子は 50 種類以上が同定されている。また MD の中で、細胞内アクチン骨格と細胞外基質ラミニンを架橋する膜貫通蛋白α-dystroglycan（αDG）の糖鎖修飾の異常により起こる muscular dystrophy-dystroglycanopathy（MD-DG）の原因遺伝子として、現状までに少なくとも 18 種が同定されている。MD のうち、顔面肩甲上腕型 MD や筋強直性 MD では、難聴の報告があるが、その発症機序の詳細は、未だ不明である。一方で、MD 中最頻・最多のデュシェンヌ型 MD では、難聴を合併するとの報告はない。
感音難聴（内耳有毛細胞以降の障害による難聴）は、感覚障害中で最多の疾患・障害であるが、根本治療法がない難病である。
今回、我々は、2 種のモデルマウスと福山型筋ジストロフィー患者を対象に、MD-DG における、聴覚障害の有無とその詳細の解明を行った。

方法
α-DG の異常に起因する先天性筋ジストロフィー（MD）である MD-DG）の聴覚について精査・検討した。対象として、2 種の MD-DG モデルマウス（Large$^{myd/myd}$, POMGnT1-KO）と福山型 MD 患者（FCMD）を用い、聴覚は聴性脳幹反応（ABR）で、蝸牛神経の組織学的検索は、免疫染色及び透過電子顕微鏡を用いて行った。

結果
MD-DG マウスで、ABR での聴覚の確立時（2 週齢）から存在する非進行性の感音難聴および I 波の潜時延長と振幅低下を発見した。9 例の FCMD 患者（対象群は年齢・性別が合致した健常人）では、明らかな（顕在化）難聴は認めなかったものの、覚醒下 ABR で I 波潜時延長（hidden hearing loss）を発見した。MD-DG マウスを用いた組織学的精査（免疫染色及び透過電子顕微鏡）で、「αDG とその結合相手のラミニンが、“glial dome”と呼ばれる蝸牛神経髄鞘移行部より末梢で、豊富に存在」、上記の ABR 所見と一致して「“glial dome”より末梢の蝸牛神経でシュワン細胞による髄鞘化が著明に障害される」との新規の感音難聴病理・機序を発見した。

考察
1. 先天性 MD の 1 つである MD-DG において、聴覚異常が存在することを、マウスモデルとヒト患者で発見・証明した。
2. “glial dome”より末梢でシュワン細胞により髄鞘化される末梢蝸牛神経は、聴覚の脆弱部位であることを発見した。
3. 500 以上存在し、未だに 50 未満しか原因が解明されていない症候群性感音難聴の少なくとのいくつかの原因が、蝸牛神経の髄鞘移行部より末梢での病変やその部の髄鞘化障害である可能性が示唆された。

結論
MD-DG では、「“glial dome”より末梢の蝸牛神経でのシュワン細胞による髄鞘化障害」により、非進行性の感音難聴を呈するとの、新規感音難聴病理・機序を発見した。この新規の感音難聴病理が、症候群性感音難聴の臨床に貢献すると確信している。

参考文献

Morioka S, Sakaguchi H, Mohri H, Taniguchi-Ikeda M, Kanagawa M, Suzuki T, Miyagoe-Suzuki Y, Toda T, Saito N, Ueyama T: Congenital hearing impairment associated with peripheral cochlear nerve dysmyelination in glycosylation-deficient muscular dystrophy. **PLOS Genet.** 16(5); e1008826, 2020.

神経筋接合部・筋の信号伝達障害の病態機構解明と治療研究

分担研究者　大野欽司[1)]
研究協力者　大河原美静[1)]、Mohammad Nazim[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)。一方、臨床症状から原因遺伝子を類推することは多くの場合困難である。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に認められた筋力低下が軽快し思春期・成人期に再増悪し成人発症と判断される例や、新生児期に全く症状がない成人発症例も存在する。特に常染色体優性遺伝性疾患であるスローチャンネル症候群では成人発症例が認められる(5)。さらに、*SYT2*-CMS(6)と *SNAP25B*-CMS (7)の 2 型も常染色体優性遺伝形式であるが報告症例数が少なく成人発症の有無は不明である。他の CMS はいずれも常染色体劣性遺伝形式を示す。

次世代シークエンサの活用により CMS の原因遺伝子の同定が飛躍的に進展し、32 種類の遺伝子における原因遺伝子変異が同定されてきた。特に最近 4 種類の分子群が同定されてきた。まず初めに、アセチルコリン受容体(AChR)クラスタリングを誘導する 4 種類のシグナル分子(*AGRN, LRP4, MUSK, RAPN*)の欠損が終板 AChR 欠損を惹き起こす(8, 9)。次に、5 種類の糖化酵素分子（*GFPT1, DPAGT1, ALG2, ALG14, GMPPB*）の欠損は、時に血清 CK が上昇し肢体型筋ジストロフィーとの鑑別・合併が重要である(10)。さらに、3 種類のシナプス小胞関連分子(*CHAT, SLC5A7, SLC18A3*)の欠損はアセチルコリンのリサイクリングを障害する(11, 12)。最後に、3 種類の SNARE 複合体関連分子(*SYT2, VAMP, UNC13A*)の欠損はランバートイートン筋無力症候群（LEMS）に類似した表現系を呈し、先天性 LEMS という CMS の新規疾患カテゴリーを形成する(6, 13, 14)。SNARE 複合体関連分子ではないが *AGRN*-CMS でも LEMS と同様の高頻度反復神経刺激における複合筋活動電位(CMAP)の異常漸増が認められる(15)。一方、VAMP と同じ SNARE 複合体を形成する SNAP-25 の欠損による *SNAP25*-CMS では高頻度反復神経刺激試験による CMAP の異常漸増を認めない(7)。

本研究において *AGRN* において同定した遺伝子変異の agrin に対する作用の解析を行なった。

方法

Whole exome sequencing により 4 名の CMS 患者において *AGRN* 遺伝子変異の同定を行なった。すプライシングを疑う変異に対してはミニジーンを作成しスプライシング解析を行なった。ミスセンス変異に対して agrin フラグメントにミスセンス変異を導入し、*in cellulo* 解析と *in vitro* 解析を行なった。

結果

4 名の CMS 患者において 6 種類の遺伝子変異を同定した。(i)に示す large-scale deletion を除いて病態を説明するための機能解析を行なった。

(i) g.950,567_958,457del は 7.9 kbp の欠失で *AGRN* exon 1, 2 を欠失させた。

(ii) c.4744G>A は *AGRN* exon 26 の 3'末端塩基で p.Gly1582Arg が予測されたが、ミニジーン解析にて exon 26 のスキッピングを誘導し p.A1506SfsX6 となることを明らかにした。

(iii) p.S1180L は SEA ドメインに位置する。SEA ドメインは agrin の糖化と分泌に重要なドメインである(16)。p.S1180L は AChR クラスタリングを阻害するとともに、分泌された agrin の破壊を促進した。

(iv) p.R1509W は LG1 ドメインに位置する。LG1 ドメインはαジストログリカンへの agrin の結合に重要である（17)。p.R1509W は AChR クラスタリングを阻害するとともに、MuSK リン酸化を阻害し agrin の骨格筋膜ならびに NMJ へのアンカリングを阻害し、さらに heparan sulfate への結合を阻害した。

(v) p.G1675S は LG2 ドメインに位置する。LG2 ドメインは LG1 ドメインと同様にαジストログリカンへの agrin の結合に重要である(17)。また、neuron-specific exon A/y は LG2 ドメインに存在する（18)。p.G1675S は AChR クラスタリングを阻害するとともに、agrin の骨格筋膜へのアンカリングを阻害し、さらに heparin への結合を阻害した。

(vi) p.Y1877D は LG3 ドメインに存在する。neuron-specific exon B/z は LG3 ドメインに存在する（18)。Exon B/z がコードするアミノ酸

は agrin の LRP4 への結合を可能にする(19)。p.Y1877D は AChR クラスタリングを阻害するとともに、MuSK リン酸化を阻害した。

考察

AGRN 変異が位置するドメインごとにことなった病態機序を示しており、病態機序に応じた治療戦略が可能になることが期待される。

結論

4 名の CMS 患者において同定した 6 種類の変異は、変異が位置するドメインごとに異なった病態機序により AChR クラスタリングを阻害した(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. Clin Exp Neuroimmunol. 7:246-259, 2016
3 Ohno K, Ohkawara B, and Ito M: Agrin-LRP4-MuSK signaling as a therapeutic target for myasthenia gravis and other neuromuscular disorders. Expert Opin Ther Targets. 21:949-958, 2017
4 Ohkawara B, Ito M, and Ohno K: Secreted signaling molecules at the neuromuscular junction in physiology and pathology. Int J Mol Sci. 22:2455, 2021
5 Shen XM, Okuno T, Milone M, et al.: Mutations Causing Slow-Channel Myasthenia Reveal That a Valine Ring in the Channel Pore of Muscle AChR is Optimized for Stabilizing Channel Gating. Hum Mutat. 37:1051-1059, 2016
6 Whittaker RG, Herrmann DN, Bansagi B, et al.: Electrophysiologic features of SYT2 mutations causing a treatable neuromuscular syndrome. Neurology. 85:1964-1971, 2015
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 Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, et al.: LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. Hum Mol Genet. 23:1856-1868, 2014
9 Ohkawara B, Shen X, Selcen D, et al.: Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner. JCI Insight. 5:2020
10 Selcen D, Shen XM, Milone M, et al.: GFPT1-myasthenia: clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. Neurology. 81:370-378, 2013
11 Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, et al.: Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:2017-2022, 2001
12 O'Grady GL, Verschuuren C, Yuen M, et al.: Variants in SLC18A3, vesicular acetylcholine transporter, cause congenital myasthenic syndrome. Neurology. 87:1442-1448, 2016
13 Engel AG, Selcen D, Shen XM, et al.: Loss of MUNC13-1 function causes microcephaly, cortical hyperexcitability, and fatal myasthenia. Neurol Genet. 2:e105, 2016
14 Salpietro V, Lin W, Delle Vedove A, et al.: Homozygous mutations in VAMP1 cause a presynaptic congenital myasthenic syndrome. Ann Neurol. 81:597-603, 2017
15 Nicole S, Chaouch A, Torbergsen T, et al.: Agrin mutations lead to a congenital myasthenic syndrome with distal muscle weakness and atrophy. Brain. 137:2429-2443, 2014
16 Bogdanik LP, and Burgess RW: A valid mouse model of AGRIN-associated congenital myasthenic syndrome. Hum Mol Genet. 20:4617-4633, 2011
17 Dempsey CE, Bigotti MG, Adams JC, et al.: Analysis of alpha-Dystroglycan/LG Domain Binding Modes: Investigating Protein Motifs That Regulate the Affinity of Isolated LG Domains. Front Mol Biosci. 6:18, 2019
18 Ohno K, Rahman MA, Nazim M, et al.: Splicing regulation and dysregulation of cholinergic genes expressed at the neuromuscular junction. J Neurochem. 142 Suppl 2:64-72, 2017
19 Zong Y, Zhang B, Gu S, et al.: Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. Genes Dev. 26:247-258, 2012

分担研究課題名 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

ゼブラフィッシュは遺伝学的にヒトとの共通部分が多いこと、一度の産卵数が多く、またゲノム編集技術を簡便に実施できること、発生過程を観察しやすいこと、小さいスペースで飼育可能なこと、薬剤スクリーニングを行いやすいこと、などの利点から、希少難病の多い筋疾患の病態解明・治療法の開発に適した動物である。

今年度我々は、筋萎縮マーカーの１つであるMuRF-1 遺伝子(*murf1*)の発現を可視化しうるゼブラフィッシュモデルを作製し、その発現を調節する薬剤のスクリーニングを行った。

方法

ゼブラフィッシュ *murf1* のプロモーター領域を決定し、murf1-EGFP cDNA を導入したトランスジェニックフィッシュの系統を作製した。RT-PCR 法を用いて *murf1* と EGFP の発現が一致していることを確認後、1,280 化合物からなるライブラリーを用いて EGFP の発現を変化させうる化合物のスクリーニングを実施した。デキサメタゾンを投与し murf1 の発現を増加させた幼魚にスクリーニングで見出した化合物を投与し、その効果を検証した。

結果

EGFP のシグナルは、受精後１日目の幼魚で観察され、また *murf1* と EGFP の遺伝子発現が一致していることを確認した。成魚においては、murf1 と EGFP は主として骨格筋と心筋にその発現が確認された。受精後４日目の幼魚を用いて化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、*murf1* の発現を低下させる５種類の化合物を同定した。さらにデキサメタゾン投与により、murf1 の発現が増強することを確認後、同定した化合物が *murf1* の発現を低下させうることをも確認した。

考察

ゼブラフィッシュを用いて、筋萎縮を抑制する可能性のある化合物の同定が可能となった。今後は類縁化合物などのスクリーニングを行うことで、さらに効果的な化合物の選択が可能となると考える。

結論

小型魚類であるゼブラフィッシュを用いることで、効率よく筋萎縮マーカーであるMuRF-1 の発現を抑制しうる化合物を複数同定し、いずれもがステロイド薬投与による筋萎縮に対しても効果があることを確認した。

参考文献

1. Hamanaka K, Šikrová D, Mitsuhashi S, Masuda H, Sekiguchi Y, Sugiyama A, Shibuya K, Lemmers RJLF, Goossens R, Ogawa M, Nagao N, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Kuwabara S, Balog J, Nishino I, van der Maarel SM. A homozygous nonsense variant in LRIF1 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neurology 94(1) e7, 2020.

分担研究課題名 筋疾患におけるメカノトランスダクション機構の解明

分担研究者　平澤恵理[1]
研究協力者　中田智史[2]，山下由莉[1]
所属
１）順天堂大学大学院・医学研究科老人性疾患病態・治療研究センター/老化・疾患生体制御学
２）順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科女性スポーツ研究センター

緒言

健常筋は、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。病的及び老化骨格筋に特徴的なメカノカスケードを解明し、最適化することで筋ジストロフィー治療におけるリハビリテーションや高齢者へ筋肥大を促すトレーニングのオーダーメイド提供が可能になると期待される。

方法

メカニカルストレスの異同による骨格筋への影響の違いを調べるため、野生型マウス（14週令雄）において下記負荷/免荷モデルを作成した。

負荷モデルとしては、拮抗筋の腱を切除することで負荷をかける腱切除（負荷）モデルとTreadmill 運動による 2 種を作成した。Treadmill 運動は、10m/min から開始し、10 分毎に 2m/min 漸増し、計 55 分/回を週 5 回、2 週間施行した。萎縮モデルとしては、腱切除モデル、神経切除モデル（腓腹神経切除)、尾部懸垂モデルの 3 種を作成した。いずれの系も試行期間は 2 週間とし、負荷/免荷開始後 2 週間（16 週令）で筋採取を行った。また、ジストロフィン—糖タンパク質複合体（DGC）に結合し、メカニカルストレスを調整するパールカンを欠損させたマウス（*Hspg2*$^{-/-}$-Tg マウス）を評価対象として、同実験による負荷/免荷の影響の差異比較を行った。

加えて、上記 *in vivo* 実験から得られた事象 を分子レベルで検証するために、骨格筋初代培養細胞や、C2C12 細胞を用いてメカニカルストレスを定性定量的に負荷する *in vitro* 系モデルとする。

結果

Treadmill 運動後は有意な筋肥大作用が確認されたが、腱切除術と同程度の肥大効果は得られなかった。また、Treadmill 運動中、野生型マウス、*Hspg2*$^{-/-}$-Tg マウスのいずれも試験完遂可能であったが、*Hspg2*$^{-/-}$-Tg マウスは比較的運動耐容能が低く走行中断する傾向がみられた。

萎縮モデルにおいては、腱切除術、神経切除術、尾部懸垂モデルのいずれにおいても、筋委縮がおこることが確認できた。しかし、腱切除術、神経切除術では *Hspg2*$^{-/-}$-Tg マウスでは野生型マウスよりも萎縮が抑制されたのに対し、尾部懸垂モデルでは明らかな萎縮抑制効果は得られなかった。一軸伸展装置および電気刺激装置を組み合わせ、C2C12 細胞を用いてメカニカルストレスを定性定量的に負荷する *in vitro* 系モデルで生体を模倣する系を立ち上げた。

考察

メカニカルシグナル伝達の違いにより、パールカン欠損骨格筋の萎縮抑制程度が異なった。細胞外マトリックスによるメカニカルストレスの制御は神経因子や筋収縮運動の有無により異なる可能性が予想される。したがって、Ach 負荷ストレッチチャンバーによる収縮負荷、電気刺激による負荷の違いにより、筋細胞でのメ

カニカルシグナルや細胞死誘導が異なるかを検討する方針した。本年度はパールカン欠損骨格筋では Ach 負荷による易刺激性が増強し過剰な Ca 流入が生じることを確認しており、これはデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同様の結果である。

結論

疾患筋及び老化骨格筋に特徴的なメカノカスケードを解明し、最適化するためには実験可能な in vivo および in vitro の系が必要であり、さらにその精度をあげるため検討を進める。

参考文献

1 Nakada S, Yamashita Y, Machida S, Miyagoe-Suzuki Y, Arikawa-Hirasawa E Perlecan facilitates neuronal nitric oxide synthase delocalization in denervation-Induced muscle atrophy Cells. 2020 Nov 23;9(11):2524 doi: 10.3390/cells9112524

2 平澤 恵理、 山下 由莉　難治性疾患(難病)を学ぶ シュワルツ・ヤンペル症候群 遺伝子医学 10(3) 98 - 100 2020 年 7 月

3 Yamashita Y, Nakada S, Yoshihara T, Nara T, Furuya N, Miida T, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle.Sci Rep. 2018 May 17;8(1):7766. doi10.1038/s41598-018-25635-x.

4 *Ning L, Xu Z, Furuya N, Nonaka R, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan inhibits autophagy to maintain muscle homeostasis in mouse soleus muscle. *Matrix Biol.* 2015 Aug 28.

5 Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y 1999. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. Nat Genet 23:354-8

6 Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I. et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 70, 1368-75 (2002).

7 Xu Z, Ichikawa N,et al.Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition *Matrix Biol.* 2010 Jul;29(6):461-70.

8 Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva JA Trejo, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, 7 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

骨格筋分化と筋萎縮を標的とした筋疾患の病態解明と治療法開発

分担研究者　土田　邦博１）

研究協力者　常陸圭介１），中谷直史 2)，上住聡芳３），高山健太郎４），林良雄５），永岡唯宏１），上田洋司１）

所属

１）藤田医科大学総合医科学研究所
　　難病治療学研究部門

２）星城大学リハビリテーション学部

３）東京都健康長寿医療センター研究所

４）京都薬科大学

５）東京薬科大学

緒言

骨格筋は運動により筋量が増加し、筋ジストロフィーを中心とした神経筋疾患、神経遮断、栄養不足、非活動、老化、慢性炎症やがんによる悪液質では逆に萎縮する。また、近年の COVID-19 の流行による不活動性も骨格筋萎縮を助長しており、健全な心身の健康維持が喫緊の課題となっている。骨格筋分化や再生は、体性幹細胞である筋衛星細胞（サテライトセル）から、HLH 型転写制御因子の秩序正しい時空間的な発現誘導により行われている。近年、200 塩基以上からなら長鎖非翻訳 RNA(lncRNA)の骨格筋における機能解析が進んでいる。我々は、筋分化経路と筋萎縮における lncRNA の役割を詳細に解析している。

方法

筋分化制御転写因子の中心の一つであるミオジェニン　(MyoG)のプロモーター領域から発現する lncRNA の *Myoparr* (Myogenin-promoter-associated lncRNA)を発見した。*Myoparr* は、ヒストンアセチル化酵素である PCAF と Ddx17 との相互作用を強め、Pol2 を Myog のプロモーターにリクルートさせることで Myog の発現を調節し筋分化を決定していることを、Ribo トラップ法とクロマチン免疫沈降法を駆使して解明した。神経遮断時において Myog が発現誘導され筋萎縮が生じる。*Myoparr* 特異的 small hairpin RNA の投与によって，Myog の発現が抑えられ，筋萎縮が緩和されることを見出した。その過程で *Myoparr* の下流で作用する分泌因子の同定を RNA-seq を駆使して行った。多くの因子が同定されたが，筋肥大効果・筋萎縮抑制効果が知られている Gdf5 の発現が上昇し，細胞内下流シグナル分子の Smad1/5/8 のリン酸化の上昇が見られた [1)]。

廃用性筋萎縮群である坐骨神経遮断、ギブス固定、全身性筋萎縮群である大腸がん担がん悪液質モデル、飢餓刺激を解析した。また、筋肥大モデルとしてミオスタチン遺伝子破壊・代償性足底筋肥大系を用いて、共通に発現変動する lncRNA，mRNA 群を絞り込んだ。

結果

長鎖非翻訳 RNA である LncMyod と linc-MD1 の発現を指標にすることで、廃用性筋萎縮群と全身性筋萎縮群とが区別可能であった [2)] 。筋量調節と相関して発現変動する分子として、IG-DMR, Gtl2 が同定された。さらに、４種の筋萎縮系で共通に変動する 18 種類の新規の lncRNA を同定した [3)]。遺伝子エンリッチメント解析から骨格筋萎縮に共通して変動する mRNA-lncRNA ネットワークの描写が可能となった。

骨格筋には，筋衛星細胞以外に、筋組織の間質に間葉系前駆細胞が存在する。間葉系前駆細胞の除去が新たな筋萎縮モデルとなることを見出した [4)]。間葉系前駆細胞は老化筋萎縮で減少する。間葉系前駆細胞由来の分泌因子である Gdf10 の発現低下が筋萎縮の要因になり、老齢筋萎縮モデルに Gdf10 を持続投与することで筋萎縮を改善できるという結果を得た [4)]。その際には，老化で見られる神経筋接合部周辺のシ

ュワン細胞の変性も正常化していた[4]。筋萎縮の治療としては、ミオスタチンを標的とする臨床治験が進行している。受容体抗体やミオスタチン抗体の中では、まだ、有望な薬剤はないのが現状である。ミオスタチンやアクチビンの細胞外結合タンパク質であるフォリスタチンに由来する阻害ペプチドを班員の東京薬科大学の林教授と創成し、その有効性を調べた[5] 。有効なペプチドをさらに検討している。

考察

現代社会で重要性が増している、筋萎縮に対する標的が次々と見つかっている。長鎖非翻訳RNAは、mRNAと比較すると量的には少ないものの、数の上では凌駕している。*Myoparr*のように筋分化調節転写因子の活性に必須の分子もあり、今後その重要性が明らかになり、治療標的になることが予想される。

結論

長鎖非翻訳 RNA(lncRNA)による筋形成および筋萎縮に関与する機構を明らかにする研究を進行させた。筋萎縮および筋肥大モデルで発現変動する lncRNA 群を抽出し分別可能であることを示した。筋疾患の病態への関与、治療法の開発へと進めていきたい。こういった基盤的な研究から筋萎縮のトランスレーショナル研究が進行することを願っている。

参考文献

1. Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K: Long non-coding RNA Myoparr regulates GDF5 expression in denervated mouse skeletal muscle. Non-coding RNA 5:33, April, 2019
2. Hitachi K, Nakatani M, Funasaki S, Hijikata I, Maekawa M, Honda M, Tsuchida K: Expression levels of long non-coding RNAs are related to skeletal muscle mass in mice. Int. J. Mol. Sci. 21:1628, Feb, 2020
3. Hitachi K, Nakatani M, Kiyofuji Y, Inagaki H, Kurahashi H, Tsuchida K: An analysis of differentially expressed coding and long non-coding RNAs in multiple models of skeletal muscle atrophy: Int. J. Mol. Sci. 22:2558. March, 2021
4. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Nakatani M, Hitachi K, Yamaguchi H, Wakatsuki S, Araki T, Morita M, Yamada H, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa T, Hino J, Fukada S-i., Tsuchida K: Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. J. Clin. Invest. 131(1):e139617, Jan, 2021
5. Saitoh M, Takayama K, Hitachi K, Taguchi A, Taniguchi A, Tsuchida K, Hayashi Y: Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. Bioorg. Med. Chem. Lett. 30(3):126892, Feb, 2020

分担研究課題名　有機化学を基盤とする筋ジストロフィー治療薬の創製研究
分担研究者　林　良雄
所属　東京薬科大学
　　　薬学部　薬品化学教室

緒言

筋ジストロフィーにおける骨格筋変性壊死に対抗する戦略として、筋量を負に制御している「マイオスタチン」の機能阻害に着目している。阻害活性および安全性、安定性の高い化合物を創製できれば、筋ジストロフィーに対する化学療法剤開発に極めて有益であると思われる。我々はマイオスタチン前駆体配列中の区分ペプチドによる阻害ペプチドの探索研究を実施し、既にマウスマイオスタチンプロドメイン由来のマイオスタチン阻害ペプチド **1**（23 残基）及びその高活性誘導体の創製に成功している。特に 16 残基のアミノ酸からなる MIPE-1686 は、トリプシンなどの分解酵素に耐性で、*mdx* マウスへの投与において、筋重量を約 14%増加する。

一方、ペプチド **1** を高機能化し、マイオスタチン阻害活性を一挙に向上させる試みにも挑んでいる。すなわち、ペプチド **1** の 12 位に光酸素化触媒を導入した機能化ペプチド **2** は、近赤外光照射下にマイオスタチンを光酸素化し、強力に不活化することを報告している [1]。本年度は、光酸素化触媒の導入位置を複数検討することで、より優れた機能化ペプチドの獲得を目指した。

筋ジストロフィーに対する治療薬開発のための策として、マイオスタチン阻害剤を巧く医薬品に仕上げることを考えている。がんなどの消耗性疾患により骨格筋量が低下する悪液質（カヘキシア）の治療薬開発である。現在、有効な治療法はほとんどない。すなわち筋量を負に制御するマイオスタチンを阻害することで、カヘキシア治療薬の新規創出に繋がる可能性がある。本年度はマイオスタチン阻害ペプチドを用い可能性を検討した。

方法 、結果、考察

１）光酸素化によるマイオスタチン不活化

マイオスタチン阻害ペプチド **1** の 1, 8, 16 位又は C 末端に光酸素化触媒を導入した一連の新規機能化ペプチド **3–6** を合成した。これらのペプチドと既存の機能化ペプチド **2**（12 位）の機能を比較した。全てのペプチドは、光照射下でマイオスタチンを同程度で光酸素化した。一方、**3**（1 位）および **6**（C 末端）ではオフターゲットモデルとして用いたサブスタンス P の光酸素化が認められたのに対して、**2**（12 位）、**4**（8 位）、**5**（16 位）ではほとんど認められず、良好な選択性が示された。次にマイオスタチンの不活性化を検討したところ、**5**（16 位）が最も効率的にマイオスタチンの活性を抑制し、IC_{50}は 2.1 nM であった。一方、**5** は非光照射下及び光照射下において有意な細胞毒性を示さなかった。

２）ペプチド **1** によるカヘキシアへの効果

ペプチド **1** が担癌カヘキシアモデルマウスを延命できることを確認した [3]。

結論

ペプチド **1**における光酸素化触媒の導入位置の最適化を行った結果、従来の機能化ペプチド **2** よりもマイオスタチン阻害活性の強い機能化ペプチド **5** を獲得することに成功した。

参考文献

1. Okamoto H, Taniguchi A, Usami S, Taguchi A, Takayama K, Hayashi Y: Inactivation of myostatin by photo-oxygenation using catalyst-functionalized peptide. Chem. Commun. 55(62):9108-9111, Aug, 2019.
2. Okamoto H, Taniguchi A, Usami S, Katsuyama M, Konno S, Taguchi A, Takayama K, Hayashi Y: Development of functionalized peptides for efficient inhibition of myostatin by selective photooxygenation. Org. Biomol. Chem. 19(1):199-207, Jan, 2021.
3. Ojima C, Noguchi Y, Miyamoto T, Saito Y, Orihashi H, Yoshimatsu Y, Watabe T, Takayama K, Hayashi Y, Itoh F: Peptide - 2 from mouse myostatin precursor protein alleviates muscle wasting in cancer - associated cachexia. Cancer Sci. 111:2954-2964, Jun, 2020.

分担研究課題名　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　京都大学大学院工学研究科
　　　合成・生物化学専攻

緒言
膜融合は骨格筋線維の形成や膜修復機構など、骨格筋における恒常性維持に必須な現象である。筋線維の形成過程では、筋衛星細胞から派生した筋芽細胞同士が融合し、筋管と呼ばれる長大な管状の構造体が形成される。また、絶え間ない筋収縮・弛緩により発生する筋線維膜の損傷は、小胞融合を介して修復されることが知られており、膜修復の破綻は筋疾患発症をもたらす。しかし細胞膜融合の根幹ともいえる「脂質の局在変化、膜融合後の脂質再配置がいかに膜構造・膜物性変化に影響を与え、骨格筋機能を統御するか」について、未だその全容は明らかではない。我々はこれまでに、リン脂質の膜間の輸送を担う「リン脂質輸送体群」が膜張力を感知する、いわゆる機械受容イオンチャネルとして知られる PIEZO1 の活性制御を通じて、秩序だった筋管形態をもたらすことを明らかにした（文献１）。本年度は筋幹細胞におけるイオンチャネル PIEZO1 のさらなる機能解明を試みた。

方法
Piezo1 欠損マウス（*Piezo1*$^{tm1c(KOMP)Wtsi}$）を UCDavis マウスリソースセンターより入手した。筋衛星細胞特異的に Cre レコンビナーゼを発現する Pax7-Cre^{ERT2}（小野悠介先生より供与いただいた）と掛け合わせを行った。6〜12 週令のマウスを用い、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。内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato タグを付加するマウスについては、野々村恵子先生より供与いただだいた。
また、機械受容イオンチャネルとも知られる TRPM7 について、その遺伝子欠損マウス（森泰生先生、京都大学）より供与いただいた、文献 2）についても同様な解析を行った。

結果
これまでの申請者の研究（文献 1）をもとに、骨格筋線維の再生過程全般での PIEZO1 の機能解明を試みた。タンパク質レベルでの PIEZO1 の発現を検討するため、内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato が融合した形で発現する Piezo1-tdTomato マウスを用いて、PIEZO1 の骨格筋での発現を検討した。実際、同マウスより FACS にて単離した筋衛星細胞にて PIEZO1-tdTomato の発現が強く認められた。一方で、成熟筋線維ではその蛍光はほとんど検出されなかった。
続いて、CreERT2/loxP システムを用いてタモキシフェン誘導型の筋衛星細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの作出・解析を行った。まずカルシウム測光にて筋衛星細胞でのカルシウム動態を検討したところ、PIEZO1 依存的な微細なカルシウム振動が認められた。またカルジオトキシンを用いて筋線維壊死後の筋再生過程を検討したところ、*Piezo1* 欠損マウスでは、筋再生能が著しく低下していることを見出した。さらに単離筋衛星細胞では、増殖能の低下が認められ、PIEZO1 は幹細胞の増殖に関わることが示された。
この表現型の原因を追究すべく、PIEZO1 下流経路の同定を目指した。その結果、*Piezo1* 欠損マウスでは、細胞骨格（アクトミオシン）の形成が損なわれていた。また *Piezo1* 欠損で見られた幹細胞の増殖能の低下は、RhoA 経路の活性化剤にてレスキューされたことから、PIEZO1-RhoA/ROCK-アクトミオシン経路が筋幹細胞に重要な役割を果たすことが示唆された。尚、上記研究は現在投稿中であり、BioRxiv でも発表を行っている。
（ https://biorxiv.org/cgi/content/short/2021.03.18.435982v1 ）。
最後に PIEZO1 以外の機械受容イオンチャネルとして、TRPM7 チャネルについて、その機能解明を試みた。興味深いことに *Trpm7* 欠損マウスでは、*Piezo1* 欠損と比較してより強い

表現型が認められた。

考察

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

また筋衛星細胞は筋線維の再生過程に重要であるが、一方でRhabdomyosarcomaにおいても筋衛星細胞と類似した経路が異常に活性化されることが報告されている。本研究で明らかにされた PIEZO1 が機械刺激を感知するメカニズムは、筋衛星細胞による筋再生能のみならず、骨格筋における多様な病態発症においても関わる可能性が考えられる。

結論

リン脂質動態により制御される機械受容イオンチャネルPIEZO1は、骨格筋再生能に重要な役割を果たすことが示された。また機械受容イオンチャネルである Trpm7 欠損マウスは重篤な表現型を示すことが明らかになった。今後の研究により、機械受容イオンチャネル間での機能的なすみ分けなどを明らかにしていきたい。

参考文献

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

リアノジン受容体関連筋疾患の病態解明と治療法開発

分担研究者　村山　尚
研究協力者　呉林　なごみ
所属　順天堂大学医学部薬理学講座

緒言

1 型リアノジン受容体（RyR1）は骨格筋筋小胞体の Ca^{2+}遊離チャネルであり、筋収縮に重要な役割を果たしている。RyR1 の突然変異はチャネル活性の増大をもたらし、悪性高熱症等の筋疾患を引き起こすことが分かっている。最近、いくつかの先天性ミオパチーにおいて RyR1 の突然変異によるチャネル活性の低下が疾患の原因であることが分かってきた。しかし、それらの疾患に対する治療法は未だ確立していない。本研究では、申請者らが開発したスクリーニングシステムを利用して、RyR1 活性化剤の探索、開発を行った。合わせて、申請者らが最近開発した新規 RyR1 阻害剤（Compound 1）についてモデル動物に対する治療効果を検討した。

方法

東京医科歯科大学保有の機能既知化合物ライブラリ（1,530 化合物）を用いて小胞体内 Ca^{2+}をモニタして RyR1 活性化薬をスクリーニングした。RyR1 選択性を調べるため、ヒット化合物については RyR2 に対する作用も調べた。RyR1 選択性ヒット化合物はマウス単離骨格筋の Ca^{2+}動態および張力測定によって評価した。Compound 1 のマウスに対する治療効果は悪性高熱症変異導入モデルマウス（RyR1-R2509C）を用いて検討した。イソフルラン麻酔および環境暑熱刺激により悪性高熱症発作を惹起させ、薬物の治療および予防効果を調べた。

結果

機能既知化合物ライブラリより 15 種類の RyR1 活性化剤を同定した。これらの化合物について濃度依存性、サブタイプ選択性を指標に二次スクリーニングを行い、3 種類の有望な RyR1 選択的活性化剤を得た。このうちの一つ X はマウス単離骨格筋細胞に対して静止 Ca^{2+}濃度を上昇させ、電気刺激による Ca^{2+}トランジエントを低下し、摘出腓腹筋の発生張力を減少した。この結果は、本化合物が RyR1 チャネルを活性化することで静止時にチャネルが開口して Ca^{2+}が筋小胞体から漏れ出すことを示唆している。

Compound 1 は RyR1-R2509C ヘテロマウスにおいてイソフルラン誘発性悪性高熱症発作および環境暑熱誘発性熱中症を効果的に予防、治療した。血中濃度変化測定により、本化合物はマウス血中半減期が僅か 10 分と非常に短いことがわかった。

考察

RyR1 選択的活性化薬の候補として見つかった X は静止時における RyR1 の Ca^{2+}リークを増大させているようであった。これは期待していた効果ではなく、むしろ毒性に近かった。RyR1 チャネルは生理的な筋収縮時には T 管膜のジヒドロピリジン受容体と共役して脱分極誘発性 Ca^{2+}遊離（DICR）モードで開口する。今回のスクリーニングは Ca^{2+}誘発性 Ca^{2+}遊離（CICR）を指標にして行ったため、目的とする化合物がヒットしなかった可能性がある。今後は DICR を指標としたスクリーニング系の構築が必要になると考えられる。

新規 RyR1 選択的阻害剤である Compound 1 は血中半減期が非常に短かった。既存薬であるダントロレンは血中半減期が長く（~10 時間）、悪性高熱症治療後に筋弛緩等の副作用が問題

となる。Compound 1 はこれらの副作用を軽減することが期待される。

結論

RyR1 選択的活性化剤および阻害剤は RyR1 関連筋疾患に対して有望な治療薬になることが示唆された。今後も探索を進めて進めていきたい。

参考文献

1. Yamazawa T et al., A novel RyR1 inhibitor prevents and rescues sudden death in a mouse model of malignant hyperthermia and heat stroke. Nat Commun, in press.
2. Ma R et al., Structural basis for diamide modulation of ryanodine receptor. Nat Chem Biol. 16: 1246–1254, 2020.
3. Iyer KA et al., Structural mechanism of two gain-of-function cardiac and skeletal RyR mutations at an equivalent site by cryo-EM. Sci Adv. 6: eabb2964, 2020.

開発費西野班 分担研究報告書

分担研究課題名：筋ジストロフィー関連疾患モデルとしてのゼブラフィッシュの活用

分担研究者：三橋弘明

所属：東海大学工学部生命化学科

緒言

筋ジストロフィー関連疾患には原因遺伝子が不明のものも多く、エクソーム等により新たな原因遺伝子の候補が見つかることがある。また、既知の原因遺伝子であっても新規な変異を持つ１例症例が見つかることもあり、変異の病原性の評価が重要である。分担研究者は遺伝子改変が容易で発生が早く、多個体の飼育が可能なゼブラフィッシュを筋ジストロフィー関連疾患のモデルとして活用することを目指している。令和２年度はラミンＡミオパチーのモデルとイメージング手法の開発、新規核膜病候補遺伝子の機能解析、骨格筋ミトコンドリアおよび神経筋接合解析のためのゼブラフィッシュ作製を行った。

方法

アクチンプロモーター制御下に EGFP-ラミン A を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、掛け合わせにより F1 世代を得て、免疫染色によって骨格筋を観察した。また、ゼブラフィッシュのライブイメージングを目指し、東海大学工学部の岡村陽介教授と共同で、撥水性樹脂の CYTOP を約 50nm 厚の薄膜にし、約 1μm 径の微細孔を開けたナノ薄膜で 7 日齢以下の稚魚をラッピングし観察した。また、国立精神・神経医療研究センター疾病研究第一部との共同研究で、核膜に異常を持つ原因不明の筋ジストロフィー患者に見出された遺伝子変異の病原性を調べるため、ミオシンプロモーター制御下に EGFP-ラミン A を発現するトランスジェニックフィッシュを用いて、原因候補遺伝子のノックダウンを行い、骨格筋を観察した。さらに、運動神経特異的に mCherry を発現するゼブラフィッシュと、骨格筋特異的にミトコンドリア移行型蛍光タンパク質 mitoKeima を発現するゼブラフィッシュを作製するため、Gateway 法による DNA コンストラクションを行い、Tol2 トランスポゾンを利用してゼブラフィッシュゲノムに導入した。

結果

ラミン A の変異体を発現するゼブラフィッシュの F1 世代では、親世代に見られたラミン A の核内凝集や核の形態異常が再現された。また、異常な核の周囲では軽度の筋線維の乱れが観察された。ラミン A ミオパチーは優性遺伝形式の筋疾患であり、本モデルゼブラフィッシュでも骨格筋の異常が優性遺伝することが確認された。核の形態異常がどのように発生するのかを追うべく、ゼブラフィッシュを生きたままタイムラプスで観察するための保定方法としてナノ薄膜でのラッピング法を検討した。その結果、ナノ薄膜ラッピングでは 5 時間まで生きたゼブラフィッシュを保定し、連続した観察を行うことができた。また、核の異常を持つ原因不明の筋ジストロフィー患者に見出された遺伝子変異の病原性を調べるため、ゼブラフィッシュにおける相同遺伝子のノックダウンを行なった。核を可視化した EGFP-ラミン A ゼブラフィッシュを活用した。アンチセンスモルフォリノにより目的遺伝子のスプライシングを変化させ、正常転写産物を減少させることに成功した。骨格筋では軽度の筋線維の乱れと、核の形態異常と chain nuclei が観察された。

蛍光標識を持つゼブラフィッシュの作製では、運動神経特異的な hb9 プロモーター制御下に mCherry を発現するゼブラフィッシュと、

アクチンプロモーター制御下に mitoKeima を発現するゼブラフィッシュともに目的組織での蛍光を確認したため、今後は次世代への遺伝を調べ、系統の樹立を目指す。

考察

ラミン A の変異体を発現するゼブラフィッシュでは核の異常が次世代に遺伝したため、ラミン A ミオパチーの疾患モデルとなることが期待される。このゼブラフィッシュに見られる核の形態異常は非常に特異なものであり、正常な核ラミナの不形成による核膜の脆弱性が疑われる。病態機序に関わる表現型と思われるため、今後、詳細な解析をおこなっていく。

ライブイメージングを目指したナノ薄膜ラッピングでは５時間までの保定に成功したため、今後は体の成長による圧や水泳運動による膜の破れの解消を行なっていく。

新規の核膜病候補遺伝子の機能評価については、核膜の可視化や個体レベルでのノックダウンというゼブラフィッシュの利点を生かすことができ、本分担研究の目指す、変異の迅速な病原性評価が実践できたと考える。このような事例を増やしていけるよう、組織/オルガネラを可視化したゼブラフィッシュ系統の拡充や遺伝子操作手法の改良・拡充に努めていく。

新たに作製中の運動神経の可視化系統とミトコンドリアの可視化系統が樹立されれば、神経原性疾患やミトコンドリアミオパチーへの応用が考えられるため、さらにゼブラフィッシュの利用範囲が広がるものと期待している。

結論

優性遺伝型の筋ジストロフィー関連疾患のモデルとして、トランスジェニック法によりラミン A ミオパチーのモデルゼブラフィッシュ系統を樹立した。このモデルが呈する核異常を指標として、今後、病態解明と治療法開発の研究を行なっていく。また劣性遺伝型の疾患のモデルとして、新規な核膜病候補遺伝子のノックダウンによりモデルゼブラフィッシュを作製した。蛍光イメージングとノックダウンの組み合わせにより迅速に変異の病原性を評価することができた。現在、作製中の新たなゼブラフィッシュも加えて今後、さらにゼブラフィッシュを神経筋疾患の病態解明と治療法開発に活用していく。

分担研究課題名　筋強直性ジストロフィーの病態解明と治療研究
分担研究者　中森　雅之
所属　大阪大学　医学系研究科　神経内科学

緒言

筋強直性ジストロフィー（myotonic dystrophy, DM）は、CTG 繰り返し配列が異常に伸長する DM1 型（DM1）と、CCTG 繰り返し配列の異常伸長による DM2 型（DM2）からなる。DM1、DM2 ともに異常に伸長したリピートをもつ RNA が、MBNL 蛋白をはじめとする核内のスプライシング制御因子を障害する。このため DM は、さまざまな選択的スプライシング調節機構の破たんをきたすスプライシング異常症とされている。DM では多くのスプライシング異常が報告され、症状との関連が示唆されているが、ADL 阻害要因となる進行性筋萎縮や心伝導障害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 の病態を解明し、筋症状をターゲットとした治療法の開発を行う。また、異常 RNA の毒性を低減して、スプライシング制御障害を抑制する低分子化合物の開発も進める。

方法

DM での骨格筋障害の原因を解明するため、顕著な骨格筋症状を呈する先天性 DM1（CDM）由来骨格筋検体を用いて、RT-PCR 法によりクラスリン（CLTC）遺伝子のスプライシング異常を定量した。また、正常筋管細胞および DM1 筋管細胞におけるクラスリン分子の形態を病理学的に解析した。

また、DM での異常 RNA 毒性を低減する低分子化合物について、DM モデル細胞における核内 RNA 凝集体抑制効果を FISH 法で、DM モデルマウス（HSA-LR）におけるスプライシング異常改善効果を RT-PCR 法で、筋強直症状改善効果を筋電計により検証した。

結果

CDM 骨格筋では、CLTC exon 31 を含まない splicing isoform が疾患対象群である脊髄性筋萎縮症（SMA）骨格筋と比し優位に増加しており、その比率は CDM の重症度と相関した。形態学的観察により、正常筋管細胞では成熟型 CLTC（exon 31 inclusion）によるプラーク型クラスリンが形成されるのに対し、DM1 筋管細胞では、幼若型 CLTC（exon 31 exclusion）による被覆ピット型クラスリンが形成されることも明らかにした（1）。

また、異常 RNA 毒性低減薬の開発に際しても、異常 RNA 結合モデルを元にした rational design に基づいて合成したイソキノリン誘導体 JM642 に、DM1 細胞でのスプライシング異常改善作用と、DM1 モデルマウス（HSA-LR）において異常 RNA による MBNL 凝集抑制効果やスプライシング改善効果があることも明らかにした（２）。

考察

CLTC 遺伝子の exon 31 がコードする 7 アミノ酸からなる蛋白部分は、クラスリン分子の三脚巴構造（triskelion）の安定化に重要な役割を果たしており、DM1 筋管細胞における幼若型 CLTC（exon 31 exclusion）による被覆ピット型クラスリン形成とプラーク型クラスリンの低下が、筋の脆弱性につながる可能性が示された。

また、rational design に基づく分子創薬が、DM における RNA 毒性を低減する低分子化合物開発に有用であり、イソキノリン誘導体が 今後の DM 治療薬としての高い potential があることが証明された。

結論

本研究により行われた、DM の病態に迫るクラスリンのスプライシング異常の同定や、次世代の創薬研究を担う低分子化合物の開発により、今後の DM 病態解明および治療開発研究のさらなる発展が期待できる。

参考文献

1. Moulay G, Lainé J, Lemaître M, Nakamori M, Nishino I, Caillol G, Mamchaoui K, Julien L, Dingli F, Loew D, Bitoun M, Leterrier C, Furling D, Vassilopoulos S.: Alternative splicing of clathrin heavy chain contributes to the switch from coated pits to plaques. J Cell Biol. 2020;219(9):e201912061.
2. Matsumoto J, Nakamori M, Okamoto T, Murata A, Dohno C, Nakatani K.: The Dimeric Form of 1,3-Diaminoisoquinoline Derivative Rescued the Mis-splicing of Atp2a1 and Clcn1 Genes in Myotonic Dystrophy Type 1 Mouse Model. Chemistry. 2020 Nov 11;26(63):14305-14309.

分担研究課題名　膜リモデリング分子に生じる先天性ミオパチー型 SNV の多階層的解析システムの構築
分担研究者　竹田　哲也
所属　岡山大学　学術研究院　医歯薬学域（医）

緒言

先天性ミオパチーは、筋力や筋緊張の低下を伴う筋疾患である。先天性ミオパチーの一つである中心核ミオパチー（Centronuclear Myopathy; CNM）の患者では、骨格筋の興奮収縮連関に必要な細胞膜の陥入構造（T 管）の形成異常により、筋収縮が正常に起こらない。先行研究で、膜リモデリング分子である BIN1 や Dynamin 2 の遺伝子上の SNV（一塩基変異）が、CNM 発症に関与することが示されていた。しかし、膜リモデリング異常により CNM が発症するメカニズムは、未解明であった。

方法

CNM 変異型 BIN1 および Dynamin 2 の膜リモデリング機能異常について、①*in vitro* 再構成系による分子レベルの解析、②筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析、③モデル生物（線虫）を用いた個体レベルの解析を通じて、CNM の発症機序をマルチスケールで解明し、新規の治療法や創薬開発につながる学術的基盤を創成する。

結果

本年度は、CNM 変異型の BIN1 や Dynamin 2 の膜リモデリング機能異常について、①*in vitro* 再構成系による分子レベルの解析、②筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析を行った。

①　*in vitro* 再構成系による分子レベルの解析

Gateway クローニング法を用いて、CNM 変異型蛋白質の発現コンストラクトを作成した。まず、既知の CNM 変異型 BIN1（K35N, D151N, R154Q， Q434X， K436X）、CNM 変異型 Dynamin 2（E368K, R369Q, R369W, R465W, S619L, S619W）、さらに国立精神・神経医療研究センターにおける CNM 患者のコホート解析で同定された、新規の意義不明 SNV を導入した Dynamin 2（P294L, G495R, V520G, A618T, G624V, E650K, R724H）のエントリークローンライブラリーを作成した。また、これらのエントリークローンを用いて、大腸菌および昆虫細胞における蛋白質発現用のコンストラクトを作成した。さらに、数種の変異型 BIN1 と Dynamin 2 については、精製蛋白質を調製し、その機能を *in vitro* 再構成系で解析した。その結果、正常型 BIN1 と CNM 変異型 BIN1（Q434X, K436X）は、どちらもリポソームに結合してチューブ化するが、形成される膜チューブ構造は、両者で大きく異なることが明らかになった。また、BIN1 は正常型 Dynamin 2 の膜切断機能に必要な GTP アーゼ活性を抑制するが、変異型 Dynamin 2 はその制御を受けず、恒常的に GTP アーゼ活性が亢進していることが明らかになった。

②筋芽細胞を用いた細胞レベル解析

上記①で作成した CNM 変異型 BIN1 および DNM2 のエントリークローンライブラリーを用いて、動物培養細胞用の発現コンストラクトを作成し、T 管様構造形成における CNM 変異型蛋白質の機能異常を解析した。その結果、Dynamin 2 と相互作用できない CNM 変異型 BIN1（Q434X, K436X）は、T 管様構造の形成能が著しく低下していた。一方、正常型 Dynamin 2 は T 管様膜構造を安定化する機能を持つのに対し、CNM 変異型 Dynamin 2 は T 管様構造の形成を顕著に抑制することが明らかになった。

考察

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

結論

本研究により、①BIN１と Dynamin２の相互作用で、T 管構造が安定に形成されること、②CNM 変異型 BIN1（Q434X，K436X）は、Dynamin２との相互作用不全により、T 管構造の形成異常を起こすこと、③CNM 変異型 Dynamin２は、膜切断に必要な GTP アーゼ活性が恒常的に亢進し、T 管構造の形成異常が起こることを明らかにした（Fujise et al., JBC 2021）。さらに、④CNM 患者のコホート解析で同定された意義不明 SNV から、*in vitro* および細胞レベルの解析法を用いて疾患責任 SNV を同定することに成功した（Fujise et al., bioRxiv 2021）。

参考文献

1. Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Noguchi, S., Takei, K., and Takeda, T. Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy. *J. Biol. Chem.* 296:100077, Jan, 2021
2. Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Takei, K., Nishino, I., Takeda, T. and Noguchi, S. Imaging-based evaluation of *DNM2* pathogenicity associated with centronuclear myopathy. *bioRxiv*, doi: https://doi.org/10.1101/2021.03.01.43347 8, Mar, 2021 （*Human mutation*, in revision）

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

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、進行性の希少難病である。臨床的、遺伝学的にも異質性が高い。一部の筋疾患を除いて、原因遺伝子は殆ど明らかではないゆえ、根本的な治療法も確立されていない。本研究では、NCNP の筋レポジトリーで管理される疾患検体を用いて統合的ゲノム解析を行い、新規の疾患原因遺伝子を同定する。変異遺伝子の生物学的特性を解析し、疾患の病態経路を明らかにする。また、新しい遺伝子診断法を開発する。さらに、疾患遺伝子データベースを構築する。

方法

本研究では、オリジナル筋疾患遺伝子解析パネル（パネル解析）、エクソームシークエンス(exome seq)、全ゲノムシークエンス（WGS)、RNA シークエンス（RNA seq)を用いて、筋疾患原因遺伝子を同定する。具体的には、パネル解析、exome seq のデータを基にしてゲノム解析を行い、exome seq では見つからない場合には､WGS と RNA seq のデータを加味しながら、イントロンや調節領域の病因性バリアント、さらには大規模な染色体構造異常を探索する。候補遺伝子（変異）については、フォローアップシークエンスや追加検体を用いた解析を行う。変異頻度と臨床情報との関連を解析する。変異遺伝子の確証が取れたならば、主治医、共同医療研究者にデータを提供する。

結果

1. **遺伝性筋疾患のパネル解析**

   NCNP の筋レポジトリーで管理される遺伝性筋疾患の臨床、病理学的診断及び遺伝子診断を行い、臨床後方支援と臨床ゲノム医療実装のための基盤構築を行なっている。本年度まで、例えば、筋ジストロフィーのパネル解析の結果は、合計 849 例を調べて診断率は 49%であった。

2. **眼咽頭遠位型ミオパチー（OPDM）原因遺伝子の同定**

   OPDM 発症の原因となる遺伝子は、2019 年に *LRP12* が発見され、本年度、我々は *GIPC1* 並びに第 3 番目の原因遺伝子として *NOTCH2NLC* を発見して、報告した。これら 3 遺伝子に共通する病因機構は、5'UTR の CGG リピートの異常伸長であった。臨床病理学的には、OPDM の CGG リピートの異常伸長がある症例には筋繊維の核内封入体、縁取り空胞を認め、神経障害、筋力低下を呈した。*NOTCH2NLC* のリピート数と発症年齢の関連は認めなかった。これらの結果を元にして、国内外の医療研究機関に対して OPDM の遺伝子診断サービスを開始した。

3. **常染色体劣性遺伝形式を呈する肢体型筋ジストロフィー25 型（LGMDR25）の研究**

   本研究では、日本人 LGMDR25 の二症例に於いて再発性の *BVES* ナンセンスバリアントを発見した。*BVES* の遺伝子産物である POPDC1 は患者の筋組織では発現は見られなかった。筋症状は、小児期から顕在化し、筋症状は非対称に現れ、壮年期には歩行不能となった。筋力低下は、近位筋のみならず遠位筋からも生じた。一人の患者筋肉に於いて小窩が著しく減少していた。同じ病因性バリアントにより発症して

いるにも関わらず、異なる臨床像を呈した。

4. **ブラジル人過剰自己貪食を伴う X 連鎖性ミオパチー（XMEA）症例の研究**
ブラジル人 XMEA2 症例についてゲノム解析を行い、*VMA21* に病因性バリアントを発見した。本症例では、特に外側広筋の外表、大腿直筋、全脛骨筋が障害されていた。新たな臨床像を示し、XMEA の疾患スペクトラムを拡充した。

考察

今年度、NCNP 筋リポジトリーの検体を用いて、OPDM の新規原因遺伝子 *GIPC1* と *NOTCH2NLC* を発見した。さらに遺伝性筋疾患パネルを用いた遺伝子診断を行った。さらに、新規の病因性バリアントを幾つかの既知遺伝子から発見して、臨床像との関連性を詳細に調べた。疾患遺伝情報を共有することで研究ならびに診断に大きな進歩をもたらした。

結論

筋レポジトリは、これまで本邦ならびに諸外国の筋疾患研究、診断法に重要な役割を果たしてきた。今回もまた、新規の原因遺伝子、病因性バリアントを発見し、病理学的解析、臨床像との相関を明らかにした。そして、OPDM 遺伝子診断法サービスを開始した。

参考文献

1. Ogasawara M, <u>Iida A</u>, Kumutpongpanich T, Ozaki A, Oya Y, Konishi H, Nakamura A, Abe R, Takai H, Hanajima R, Doi H, Tanaka F, Nakamura H, Nonaka I, Wang Z, Hayashi S, Noguchi S and Nishino I.
CGG expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations.
Acta Neuropathologica Communications, 2020 Nov 25;8(1):204.
2. Indraati LA, <u>Iida A</u>, Tanaka Y, Honma Y, Mizoguchi K, Yamaguchi T, Ikawa M, Hayashi S, Nougchi S and Nishicno I.
Two Japanese LGMDR25 patients with a biallelic recurrent nonsense variant of BVES.
Neuromuscular Disorders, 2020 Aug;30(8):674-679.
3. Cotta A, Carvalho E, da-Cunha-Junior AL, Navarro MM, Menezes MM, Paim JF, Valicek J, Lima MI, Velloso-Filho R, Freire-Lyra MH, Takata RI, Inoue M, Okubo M, <u>Iida A</u> and Nishino I.
Clinical, imaging, morphologic, and molecular features of X-linked VMA21-related myopathy in two unrelated Brazilian families.
Journal of the Neurological Sciences, 2020 Aug 15;415:116977.

分担研究課題名
骨格筋幹細胞の分化決定メカニズムの解明と筋疾患治療への応用

分担研究者　林 晋一郎
所属　国立精神・神経医療研究センター
　　　神経研究所　疾病研究第一部

緒言

筋ジストロフィーの根本的治療法の一つとして、骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）を用いた再生医学的治療法が挙げられる。転写因子 Pax7 は全ての骨格筋幹細胞に発現し、筋幹細胞の機能維持に必須であるが、その共役因子、標的因子、および発現制御機構については殆ど明らかにされていない。この理由の一つとして、市販の Pax7 抗体に有用なものが無く、免疫沈降法による共役因子の探索やクロマチン免疫沈降-シークエンシング（ChIP-seq）による標的因子の同定を行うことが非常に困難であることが挙げられる。この問題を解決するため、本分担研究者は Pax7 に HA タグを付加した Pax7-HA ノックイン（KI）マウスを作出した。本研究では、この新規 KI マウスを活用し、筋幹細胞における Pax7 の転写調節共役因子および標的因子を明らかにすることで骨格筋幹細胞の機能調節・機能維持機構を明らかにすることを目的とした。

方法

1)ゲノム編集によって Pax7 の C 末端にヒトヘマグルチニン（HA）を付加した Pax7HA KI マウスを作成した。Pax7HA KI マウスおよび野生型マウス（6-8 週齢）の前頸骨筋にカルジオトキシンを投与し、筋再生を誘導した。筋損傷後の再生筋を採取し、筋線維径および Pax7/HA 陽性の筋幹細胞数を評価した。
2)Pax7HA/HA および野生型 E12.5 日胚より四肢および体幹部を採取し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降-質量分析法により HA（Pax7）と結合するタンパク質を解析した。
3) Pax7HA/HA および野生型 E12.5 日胚（四肢および体幹）、生後 10 日目の後肢筋、さらにそれぞれのマウスからセルソーターにより単離した筋幹細胞を用いて、抗 HA 抗体を用いた ChIP-qPCR を行い、Pax7 の Myf5 エンハンサー領域への結合を解析した。

結果

1)Pax7HA KIマウスは野生型マウスと比較して成長曲線・産仔数に違いは見られなかった。次に、正常筋およびカルジオトキシンを投与した筋損傷後の筋線維径とPax7陽性筋衛星細胞数を比較した。その結果、Pax7HAKIマウスは野生型マウスと同等の筋衛星細胞数と筋線維径を有し、筋再生能についても同様であった。
2)抗HA抗体を用いた免疫沈降-質量分析法の結果、野生型と比較してPax7HA/HA胚で2倍以上の差が有意に見られたタンパク質を325種類同定した。GO解析の結果、クロマチン関連因子や細胞増殖に関するタンパク質が多く含まれていた。
3)抗HA抗体を用いてクロマチン免疫沈降法（ChIP）を行った。筋発生期の体幹および四肢、培養筋衛星細胞、生後10日齢の後肢それぞれについて解析した結果、いずれも過去に報告のあったMyf5のエンハンサー領域へのPax7の結合が見られ、これまで市販のPax7抗体では不可能であったPax7の標的因子の探索がPax7HAHAマウスを用いることで可能であることが示された。

考察

Pax7HA/HAと野生型マウスでは、成長曲線や損傷後の筋再生能などに差は見られず、C末に付加したHAタグはPax7の機能に影響を与えないことが示された。免疫沈降-質量分析法の結果、クロマチン関連因子が有意な差をもって検出された。これまでもMLL2やCarm1などのクロマチン関連因子やヒストンメチル化酵素がPax7と結合して下流の遺伝子発現を制御することが報告されている（文献1）。しかしこれらの因子は検出されなかった。今回の研究では、サンプル量を十分に確保するためE12.5日胚を用いたが、これまで報告されたものはいずれもPax7を過剰発現した筋細胞を用いて行われている。このような実験に用いたサンプルあるいは実験系の違いにより検出されるタンパク質が異なったものと考えられる。今回新たに同定したタンパク質を検証するとともに、今後成体マウスより筋幹細胞を単離し、培養筋幹細胞を用いて同様の実験を行いうことを計画している。今回ChIP法によりMyf5のエンハンサー領域へのPax7を検出し、Pax7HA/HAマウスの有用性を確認した。サンプル量が十分ではなかったためChIP-seqまで行うことができなかったが、今後は抗ヒストン抗体ともにChIP-seqを行い、Pax7の標的遺伝子を同定する。

結論

本研究によってPax7HAマウスを用いた実験系の有用性が示された。本研究の進展に伴い、骨格筋幹細胞の増殖・分化制御、筋形成の全容が解明されるとともに、その成果が再生医療へと応用されることが強く期待される。

参考文献

1. Kawabe Y, Wang YX, McKinnell IW, Bedford MT, Rudnicki MA. Carm1 regulates Pax7 transcriptional activity through MLL1/2 recruitment during asymmetric satellite stem cell divisions. Cell Stem Cell. 11(3):333-45, 2012.

分担研究課題名 細胞内分解機構に基づく筋疾患の病態解明

分担研究者 株田 智弘
所属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第四部

緒言

これまでの国内外の研究から、細胞内分解機構は神経系や骨格筋の維持に必要であり、その破綻は神経・筋疾患の原因となることがわかってきていることから、細胞内分解機構の解明は極めて重要な研究課題である。オートファジー系はリソソームによる細胞内分解機構であり、恒常性の維持に必須の役割を果たしているが、マクロオートファジー以外のオートファジー系に関する研究は立ち遅れているのが現状である。申請は近年、リソソームが直接的にRNA、DNA を取り込み分解するという新規経路RNautophagy/DNautophagy (RDA)を発見し、その分子メカニズムを解明してきた。さらに、リソソームがタンパク質を直接取り込み分解する新規分解経路も見いだし、研究中である。これまでに、RNA トランスポーターファミリーであるリソソーム膜タンパク質 SIDT2 はこれら経路において、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。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。

方法

RNautophagy の際に SIDT2 と基質核酸が結合するかどうかについては不明であったため、プルダウンアッセイにより結合性の解析を行なった。また結合が確認された疾患関連RNA についてその分解とタンパク質量へのSIDT2 過剰発現の影響を解析した。

結果

SIDT2 の細胞質領域 (CD)を介して SIDT2 が RNA と直接結合することを見いだした。またこの結合は CD のアルギニン・リッチ・モチーフを介していた。CD のアルギニンの変異体を用いた解析から、RNautophagy による RNA 分解に重要であることがわかった。それぞれ単一の塩基から成る RNA との結合性を調べたところ、SIDT2 CD は Poly-G と結合し、Poly-A, C, U とは全く結合しなかった。神経・筋疾患のうちリピート病の多くがリピート RNA に G を含むため、このようなRNA が RNautophagy の標的となると考え、今回ハンチントン病の原因である *HTT* を用いて解析を進めた。その結果、SIDT2 の細胞質側配列に直接 *HTT* mRNA が結合することを見いだした。また、この結合量は野生型 *HTT* より変異型で高く、CAG リピート依存的であった。細胞レベルの実験では、*HTT* mRNA の分解が SIDT2 過剰発現により促進され、*HTT* mRNA は RNautophagy の基質となり分解された。さらに、SIDT2 の過剰発現により細胞内の変異型 HTT タンパク質の量を低減できることを明らかにし、その低減効果には SIDT2 と *HTT* mRNA の結合が重要であることを示した。

考察・結論

SIDT2 の細胞質側ドメインは核酸結合能をもち、この結合を介して核酸をリソソーム内へ取り込む。SIDT2 によるリピート RNA の分解はリピート病の治療法開発に応用できる可能性がある。

参考文献

1. Hase K, Contu VR, Kabuta C, Sakai R, Takahashi M, Kataoka N, Hakuno F, Takahashi SI, Fujiwara Y, Wada K, *Kabuta T. Cytosolic domain of SIDT2

carries an arginine-rich motif that binds to RNA/DNA and is important for the direct transport of nucleic acids into lysosomes. Autophagy. 2020; 16 (11): 1974-1988.

遺伝性筋疾患における E3 ユビキチンリガーゼの機能と病態の解明

分担研究者　今村道博
所属　国立精神・神経医療研究センター
　　　神経研究所　遺伝子疾患治療研究部

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子とその産物であるジストロフィンが同定されて以来、様々な種類の筋疾患について原因遺伝子が明らかにされてきた。これと並行して既に自然発生により樹立されていた種々の筋疾患実験動物の原因遺伝子も明らかにされ、ヒト疾患を再現する動物モデルとして、病態の解明や診断及び治療研究に大きな役割を果たしている。しかしながら、その中にあって筋ジストロフィーニワトリ (NH-413) についてはヒト筋疾患との関連が未だ明らかでない。そのため原因遺伝子として同定された *Wwp1* 遺伝子から発現する変異型 WWP1 E3 ユビキチンリガーゼがヒト筋疾患にどう関与するのか注目される [1)]。本研究では、筋ジストロフィーニワトリのマウスモデルを作製し、ヒト筋疾患との関連を検討する。マウス *Wwp1* 遺伝子に NH-413 ニワトリと同じ R441Q ミスセンス変異（マウスでは R436Q) を導入したノックイン(WWP1-KI) マウスを用いてバイオインフォマティックスの視点から *Wwp1* 遺伝子の変異が筋肉の遺伝子発現に及ぼす影響を解析する。また、骨格筋に発現する WWP2 と ITCH E3 ユビキチンリガーゼに注目し、これらが WWP1 の機能代償に関わる可能性を検討する。

方法

WWP1-KI マウスと野生型マウスの大腿直筋から RNA を調製し、Applied Biosystems™ GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array を用いてマイクロアレイ解析を行った。また、野生型マウスの大腿直筋のジギトニン可溶化分画を調製し、抗 WWP1 抗体を用いた免疫沈降法により WWP1 に結合するタンパク質を同定した。

結果

WWP1-KIマウスの大腿直筋では、野生型マウスに比べ、様々な遺伝子発現の変化が認められたが、オントロジー解析からはインシュリンに対する応答や糖新生など、糖代謝に関わる遺伝子の活性化が示唆された。我々は既に糖尿病のおける筋萎縮が、WWP1の発現抑制により生じるKLF15の活性化（分解の抑制）を原因とすることを示しており [2)]、その関連が注目された。また、ミトコンドリアの形態形成への関与も示唆された。NH-413ニワトリの胸筋ではミトコンドリアの増加が報告されており、我々の抗WWP1抗体を用いた免疫沈降においても複数のミトコンドリア関連タンパク質が同定されたため、これらとの関連が注目された。本解析においてWWP2とItch E3ユビキチンリガーゼの遺伝子発現について調べたところ、mRNAレベルでの変化は認められなかった。WWP1の機能補償にWWP2とITCHが関わっている可能性を調べるため、それぞれの遺伝子改変マウスをWWP1-KIマウスと交配し、二重及び三重の遺伝子改変マウス作製を試みているが、本年度はWWP1-KIとWWP2のインフレーム欠失型変異マウスとの二重変異体を作製した段階である。

考察

マイクロアレイ解析からいくつかの興味深い知見を得ることができたが、本研究における問題は、WWP1-KIマウスに筋ジストロフィーと認められる明瞭な症状が現れないことである。WWP1-KIマウスが生化学的、細胞生物学的にNH-413ニワトリで認められる変異型

WWP1の分子特性を再現していることからすれば[3]、本来WWP1が担うべき機能のうち、少なくとも一部が何らかのシステムにより補償されているものと推察される。一方、Yoonらのグループは、WWP1の基質はβ-ジストログリカンであり、R441Q変異が酵素活性を亢進し、基質を過剰に分解してしまうため、筋ジストロフィーを生じるという仮説を提唱している。しかしながら、我々のデータはこれとは異なるため、今後改めて骨格筋におけるWWP1の基質の同定法を検討しながら、遺伝子改変マウスの解析を進めて行く必要がある。

結論

NH-413 ニワトリをマウスモデル化したWWP1-KI マウスの解析から、WWP1 E3 ユビキチンリガーゼが 糖新生やミトコンドリア形成に関与することが示された。一方で、WWP1-KI マウスには NH-413 のような筋ジストロフィー症状が認められないことから、WWP1 の機能喪失による筋メインテナンス機構の破綻が、マウスでは補償される可能性を示唆していた。

参考文献

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

分担研究課題名：部位特異的な筋幹細胞に着目した骨格筋維持機構の解明
分担研究者：本橋　紀夫
所属：国立精神・神経医療研究ｾﾝﾀｰ・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

＜緒言＞

骨格筋は肥大・萎縮の可塑性を有する．同時に筋衛星細胞と呼ばれる筋幹細胞が存在し，増殖・分化して新しい筋線維を形成する筋再生能を持つ．ところが加齢や筋疾患に伴い骨格筋は萎縮を惹き起こし，筋幹細胞の数は減少する [1]．これらは運動機能の低下を誘発する要因となり，さらに重度傷害後の再生遅延が寝たきりを惹き起こすと考えられる事から，筋機能維持は必須である．一方，筋萎縮，或いは筋幹細胞数の減少は，筋線維タイプ，あるいは骨格筋部位に依存する [1, 2]．事から，骨格筋維持能力がそれぞれ異なる可能性が考えられている．そこで本研究では，筋線維タイプおよび部位特異的な筋幹細胞と，それらから形成される筋管細胞を用いて機能的特徴を分子生物学的に明らかにする事を目指し，加齢や筋疾患による筋萎縮・筋幹細胞数の減少の原因究明，および予防・治療法開発を長期的目標とした．

＜方法＞

各筋線維タイプの骨格筋組織(速筋：前脛骨筋，遅筋：ヒラメ筋)から由来する筋幹細胞を単離・培養した後，フローサイトメーターを用いた細胞内 ROS 産生の計測，および細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞内代謝機能を測定した．また細胞の機能特性を明らかにする為，各細胞を用いてプロテオミクス解析を行った．解析により同定された遺伝子は，レトロウィルスベクターにより筋細胞に過剰発現させ，BrdU を用いた細胞増殖，筋管に分化した割合を示す筋分化能，及び MyHC(-)EdU(-)リザーブ細胞(In vitro で筋幹細胞に相当する)の産生能評価を行った．

＜結果＞

これまで筋線維タイプと筋幹細胞の関係性に着目し，遅筋・速筋線維から筋細胞を単離・培養した結果，遅筋由来筋幹細胞は高い自己複製能を持つ事を見出してきた [3]．今年度は，これら筋幹細胞の機能的違いを明らかにする事を目標とし，下記研究結果が得られた．

1. 遅筋・速筋線維由来の培養筋芽細胞を用いてプロテオミクス解析を行い，各筋細胞の特徴を明らかにした．特にアポトーシスおよびオートファジー関連タンパク質発現に違いが多く認められた．
2. 遅筋・速筋線維由来の筋細胞において，解糖・ミトコンドリア代謝機能に大きな違いが認められ，さらに速筋由来筋細胞においてROS(活性酸素種)の蓄積が認められた．
3. プロテオミクス解析の結果，遅筋由来の筋細胞においてミトコンドリア複合体 I の構成分子である Ndufs8 発現が高い事が明らかになった．
4. 筋細胞における Ndufs8 の機能評価を行い，Ndufs8過剰発現は筋細胞の自己複製を亢進させ，さらにアポトーシス耐性能も向上させた．これらの結果は，遅筋由来筋細胞の特徴と合致していた．

＜考察および結論＞

上記の結果から，遅筋由来筋細胞において発現の高い Ndufs8 はその細胞特性を決定づける重要な因子の一つである可能性が示唆された．その一方で，Ndufs8 による筋細胞の維持に関わる分子メカニズムは不明であるため，今後は筋細胞における Ndufs8 機能解析を進める．

具体的には, 1) Ndufs8 を過剰発現した速筋由来筋細胞を生体内に移植し, 筋線維および筋幹細胞の形成能を評価する. 2)Ndufs8 発現による自己複製機能を向上させるシグナル経路を同定する. 3)全身骨格筋組織(前脛骨筋・ヒラメ筋・大腿四頭筋・横隔膜・外眼筋等)由来の筋幹細胞を単離・培養し, 増殖・分化および自己複製機能を in vivo および in vitro で評価すると同時に, Ndufs8 発現との関連性を検討する.

Ndufs8 を中心とした筋細胞の機能解析およびメカニズム解明は, 加齢や筋疾患に対する治療の標的分子同定につながると考えられ、今後研究を継続していく予定である.

＜参考文献＞

1. Day K, Shefer G, Shearer A, Yablonka-Reuveni Z. The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. Dev Biol, 340(2): 330-343 (2010).
2. Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJ. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. Age (Dordr) (2013).
3. Motohashi N, Uezumi A, Asakura A, Ikemoto-Uezumi M, Mori S, Mizunoe Y, Takashima R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Shigemoto K: Tbx1 regulates inherited metabolic and myogenic abilities of progenitor cells derived from slow- and fast-type muscle. Cell Death Differ. 26(6):1024-1036 (2019)

細胞死経路に着目した筋ジストロフィーの病態解明と新規治療法の開発

分担研究者　橋戸　和夫
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　ラジオアイソトープ管理室

緒言

筋ジストロフィーの診断に際しては、従来血清クレアチンキナーゼ(CK)活性が指標として用いられてきた。しかし、CK 活性は診断ツールとしては優れているが、運動等による影響を受けやすく、必ずしも筋の損傷度や病期・病勢を反映しないのではないかとの限界が指摘されている。そこで、本研究では運動等による影響を受けにくく安定性の高い診断ツールとして血清の骨格筋特異的 microRNA を検出する方法が有用であることを報告してきた。血清中へ骨格筋特異的な microRNA を放出するメカニズムとしてエクソソームに着目し、筋ジストロフィーの新たな病態解明の一助とすることを目的として、エクソソーム形成のキーエンザイムのノックアウトマウスを作出し、エクソソーム形成を抑制することによって細胞外への microRNA 輸送を低下させることにより筋ジストロフィーの症状が改善される事を報告してきた。今回我々は細胞死経路に着目し、ジストロフィン欠損によってどのようなメカニズムでエクソソーム放出が高進しているのかを解明する事を目的とする。

方法

1. CRISPR/Cas9 の系により、Dystrophin 遺伝子をゲノム編集した筋芽細胞系 C2C12 細胞株を作出する。作出したジストロフィン欠損細胞株を用いて細胞内のアポトーシス経路、ネクロトーシス経路に着目し、各種阻害剤の影響を解析する。ジストロフィン欠損筋芽細胞においてどのような経路が活性化、あるいは低下しているかを比較検討する。
2. 中性スフィンゴミエリナーゼ２は TNF-α の刺激により活性化されること、DMD モデルマウス骨格筋では TNF-α が高値を示すことが知られていることから、TNF-α を阻害することにより中性スフィンゴミエリナーゼ２の活性化を抑制できるのかを検討する。

結果

CRISPR/Cas9 の系を使用し、筋芽細胞 C2C12 の dystrophin 遺伝子を改変し、ノックダウン細胞系を作出した。作出した細胞系を使用し、細胞死経路のひとつであるネクロトーシスに関与する p-MLKL が TNF-α による刺激後、長期間にわたり発現が上昇していることを見いだした。

考察

Dystrophin 遺伝子をノックアウトすることによりネクロトーシス系の遺伝子発現が上昇・継続していること、既に我々が参考文献 2) により報告しているように DMD モデルマウス血清中を循環する骨格筋特異的 microRNA のひとつである mi-133a がアポトーシスを抑制していることから、ジストロフィン欠損株は TNF-α 等の外部刺激により細

胞死経路が活性化されるが、ジストロフィンを欠損することによりアポトーシスではなくネクロトーシスにより細胞死が引き起こされるため、より広範囲にわたって炎症性の細胞障害が引き起こされる可能性を示唆している。

結論

Dystrophin 欠損株について、アポトーシス・ネクロトーシスそれぞれについてコントロール細胞系と比較し、細胞死についての変動を生化学的手法により解析した結果、ネクロトーシスに関与する p-MLKL の活性化が長時間庭田って継続していることが明らかとなった。

参考文献

1) Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, *et al.*：Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med.*；19(6):452-8.: 2014

2) Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, *et al.*: Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PLoS One.* 15;11(12):e0167811. doi: 10.1371/journal.pone.0167811. eCollection 2016

3) 炎症と免疫　Vol.26 No.4, 2018. 「エクソソーム最前線」　神経筋疾患　筋ジストロフィーとエクソソーム

4) Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, *et al.*: The *nSMase2/Smpd3* gene modulates the severity of muscular dystrophy and the emotional stress response in *mdx* mice, BMC Medicine, DOI：10.1186/s12916-020-01805-5 BMED-D-20-00175R4,

2 - 5

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

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

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

Not only therapy is unavailable but even the cause is unknown for many of most muscle diseases including limb girdle muscular dystrophy. To overcome this situation, we should elucidate the mechanism and develop therapies for muscle disease by maximally utilizing our muscle repository. In this project, we aim: 1) to maintain and further improve the diagnostic network system for muscle disease and muscle repository; 2) to elucidate the cause and mechanism of muscle diseases; 3) to develop diagnostic markers; and 4) to develop therapies for muscle diseases. The number of muscle biopsy samples we receive has been steadily increasing in the last 10 years with more than 1000 samples per year in 2017-2020. As a result, the total number of frozen and cultured muscle samples has reached 21235 and 2084, respectively, by the end of 2020, which constitute the world-leading muscle repository. Using this muscle repository, we have made a number of achievements including: 1) the identification of 65 Japanese oculopharyngodistal myopathy (OPDM) with CGG expansion in LRP gene, in addition to 11 OPDM patients with CGG expansions in GIPC1 and 7 with CGG expansions in NOTCH2NLC2; the identification of 63 Japanese ADSSL1 myopathy patients from 59 families; 2) the identification of 2 Japanese patients with limb girdle muscular dystrophy R25 due to BVES nonsense variants; 3) the association between dermatomyositis sine dermatitis and anti-NXP-2 antibodies; 4) perifascicular necrosis and perimysial pathology as characteristic features of anti-Mi-2 dermatomyositis; and 5) identification of new oxolinic acid derivative as a potential preventive agent again malignant hyperthermia.