29‐4　筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

西　野　一　三

総括研究報告

1. 研究目的

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

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

(2) 病因・病態解明：　筋疾患には依然として原因不明のものが多い。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
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
松田良一	東京理科大学理学研究科 科学教育専攻
遠藤玉夫	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター　東京都健康長寿医療センター研究所
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
林　良雄	東京薬科大学薬学部薬品化学教室
杉江秀夫	常葉大学保健医療学部
遠藤　剛	千葉大学 大学院理学研究院
斉藤史明	帝京大学医学部神経内科
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
鈴木重明	慶應義塾大学医学部
中森雅之	大阪大学大学院医学系研究科
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
竹田哲也	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

3.研究成果

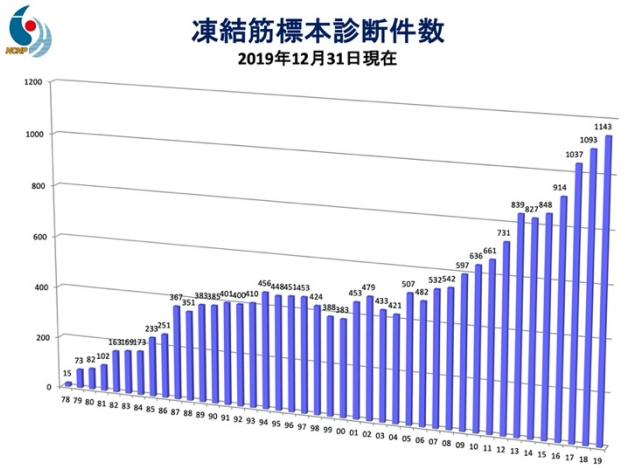
我々は、肢帯型筋ジストロフィー関連疾患の分子病態、次世代技術等を活用することにより、国立精神・神経医療研究センターを初めとする機関に蓄積された患者検体を有効活用して解明し、さらに治療法開発の基盤を形成することを目指している。具体的には、1）原因不明の各種遺伝性筋疾患の病因・病態解明研究、2）ハイスループット診断法開発研究、3）分子病

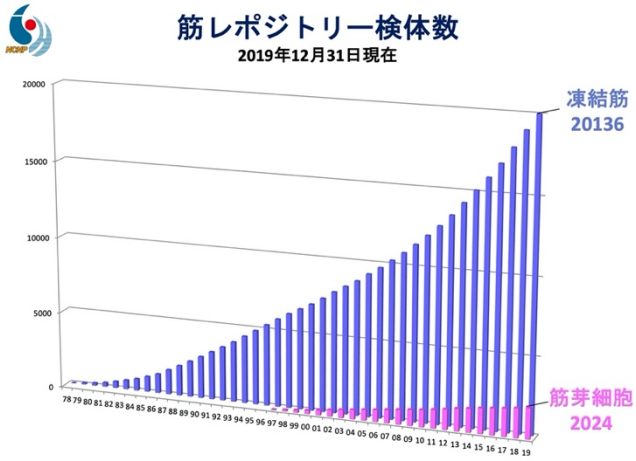
態に基づく治療法開発研究、4）以上を可能にするための基盤的研究、の 4 つを柱として研究を進めた。

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

2017 年～2019 年（暦年）の 3 年間、毎年、総筋病理診断件数は 1000 件を突破し更に増え続けた。その結果、2019 年の年間診断総件数は史上最高の 1143 件に達した。また、総検体数は、2 万検体を突破して 2019 年末で 20136 検体となり、名実ともに世界最大規模の筋レポジトリーとなった。培養筋も 2 千件を突破し、総検体数 2024 件となった。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

タイ・マヒドン大学との共同で、第 1 回国際筋病理セミナーを 2018 年 8 月 15 日-17 日に、第 2 回を 2019 年 6 月 27 日-29 日に、何れもマヒドン大学シリラート病院（バンコク）で開催した。タイ、ミャンマー、ベトナムの基幹病院から脳神経内科医・小児科医・病理医が参加し大変好評であった。また同病院と共同で、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・タイ語版の 3 バージョンがある）を作成し、2018 年 1 月より疾病研究第一部 HP 上で公開した。世界 95 カ国／地域よりアクセスがあった。World Federation of Neurology の News でも取り上げられるとともに、国内外の 8 学術団体から推薦を受けた。

2）病因・病態解明

a) 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、63 例（59 家系）で *ADSSL1* 遺伝子の両アレル性の変異が同定された（**Neurology**, *in press*）。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。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。

b）*COX6A2* 遺伝子変異による新たなチトクローム C 酸化酵素（COX）、欠損症

COX6A2 遺伝子変異による COX 欠損症患者 2 家系 2 人を、世界で初めて見いだした（**Ann Neurol** 2019）。患者およびノックアウトマウス骨格筋では、COX の酵素活性と COX 複合体のアセンブリーが低下していた。Hela 細胞に、野生型/変異型 COX6A2 を発現させたモデルにおいては、変異型では野生型と異なる形態的特徴を認めた。これは、世界で初めての横紋筋特異的サブユニット異常による COX 欠損症である。

c）眼咽頭遠位型ミオパチー（OPDM）の原因遺伝子同定

東京大学・石浦博士らとの共同研究で、OPDM が *LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長によることを明らかにした（**Nat Genet** 2019）。さらに 34 家系 36 名の日本人患者で検討したところ、男性患者が女性患者の 2 倍多いことが明らかとなった（論文投稿中）。*LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長の発見を契機として、北京大学との共同研究で、*GIPC* 遺伝子の CGG リピート伸長も OPDM の原因となること（**Am J Hum Genet** 2020）、さらには、神経

核内封入体病の原因である *NOTCH2NLC* 遺伝子の CGG リピート伸長によっても OPDM を来しうること（論文投稿中）を相次いで同定した。

d）乳児重症型ミトコンドリア脳筋症の新規原因遺伝子

各種代謝性ミオパチーを対象とした原因遺伝子変異同定を試み、乳児重症型のミトコンドリア脳筋症で 3 つの新たな原因遺伝子（*IBA57*、*UNDUFAF3*、*WDR45*）を見いだした（**Neurol Genet** 2017, **Clin Genet** 2018, **Neurology** 2018）。

e) STAC3 関連ミオパチー

本邦で初めて 2 家系 3 患者において STAC3 関連ミオパチー例を見いだした。*STAC3* 変異例はこれまでミスセンス変異を有する Native American が報告されているのみである（Native American myopathy）。本邦患者では、ホモ接合性のフレームシフト変異を有し、生下時からの人工呼吸器管理、経管栄養を必要とする重症型であった。

f) Tubular aggregate myopathy の病態解明

Orai1 G100S 変異をもつノックインマウスを作製した。ヘテロ接合体マウスにおいて、前脛骨筋の筋張力低下が観察された。また、筋病理では、少数ながら、中心核線維、壊死線維が見られた。また、同マウスからの初代細胞では、カルシウム流入の亢進が観察された。store-operated calcium channel が恒常的に活性化していること、また、このカルシウム流入が骨格筋の機能低下を引き起こすことが示された。

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

これまでに皮膚筋炎ではミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）が筋線維に発現していること、また MxA の発現により皮膚筋炎の診断が可能であることを報告してきた。MxA の発現を確認し、更に皮膚筋炎特異的自己抗体を確定している 182 例について調べたところ、14 例は皮膚症状を呈していなかった。このことは、これまでその存在について疑問視する声が多かった dermatomyositis sine dermatitis が確かに存在することが初めて明らかになった。またこの 14 例のうち 12 例は、抗 NXP-2 抗体陽性であり、dermatomyositis sine dermatitis が抗 NXP-2 抗体と強く関連していることが明らかとなった（**JAMA Neurol** 2020）。また、皮膚筋炎での陽性自己抗体別のサブタイプで臨床病理所見が異なるかどうかを検討したところ、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（**Neurology**, in revision）。一方、抗 Jo-1 抗体など抗 ARS 抗体が陽性の抗合成酵素症候群も皮膚科およびリウマチ膠原病科では皮膚筋炎に分類される。そこで抗 ARS 抗体陽性であった 194 例について MxA の発現を調べたところ、筋線維での発現が認められたのは 3 例のみであった（**Neuropathol Appl Neurobiol** 2019）。このうち 1 例は皮膚筋炎特異的自己抗体である抗 MDA5 抗体が陽性であった。このことは、抗合成酵素症候群と皮膚筋炎は異なる疾患であることを示している。

b）悪性高熱症素因

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。

c）コア鑑別法

セントラルコアはセントラルコア病の重要な所見であり、*RYR1* の C 端領域の変異により生じる。しかし、N 端領域にある変異では、やや非典型的なコアが出現する。一方、*RYR1* 変異以外の理由でもコア病変は生じる。例えば、いわゆる target fiber や targetoid fiber と呼ばれる所見も、セントラルコアとの鑑別が難しい場合がある。そこで *RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーを検索したところ、*RYRI* 変異例では、RYR1 に加えて、triadin などがコア構造内で発現していた。この所見は、*RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとなり得る（**J Neuropathol Exp Neurol**, in press）。

4)治療法開発

a）筋強直性ジストロフィー

中森班員らは、CAG リピート伸長 DNA の副政治に生じるスリップ型中間構造体に特異的に結合する naphthyridine-azaquinolone が、CAG リピート伸長を有する Huntington 病（HD）マウスおよび HD 患者細胞において、ゲノム DNA 上の CAG リピート数

を減少させることを世界で初めて明らかにした（**Nat Genet** 2020）。本技術は triplet repeat 身長を原因とする筋強直性ジストロフィーにも応用可能であり、初めて根本的治療法開発可能性への展望が開けた。

b) 悪性高熱症

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（論文投稿中）。今後 RyR1 関連筋疾患に対する効果を in vivo および in vitro 実験において詳細に検討していく。

c) 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. Nakamori M, Panigrahi GB, Lanni S, Gall-Duncan T, Hayakawa H, Tanaka H, Luo J, Otabe T, Li JX, Sakata A, Caron MC, Joshi N, Prasolava T, Chiang K, Masson JY, Wold MS, Wang X, Lee MYWT, Huddleston J, Munson K, Davidson S, Layeghifard M, Edward LM, Gallon R, Santibanez-Koref M, Murata A, Takahashi MP, Eichler EE, Shlien A, Nakatani K, Mochizuki H, Pearson CE: Slipped-CAG DNA binding small molecule induces trinucleotide repeat contractions in vivo. ***Nature Genetics***. 52(2): 146-159, Feb, 2020
2. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S: Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. ***Nat Genet.*** 51(8):1222-1232, Aug, 2019
3. Tanboon J, Nishino I: Classification of idiopathic inflammatory myopathies: pathology perspectives. ***Curr Opin Neurol.*** 32(5):704-714, Oct, 2019
4. Inoue M, Tanboon J, Okubo M, Theerawat K, Saito Y, Ogasawara M, Indrawati LA, Uruha A, Okiyama N, Fujimoto M, Suzuki S, Nishino I: Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases. ***Neuropathol Appl Neurobiol.*** 45(5): 523-524, Aug, 2019
5. Inoue M, Uchino S, Iida A, Noguchi S, Hayashi S, Takahashi T, Fujii K, Komaki H, Takeshita E, Nonaka I, Okada Y, Yoshizawa T, Van Lommel L, Schuit F, Goto YI, Mimaki M, Nishino I: COX6A2 variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency. ***Ann Neurol***. 86(2): 193-202, Aug, 2019
6. Masaki T, 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.*** 24;9(1):2049, May, 2018
7. Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka K, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H,

Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K: UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. ***Nat Commun.*** 9(1): 3396, Sep, 2018

8. Ishiyama A, Kimura Y, Iida A, Saito Y, Miyamoto Y, Okada M, Sato N, Nishino I, Sasaki M: Transient swelling in the globus pallidus and substantia nigra in childhood suggests SENDA/ BPAN. ***Neurology.*** 90(21): 974-976, May, 2018
9. Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, Ogata T, Suzuki E, Komaki H, Sasaki M, Mimaki M, Goto YI, Nishino I: NDUFAF3 Variants that Disrupt Mitochondrial Complex I Assembly may associate with Cavitating Leukoencephalopathy. ***Clin Genet***. 95(5): 1103-1106, May, 2018
10. Nakamori M, Hamanaka K, Thomas JD, Wang ET, Hayashi YK, Takahashi MP, Swanson MS, Nishino I, Mochizuki H: Aberrant Myokine Signaling in Congenital Myotonic Dystrophy. ***Cell Rep***. 21(5):1240-1252, Oct, 2017
11. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, Watanabe Y, Nakahara J, Shiina T, Suzuki N, Nishino I: Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. ***JAMA Neurol***. 74(8): 992-999, Aug, 2017

筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発

分担研究者　西野一三
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

国立精神･神経医療研究センターでは過去 40 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下支えしてきた。その結果として本邦筋生検の約 8 割が集まる、名実ともに国内のセンターとして機能するに至っている。その結果構築された筋レポジトリーは、世界最高水準の規模と品質を有するに至っている。本申請研究においては、この筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーを更に発展させる事を第一の目的とし、それを基盤として活用し、次世代解析技術等を活用しつつ肢帯型筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発を進めることを目的とする。

方法

（1）筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーの発展

全国の医療施設に向けて高度専門的な知識と技術を要する筋病理診断を中心とする筋疾患診断を提供する。その結果として集まる、凍結筋を中心とする検体は筋レポジトリーとして保管し、神経・筋疾患の病因・病態解明と治療法開発研究に役立てる。また国際的均てん化にも寄与すべく、筋疾患に関する教育を行う。

（2）病因・病態解明

主に AMED のプロジェクトにより行われる次世代解析等により新たに明らかとなった原因遺伝子あるいはその候補について、その病因・病態を明らかにする。具体的には、筋レポジトリーにおいて更なる同様の症例がないかを確認するとともに、臨床病理所見の詳細を明らかにする。また、培養細胞、モデル動物作製等によりその分子病態を明らかにする。

（3）診断法開発

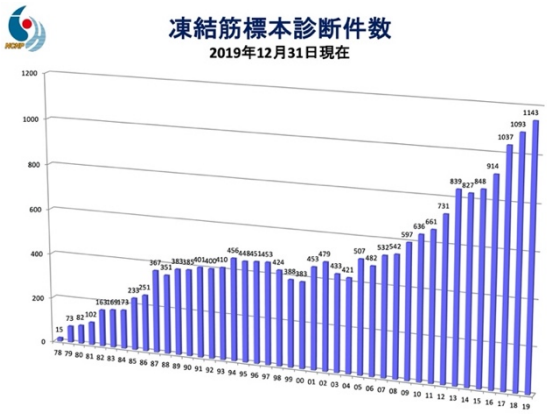
筋レポジトリー検体を有効活用し、より優れた診断マーカーを明らかにする。

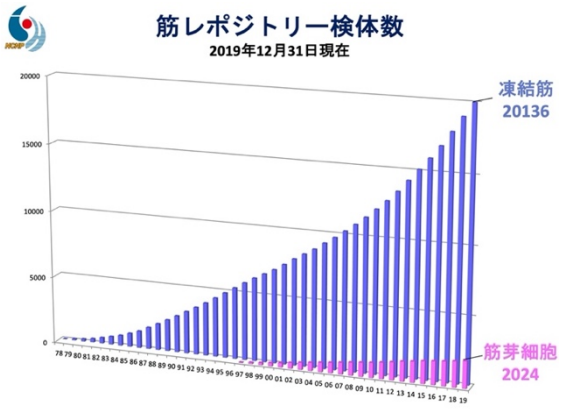
結果

（1）筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーの発展

a）筋病理診断と検体数

2017 年～2019 年（暦年）の 3 年間、毎年、総筋病理診断件数は 1000 件を突破し更に増え続けた。その結果、2019 年の年間診断総件数は史上最高の 1143 件に達した。





また、総検体数は、2 万検体を突破して 2019 年末で 20136 検体となり、名実ともに世界最大規

模の筋レポジトリーとなった。培養筋も 2 千件を突破し、総検体数 2024 件となった。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

タイ・マヒドン大学との共同で、第 1 回国際筋病理セミナーを 2018 年 8 月 15 日-17 日に、第 2 回を 2019 年 6 月 27 日-29 日に、何れもマヒドン大学シリラート病院（バンコク）で開催した。タイ、ミャンマー、ベトナムの基幹病院から脳神経内科医・小児科医・病理医が参加し大変好評であった。また同病院と共同で、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・タイ語版の 3 バージョンがある）を作成し、2018 年 1 月より疾病研究第一部 HP 上で公開した。世界 95 カ国／地域よりアクセスがあった。World Federation of Neurology の News でも取り上げられるとともに、国内外の 8 学術団体から推薦を受けた。

2) 病因・病態解明

a) 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、63 例（59 家系）で *ADSSL1* 遺伝子の両アレル性の変異が同定された（**Neurology**, *in press*）。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。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。

b) *COX6A2* 遺伝子変異による新たなチトクローム C 酸化酵素（COX）、欠損症 *COX6A2* 遺伝子変異による COX 欠損症患者 2 家系 2 人を、世界で初めて見いだした（**Ann Neurol** 2019）。患者およびノックアウトマウス骨格筋では、COX の酵素活性と COX 複合体のアセンブリーが低下していた。Hela 細胞に、野生型/変異型 COX6A2 を発現させたモデルにおいては、変異型では野生型と異なる形態的特徴を認めた。これは、世界で初めての横紋筋特異的サブユニット異常による COX 欠損症である。

c) 眼咽頭遠位型ミオパチー（OPDM）の原因遺伝子同定

東京大学・石浦博士らとの共同研究で、OPDM が *LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長によることを明らかにした（**Nat Genet** 2019）。さらに 34 家系 36 名の日本人患者で検討したところ、男性患者が女性患者の 2 倍多いことが明らかとなった（論文投稿中）。*LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長の発見を契機として、北京大学との共同研究で、*GIPC* 遺伝子の CGG リピート伸長も OPDM の原因となること（**Am J Hum Genet** 2020）、さらには、神経核内封入体病の原因である *NOTCH2NLC* 遺伝子の CGG リピート伸長によっても OPDM を来しうること（論文投稿中）を相次いで同定した。

d) 乳児重症型ミトコンドリア脳筋症の新規原因遺伝子

各種代謝性ミオパチーを対象とした原因遺伝子変異同定を試み、乳児重症型のミトコンドリア脳筋症で 3 つの新たな原因遺伝子（*IBA57*、*UNDUFAF3*、*WDR45*）を見いだした（**Neurol Genet** 2017，**Clin Genet 2018**, **Neurology 2018**）。

3) 診断法開発

a) 筋炎マーカー開発

これまでに皮膚筋炎ではミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）が筋線維に発現してい

ること、また MxA の発現により皮膚筋炎の診断が可能であることを報告してきた。MxA の発現を確認し、更に皮膚筋炎特異的自己抗体を確定している 182 例について調べたところ、14 例は皮膚症状を呈していなかった。このことは、これまでその存在について疑問視する声が多かった dermatomyositis sine dermatitis が確かに存在することを初めて明らかにした。またこの 14 例のうち 12 例は、抗 NXP-2 抗体陽性であり、dermatomyositis sine dermatitis が抗 NXP-2 抗体と強く関連していることが明らかとなった（**JAMA Neurol** 2020）。また、陽性皮膚筋炎特異的自己抗体別のサブタイプで臨床病理所見が異なるかどうかを検討したところ、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していた（**Neurology**, in revision）。一方、抗 Jo-1 抗体など抗 ARS 抗体が陽性の抗合成酵素症候群も皮膚科およびリウマチ膠原病科では皮膚筋炎に分類される。そこで抗 ARS 抗体陽性であった 194 例について MxA の発現を調べたところ、筋線維での発現が認められたのは 3 例のみであった（**Neuropathol Appl Neurobiol** 2019）。このうち 1 例は皮膚筋炎特異的自己抗体である抗 MDA5 抗体が陽性であった。このことは、抗合成酵素症候群と皮膚筋炎は異なる疾患であることを示している。

b)コア鑑別法

セントラルコアはセントラルコア病の重要な所見であり、*RYR1* の C 端領域の変異により生じる。しかし、N 端領域にある変異では、やや非典型的なコアが出現する。一方、*RYR1* 変異以外の理由でもコア病変は生じる。例えば、いわゆる target fiber や targetoid fiber と呼ばれる所見も、セントラルコアとの鑑別が難しい場合がある。そこで RYR1 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーを検索したところ、RYRI 変異例では、RYR1 に加えて、triadin などがコア構造内で発現していた。この所見は、RYR1 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとなり得る（**J Neuropathol Exp Neurol**, in press）。

考察

（1）筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーの発展

筋病理診断件数は順調に増加し、2017 年～2019 年（暦年）と 3 年連続で 1000 検体を越えた。総検体数はついに 2 万検体を超えた。恐らく本邦で施行されている筋生検の約 8 割の検体が国立精神・神経医療研究センターに送付されているものと推測される。送付された検体に対しては、全例に 20 種類以上の組織化学染色を施行するとともに、70%以上の例に対して筋ジストロフィー関連蛋白質および筋炎関連蛋白質を網羅する免疫染色が施行されており、名実ともに、世界最高峰の質と量を誇る筋レポジトリーと言える。

（2）病因・病態解明

ADSSL1 変異例は韓国からの先行論文とは異なり、遠位型ミオパチー例だけでなく、近位筋優位に筋障害を来す例が相当数あった。また病理学的にはタイプ 1 線維優位に加えて、全例でネマリン小体を認めたことから、病理学的にはネマリンミオパチーと分類することが可能である。ADSSL1 ミオパチーは、遺伝学的に診断された本邦例の中では、最も頻度の高いネマリンミオパチーであることが明らかとなった。OPDM は長らく原因が不明であったが、筋レポジトリー検体を用いた解析により、一気に 3 つ

の原因遺伝子が同定されるに至った。

（３）診断法開発

筋炎研究に関しては、筋線維での MxA が皮膚筋炎の診断マーカーとなることを報告して来たことを元に、これまでその存在が疑問視されていた dermatomyositis sine dermatitis が確かに存在すること、更には、dermatomyositis sine dermatitis は抗 NXP-2 抗体と強く関連していることを初めて明らかにする事ができた（JAMA Neurol 2020）。また皮膚科およびリウマチ膠原病科ではしばしば皮膚筋炎として扱われる抗合成酵素症候群が皮膚筋炎と異なる病態を有していることを明らかにした（**Neuropathol Appl Neurobiol** 2019）。また *RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとして、RYR1 および triadin のコア構造内での発現が、*RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとなり得る事を明らかにした（**J Neuropathol Exp Neurol**, in press）。これらは何れも筋レポジトリー検体を活用したものであり、金レポジトリーの質の高さが改めて示されたと言える。

結論

筋病理診断件数が 3 年連続で 1000 件を突破し、凍結筋層検体数は 2 万件体を突破した。名実ともに世界最高峰の質と量を誇る筋レポジトリーと言える。ADSSL1 ミオパチーは日本で最も頻度の高いネマリンミオパチーである。LRP12, GIPC1, NOTCH2NLC の非翻訳領域の CGG リピート伸長が OPDM の原因である。Dermatomyositis sine dermatitis は確かに存在し、抗 NXP-2 抗体と関連する。

参考文献

1. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S: Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. ***Nat Genet.*** 51(8):1222-1232, Aug, 2019
2. Tanboon J, Nishino I: Classification of idiopathic inflammatory myopathies: pathology perspectives. ***Curr Opin Neurol.*** 32(5):704-714, Oct, 2019
3. Inoue M, Tanboon J, Okubo M, Theerawat K, Saito Y, Ogasawara M, Indrawati LA, Uruha A, Okiyama N, Fujimoto M, Suzuki S, Nishino I: Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases. ***Neuropathol Appl Neurobiol.*** 45(5): 523-524, Aug, 2019

4. Inoue M, Uchino S, Iida A, Noguchi S, Hayashi S, Takahashi T, Fujii K, Komaki H, Takeshita E, Nonaka I, Okada Y, Yoshizawa T, Van Lommel L, Schuit F, Goto YI, Mimaki M, Nishino I: COX6A2 variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency. ***Ann Neurol***. 86(2): 193-202, Aug, 2019
5. Ishiyama A, Kimura Y, Iida A, Saito Y, Miyamoto Y, Okada M, Sato N, Nishino I, Sasaki M: Transient swelling in the globus pallidus and substantia nigra in childhood suggests SENDA/ BPAN. ***Neurology.*** 90(21): 974-976, May, 2018
6. Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, Ogata T, Suzuki E, Komaki H, Sasaki M, Mimaki M, Goto YI, Nishino I: NDUFAF3 Variants that Disrupt Mitochondrial Complex I Assembly may associate with Cavitating Leukoencephalopathy. ***Clin Genet***. 95(5): 1103-1106, May, 2018
7. Nakamori M, Hamanaka K, Thomas JD, Wang ET, Hayashi YK, Takahashi MP, Swanson MS, Nishino I, Mochizuki H: Aberrant Myokine Signaling in Congenital Myotonic Dystrophy. ***Cell Rep***. 21(5):1240-1252, Oct, 2017
8. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, Watanabe Y, Nakahara J, Shiina T, Suzuki N, Nishino I: Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. ***JAMA Neurol***. 74(8): 992-999, Aug, 2017

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

近年、筋萎縮発症の分子機構が徐々に明らかとなり、その克服を目指す治療薬の開発が盛んである。ところが、日本では筋萎縮を適応に保険適応を獲得している薬剤は皆無である。

マイオスタチンは、骨格筋量を負に制御する骨格筋特異的な TGF-β分子として同定され、その阻害は筋ジストロフィーおよび関連筋消耗性疾患の治療戦略として世界的に脚光を浴びている。米国 FDA は、2013 年からそのタイプ II 膜受容体を標的とするヒト化阻害抗体医薬を孤発性封入体筋炎に対する break-through therapy と認定して、治験が実施されている。さらにマイオスタチンリガンド阻害抗体医薬やデコイ受容体医薬のデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)を対象とした治験も進行中である。

マイオスタチン N 末端に相当するプロドメインは 239 アミノ酸残基から構成され、血中ではプロドメインが C 末端の活性をもつアクティブドメイン（リガンド）を非共有結合で包含し、その活性を抑制する不活性型複合体を形成していることが知られている。われわれは、これまでに、カベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー（LGMD1C）モデルマウスでは、カベオリン-3 欠損により、その結合タンパク質であるマイオスタチン膜受容体キナーゼが活性化して筋萎縮が発症すること、プロドメイン高発現マウスとの交配により筋萎縮が改善することを発表した（Ohsawa, J Clin Invest 116, 2006)。さらにプロドメイン全長 239 アミノ酸残基のうち、マイオスタチン *in vitro* 転写活性を 79%阻害する 29 アミノ酸残基から構成される阻害活性中心(Inhibitory core: IC）が存在することを見出した（PCT: WO2014/119753; PLoS One 10, 2015）。

本研究は、特殊ペプチドのスクリーニング技術によって、IC ペプチドよりマイオスタチン阻害活性が高く、血中安定性も高いペプチドを同定する。LGMD1C モデルマウス、および最重症型 DMD モデルマウスに全身投与して、将来の First-in-human 治験の実施の基盤となる非臨床 POC 取得を目標とする。

方法

(i)マイオスタチンリガンドを探索プローブとして、これに結合するペプチドを、ペプチドライブラリーからスクリーニングする。(ii)得られたペプチド群について構造活性相関解析を施行して阻害活性を予測する。(iii)ペプチド群を、それぞれマイオスタチン転写活性測定系（ヒト胎児腎芽細胞 HEK293-$(CAGA)_{12}$-luc レポーター遺伝子系）に添加し、リコンビナントマイオスタチン刺激によるレポーター遺伝子発現によって *in vitro* 阻害活性を測定する。(iv)阻害活性の高いペプチド群について、野生型及び LGMD1C モデルマウスの前脛骨筋へ局所投与し、4 週後に筋量・筋力を測定して筋肥大効果を検討する。(v)筋肥大効果の高いペプチドについて、化学修飾を施す。阻害活性、ADME 試験、PK 試験により血中安定性が高率なペプチドを選択する。(vi)得られた特殊ペプチドを最重症型デュシェンヌ型筋ジストロフィー　(DMD) モデル DBA/2-*mdx* マウスに静脈投与し、筋萎縮・筋力低下・ジストロフィー変化に対しての有効性を検討する。

結果

①スクリーニングにより、マイオスタチンリガンドに結合するペプチド群を得た。②構造活性相関解析によって、マイオスタチン阻害が予測されるペプチド群を選択した。③*in vitro* マイオスタチン転写活性測定により、プロトタイプである IC ペプチドと比較して、阻害活性が 100 倍以上の阻害ペプチド群を絞り込んだ。③さら

に、阻害ペプチド群を LGMD1C モデルマウスの前脛骨筋に注射し、4 週間目に筋量・筋力が増大し、かつ、マイオスタチンの細胞内エフェクターであるリン酸化 Smad2 量が低下するペプチド群を選択した。④このペプチドを修飾した。その ADME 試験、および PK 試験により、肝マイクロゾーム安定性、血中安定性の極めて高い特殊ペプチドを同定した。⑤特殊ペプチドの最重症型 DMD モデル DBA/2-*mdx* マウスへの静脈投与の取り組みを開始した。

考察

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。ワンショット静注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。2020 年度には、特殊ペプチドの DMD モデルマウスの筋萎縮・筋力低下・ジストロフィー変化に対する有効性と安全性を明らかとして、非臨床 POC を取得したい。

骨格筋量を負に制御、すなわち骨格筋から分泌される骨格筋サイズを決定するマイオスタチンの阻害戦略は、魅力的な筋萎縮の治療アプローチであると考えられる。現在、この分子の発見から 20 年を経て、阻害医薬の臨床応用が、現実のものとなろうとしているが、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 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。また骨格筋幹細胞である筋衛星細胞を欠損したマウス骨格筋でも、マイオスタチン阻害によって骨格筋量が増大することから、マイオスタチンは主に速筋線維で作用すると考えられる。この筋線維周囲ないし筋線維内部への阻害医薬の特異的デリバリー法の確立できれば、マイオスタチン阻害医薬の今後の臨床応用に向けた真の break-through となるものと予想される。

本研究が成功すれば、筋ジストロフィーだけでなく、ミオパチーなどの骨格筋消耗性疾患だけではなく、加齢性筋萎縮（サルコペニア）や廃用症候群など広範な臨床応用が期待できる。すなわち、現在の厚生労働施策の課題である希少疾患対策(Unmet Medical Needs) ばかりでなく、超高齢化社会を迎える本邦の国民的課題である介護医療費削減に発展するものと考えられる。マイオスタチン阻害特殊ペプチドによる筋消耗性疾患治療法の臨床応用に向け、ジストロフィーおよび関連筋消耗性疾患の対象患者に対する治験実施を最終目標とする。

結論

同定したマイオスタチン阻害特殊ペプチドは、プロトタイプ IC ペプチドから 100 倍以上と卓越した阻害活性を示し、局所投与によってカベオリン-3 欠損 LGMD1C モデルマウスの筋萎縮と筋力低下が改善した。現在、最重症型デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス（DBA/2-*mdx*）全身投与の有効性を検証する研究を進めている。ペプチド医薬による筋ジストロフィーdisease modifying therapy の実現を目指す。

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. 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 とは、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、細胞膜修復機構の詳細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、筋細胞膜修復機構の全容解明を目指す。そして、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

Dysferlin 特定領域のアフィニティカラムを作成し、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、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（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（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 活性化剤のモデル動物の異常回復効果の検証実験において、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が、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以外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

本研究で得られた AMPK 複合体が損傷を受けた筋細胞膜の修復において重要な役割を担っているという新たな知見は、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。

本研究成果は、2020 年 2 月に米国遺伝子細胞治療学会の機関誌である「Molecular Therapy」のオンライン版に掲載された。

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

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

分担研究者
戸田 達史 1)

研究協力者
池田真理子 2)

所属
1) 東京大学大学院・医学系研究科・神経内科学
2) 藤田医科大学病院・臨床遺伝科

緒言

福山型筋ジストロフィー（FCMD と略）は重度の筋病変と中枢神経細胞異動をきたす難病であり治療法がない。原因遺伝子フクチンの 3' 非翻訳領域に日本人に特有のレトロトランスポゾン挿入があり、その挿入変異に特異的な異常スプライシングが誘導され、αジストログリカン（αDG）の O マンノース型糖鎖修飾の欠損がみられ発症する。スプライシング異常により産生される異常フクチンは、その局在がゴルジ体から ER に変化し、機能を喪失する。われわれは、細胞・動物などのモデルを用いて、創薬開発のためのスクリーニング法を確立した。また、これまでに挿入変異とノックアウト型の複合ヘテロマウスでは、αDG の糖鎖修飾は減少するものの、筋の表現型はなく、中枢においてはそのフェノタイプを認めない。福山型筋ジストロフィーの治療法開発には中枢の病状を反映するモデル作成が必須である。

方法

我々はスプライシング異常、局在異常、αDG 糖鎖修飾異常の 3 つの方向性から、そのアッセイ系を作成し、既存のドラッグパネルを用いて薬剤スクリーニングを行った。

また FCMD 患者より iPSC を樹立し、その機能を評価した。また iPSC より無血清凝集浮遊培養法（SFEBq 法）をもちいて大脳皮質への分化誘導を行った。

結果

薬剤スクリーニングのアッセイ系では、1 スプライシング異常を改善する薬剤が 12 個同定された。その中にはすでにスプライシング調節に関与することが知られている薬剤が含まれていた（未発表）。しかし、我々の開発薬であるアンチセンス核酸の効果を超える薬剤はみつからなかった。局在異常を改善する薬剤は同定されなかった。αDG の糖鎖修飾を改善する薬剤も複数同定した。

また疾患由来 iPSC をもちいて大脳皮質オルガノイドを作成した。大脳皮質オルガノイドでは脳表のαDG の低下がみられた。

考察

局在異常については、もともと異常フクチンにおいて、フクチンの活性がないことにより、局在を変化させても機能的な回復は乏しい可能性が示唆された。スプライシング異常を是正する薬剤に関しては、もともとのスプライシング異常の特異性が高いため、アンチセンス核酸のような分子標的でないと効果が出にくい可能性があると考えられた。

結論

FCMD の病態に基づいたスクリーニング系を作成し、ドラッグスクリーニングを行った。スプライシング異常の改善・糖鎖修飾の改善をもたらすリード化合物が複数同定された（未発表・投稿準備中）。これら化合物は今後 iPSC 含めさまざまなモデルをもちいて検討を予定している。

参考文献

Ujihara Y, Kanagawa M, Mohri S, Takatsu S, Kobayashi K, Toda T, Naruse K, Katanosaka Y. Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure. *Nat Commun.* 2019 Dec 17;10(1):5754.

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　Kun Huang[1)], Guiying Chen[1)] , 増田章男 [1)], 木下正信 [2)], 加門正義 [3)], 荒木敏之 [3)]

[1)] 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学
[2)] 夢眠クリニック大宮北
[3)] 国立精神･神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第 5 部

緒言

筋強直性ジストロフィー1 型(myotonic dystrophy type I, DM1)は *DMPK* 遺伝子の 3'UTR の異常延長 CUG 繰り返し配列に RNA 結合タンパク MBNL1 が異常集積し MBNL1 の機能低下が起きるとともに、別の RNA 結合タンパク CUGBP1 の活性化がおきることによりスプライシング異常を含む mRNA 代謝異常により各種病態を呈する[1,2]。DM1 に合併する糖尿病・白内障・高コレステロール血症などに対する対症療法はあるが、患者の ADL の低下に大きく寄与する筋力低下・筋委縮に対する確立した治療法はない。アンチセンスオリゴヌクレオチドにより異常延長した CUG 繰り返し配列への MBNL1 への集積を抑制する治療法が現在開発されつつある。

我々は以前に本研究班において、広く臨床応用されている既認可薬の新規薬効を同定し、特に希少疾患に対して適用するドラッグリポジショニング戦略を DM1 に対して用い、非ステロイド性抗炎症薬(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID) フェニルブタゾン(PBZ)が DM1 に対して有効であることを同定した[3]。PBZ は C2C12 筋芽細胞に対して濃度依存性に Mbnl1 の mRNA 発現ならびにタンパク発現を上昇させ、HSA^{LR} DM1 モデルマウスにおいて PBZ 経口投与は MBNL1 の mRNA 発現ならびにタンパク発現を上昇させた。さらに PBZ はモデルマウスの筋力低下を改善し、*Clcn1, Nfix, Rpn2* 遺伝子のスプライシングを補正した。さらに、PBZ は筋の中心核を減少させ、クロライドチャンネルの膜発現を上昇させた。PBZ は *Mbn1* の第 1 イントロンのメチレーションを減少させ、*Mbnl1* の転写を促進した。さらに、C2C12 筋管ならびに RNA EMSA にて、PBZ は CUG 繰り返し配列と MBNL1 の異常集積を抑制することを報告した。本研究では他の NSAIDs の DM1 への効果を検証することにより NSAIDs の DM1 に対する効果のメカニズムの解明を試みた。

方法

MBNL1 プロモータ領域に firefly luciferase 遺伝子をつなぎ C2C12 筋芽細胞に導入した。29 種類の既認可 NSAID 100 μM を付加し、firefly luciferase 活性を測定し NSAID のスクリーニングをおこなった。同様に、C2C12 筋芽細胞を用いて 100 μM NSAID による MBNL1 発現誘導を qRT-PCR と Western blotting により解析を行った。COX1 siRNA と COX2 siRNA の MBNL1 発現に対する影響を C2C12 筋芽細胞を用いて qRT-PCR と Western blotting により調べた。Mnbnl1 intron 1 のメチル化部位 MeR2 に対する COX1 siRNA と COX2 siRNA の効果を bifulfite sequencing により調べた。また、C2C12 筋管に対して MeR2 を CRISPR/Cas9 で欠損させることにより COX1 siRNA 効果と COX2 siRNA 効果の変化を調べた。

結果

MBNL1 プロモータ領域に firefly luciferase 遺伝子をつなぎ C2C12 筋芽細胞に導入した。29 種類の既認可 NSAID 100 μM のスクリーニングにより 13 種類の NSAIDs が MBNL1 の発現を誘導することを同定した。特に COX1 選択的 NSAIDs により効果を認めた。COX1 siRNA は mRNA レベルでもタンパクレベルでも MBNL1 の発現を誘導したが、COX2 siRNA には効果を認めなかった。同様に DM1 患者由来 iPS 細胞から誘導した筋管において COX1 siRNA のみ

MBNL1 発現誘導効果を認めた。C2C12 細胞の *Mbnl1* intron 1 のメチル化部位 MeR2 を bifulfite sequencing と MeDIP により定量をおこない、COX1 siRNA のみが MeR2 のメチル化を抑制することを明らかにした。また、C2C12 筋管に対して MeR2 を CRISPR/Cas9 で欠損させることにより COX1 siRNA による MBNL1 発現誘導効果が消失することを同定した。

考察

COX1 抑制は *Mbnl1* intron 1 MeR2 のメチル化を抑制することにより MBNL1 発現誘導を起こすことを明らかにした[4]。

結論

COX1 選択的 NSAIDs は DM1 に対する治療薬となり得ることが期待される。

参考文献

1. Batra R, Charizanis K, Manchanda M, Mohan A, Li M, Finn DJ, Goodwin M, Zhang C, Sobczak K, Thornton CA, Swanson MS. Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol Cell.* 2014, 56: 311-22.
2. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep.* 2012, 2: 209.
3. Chen G, Masuda A, Konishi H, Ohkawara B, Ito M, Kinoshita M, Kiyama H, Matsuura T, Ohno K. Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci Rep.* 2016, 6: 25317.
4. Huang K, Masuda A, Chen G, Bushra S, Kamon M, Araki T, Kinoshita M, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Inhibition of cyclooxygenase-1 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs demethylates MeR2 enhancer and promotes Mbnl1 transcription in myogenic cells. *Sci Rep.* 2020, 10: 2558.

遺伝性ミオパチーの筋変性機序の解明と治療法の開発

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

エメリー・ドレイフス筋ジストロフィー(EDMD)のモデルマウスはこれまでにも複数作製され、解析されてきたが骨格筋に関する研究は少ない。その背景に、症状を反映する適切なモデル動物がいなかったことが挙げられる。

方法

筋ジス症状を呈さないエメリン欠損(Emd)マウスと進行性の心筋障害を起こすラミンA/C変異導入(H222P)マウスを交配させた重複変異(EH)マウスを作製し、これらの変異が骨格筋と心筋にどのような影響を与えるかを検討するとともに、病態の発症メカニズムを探索した。

結果

EHマウスはEmdマウスとH222Pマウス同様に、発生や成長障害はなくホモで系統維持が可能であった。18週頃からH222Pマウスと同様に心不全の兆候を示し体重の減少が認められた。30週齢で骨格筋と心筋を解析した結果、EHマウスの心筋障害はH222Pマウスと同程度であったが、骨格筋は明らかに症状が悪化していた。

骨格筋の病態機序を明らかにするため、心機能が正常に保たれている 12 週齢で解析を進めた。EHマウスは骨格筋の核構造異常が認められ、さらに筋線維の大小不同、再生筋線維の増加、炎症の増加などの筋ジストロフィー症状を示した。さらに運動能が有意に低下していること、運動負荷を与えると EH マウスの筋病理変化が増悪することが明らかとなった。

幹細胞の機能低下は、核膜病の病態メカニズムに関与していると考えられている。EHマウスの骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）の機能をヘビ毒を用いた筋再生モデルで検討した結果、*Pax7* や *Myog* の遺伝子発現は遅延するものの、再生７日後の筋線維径の回復は正常対照マウスのものと比較して同程度であった。

考察

EHマウスはH222Pマウスと比較して、骨格筋病態が悪化するが、心筋機能は同程度であったことからエメリンの機能は骨格筋と心筋で異なることを示唆した。また、EHマウスの骨格筋ではメカニカルストレスに対する抵抗性の減弱が症状悪化に寄与することを示唆した。EHマウスにおいては筋衛星細胞の機能が比較的保たれており、病態への関与は少ないと示唆した。

結論

EHマウスはEDMDの筋病態メカニズムを解析するだけでなく、心筋と骨格筋におけるラミンとエメリンの関係について研究することのできる有用なモデルマウスであるといえる。

参考文献

1. Kawahara G, Nakayashiki MS, Maeda H, Kikura-Hanajiri R, Yoshida K, Hayashi YK. Antagonists for serotonin receptors ameliorate rhabdomyolysis induced by 25D-NBOMe, a psychoactive designer drug. Forensic Toxicology. 38:122-128,2020.
2. Wada E, Kato M, Yamashita K, Kokuba H, Liang W-C, Bonne G, Hayashi YK. Deficiency of emerin contributes differently to the pathogenesis of skeletal and cardiac muscle in $Lmna^{H222P/H222P}$ mutant mice. PLoS One. 14(8):e0221512,2019.
3. Wada E, Hamano T, Matsui I, Yoshida M, Hayashi YK. Matsuda R. Renal involvement in the pathogenesis of mineral and bone disorder in dystrophin-deficient mdx mouse. J Physiol Sci. 2019; 69: 661-671.

筋ジストロフィー治療のための bispecific 抗体の作製と筋変性における血液凝固の役割
－ビタミン C による低温、リンおよび TGF-β による筋細胞分化抑制の解除－

分担研究者　松田　良一
所属　東京理科大学大学院理学研究科

緒言

筋ジストロフィーは筋の変性と再生が激しく起き、やがて繊維化の増大と筋再生の阻害により、筋の進行的萎縮がおきる疾患である。その過程において、TGF-βファミリーの関与で筋再生の阻害と繊維化の亢進が示唆されている。我々は筋ジストロフィーの進行を食い止める因子が分かれば治療にも使える可能性がある。そこで、培養筋細胞の筋分化を阻害する因子として TGF-β か高濃度のリン酸を含む培養液、あるいは摂氏３０度以下の低温培養条件を標的に、これらの因子による筋分化抑制効果を解除する因子を検索した。

方法

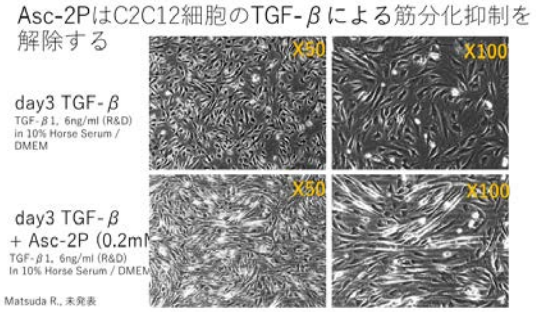
マウス衛星細胞由来筋芽細胞株 C2C12 を用い、分化誘導培養液に最終濃度①6ng/ml の TGF-β1(R&D 社製)あるいは②10mM のリン酸ナトリウム（富士フィルム和光）を添加し、5%CO2 、37℃で培養した。また、③分化誘導培養液で摂氏 28℃、5%CO2 で培養した。それぞれの培養液に分化培養液に変えた直後から 0.2mM のアスコルビン酸 2-りん酸（富士フィルム―和光）の存在下あるいは非存在下で培養した。培養 3-5 日後、あるいは 28℃の場合は 1 か月後に Fusion index を求め、で―筋細胞分化を定量化した。

結果

表1.

	A 【TGF-b】(%)	B 【High Pi】(%)	C 【Low temp】(%)
Cont.	0/163(0)	0/1740(0)	0/151(0)
Exp.	25/156(16.0)	297/615(48.3)	26/160(16.3)

1） 6ng/ml の TGF-β1 は C2C12 の細胞分化を阻害したが、0.2mM のアスコルビン酸の添加により抑制効果は消失した。（表 1. A）



2）10mM のりん酸（pH.0）存在下に培養すると筋分化は抑制されたが、0.2mM のアスコルビン酸の添加により抑制効果は消失した。（表 1.B）

3）分化培地に交換後、28℃で低温培養すると C2C12 の細胞分化は抑制されたが、0.2mM のアスコルビン酸の添加により抑制効果は消失した。（表 1. C）

考察

アスコルビン酸の添加により、TGF-β、リン酸、あるいは低温培養による筋細胞分化の抑制は解除された。アスコルビン酸はプロリン水酸化酵素の活性化するので、成熟コラーゲンの生成あるいは HIF（低酸素誘導因子）の不活性化
が TGF-β 活性の解除、あるいは高濃度りん酸による筋分化抑制活性の解除、あるいは低

温による筋分化抑制の解除に関与している可能性が考えられる。

結論

これら TGF-β や高濃度りん酸、あるいは低温による筋分化抑制の解除にアスコルビン酸が有効であることを示した。筋ジストロフィーの増悪化が成熟コラーゲンの産生（線維化）あるいは HIF の不活性化により抑制されるのであれば、アスコルビン酸投与が治療的役割を持つ可能性がある。

参考文献

1.Mssague j, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B: Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. PNAS 83(21):8206-10.1986

2.Hillege MM, Caro RAG, Offringa Cala, de Wit GJ, Jaspers RT, Hoogaars WHM:TGF-b regulates collagen typeI expression in myoblasts and myotubes via transit Ctgf and Fgf-2 expression. Sci Rep 9(2):375. Doi:10.3390/cells 9020375,2020

3.Liu D, Black BL, Derynck R: TGF-b inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. Genes Dev 15(22):2950-2966.2001.

4. Shima A, Pham J, Blanco E, Barton ER, Sweeney HL, Matsuda R: IGF-I and vitaminC promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal muscle cells at low temperatures. Exp Cell Res 317(3):356-366.2011

5. Kikkawa N, Ohno T,Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, Matsuda R: Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice. Cell Str. Funct 34(2):77-88.2009

α-ジストログリカノパチ―の病態解明と糖鎖による治療法の開発研究

分担研究者　遠藤玉夫

研究協力者
萬谷博, 赤阪啓子, 今江理恵子

所属　地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

緒言

α-ジストログリカノパチーは、筋形質膜タンパク質ジストログリカン(DG)の *O*-マンノース（Man）型糖鎖不全によるDGと基底膜ラミニンとの結合障害を原因とする先天性筋ジストロフィー症の一群であり、福山型およびその類縁疾患を含む。我々はこれまでに発症に関わる*O*-Man型糖鎖（コアM3糖鎖）の構造とその生合成経路を解明した[1-3]。コアM3糖鎖には2個のリビトールリン酸（RboP）が含まれ、これらのRboPは、α-ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物であるfukutinとFKRPによって形成される[2]。RboPを含む糖鎖は哺乳類では初めての発見であり、RboP含有糖鎖の意義や合成機構を理解することは、α-ジストログリカノパチーの病態解明や治療法開発を目指す上で重要である。そこで我々は、*O*-Man型糖鎖生合成の詳細なメカニズムを理解するために関連酵素のX線結晶構造解析を進めており、これまでに、POMKとPOMGNT1の結晶構造を解明し、POMKによるコアM3三糖（GalNAc-GlcNAc-Man）のManリン酸（ManP）化とPOMGNT1-fukutin複合体による1番目のRboP転移反応を明らかにした[4,5]。今年度は、2番目のRboP転移酵素であるFKRPの結晶構造解析から、FKRPの基質認識機構と患者変異による影響について検討した[6]。

方法

N末側の細胞質領域と膜貫通領域を除去したFKRPをHEK293細胞で発現・精製し、X線結晶構造解析を行った。FKRPと基質[CDP-Rbo とRboP-GalNAc-GlcNAc-ManP-peptide]との共結晶化により基質認識に関わるアミノ酸を特定した。特定したアミノ酸に変異を導入した変異FKRPを作製し酵素活性を指標にして各アミノ酸の重要性を検証した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーにより溶液中におけるFKRPの重合体形成を確認し、α-ジストログリカノパチー患者変異（Y88F,S221R,L276I）による重合体形成と酵素活性への影響を調べた。

結果

結晶構造からFKRPのゴルジ内腔側領域は、N末側から幹領域と触媒領域に分けられ、幹領域を介した四量体の形成が確認された。基質との共結晶の解析から、触媒ポケットの形成には2分子のFKRPが必要であり、一方の分子の幹領域でManPのリン酸と相互作用し、もう一方の分子の触媒領域でRboPのリン酸とCDP-Rbo、Mg^{2+}イオンと相互作用することが明らかとなった。アルカリホスファターゼによりManPのリン酸を除去した基質[RboP-GalNAc-GlcNAc-Man-peptide]にはFKRPはRboPを転移できず、FKRP基質認識にはManPが必要であることが確認された。患者変異（Y88F,S221R,L276I）を導入した疾患FKRP変異体の酵素活性は顕著に低下した。ゲル濾過クロマトグラフィーによるサイズ分画の結果、溶液中におけるFKRPの複合体形成が確認され、疾患FKRP変異体（Y88F,S221R,L276I）は低分子量画分に検出された。

考察

FKRPは四量体を形成しており、今回調べた疾

患変異（Y88F,S221R,L276I）は四量体形成を阻害することで酵素活性を減少させることが示唆された。1 つの触媒ポケットは二量体により形成され、2 分子の FKRP のそれぞれの触媒領域と幹領域を使って、基質となるコア M3 糖鎖の RboP と ManP のリン酸を捕捉することが明らかとなった。アルカリホスファターゼによる ManP のリン酸除去実験から、幹領域による ManP のリン酸との相互作用が FKRP 活性に必要であることが確認された。こうした構造生物学的な手法は各酵素の詳細な反応機構や機能解析に有用であり、α-ジストログリカノパチーの病態解明および治療法開発への貢献が期待される。

結論

FKRP は四量体を形成し、疾患変異による四量体形成障害は触媒活性低下の原因となることが示された。触媒ポケットは二量体により形成され、コア M3 糖鎖の 2 個のリン酸が FKRP の認識に必要であることが明らかとなった。

参考文献

1. Manya H, Endo T: Glycosylation with ribitol-phosphate in mammals: New insights into the O-mannosyl glycan. Biochim. Biophys. Acta, 1861(10): 2462-2472, Oct, 2017
2. Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manya K, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T: Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. Cell Rep., 14(9): 2209-2223, Mar 8, 2016
3. Manya H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manya K, Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T: The muscular dystrophy gene TMEM5 encodes a ribitol β1-4 xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. J. Biol. Chem., 291(47): 24618-24627, Nov 18, 2016
4. Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y: 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy. Genes Cells, 22(4):348-359, Apr, 2017
5. Kuwabara N, Manya H, Yamada T, Tateno H, Kanagawa M, Kobayashi K, Akasaka-Manya K, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Toda T, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R: Proc Natl Acad Sci U S A, 113(33):9280-5, Aug 16,2016
6. Kuwabara N, Imae R, Manya H, Tanaka T, Mizuno M, Tsumoto H, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Senda T, Endo T, Kato R: Nat Commun., 11(1):303, Jan 16, 2020

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）２）
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

疾患筋におけるメカニカルストレスへの脆弱性が筋ジストロフィー症などにおける筋崩壊の原因になる。一方でメカニカルストレスは、筋の維持、肥大に必須である。メカニカルストレス負荷の適正値を評価する方法は未だ確立されていない。申請者らは、筋における細胞外マトリックスバイオロジーを解明する立場から、この課題に取り組んでいる。疾患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、定量的に負荷する筋細胞システムの精度をさらに高め、形態学的、生化学的に解析を可能にする。本報告には、除神経によるメカニカルストレス免荷の系を用いて、サンプル数を追加した生化学的解析に加え、nNOS の発現と活性を形態学的に定量した結果を示す。

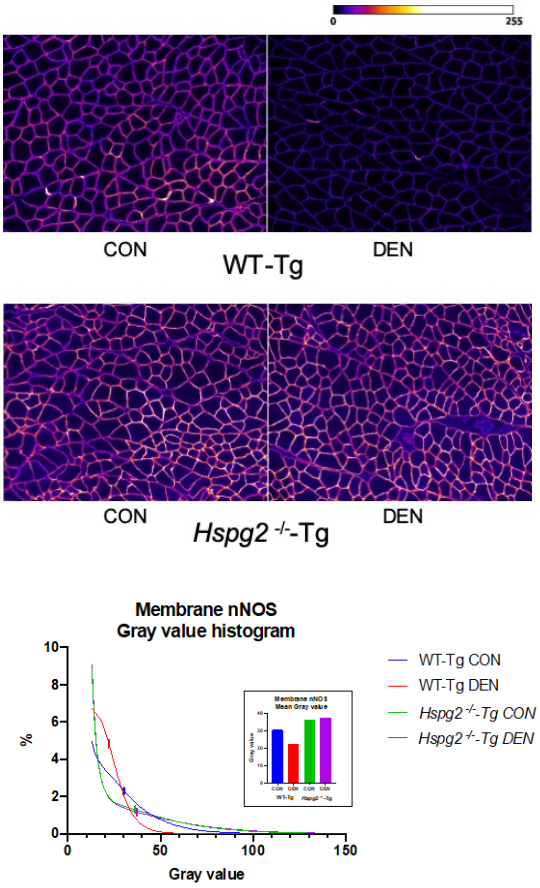
方法

本研究では、周産期致死を回避したのパールカンノックアウト（*Hspg2*$^{-/-}$-Tg）マウスとコントロール（WT-Tg）マウスを使用した。

片足を対象とした坐骨神経切除手術を行い、腓腹筋の除神経を行った（DEN）。もう一方の足は内部コントロールとして偽手術を行った（CON）。手術４日後に腓腹筋を採取し、腓腹筋は液体窒素下で冷却したイソペンタン中で凍結した。凍結サンプルは 10μm 厚で薄切し、抗 nNOS 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。加えて、NOS 活性を測定するために、Frandsen らのプロトコルに従い NADPH 染色を施行した（Frandsen et al., Biochem Biophys Res Commun. 1996）。

結果

細胞膜上の nNOS の発現シグナル強度を疑似カラーで表示した（下図）。細胞膜上の nNOS 発現のシグナル強度を解析したところ、WT-Tg では除神経に伴い、シグナル強度の低下が見られたが、*Hspg2*$^{-/-}$-Tg では除神経後もシグナル強度の低下が見られなかった。



考察

以前本研究班で報告した細胞質画分を用いたウエスタンブロッティングにより、WT-Tg マウスでは除神経後の細胞質 nNOS 量が増加したが、*Hspg2* $^{-/-}$-Tg マウスでは増加が見られなかった。さらに、タンパク分解に関連する FoxO1a、FoxO3a、Atrogin-1、および Lys48-ポリユビキチン化タンパク質の発現量は、WT-Tg マウスの除神経筋で増加が見られたが、*Hspg2* $^{-/-}$-Tg マウスでは増加が抑制されていた。*Hspg2* $^{-/-}$-Tg ではメカニカルストレスの減弱に伴う nNOS の細胞質への移行が抑制されることで、FoxO 系タンパク分解シグナルの活性化が抑制され、筋萎縮が抑制されると考察された。今回の結果は、以前報告したウエスタンブロッティングでの結果を支持するものと考えられた。

結論

筋の肥大と萎縮においてメカニカルストレスを制御する細胞外環境の重要性が示唆された。

参考文献

1 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

2 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).

3 *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.

4 *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.

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 Sato K, Kerever A, Kamagata K, Tsuruta K, Irie R, Tagawa K, Okazawa H, Arikawa-Hirasawa E, Nitta N, Aoki I, Aoki S. Understanding microstructure of he brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain *Acta Radiol Open.* 2017 Apr 17;6(4):2

7 Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A.Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2017 Oct 5.

8 Yamada T, Kerever A, Yoshimura Y, Suzuki Y, Nonaka R, Higashi K, Toida T, Mercier F, Arikawa-Hirasawa E Heparan sulfate alterations in extracellular matrix structures and fibroblast growth factor-2 signaling impairment in the aged

neurogenic niche. *J Neurochem*. 2017 Aug;142(4):534-544.

9 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Urao M, Yamataka A.The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatr Surg Int.* 2017 Oct 10.

10 Irie R, Kamagata K, Kerever A, Ueda R, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yoshizawa H, Hayashi A, Tagawa K, Okazawa H, Takahashi K, Sato K, Hori M, Arikawa-Hirasawa E, Aoki S.The Relationship between Neurite Density Measured with Confocal Microscopy in a Cleared Mouse Brain and Metrics Obtained from Diffusion Tensor and Diffusion Kurtosis Imaging. *Magn Reson Med Sci.* 2017 Dec 7.

筋分化システム解析に基づいた難治性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

分担研究者　土田邦博
研究協力者　常陸圭介１），中谷直史１），永岡唯宏１），上田洋司１），草野大樹１,2)、大野欽司 2)
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）名古屋大学　大学院医学系研究科
　　神経遺伝情報学

緒言

生体最重量器官である骨格筋は、筋ジストロフィーを中心とした遺伝性難治疾患、神経原性筋萎縮、慢性炎症、がん悪液質等の病態で障害される。筋組織は、筋衛星細胞からの精密な分化システムが働くことで形成される。筋分化システムを理解し、筋病態を解明し治療法開発を多面的に推進させることは重要である。近年、200 塩基以上の長鎖非翻訳 RNA（lncRNA)の機能解析が進み、筋萎縮・筋肥大、筋分化に寄与することが解明されている。マイオジェニンのプロモーター領域由来の lncRNA（*myoparr*)の解析を進行させた。複数の筋萎縮モデルと筋肥大モデルで、筋分化やゲノムインプリンティング制御に関わる 12 種の lncRNA の発現変化を精査し、共通の分子機構を探索した。筋疾患の病態の中で、骨格筋内異所性骨化が観察されるが治療法は限定的である。骨化の起源となるヒト骨格筋由来の PDGFRα陽性間葉系前駆細胞の骨分化培養系を駆使して、骨分化抑制効果のある既存薬 320 種をスクリーニングした。最後に、エクソソーム（小型分泌型膜小胞）の解析を推進させた。ユビキチン様タンパク質（UBL3)が、ユビキチンとは異なった翻訳後修飾活性を持ち、多胞体を介してエクソソームとして特定タンパク質の細胞外への輸送に関与することを見出し解析を推進させた。

方法

マイ オジェニンは、MyoD, Myf5, MRF4 とともに筋分化に必須の HLH 型転写因子である。筋形成過程で MyoD に続いて発現が誘導され、最終分化に寄与する。除神経時に再誘導され、ユビキチン・プロテアーゼ系の活性化により筋萎縮を惹起する。マイ オジェニン遺伝子プロモーター由来のアンチセンス型の新規 lncRNA の作用を詳細に解析した。プロテオミクス解析を駆使して会合する RNA 結合タンパク質として Dead box 型 転写因子 Ddx17を同定し、マイ オジェニンの発現誘導調節機構を詳細に解析した。神経遮断による筋萎縮に対して、*myoparr*抑制核酸投与による萎縮の緩和効果を調べた。６種類の筋萎縮モデルと２種類の筋肥大モデルにおいて、１２種類の lncRNA の発現を精査した。共通に発現変動を示す分子を抽出した。

筋疾患では、筋変性と共に筋肉内脂肪変性や異所性骨化が生じる。ヒト骨格筋試料を用いて、間質に存在する間葉系幹細胞を増殖させ、アルカリフォスファターゼとアリザリンレッド染色を定量し、骨化抑制薬のスクリーニングを行い阻害薬を同定した。

結果

筋分化の主要制御転写因子の１つである マイ オジェニン遺伝子のプロモーター近傍から発現する約 1.4kb の lncRNA を同定した。マイ オジェニン遺伝子発現を活性化して、筋芽細胞が運命決定されるために必須であること、活性には転写補因子の Ddx17 との会合が重要であることを示した １)。マイ オジェニン遺伝子の発現に影響以外に、筋特異的 miRNA の発現調節を介して細胞周期を制御することを見出した。*myoparr*が神経原性筋萎縮に関与しており、発現阻害により筋萎縮を緩和することを見出した１)。神経遮断、ギブス固定、尾部懸垂、デキサメタゾン投与、がん悪液質、飢餓の６種

の筋萎縮モデルおよびメカニカル負荷とミオスタチン遺伝子破壊の２種の筋肥大モデルで、筋分化関連の９種の lncRNA とゲノム刷り込みに関与する３種の lncRNA の発現変動変化をクラスター解析した。LncMyod と linc-MD1 の発現によって筋萎縮を２つのグループに分けられること、Gtl2, IG-DMR, DUM1 の変動が筋重量変化と相関することを示した２)。抗ヒスタミン薬であるデスロラタディンが、BMP シグナルを制御することで骨分化を抑制すること、アキレス腱切断により筋・腱近傍の異所性骨化を抑制することを示した３)。

考察

筋疾患の病態を考える上で、筋分化・再生能の制御の破綻、筋萎縮、筋内骨化が重要である。マイオジェニンの発現に必須の lncRNA を発見し、筋萎縮の新たな標的となることを示した。筋萎縮および筋肥大モデルで、lncRNA の発現変動を統計的に精査し、共通に変動する分子を抽出しカタログ化した。エクソソームは、miRNA やタンパク質を内包し、細胞間コミュニケーションを担う新たな機構を担う。間葉系幹細胞が分泌するエクソソームを疾患治療に応用する動きが国内外である。新たな翻訳後修飾活性を持ち、エクソソーム輸送に関与する分子の解析を進めた４)。

結論

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した。筋萎縮および筋肥大モデルで発現変動する lncRNA 群を抽出した。ユビキチン化とは異なった分子機構で、エクソソームへのタンパク質の輸送に重要な役割を果たす因子を解析した。これらを統合して、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。

参考文献

1. Hitachi K, Nakatani M, Takasaki A, Ouchi Y, Uezumi A, Ageta H, Inagaki H, Kurahashi H, Tsuchida K. Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation. EMBO Reports 20(3):e47468, 2019
2. Hitachi K, Nakatani M, Funasaki S, Hijikata I, Maekawa M, Honda M, Tsuchida K. Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation. Int J. Mol. Sci. 21:1628, 2020
3. Kusano T, Nakatani M, Ishiguro N, Ohno K, Yamamoto N, Morita M, Yamada H, Uezumi A, Tsuchida K. Desloratadine inhibits heterotopic ossification by suppression of BMP2-Smad1/5/8 signaling. J. Ortho. Res. 1-8, 2020 DOI: 10.1002/jor.24625
4. Ageta H, Tsuchida K. Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs. Cell. Mol. Life Sci. 76:4829-4848, 2019

生体関連化合物の分子認識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 1)

研究協力者
谷口敦彦 1)、髙山健太郎 1)、田口晃弘 1)、伊東史子 2)、根岸洋一 3)、池山弘晃 1)、大村紀子 1)、岡本英之 1)、小林理奈 1)、宇佐美翔哉 1)、小田切美樹 1)、嶋野慶樹 1)、向山慧 1)、大房莉奈 1)、澤田直志 1)、古屋結衣 1)、臼井健郎 4)

所属
1）東京薬科大学　薬学部　薬品化学
2）東京薬科大学　生命科学部　心血管医科学
3）東京薬科大学　薬学部　薬物送達学
4）筑波大学　生命環境系

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異による重篤な進行性筋変性疾患であり、本疾患の約 20%はナンセンス変異に起因する。我々は、ナンセンス変異読み飛ばし（リードスルー）活性を有するジペプチド型抗生物質（+）–ネガマイシン [1]（**1**）を礎としたリードスルー薬創製研究を展開してきた。これまでに天然類縁体 3-エピ-5-デオキシネガマイシンや合成誘導体 TCP-112（**2**）が良好な活性を示すことを見出した。また、これらを親化合物としたエステル型プロドラッグを複数得ることにも成功した [2-4]。更に、誘導体 **2** の 3 位アミノ基に非天然アミノ酸を導入した誘導体 TCP-1109（**3**）では、TGA 変異において **1** の約 10 倍強力なリードスルー活性を有することを見出した。本年度は、誘導体 **3** の詳細なリードスルー活性を評価するべく、濃度依存性評価および他のナンセンス変異（TAG、TAA 配列）に対する活性評価を実施した。

一方、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の一つとして、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。創薬標的としての本因子の重要性は、ヒト及び複数の動物において、当該因子の遺伝子異常に因るマイオスタチン関連筋肥大症の報告などから明らかである。従って、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マイオスタチン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 **4**（23 残基、IC_{50} = 3.56 μM）及びその高活性誘導体 **5**（22 残基、IC_{50} = 0.32 μM）、さらには環状化体（22 残基、IC_{50} = 0.26 μM）及び小型化誘導体（16 残基、IC_{50} = 0.13 μM）をそれぞれ報告している [6–9]。本年度は、小型化誘導体 MIPE-1686 に関して、二次構造解析と酵素溶液中での安定性試験を実施し、生体内での安定性に関する知見の獲得を目指した。また一方で、新たなマイオスタチン阻害ペプチドの創薬プラットフォームの獲得を目的に、フォリスタチンの N 末端ドメインに着目した探索研究を実施した。さらに、ペプチド **4** に光酸素化触媒を導入することで、光照射に伴って効率的にマイオスタチンを不活化させる機能化ペプチド **6** も報告した [11]。

ところで、福山型筋ジストロフィー及びその類縁疾患では、α-ジストログリカン糖鎖形成能が低下している。シチジン二リン酸リビトール（CDP-Rbo）は本糖鎖形成に必須な酵素基質となるため、CDP-Rbo を補充して糖鎖形成を回復させる療法が提案されている。しかし、本療法では CDP-Rbo の低い細胞内透過性が障壁となる。そこで、我々は CDP-Rbo に細胞膜透過性機能分子を付加した誘導体 **7** を合成した。

方法、結果、考察

１）TCP-1109（**3**）のリードスルー活性評価

まず、未熟終止コドン（PTC）として TGA を含む DMD 疾患由来配列を導入した、デュアルレポータープラスミドを COS-7 細胞に導入し、誘導体 **3** のリードスルー活性評価を行った。その結果、誘導体 **3** は濃度依存的にリードスルー活性を増強することを確認した。当該活性は、天然物において最も高活性なアミノグリコシド

G418 の活性よりも約 2 倍高値であった。また、TGA 配列以外の PTC（TAG、TAA 配列）に対する当該活性の評価も実施し、誘導体 **3** は両配列に対しても比較的高い活性（TGA ： 18.3, TAG：4.39, TAA：2.24）を示すことが明らかとなった[5]。

２）小型マイオスタチン誘導体の二次構造／安定性解析

MIPE-1686 をはじめとする構造活性相関（SAR）研究で合成した一連の 16 残基阻害ペプチド誘導体の二次構造解析を実施した。ペプチドは、10%TFE を含むリン酸バッファーに溶解し、円二色分散計を用いて CD スペクトル解析に付した。これまでに 23 残基のペプチド **4** が、プロドメインタンパク質中と同様にαヘリックス形成能を示す一方で、高活性化誘導体 **5** がβシート形成能を示すことがわかっている[6,7]。ペプチド **4** の C 末端 16 残基フラグメントを小型化のための SAR においてリード化合物として用いたが、本ペプチド **4** はαヘリックス形成能を示した。一方で、マイオスタチン阻害活性の向上とともにβシート形成能の増大が観察された[9]。MIPE-1686 は、76%がβシート、残りの 24%がランダムコイル、という解析結果であった。即ち、ペプチドの阻害能とβシート形成能は相関している可能性が示唆された。

次に、N 末端未修飾の直鎖ペプチドである MIPE-1686 の酵素溶液中での安定性について検討した。アミノペプチダーゼ N、キモトリプシン C、トリプシン 3 の 3 種のリコンビナント蛋白質（ヒト由来）に対して、いずれも 37℃で少なくとも 4 時間半以上安定に存在できることが HPLC 解析により明らかとなった。各種 16 残基ペプチドの酵素に対する安定性を評価したところ、上述のβシート形成能との一定の相関がみられた。本結果より、MIPE-1686 は生体内で安定に存在できる可能性が示唆されたため、*in vivo* での検討を促進していきたい。

３）フォリスタチン由来マイオスタチン阻害ペプチドの獲得

フォリスタチンは生体内でアクチビンやマイオスタチンに結合して、その機能を制御するタンパク質として知られている。ペプチド **4** の獲得において、その由来の前駆体プロドメイン N 末端領域がマイオスタチンの I 型受容体結合部位に相互作用していることに着目した。即ち、当該部位に相互作用するフォリスタチンの N 末端ドメイン（ND）に由来する新規マイオスタチン阻害ペプチドが獲得できるのではないかと考えた。ND に由来する区分ペプチドを各種合成し、HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによりマイオスタチン阻害活性を評価した。その結果、14 残基からなる新規ペプチド DF-3 の獲得に成功した[10]。今後、誘導体の高活性化を試みていく。

４）光酸素化によるマイオスタチン不活化

当研究室で開発された 23 残基のマイオスタチン阻害ペプチド **4** に、光酸素化触媒を導入した機能化ペプチド **6** を合成した。ペプチド **6** は光照射によってマイオスタチンの光酸素化を起こした。酸素化されたマイオスタチンは顕著に活性を失っていた。本光酸素化によってペプチド **6** はペプチド **4** よりも低濃度で効率的にマイオスタチン活性を抑制した。

５）細胞膜透過性 CDP-Rbo 誘導体の創製

CDP-Rbo の低い細胞膜透過性を克服するための、CDP-Rbo 誘導体 **7** を合成した。

結論

リードスルー薬創製研究では、ネガマイシン誘導体 TCP-1109（**3**）が、TGA 配列において濃度依存的なリードスルー活性を示した。また、TAG および TAA 配列に対しても良好な活性を示すことがわかった。従って、本誘導体はナンセンス変異に起因する DMD 治療薬候補化合物として期待される。

マイオスタチン阻害ペプチド創製研究において、小型化ペプチド MIPE-1686 が高いβシート形成能を有していることが確認された。また N 末端未修飾の直鎖ペプチドであるにも関わらず、極めて高い酵素分解耐性を示すことが明らかとなり、今後の *in vivo* 展開の推進が期待される。また、フォリスタチンに由来する新規ペプチド DF-3 の同定に成功し、今後、新たな高活性化ペプチドの創製への弾みとなった。さらに、マイオスタチン阻害ペプチドを基盤とし、光酸素化によるマイオスタチン不活化という新しい阻害戦略を提案できた。

細胞膜透過性CDP-Rbo 誘導体**7**については、今後 *in vitro* 活性評価によって糖鎖回復効果を検討する予定である。

参考文献

(1) Arakawa M., *et al*., J. Biochem. 134, 751-758 (2003).
(2) Taguchi A., *et al.*, ChemMedChem 9, 2233-2237 (2014).
(3) Hamada K., *et al.*, ACS Med. Chem. Lett. 6, 689-694 (2015).
(4) Taguchi A., *et al*., ACS Med. Chem. Lett. 8, 1060-1065 (2017).
(5) Hamada K. *et al.*, ACS Med. Chem. Lett. 10, 1450-1456 (2019).
(6) Takayama K., *et al.*, J. Med. Chem. 58, 1544-1549 (2015).
(7) Takayama K., *et al*., ACS Med. Chem. Lett. 8, 751-756 (2017).
(8) Rentier C., *et al*., Bioorg. Med. Chem. 27, 1437-1443 (2019).
(9) Takayama K., *et al*., ACS Med. Chem. Lett. 10, 985-990 (2019).
(10) Saitoh M., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 30, 126892 (2020).
(11) Okamoto H., *et al.*, Chem. Commun. 55, 9108-9111 (2019).

代謝性ミオパチーが示す病態スペクトラムの解明と病態に即した診断・治療法の開発

分担研究者　杉江　秀夫 1）
研究協力者　福田　冬季子 2）、杉江　陽子 2）、平出　拓也 2）、漆畑　伶 2）
所属
1）　常葉大学保健医療学部
2）　浜松医科大学小児科

緒言

代謝性ミオパチーの症状は exercise intolerance あるいは static/slowly progressive weakness に大別される。本症では二次的な代謝変容の賦活により、さらに広範な臓器障害や新たな代謝障害を合併することもあり、幅広い症候を示す Metabolic Myopathy Spectrum（MMS）と考えられる。今回筋型糖原病 IIIa 型（Cori 病）および V 型（以下 McArdle 病）について食事療法治療経過と基礎病態について検討した。

方法

（１）糖原病 IIIa 型：多施設において個々に倫理委員会承認を受け、「糖原病 IIIa 型および IIId 型に対する修正アトキンス食事療法の効果」の課題で UMIN 試験 ID (UMIN000023132)登録を行った。多くの症例において入院前は総カロリーの 80%以上を糖質が占めていたが、入院後糖質を徐々に漸減し、20～50g/日 (総カロリーの 10～20%)を目標に炭水化物を漸減した。心電図、心エコー、BNP などの心機能、血清 CK、肝機能などの検査を継時的に行った。観察期間は全例 6 か月以上であった。

（２）McArdle 病；Origene 社の *PYGM* cDNA を挿入した Plasmid Vector を使用し、欧米に多い p.Arg50 変異、日本人に多い p.Phe710del を挿入した cDNA を作成し、HEK293 細胞にトランスフェクト後培養液にビタミン B6 を 500μM 添加してホスホリラーゼ活性、ホスホリラーゼ蛋白を Western blot で比較した。またバルプロ酸を添加してホスホリラーゼ活性を C2C12 細胞で myoblast、myotube の stage でのホスホリラーゼ活性の変化を検討した。

結果

（１）全例で心機能・心筋障害マーカーの改善がみられるとともに、運動能力、CK の改善も併せて見られる症例もあった。食事療法を継続できなかった 4 例では心筋障害、筋障害の再悪化を見た。

（２）ホスホリラーゼ活性は p.Arg50 ではビタミン B6 添加前後では活性の増加はなく、ほぼ活性はゼロであった。一方 p.Phe710del ではビタミン B6 添加前で約 5%程度、ビタミン B6 添加後約 15%と活性の増加が認められた。バルプロ酸を C2C12 細胞に添加することで myoblast 、myotube の細胞においてホスホリラーゼの活性は増加した(有意差なし)。

考察

糖原病 IIIa 型患者への低炭水化物食による食事療法が有効であることが判明した。特に心筋障害への効果は患者の生命予後を改善する意味で重要である。

本食事療法の問題点として、①継続性、②肝機能障害の改善不良、③高脂血症の増悪などが挙げられた。今後の課題として炭水化物の制限の基準作りが必要である。McArdle 病では欧米の症例に比較すると本邦症例のではビタミン B6 の効果が良い。これは欧米の null mutation に比較して日本人の好発変異では B6-binding site が保持されていることなどが関連していると思われた。また histon deacetylase inhibitor であるバルプロ酸は脳型ホスホリラーゼの再活性化を促進する作用が期待されゼ McArdle 病の付加療法として期待される。

結論

心筋障害を合併する GSDIIIa 型では低炭水化物+高蛋白食/脂肪食が有効である。また日本人 McArdle 病では、特に好発変異（p.Phe710del）を持つ症例ではビタミン B6 投与が治療選択とすべきである。

参考文献

1. Kishnani PS, Austin SL, Arn P et al. Genet Med. 12:446-63 (2010)
2. Sentner CP, Caliskan K, Vletter WB, et al. JIMD Rep. 5:13-6 (2012)
3. Quinlivan R, Martinuzzi A, Schoser B. Cochrane Database Syst Rev. (2014) Nov12;(11)
4. Sato S, Ohi T, Nishino I, Sugie H. Muscle Nerve. 45:436-40 (2012)
5. de Luna N, Brull A, Guiu JM, et al. Dis Model Mech. 8(5):467-72 (2015)

筋原線維異常と筋変性を伴う遺伝性筋疾患の分子機構の解明

分担研究者　　遠藤　剛 1)
研究協力者　　高野和儀 1)，西野一三 2)

所属
1) 千葉大学大学院理学研究院 生物学研究部門
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

本研究では，次の 3 つのことがらについて解明することを目的とする．

(1) これまでに，骨格筋筋原線維のアクチン線維形成は nebulin (Neb)–N-WASP 複合体を介してもたらされることを明らかにし，そのシグナル伝達機構と分子機構を解明してきた．*NEB* の突然変異により，筋原線維形成異常を伴うネマリンミオパチー (NM) が発症する．そこで Neb および N-WASP の遺伝子改変マウスを用いて，NM の発症と病態の分子機構を解明する．

(2) BIN1 の突然変異を介した N-WASP の局在異常により中心核ミオパチー (CNM) が発症する．そこで N-WASP の核から細胞質への移行の分子機構，ならびに骨格筋における BIN1–N-WASP による周辺核化の分子機構を解明する．これについてはこれまでに，N-WASP の核から細胞質への移行には，Fyn による N-WASP Tyr256のリン酸化が働いていることを明らかにした．

(3) 筋ジストロフィーでは筋再生における筋細胞分化の不全がみられる．また myostatin (Mstn) を介した筋萎縮が起こる．一方，サルコペニアでは GDF11 により筋萎縮が起こる．Ras–ERK 経路は骨格筋細胞分化や筋再生に対して抑制的に働く．私たちが発見した DA-Raf は，Ras に結合することにより ERK 経路の拮抗因子として機能する．そこで DA-Raf が骨格筋細胞分化誘導因子として筋再生に働くとともに，筋萎縮抑制にも働いていることを明らかにし，これらの分子機構を解明する．

今年度は特に (2) と (3) について，CNM の発症機構および骨格筋細胞分化と筋形成における PI(4,5)P_2 (PIP_2) と N-WASP の役割を解析した．さらに Mstn や GDF11 による筋細胞分化阻害を ERK 経路阻害剤や DA-Raf が解除することを明らかにした．これらの結果は，遺伝性筋疾患や加齢による筋萎縮の予防や治療の手がかりとなることが期待される．

方法

BIN1 と N-WASP の結合は，GST–N-WASP を用いた pull-down アッセイにより解析した．

マウス骨格筋 C2C12 細胞を 10% FBS を含む増殖培地から 5% 馬血清を含む分化培地に移すことにより，分化を誘導した．細胞膜 外層の PIP_2の局在をみるために，3.7% PFA, 0.1% glutaraldehyde で固定した未透過の C2C12 細胞に PIP_2 mAb KT10 を作用させ，免疫蛍光染色により PIP_2を検出した．また分化培地中に mAb KT10 をさまざまな濃度で加え，C2C12 細胞の分化を 免疫蛍光染色と イムノブロッティング (IB) により解析した．

C2C12 細胞に 500 ng/ml Mstn や GDF11 を作用させた．DA-Raf の強制発現は retrovirus の系で行った．DA-Raf, myogenin，筋特異的蛋白質の発現，および活性化 P-ERK のレベルは IB と免疫蛍光染色により解析した．

結果

(A) CNM における PIP_2と N-WASP の役割

細胞膜内層の PIP_2に結合した BIN1 は N-WASP を介してアクチン線維形成を引き起こし，中心核から周辺核への移行に働いている．そこで BIN1 と N-WASP がどのような相互作用を介して結合するかを解析した．CNM でみられる BIN1 の BAR ドメイン突然変異体 BIN1(D151N/R154Q) では，N-WASP の Pro-rich 領域との結合が弱いことが，pull-down アッセイにより示された．また CNM でみられる BIN1 の SH3 ドメイン突然変異体 BIN1(K436X) は，N-WASP の Pro-rich 領域にまったく結合しなかった．したがって CNM につながるアクチン線維形成不全は，BIN1 の SH3 ドメインと N-WASP の Pro-rich 領域との相互作用の欠如により起こると考えられる．

(B) 筋細胞分化における細胞膜外層の PIP_2の役割

細胞膜内層の PIP_2は dynamin2–Tks5–N-WASP を介してアクチン線維束形成を引き起こし，これがさらに podosome 形成を介して筋細胞融合に働いている．PIP_2は floppase により細胞膜外層にも移行する．そこで筋細胞分化における外層のPIP_2の機能を調べた．まず，固定した 未透過の C2C12 細胞に PIP_2 mAb KT10 を作用させて，外層の PIP_2の局在を調べた．外層のPIP_2は，筋細胞同士の接着面に局在していたことから，筋細胞融合を含めて筋細胞分化に働いている可能性が示唆された．次に，PIP_2の阻害抗体として働く KT10 を分化培地中に加えて培養すると，活性化 P-Akt のレベル，myogenin と筋特異的蛋白質の発現，および筋細胞融合が顕著に阻害された．

これらの結果から，外層のPIP_2は筋細胞分化において筋特異的蛋白質の発現および筋細胞融合の両者に働いていることが明らかになった．

(C) Mstn と GDF11 による骨格筋細胞分化阻害に対する DA-Raf の作用

分化培地中の C2C12 細胞に Mstn または GDF11 を作用させると，いずれの場合にも ERK 経路が活性化され，myogenin と 筋特異的蛋白質の発現および筋細胞融合が顕著に阻害された．また DA-Raf の発現も低下した．それに対し，ERK 経路阻害剤を作用させた場合には，DA-Raf の発現が誘導され，筋細胞融合が促進された．また Mstn や GDF11 と ERK 経路阻害剤を同時に作用させると，DA-Raf の発現が誘導され，Mstn や GDF11 による分化阻害が解除された．一方，C2C12 細胞に DA-Raf を強制発現させると，筋細胞分化が促進された．また DA-Raf を強制発現させた C2C12 細胞に Mstn や GDF11 を作用させた場合には，Mstn や GDF11 による分化阻害が解除され，筋特異的蛋白質の発現と筋細胞融合が誘導された．したがって DA-Raf は，Mstn や GDF11 の non-Smad シグナリングの一つである Ras–ERK 経路による骨格筋細胞分化の阻害を解除して，筋細胞分化を誘導することが明らかになった．

考察／結論

CNM には複数の型が存在するが，このうち常染色体劣性型 CNM は BIN1 の BAR ドメイン，(PIP_2に結合する) PI ドメイン，(dynamin 2 と N-WASP に結合する) SH3 ドメインの突然変異によって起こる．本研究により，CNM でみられる SH3 ドメイン突然変異体は N-WASP の Pro-rich 領域に結合できないことが示された．したがって CNM につながるアクチン線維形成不全は，BIN1 の SH3 ドメインと N-WASP の Pro-rich 領域との相互作用の欠如により起こると考えられる．

細胞膜内層の PIP_2は dynamin2–Tks5–N-WASP を介してアクチン線維束を形成し，これが podosome 形成を通して筋細胞融合に働いている．一方，本研究によりさらに，細胞膜外層の PIP_2が筋細胞分化における筋特異的蛋白質の発現および筋細胞融合の両者に働いていることが明らかになった．PIP_2の阻害抗体により 活性化 P-Akt のレベルが低下したことから，外層の PIP_2は PI3K–Akt シグナリングを活性化することにより myogenin などの筋特異的転写因子の発現を誘導して，筋細胞分化に働いている可能性が考えられる．

Mstn や GDF11 による骨格筋細胞分化阻害や筋萎縮は，おもに Smad シグナリングを介して Akt が阻害されることによると考えられている．しかし 本研究により，non-Smadシグナリングの Ras–ERK 経路も骨格筋細胞分化阻害に深くかかわっており，ERK 経路阻害剤や DA-Raf がこの阻害を解除して筋細胞分化を誘導することが明らかになった．今後は，筋ジストロフィーなどの遺伝性筋疾患や，加齢による筋再生不全や筋萎縮が，ERK 経路阻害剤や DA-Raf の発現誘導により改善されるかどうかを検討する．これにより筋再生不全や筋萎縮の予防や治療の手がかりが得られることが期待される．

参考文献

(1) Yokoyama, T., 6 authors, Endo, T.: *J. Cell Biol.* 177: 781–793 (2007).

(2) Takano, K., 7 authors, Endo, T.: *Science* 330: 1536–1540 (2010).

(3) Watanabe-Takano, H., 5 authors, Endo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2291–E2300 (2014).

(4) Watanabe-Takano, H., 5 authors, Endo, T.: *PLoS One* 10: e0127888 (2015).

(5) Endo, T.: *Bone* 80: 2–13 (2015).

(6) Kanno, E., 3 authors, Endo, T.: *Exp. Cell Res.* 362: 111–120 (2018).

(7) Takahashi, K., 2 authors, Endo, T.: *Exp. Cell Res.* 376: 168–180 (2019).

(8) Endo, T.: *Exp. Cell Res.* 387: 111775 (1–12) (2020).

遺伝性筋疾患の病態解析と遺伝子／蛋白質治療に関する研究

分担研究者　斉藤史明
所属　帝京大学医学部神経内科

緒言

筋強直性ジストロフィー１型は dystrophia myotonica protein kinase（*DMPK*）遺伝子の 3’非翻訳領域に存在する CTG リピートの異常伸長が原因である。この mRNA が核内で RNA foci と呼ばれる凝集体を形成し、そこにスプライシング調節因子 MBNL1 がトラップされる。この結果種々の遺伝子のスプライシング異常が生じることにより本症が発症する。一方 CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術が飛躍的な進歩を遂げ医療分野における応用も急速な広がりを見せている。本研究はゲノム編集による *DMPK* 遺伝子 CTG リピート配列の切断・除去、あるいは転写抑制による治療法開発へ向けての基礎的なデータを収集することを目的として行われた。さらに将来的な臨床応用へ向けて特に重要と考えられる予期せぬ遺伝子変異の発生、すなわち off-target 効果について先進的かつバイアスのかからないゲノムワイドな手法を用いて検討を行った。

方法

DMPK 遺伝子 3’非翻訳領域に存在するリピート配列の 5’側と 3’側に guide RNA を設計した。そして通常の Cas9 nuclease を用いる方法および Cas9 nickase を用いるダブルニッキング法により患者由来の線維芽細胞に対してゲノム編集を行った。リピート配列の切断・除去はサンガーシーケンスにより確認した。また *DMPK* 遺伝子の転写開始点近傍に guide RNA を設計し CRISPR interference 法（CRISPRi）により同遺伝子の転写抑制を行った。さらに CTG 配列に対する RNA プローブを作成し RNA FISH 法により核内 RNA foci の検出・定量を行った。Off-target 効果の検出は LAM-HTGTS（Linear Amplification-mediated High-Throughput Genome-Wide Translocation Sequencing）法 [1]を用いて行った。

結果

我々は過去２年間の本分担研究において、①通常の Cas9 nuclease を用いる方法および Cas9 nickase を用いるダブルニッキング法の両者において、*DMPK* 遺伝子の CTG リピート配列を切断・除去することが可能なこと、②このリピートの除去により核内の RNA foci 形成が高度に抑制されること、③その結果 MBNL1 の RNA foci へのトラップも解除されることを示してきた。本年度は始めに LAM-HTGTS を用いた off-target 効果の検討を行った。本法は off-target に生じた DAN の２重鎖切断が on-target の２重鎖切断と結合する事を利用して off-target 部位を検出する方法である。この結果通常の Cas9 nuclease を用いる方法では全ゲノム上に６カ所の off-target 部位を確認した。一方でより配列特異性が高いと考えられているダブルニッキング法では、予想に反して 24 カ所の off-target 部位が確認された。さらに驚くべき事に on-target 部位において Cas9 nuclease による切断では 20 kb、ダブルニッキング法では 60 kb に及ぶ巨大な欠失が検出された。このような予期せぬゲノム上の変異が見い出されたことから、DNA 切断を伴わなずより安全と考えられる CRISPRi を試みた。この結果定量的 RT-PCR により DMPK 遺伝子の mRNA への転写は減少し、RNA foci の形成も有意に抑制されることを明らかにした。

考察

安全性が高いと考えられていたダブルニッキング法で通常の Cas9 nuclease よりも多くの off-target 部位と、より大きな on-target 部位の欠失を検出した。この詳細なメカニズムは不明であるが、ニックが生じた状態で染色体の複製が起こるとこの部位に二重鎖切断が生じることが知られており [2]これが一因かもしれない。一方でゲノムの切断を伴わない CRISPRi によっても RNA foci の抑制効果が示されたことから、より安全な方法として今後注目すべきと考えられた。

結論

1）通常の Cas9 nuclease およびダブルニッキング法の両者で予期せぬ遺伝子変異を認め、特に後者で顕著であった。

2）ゲノム切断を伴わずより安全性の高いCRISPRi によっても RNA foci の抑制は可能であり今後注目すべき方法と考えられる。

参考文献

1) Frock RL, et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. Nat Biotechnol. 2015; 33: 179-186.
2) Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.2001; 98: 8241-8246.

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、膜修復の破綻は三好型筋ジストロフィー、肢体型筋ジストロフィーの発症に至る。しかし細胞膜融合の根幹である「膜融合における膜構造・物性変化の制御機構、さらに細胞融合を経て各器官固有の形態・機能に至る分子基盤」について、未だその全容は明らかではない。我々はこれまでの結果（文献１）に基づき、本年度はリン脂質動態を感知するイオンチャネル PIEZO1 の筋再生時の機能解明を試みた。

方法

Piezo1 欠損マウス(Piezo1t$^{m1c(KOMP)Wtsi}$)を UCDavis マウスリソースセンターより入手した。本マウスの全身性欠損は胎生致死のため、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）を用いて掛け合わせを行った。マウスについては 6～12 週令を用い、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いた。

結果

これまでの申請者の研究により、PIEZO1 は筋芽細胞からの筋管形成に関わることが示された（文献１）。一方、インシリコ解析の結果、PIEZO1 は筋芽細胞だけでなく、筋衛星細胞にて高く発現することが明らかになった。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。同マウスより単離した筋線維について PIEZO1 を検出したところ、筋衛星細胞にて PIEZO1 の発現が認められた。一方で、成熟筋線維では tdTomato の蛍光はほとんど検出されなかった。この現象についてウェスタンブロット解析でも同様な結果が得られたことから、PIEZO1 は未分化の筋衛星細胞に高発現することが示された。

続いて本研究では、筋衛星細胞における PIEZO1 の役割解明を目指した。*Piezo1* の全身性欠損は胎生致死を示すことから、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。骨格筋の再生過程を観察するために、筋線維融解作用を持つヘビ毒（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。カルジオトキシン適用１週間後に *Piezo1* 欠損マウスの前脛骨筋を単離し組織学的解析を行ったところ、*Piezo1* 欠損マウスでは、免疫細胞の浸潤、線維化、筋線維断面積の低下などの表現型を呈し、筋再生能が著しく低下していることを見出した。

続いて筋衛星細胞での PIEZO1 の役割解明のため、同欠損マウスより筋線維を単離後、筋線維上で筋衛星細胞を２日間培養し、筋衛星細胞の活性化時の様子を観察した。免疫染色法を用いて筋衛星細胞を抗 Pax7 抗体にて検出したところ、欠損型では筋線維１本あたりの筋衛星細胞数が減少しており、筋衛星細胞の増殖能の著しい低下が認められた。

考察

本研究を通じて、機械受容イオンチャネル PIEZO1 は筋衛星細胞にて高発現し、骨格筋の再生に重要な役割を果たすことが示唆された。インシリコ解析および PIEZO1-tdTomato マウ

スの解析により、PIEZO1 は筋衛星細胞に強く発現し、筋衛星細胞の増殖に関わること示された。我々は、先行研究により、PIEZO1 依存的なカルシウム流入は、RhoA/ROCK 経路を介したアクトミオシン形成に関わることを見出した（文献１）。筋衛星細胞にて、PIEZO1 を介した細胞骨格の再編成がどのような機能をもたらすのか、あるいは細胞骨格とは別経路の活性化に関わるのか、などを今後明らかにすることで、骨格筋再生機構の全容解明をめざしたい。

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疾患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。また現在、他の機械受容イオンチャネルについても解析を行っており、*Piezo1* 欠損よりもさらに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).

リアノジン受容体関連筋疾患の病態発症機構の解明

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（SR）の Ca^{2+}遊離チャネルであり、遺伝子変異により悪性高熱症（MH）を引き起こす。MH では RyR1 チャネル活性が異常亢進しており、吸入麻酔薬等の刺激により筋拘縮、体温上昇といった病態を発症する。MH 治療薬としてはダントロレンが知られているが、水溶性が低く、臨床現場で使いにくいという欠点を持つ。

最近、申請者らは小胞体内 Ca^{2+}濃度測定法を利用した新規の RyR1 阻害薬スクリーニング法を開発し、RyR1 選択的阻害薬としてオキソリン酸を見出した（1）。本研究では、オキソリン酸の構造展開を行って親和性の高い誘導体を探索するとともに、オキソリン酸誘導体の MH モデル動物に対する治療効果を検討した。

方法

オキソリン酸は窒素原子へのアルキル鎖の付加、ベンゼン環への置換基の導入により種々の誘導体を合成した。誘導体の RyR1 阻害活性は小胞体内 Ca^{2+}測定および[^{3}H]リアノジン結合活性測定により評価した（1, 2）。

MH モデルマウスは MH 患者に見出された R2508C 変異をマウス RyR1 に CRISPR/Cas9 法でゲノム編集して作製した。骨格筋細胞内 Ca^{2+}動態は単離短趾屈筋を、張力測定は摘出ヒラメ筋を用いた。in vivo 実験はイソフルラン麻酔によりマウスに MH 発作を起こし、薬物の効果を評価した。

結果

オキソリン酸の窒素原子のアルキル基の炭素数を増やすと、RyR1 阻害活性が増大し C8 で最大活性を示した。ベンゼン環の 6 位への置換基の導入は阻害活性を低下させたが、7 位への導入は阻害活性を増大させた。6,7 位へのジオキソラン環の導入が最大活性を示した。最終的にオキソリン酸に比べて 70 倍以上高い親和性を有する誘導体（化合物 1）の合成に成功した（3）。いずれの誘導体もオキソリン酸と同様に RyR1 選択的な阻害作用を示した。

化合物 1 は MH モデルマウスから単離した骨格筋細胞のハロセンによる細胞内 Ca^{2+}濃度上昇を抑制し、摘出骨格筋のカフェイン拘縮を減弱させた。化合物 1 を事前に腹腔内投与するとイソフルラン麻酔による体温上昇と MH 発作を効果的に抑制した。イソフルラン麻酔で体温上昇したモデルマウスに化合物 1 を投与したところ、体温低下をもたらし、MH 発作を回避した。以上の結果から、化合物 1 は MH 治療薬として有用であることが明らかとなった。

考察

RyR1 活性は筋ジストロフィー症や種々のミオパチーでも亢進していることが示されているため、そのため、化合物 1 はこれらの筋疾患に対しても治療効果を有する可能性がある。今後、経口投与による検討を行う予定である。

結論

本研究により、ダントロレンに代わる MH 治療薬となりうる新規 RyR1 阻害薬（化合物 1）を見出した。本化合物の体内動態、副作用等を検討することにより臨床応用に向けて取り組んでいきたい。

参考文献

1. Murayama T, Kurebayashi N, Ikegami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H, Sakurai T: Efficient high-throughput screening by ER Ca^{2+} measurement to identify inhibitors of ryanodine receptor Ca^{2+}-release channels. Mol Pharmacol, 94: 722-730, 2018.
2. Murayama T, Kurebayashi N. Assays for modulators of ryanodine receptor (RyR)/Ca^{2+} release channel activity for drug discovery for skeletal muscle and heart diseases. Curr Protoc Pharmacol, 87: e71, 2019.
3. Mori S, Iinuma H, Manaka N, Ishigami-Yuasa M, Murayama T, Nishijima Y, Sakurai A, Arai R, Kurebayashi N, Sakurai T, and Kagechika H: Structural development of a type-1 ryanodine receptor (RyR1) Ca^{2+}-release channel inhibitor guided by endoplasmic reticulum Ca^{2+} assay. Eur J Med Chem, 179: 837-848, 2019.

ゼブラフィッシュモデルを用いた筋ジストロフィー関連疾患の病態解明研究

分担研究者　三橋　弘明

研究協力者　なし

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は希少疾病であるため原因遺伝子変異の同定が困難だという問題がある。近年、次世代シークエンサーの活用により、遺伝子解析の速度は飛躍的に向上したが、大量のゲノム配列情報の中から疾患の原因となる遺伝子変異を見出すためにはモデル生物を用いた機能解析が不可欠である。そこで、容易に遺伝子改変が可能で、組織やオルガネラを蛍光標識で可視化でき、発生速度の早いゼブラフィッシュをモデル生物として用い、筋ジストロフィー患者と相同な遺伝子変異を導入して、筋疾患モデルとして利用することを考えた。平成 30 年度までにエメリー・ドレフュス型筋ジストロフィー原因遺伝子である *LMNA* に患者型変異を持つトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。平成 31 年度はそのゼブラフィッシュの子世代、孫世代を獲得し、表現型の遺伝を確認し、詳細な病態研究を行った。

方法

昨年度、作製に成功したラミン A ロッドドメイン変異を持つトランスジェニックゼブラフィッシュを野生型と交配し、子世代(F1)を獲得した。F1 をさらに野生型と交配した F2 個体について免疫組織化学染色を行い、骨格筋変性や DNA 損傷、アポトーシスについて検討した。また、新規にゼブラフィッシュラミン A 抗体を作製した。次に、共焦点レーザー顕微鏡で核を観察し、核の形態について画像解析ソフト cellSens で定量化した。受精後 6 日目の個体については電子顕微鏡観察も行った。さらに、F2 個体から RNA を抽出し、qPCR によって各種マーカー遺伝子の発現量の変化を検討した。

結果

ロッドドメイン変異体 F0 世代で観察されたラミン A の核内凝集が F1,F2 世代でも観察され、遺伝子変異と表現型の segregation が確認された。さらに、F2 世代では核と核が細長いひも状構造でつながれた nucleoplasmic bridge 構造や、1 つの核から複数の小突起が生じる nuclear protrusion、長軸方向の核の elongation などの特徴的な核形態異常が観察された。これらの核形態異常は経過日数により異常が増加したことから進行性であることがわかった。形態異常を示す核ではヒストン H2AX 染色陽性率が高かったため、DNA 損傷が起きやすくなっていると考えられた。一方、カスパーゼ染色やファロイジンによるアクチン染色は対照と同様で際立った変化は見られなかった。電子顕微鏡観察では、核近傍にオートファゴソームが見られ、また qPCR による遺伝子発現解析では、p62 の発現量増加が見られたことから、オートファジー経路の関与が示唆された。

考察

ラミン A ロッドドメイン変異と核内凝集体の segregation が確認されたことから、この表現型とエメリー・ドレフュス型筋ジストロフィーの病態との関連が示唆された。nucleoplasmic bridge、nuclear protrusion などの核形態異常は非常に特徴的であり、*LMNA* ミオパチーの病態機序を解く鍵になるものではないかと考えられる。また、DNA 損傷やオ

ートファジーが *LMNA* ミオパチーに関与する可能性が示唆された。これらの新たな知見は *in vivo* で核を可視化できるゼブラフィッシュモデルを作製したために得られた結果と考えられた。

結論

世界で初めて *LMNA* の筋ジストロフィー変異を持つゼブラフィッシュの系統樹立に成功した。また、*LMNA* ロッドドメイン変異を持つ筋ジストロフィー動物モデルはこれまでに例がなく、新たな動物モデルを創成することができた。本ゼブラフィッシュモデルを用いることで、*LMNA* ミオパチーの病態解明、治療法開発研究の発展に寄与できるものと期待している。

参考文献

特になし

筋ジストロフィーの鑑別診断における自己抗体測定の意義

分担研究者　鈴木重明

所属
慶應義塾大学医学部神経内科

緒言

免疫チェックポイント阻害薬による筋炎の症例が散発的に報告され，その特徴的な臨床像が指摘されてきた．一般的な筋炎と異なる点としては眼瞼下垂や眼球運動障害など眼症状を呈する点である．重症筋無力症と鑑別を要する場合や両者が合併する可能性が指摘されている．

方法

2016 年 7 月から 2018 年 6 月までの 2 年間に抗 PD-1 抗体であるニボルマブあるいはペムブロリズマブの単剤投与により発症した筋炎の症例に対して慶應義塾大学に自己抗体測定依頼のあった 19 例を対象として臨床像，自己抗体，筋病理について検討した．

結果

男性 13 例，女性 6 例，平均年齢は 70 歳（25 歳-84 歳）であった．有害事象の重症度は，筋症状が軽症であり日常生活への影響が少ない grade 2 の症例が 10 例であった．一方，筋症状が中等症あるいは重症で日常生活への影響が多いあるいは生命にかかわる grade 3 あるいは grade 4 は 9 例であった．原病である悪性腫瘍は非小細胞肺がんが 10 例で最多であり，その他は悪性黒色腫が 1 例，腎細胞がんが 2 例，頭頸部がんが 1 例，ホジキンリンパ腫が 1 例，尿路上皮がんが 2 例，大腸がんが 2 例（非適応疾患）であった．抗 PD-1 抗体はニボルマブが 11 例，ペムブロリズマブが 8 例で使用され，投与回数については 1 回が 4 例，2 回が 13 例，3 回が 2 例であった．初回投与から発症までは平均 29 日（19 日-48 日）であった．

臨床像は複視と眼瞼下垂の両者を呈していたのが 12 例，眼瞼下垂だけが 3 例，複視だけが 1 例であった．19 例にうち 5 例は全経過において症状が眼筋だけに限られていた．球症状を呈して 10 例についてはすべて嚥下困難を自覚していたが，構音障害を呈していたのは 5 例であった．四肢筋力低下が 13 例に認められたのに対して，体幹筋の障害が 14 例でありより特徴的な症状であった．頚部筋力低下が目立ち，症状の重い 6 例では頚下がりを呈していた．心筋障害は 4 例で認め，うち 2 例については心筋生検で心筋炎の確定診断が得られた．呼吸筋障害は 6 例で認められた．筋痛は 16 例と多くの症例で認められ，筋力低下が出現する前に自覚している場合が多かった．特に，頚部，背部，下肢で筋痛を認めていた．

血清 CK 値は筋力低下が出現する数日前から上昇が認められる場合があった．19 症例の血清 CK 値の平均は 5,247 IU/L と著明な上昇を認めた．RNA 免疫沈降法や enzyme-linked immunoassay によって筋炎に関連した自己抗体をスクリーニングしたが，検出できなかった．抗横紋筋抗体は cytometric cell-based assay 法により測定をおこない，抗 titin 抗体は 10 例で，抗 Kv1.4 抗体は 9 例で検出され，いずれかの自己抗体が陽性であった症例は 13 例（68%）であった．筋病理では筋線維の壊死・再生の分布が特徴な所見であり，10 個から 15 個程度の筋線維が集簇的に壊死・再生を呈していた．リンパ球浸潤は筋線維の壊死・再生周囲に集簇的に観察された．T リンパ球の表面マーカーでは CD4 と CD8+ T 細胞はほぼ同程度であった．

結論

免疫チェックポイント阻害薬により発症する筋炎は重症筋無力症の要素を含む，特有な病型と考えられる．

参考文献

Seki M, Uruha A, Ohnuki Y, et al. Inflammatory myopathy associated with PD-1 inhibitors. J Autoimmun 100: 105-113, 2019

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(筋未熟性)を呈する先天性 DM1（CDM）由来骨格筋検体を用いて、次世代シークエンサーを用いた RNA-seq 解析により、CDM 骨格筋の筋未熟性と相関するスプライシング異常を探索した。DM1 心筋における刺激伝導系に関わる Ca チャネル発現についても解析した。また、DM での異常 RNA 毒性を低減する低分子化合物の効果を、DM モデル細胞、DM モデルマウス（HSA-LR）を用いて検証した。さらに、CTG リピートを短縮誘導して異常 RNA 毒性を低減する治療開発を目指し、モデル細胞での有効性も検証した。

結果

CDM 骨格筋検体を用いた RNA-seq 解析により、骨格筋症状の重症度と有意に相関する新規スプライシング異常を同定した。また、DM１心筋における Ca チャネル（CACNA2D3）発現亢進が、DM1 でみられる心伝導障害に関与することを Drosophila モデルも使用して証明した（１）。低分子化合物による異常 RNA 毒性低減効果としては、high throughput screening により痛風治療薬として使用されているコルヒチンに、異常 RNA の毒性を低減する作用があることを見出した（２）。また、すでに有効性を報告していたフラミジンとエリスロマイシンの併用療法が相乗的な効果を示すこと HSA-LR マウスで実証した（３）。さらに、CAG ミスマッチヘアピン DNA 構造に結合する低分子 NA が、DM の根源的な原因となる異常伸長 CTG/CAG リピートを短縮誘導することを細胞モデルで証明した（４）。

考察

今回同定した、骨格筋でのスプライシング異常や心筋での発現異常は、これまで長らく不明であった DM の筋病態の解明の端緒となる可能性がある。また、DM における RNA 毒性を低減する低分子化合物や、CTG リピートを短縮する核酸標的低分子に、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 の病態に迫る新規スプライシングや発現異常の同定や、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. Auxerre-Plantie E, Nakamori M, Renaud Y, et al. Straightjacket/alpha2delta3 deregulation is associated with cardiac conduction defects in myotonic dystrophy type 1. Elife. 2019;8. e51114
2. Reddy K, Jenquin JR, McConnell OL, et al. A CTG repeat-selective chemical screen identifies microtubule inhibitors as selective modulators of toxic CUG RNA levels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(42):20991-1000.
3. Jenquin JR, Yang H, Huigens RW, 3rd, Nakamori M, Berglund JA. Combination Treatment of Erythromycin and Furamidine Provides Additive and Synergistic Rescue of Mis-Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1 Models. ACS Pharmacol Transl Sci. 2019;2(4):247-63.
4. Nakamori M, Panigrahi GB, Lanni S, et al. A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions in vivo. Nat Genet. 2020;52(2):146-59.

骨格筋幹細胞の分化制御機構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

筋ジストロフィーに対する根治療法として、以前より骨格筋幹細胞を移植療法が期待されている。しかしながら生体外で長期培養した筋幹細胞は移植後の筋線維への融合寄与率、幹細胞としての定着率も悪く、有効な治療法としては確立されていない。成体から単離直後の筋幹細胞は転写因子 Pax7 を高発現し、移植すると移植寄与率も高いことから、いかに Pax7 の発現量が高い状態の筋幹細胞を in vitro で増産しうるかが筋幹細胞移植療法の確立へのカギとなる（1)。筋幹細胞の未分化維持・分化制御機構については古くから研究されてきてはいるものの、とりわけ Pax7 の標的因子や共役因子などは不明な点も多く、成体外での筋幹細胞の未分化維持も確立されていない。そこで本研究では、骨格筋幹細胞の新たな未分化性維持・分化制御機構を、筋発生・再生モデル、in vitro 分化誘導モデルを用いて解明し、筋ジストロフィーをはじめとする難治性筋疾患の幹細胞治療法の確立に貢献することを目的とした。

方法

本分担課題では下記の 4 つの項目について研究を行った。

1)ストレスによって誘導される転写因子 Klf5 による骨格筋幹細胞の分化制御機構を筋幹細胞特異的 Klf5 欠損マウスを用いて解明する。

2) in vitro において幹細胞の未分化性を維持したまま筋細胞数を増幅する方法を確立し、そのメカニズムを解明する。

3)典型的なX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）の筋病理所見を示すが、病因性の変異が同定されなかった 14 症例について RNA-seq を行い *MTM1* mRNA の構造異常を解析して新規変異を同定する。

4)Pax7 にエピトープタグを付加したノックインマウスを CRISPR-Cas9 技術により作製し、Pax7 の新規標的因子・共役因子を同定する新たなツールとして活用する。

結果

1) 筋幹細胞特異的 Klf5 欠損マウスの表現型解析および Klf5 欠損マウス由来初代筋幹細胞を用いた RNA-seq 解析により、Klf5 が細胞周期調節因子 p21 と p57 の発現を直接制御して筋細胞のアポトーシスを抑制すること、また筋再生時と同様に Myogenin の遺伝子発現を促進することによって Klf5 が胎児後期の筋発生を調節していることを明らかにした。

2) レチノイン酸によって筋幹細胞の未分化性を in vitro で保持できることを見出し、これまで困難であった筋幹細胞の長期間培養を可能にした。レチノイン酸存在下で培養したヒト筋幹細胞は免疫不全 mdx マウスへの移植率を向上させた。また、筋前駆細胞では主に RARα を介して Gpx3 などの下流遺伝子の発現を調節していることを明らかにした。さらに、レチノイン酸処理と未処理の培養筋細胞を用いて RNA-seq により比較解析を行い、筋幹細胞の未分化性を維持する新規因子の探索を行った。その結果、因子 X の発現が未分化を維持した筋幹細胞で有意に増加していることを見出した。因子 X は胸腺や脾臓などで発現し、B 細胞や T 細胞の分化を抑制することが知られているが、骨格筋における機能は全く不明であった。骨格筋において因子 X は活性化した筋幹細胞で発現し、筋

分化と共にその発現は減少した。因子 X の過剰発現細胞の解析により因子 X は筋細胞の増殖を促進し、分化を抑制する事を明らかにした。また、因子 X を阻害すると細胞増殖関連因子のカスケードが乱れ、RNA-seq による網羅的な解析によって、因子 X が細胞増殖に必須の因子であることが示された。

3) 典型的な X 連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）の筋病理所見を示すが、病因性の変異が同定されなかった 14 症例について RNA-seq を行い mRNA レベルでの *MTM1* の異常を解析した。その結果、4 例で *MTM1* の発現低下を認め、そのうち 2 例では Exon1 を含む領域の large deletion があることを見出した。また、1 例においてはエクソン 4 の、別の 2 例においては deep intron 領域の cryptic splice site の変異によるスプライシング異常があることを見出した。患者由来の筋細胞はこの異常スプライシングに加え、核近傍ミトコンドリアが集積するという表現型を示し、アンチセンスモルフォリノ核酸によってこれらの異常が回復することを明らかにした。

4)Pax7 の C 末端に 2 つの HA タグを付加したノックインマウス（Pax7HA-KI）を作製した。Pax7HA-KI ホモマウスの成長曲線は野生型と変わらず、Pax7 陽性の筋衛星細胞数や筋再生にも異常は見られなかった。胎齢 10.5 日の胚を用いた免疫沈降-質量分析法によって、筋発生時に Pax7 と会合すると考えられるタンパク質を 1700 種類以上同定した。野生型と比較してタグノックインマウス胚で多く検出されたタンパク質のリストを基に機能エンリッチメント解析を行った結果、細胞周期関連因子やストレス応答因子、ユビキチン関連因子などが変動していることが明らかとなった。さらに HA タグ抗体を用いた ChIP-qPCR 解析により、Pax7 のターゲットとされる Myf5 のエンハンサー領域への結合も検出できたことから、本マウスは新たな Pax7 の標的因子同定のためのツールとして非常に有効であると考えられた。

考察

本研究によってレチノイン酸による筋幹細胞未分化維持培養法が確立され、その下流因子についても明らかになりつつある。しかしながらその機序についてはいまだ不明な点が多い。今後の研究の進展と、Pax7-HA KI マウスを用いた Pax7 の標的因子・共役因子の探索とを合わせることで骨格筋幹細胞の未分化維持機構のさらなる解明が進み、未分化維持培養法が改良できると期待される。また、本研究では MTM1 の deep intron 領域の変異を起因とする MTM1 mRNA のスプライシング異常による XLMTM の発症機構が初めて解明された。しかしながら解析した 14 症例のうち、7 例については未だ原因が不明であり、さらなる原因究明が必要である。

結論

本研究によって骨格筋幹細胞の新たな分化制御機構が明らかとなった。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. Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J, Sun K, Sun H, Wang H, Zhang Z, Zhang BT, Sheng C, Wang H, Hu P: Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion . Cell Res. Cell Res. Jun;25(6):655-73, May 2015

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 SNP 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　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

緒言

先天性ミオパチーは、筋力や筋緊張の低下、呼吸障害などが起こる先天性の筋疾患である。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）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。先行研究において、細胞膜の変形や切断（膜リモデリング）に関わる BAR ドメインタンパク質（BIN1）やダイナミン（DNM2）の遺伝子上の SNP（一塩基多型）が、CNM 発症に深く関与することが明らかになっている。しかし、膜リモデリングの異常により CNM が発症するメカニズムは、未だに解明されていない。本研究では、CNM 変異型の DNM2 や BIN1 の膜リモデリング機能の異常について、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、③CNM モデル動物を用いた個体レベルの解析を行い、CNM の発症機序をマルチスケールで解明し、診断や治療法、創薬開発に向けた学術的基盤を創生することを目指した。

方法

① *In vitro* 再構成系による分子レベルの解析

変異型の DNM2 や BIN1 の構造やダイナミクス、膜リモデリング機能の異常について、*in vitro* 再構成系を用いた電子顕微鏡および高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）解析行い、CNM 発症機序を分子レベルで解明する。

② 筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析

マウス筋芽細胞 C2C12 を用いた T 管様構造の誘導アッセイや筋分化アッセイにおいて変異型 DNM2 や BIN1 の機能異常を解析し、CNM 発症機序を細胞レベルで解明する。

③ CNM モデル動物を用いた個体レベルの解析

線虫のダイナミン遺伝子 dyn-1 および BIN1 の相同遺伝子 amph-1 のコーディング領域を、CNM 変異型のヒト由来 DNM2 や BIN1 遺伝子で置換した CNM モデル線虫を確立し、その表現型を解析して、CNM 発症機序を個体レベルで解明する。

結果

① *In vitro* 再構成系による分子レベルの解析

変異型蛋白質の発現コンストラクトの作成を Gateway クローニング法により行った。まず、変異型 BIN1(K35N,D151N,R154Q,Q434X,K436X)、既知の変異型 DNM2(R369Q,R369W,R465W,E368K, S619L, S619W) および CNM 患者より同定された新規の変異型 DNM2(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。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発現コンストラクトを作成した。このうち数種の変異型 BIN1 と DNM2 について蛋白質を精製し、機能解析を行った。その結果、変異型 BIN1(Q434X, K436X) は、正常型 BIN1 とは構造的に異なる、凝集した膜チューブを形成した。一方、正常型 DNM2 は BIN1 により GTP アーゼ活性が抑制されるが、変異型 DNM2 ではその制御が起こらず、恒常的に GTP アーゼが活性化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で作成した変異型の 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、哺乳類細胞用の発現コンストラクトを作成し、C2C12 細胞における T 管様構造の誘導アッセイ

を用いて変異型蛋白質の機能異常を解析した。その結果、変異型 BIN1(Q434X, K436X) は、T 管様構造の形成能が低下していた。一方、P294L および R724H を除く変異型 DNM2 でも、T 管様構造の形成が顕著に抑制されていた。

③ CNM モデル動物を用いた個体レベル解析

CNM モデル線虫の確立に向け、正常型ヒト DNM2 による線虫ダイナミンの機能代替を解析した。その結果、線虫ダイナミン変異体が示す運動異常などの表現型が、ヒト DNM2 の発現によって機能回復することが明らかになった。そこで、変異型ヒト DNM2 を発現するトランスジェニック線虫を作成し、その表現型を解析した。その結果、変異型 DNM2 を発現するトランスジェニック線虫は、筋機能不全を示唆するような行動異常を示した。

考察

① DNM2 の CNM 型変異は、GTP アーゼの活性制御に必要な Stalk および PH ドメインに集中していた。そのため、CNM 変異に伴う立体構造変化により、GTP アーゼの恒常的な活性化(＝膜切断活性の亢進) が起こり、T 管の形成異常に起因して CNM が発症する可能性が高い。今後変異型 DNM2 の構造解析 (X 線結晶解析、クライオ電顕) や高速 AFM を用いた分子動態解析を行い、CNM 発症に繋がる DNM2 の gain-of-function 機構を解明する。

② 筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析より、CNM 変異型 BIN1 および DNM2 は T 管様構造の形成異常を示すことが明らかになった。今後、*in vitro* 再構成系を用いてこれらの変異型 BIN1 および DNM2 の膜リモデリング機能の異常を網羅的に解析することにより、CNM 発症機序を分子レベルで解明する。

③ 正常型ヒト DNM2 は線虫ダイナミンの機能を代替した。さらに変異型ヒト DNM2 を発現する線虫は、筋機能不全を示唆するような行動異常の表現型を示した。今後、機能異常を示した線虫の筋組織構造の解析や，疾患型変異蛋白質の細胞内局在やダイナミクスの詳細な解析を進め，個体レベルでの CNM 発症機序を解明する。

結論

本研究により、膜リモデリング分子 BIN1 と DNM2 の機能異常を分子、細胞、個体の多階層で解析するシステムの基盤を構築した。昨今、筋疾患の治験研究では、患者の心身両面に苦痛を与える筋生検に代わる方法の開発が求められている。本研究で用いた、*in vitro*、*in cellulo*、線虫のようなモデル生物を用いた実験系は、低侵襲性かつ臨床治験の効果をより定量的に解析可能にする新たなアプローチであり、今後これらの解析を進め、CNM の発症機序の解明、さらに 診断や治療法、創薬開発に貢献したい。

参考文献

1. 竹居 孝二, 山田 浩司, 竹田 哲也. ダイナミン複合体による新規の膜切断機構:クラスターゼ・モデル, **生物物理** 59(5), 2019, 001-007
2. Abe, T., La, T.M., Miyagaki, Y., Oya, E., Wei, F.Y., Sumida, K., Fujise, K., Takeda, T., Tomizawa, K., Takei, K., *Yamada, H. Phosphorylation of cortactin by cyclin-dependent kinase-5 modulates actin bundling by the dynamin 1-cortactin ring-like complex and formation of filopodia and lamellipodia in NG108-15 glioma-derived cells. *Int J Oncol.*, 2019; 54(2): 550-558.

29－4

Basic research for developing diagnostic and therapeutic methods for muscular dystrophy and its related disorders

Ichizo Nishino（Principal Investigator）

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 2017-2019. As a result, the total number of frozen and cultured muscle samples has reached 20136 and 2024, respectively, by the end of 2019, which constitute the world-leading muscle repository. Using this muscle repository, we have made a number of achievements including: 1) The identification of 63 Japanese ADSSL1 myopathy patients from 59 families all of who pathologically had ADSSL1 myopathy, making ADSSL1 myopathy the most common genetically diagnosable nemaline myopathy in Japan; 2) The identification of 2 patients with COX deficiency due to COX6A2 gene mutations who showed symptoms in skeletal and cardiac muscles, which is compatible with the expression pattern of COX6A2; 3) The identification of CGG repeat expansions in LPR12, GIPC1 and as the cause for oculopharyngodistal myopathy; 4) Utility of MxA expression in distinguishing dermatomyositis (DM) and antisynthetaase syndrome; and 5) The proof of the existence of DM sine dermatitis and its association with anti-NXP-2 antibodies.