

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07094

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたGFPT1先天性筋無力症の病態解析および治療研究

研究課題名(英文) Pathological analysis of GFPT1 congenital myasthenia and development of new therapy using iPS cells.

研究代表者

伊藤 美佳子 (Ito, Mikako)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：60444402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先天性筋無力症候群(CMS)の原因分子の一つに、タンパクや脂質の糖化酵素であるGFPT1の変異があり、肢帯型の筋力低下が特徴である。骨格筋ではGFPT1-L isoformが形成され、酵素活性が減少する。本研究ではGFPT1-Lの骨格筋での役割を明らかにするため、モデルマウスGfpt1-L-/-を作製し、表現型解析を行った。

また、CMS患者においてGFPT1 c.722r3insG変異を同定し、同変異のモデルマウスを作製したところ、運動機能の低下、グリコシル化タンパク質の量の減少、AChRクラスターの断片化、筋萎縮、筋線維間腔の増加など、患者と似た表現型を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性筋無力症候群は指定難病の対象となっており、全身の筋力低下、易疲労性を呈し、生後1年以内に発症することが多い稀な疾患である。神経筋接合部を構成する遺伝子検査を実施し、変異が発見された場合は、CMSの原因となりうる変異かどうかを精査する必要がある。本研究では先天性筋無力症候群患者において、GFPT1内に複合ヘテロ変異を同定した。GFPT1の神経筋接合部での機能は不明な点が多く、GFPT1の骨格筋でのisoformについて調査した。また、患者変異を保有するマウスを作成し、病態の詳細な解析を行った。今後、治療薬のスクリーニング、治療法の開発へ応用できると期待している。

研究成果の概要(英文)：One of the causative molecules of congenital myasthenia syndrome (CMS) is a mutation in GFPT1, a glycosylation enzyme of proteins and lipids, which is characterized by limb-type muscle weakness. GFPT1-L isoform is formed in skeletal muscle and enzyme activity is reduced. In this study, in order to clarify the role of GFPT1-L in skeletal muscle, model mouse Gfpt1-L-/- was prepared and phenotypic analysis was performed. In addition, we identified the GFPT1 c.722 23insG mutation in CMS patients and prepared a model mouse of the mutation. The mice were decreased motor function, decreased amount of glycosylated protein, fragmentation of AChR cluster, muscle atrophy, and increased interstitial space. of muscle fiber. It showed a patient-like phenotype.

研究分野：神経筋接合部疾患

キーワード：先天性筋無力症候群 GFPT1 iPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes, CMS) は神経筋接合部 (neuro muscular junction, NMJ) に発現するタンパクをコードする遺伝子の先天性分子欠損症により神経筋伝達障害が起こる疾患群である。NMJ で機能する分子のうち CMS の原因として知られている分子は、骨格筋アセチルコリンレセプター (AChR)、Collagen Q、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、Rapsin、MuSK、LRP4、GFPT1、DOK7、Agrin 等が挙げられる。これらの分子の先天性な欠損や機能異常により、筋力低下や易疲労性を呈し、呼吸困難、嚥下困難を伴う重度の筋力低下が認められる。先天性筋無力症候群の中で、近年、GFPT1 の糖化酵素をコードする遺伝子が CMS の原因であることが解明された。GFPT1 (Glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase) は 2011 年に肢帯型 CMS で acetylcholinesterase 阻害剤が有効である患者から、原因遺伝子として同定された。GFPT1 は Fructose 6-phosphate から Glucosamine 6-phosphate 合成パスウェイの第一段階で働く酵素であり、UDP-GlcNAc (Uridine diphosphate N-

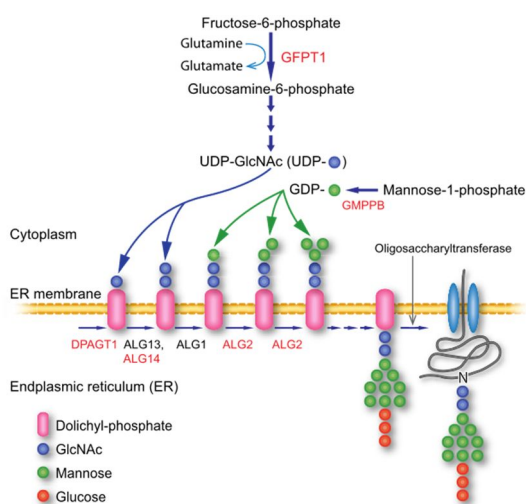


Figure 1. GFPT1 produce Glutamate and GlcNAc from F6P and Glutamine.

acetylglucosamine) 生成の律速段階酵素となる (Figure 1)。GFPT1 の強発現は、グリコーゲン貯蔵過多となり、脂質異常症、肥満、耐糖尿異常を引き起こす。一方、GFPT1 の分子欠損は劣性遺伝形式で CMS を引き起こす。GFPT1 は糖鎖生成に必須の酵素であり全組織で高い発現がみられるにもかかわらず、何故か遺伝子変異による表現型は神経筋接合部に限局している。GFPT1 欠損による CMS 患者では、筋組織内の骨格筋管状凝集体 (tubular aggregates) 形成や endplate 小房状領域の AChR 形成などの異常所見が知られているが、認められない症例もあり、GFPT1 変異による病態分子機構の詳細は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞および患者 iPS 由来筋管細胞を用いて GFPT1 の NMJ 形成における分子機能解析を行う。また患者 GFPT1 変異において、その遺伝子変異と発病の関係を調査する。

3. 研究の方法

骨格筋には、選択的スプライシングされた 54 塩基のエクソン 9 が含まれており、酵素活性の低い長い GFPT1-L アイソフォームが生成される。なぜ骨格筋がこのアイソフォームを高発現しているのか不明である。本研究では骨格筋における GFPT1-L バリエーションの役割を調査するため、スキップされたエクソン 9 マウスモデルを作製した。トランスジェニックマウスは、Gfpt1 のエクソン 9 を削除することにより、CRISPR/Cas システムを使用して当施設の特設病原体除去動物施設で作製した。マウスの遺伝子型決定を行い、2 匹のヘテロ接合性マウスの繁殖によってホモ接合性マウス (Gfpt1-L^{-/-}) を生成した。骨格筋および心臓、腎臓におけるエクソン 9 のスキップは、RT-PCR によってホモ接合性マウスで確認された (Figure 2)。運動能を調べるために、rota-rod test を実行した。さらに、CMS 患者の iPS 細胞を用いて、変異によるエキソンスキッピングを調べ、同変異を有するマウスを作製し、その病態解析を行った。

4. 研究成果

(1)骨格筋における GFPT1-L アイソフォームの機能

Gfpt1-L^{-/-}マウスは、野生型マウスと比較して、12 か月齢から筋持久力の 20 ~ 30%の低下を示した(Figure 3A)。 Gfpt1-L^{-/-}マウスは、12 ~ 14 か月齢で野生型マウスよりも高い体重を示した(Figure 3B)。骨格筋にエキソン 9 がないことで神経筋接合部 (NMJ) の形成が変化するかどうかを判断するために、大腿直筋と腓腹筋を神経終末で発現する synaptophysin に対する抗体で染色し、AChR クラスタを視覚化する α -bungarotoxin Alexa594 で標識した。その結果、骨格筋のスキップ E9 が AChR クラスタ領域のサイズを減少させることを示した。また、AChR クラスタの断片化も増加した(Figure 4)。四肢の筋肉の筋萎縮は、GFPT1 関連の CMS 患者であると報告されている(Chihiro Matsumoto, *et al*, 2019, *Brain & Development*)。したがって、コンピューター断層撮影 (CT) スキャンを実行した。CT 画像は、Gfpt1-L^{-/-}および椎前筋の腰部の皮下および内臓脂肪組織に有意な変化を示唆しなかった(Figure 5)。Gfpt1-L が筋肉代謝に関与しているかどうかを明らかにするために、13 か月齢の Gfpt1-L^{-/-}および野生型マウスの上腕三頭筋を使用してメタボロミクス分析を行い、解糖経路の代謝物の約 15 ~ 20%の減少が見られた。

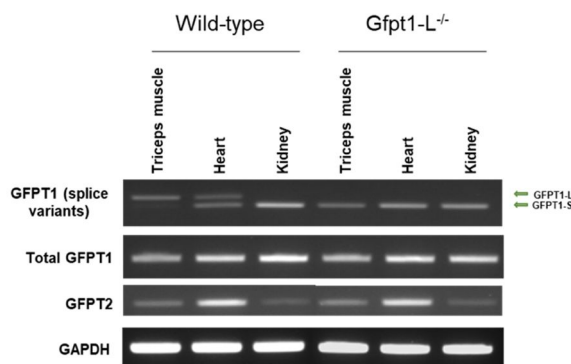


Figure 2. mRNA expression of mGfpt1-S, mGfpt1-L, total mGfpt1 and GFPT2 in both wild-type and mutant.

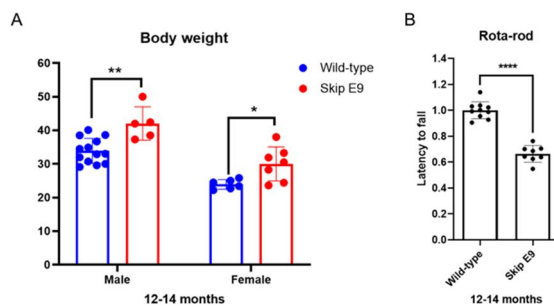


Figure 3. (A) Body weight of male wild-type (male n = 13/ female n=6) and Gfpt1-L^{-/-} (male n = 5/ female n=7) mice on regular chow diet.(B) Accelerated Rota-rod test for Gfpt1-L^{-/-} mice (n = 8) compared to wild-type (n = 8). p-value of unpaired two-tailed Student's t test are indicated by *P<0.01, **P<0.001, and ****P<0.0001.

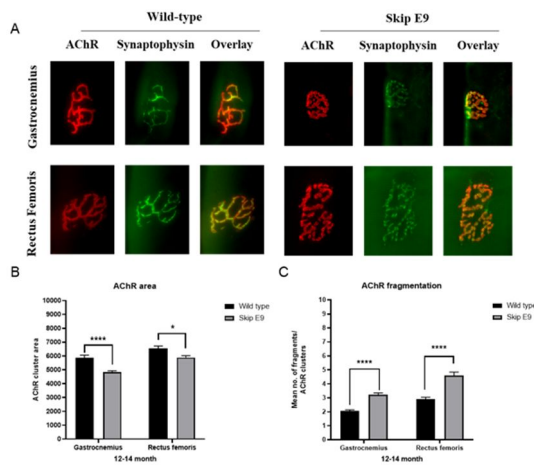


Figure 4. AChR clusters and nerve terminals in the Rectus femoris and gastrocnemius muscle at high-magnification in wild-type and *Gfpt1-L^{-/-}* at the age of 12-14 months. (A) Representative confocal images of the NMJs stained with anti-synaptophysin antibody (green) and α -bungarotoxin (red) to visualize the nerve terminals and acetylcholine receptors (AChRs), respectively. (B) Quantitative analysis demonstrating

AChR cluster area and (C) mean number of fragments/AChR cluster. Data are mean \pm SEM (wild-type n = 64-151 NMJs/ *Gfpt1-L^{-/-}* n=186-236). p-value of unpaired two-tailed Student's t test are indicated by *P<0.01, ***P<0.0001.

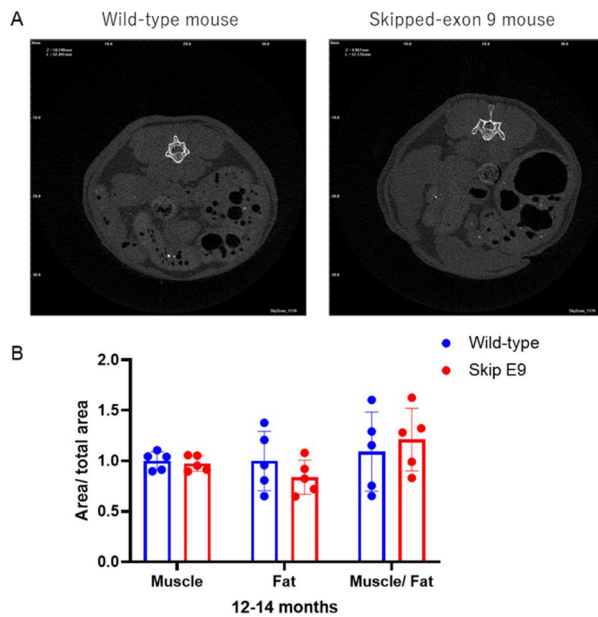


Figure 5. (A) Muscle CT of lower back at age of 12-14 months. (B) Quantitative analysis demonstrating area of paravertebral muscles, subcutaneous and visceral fat of lower back, and the ratio of the paravertebral muscles to total fat in lower back area.

(2)患者 iPS 細胞を用いた病原解析

CMS 患者から GFPT1 変異 c.252A>T を同定した。c.252 はエキソン 4 内の変異である。患者 iPS 細胞由来の myoblast を用いて、RT-PCR を行なった結果、分化前、分化後共に、エキソン 4 のスキッピングが認められた。また、GFPT1 の発現量は大幅に減少し、O-glycosylation が減少した(Figure 6)。

同 c.252A>T 変異を保有するノックインマウスを作製し、遺伝発現を調べたところ、患者 iPS のようなエキソン 4 のスキッピングは脳、心臓、骨格筋において観察されなかった。また、タンパクの O-glycosylation 量がコントロールと変化がなく、患者 iPS 細胞でみられたような減少が観察されなかったため、病態モデルとして今後使用することには不向きとなった(Figure 7)。

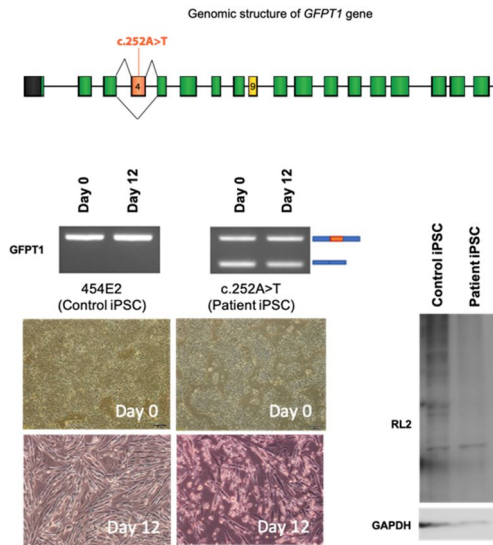


Figure 6. Patient-derived iPSC carrying c.252A>T showed 50% skipping of exon 4 which reduced both GFPT1 protein level and epitopes of O-glycosylated proteins

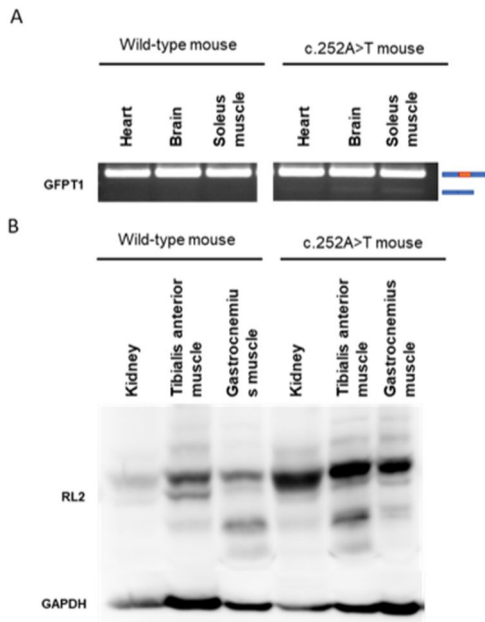


Figure 7. Only partial skipping of exon 4 were observed in knock-in mouse carrying c.252A>T with no adverse effect on O-glycosylation. (A) RT-PCR showing splicing of GFPT1 exon 4 in wild-type and knock-in mouse model carrying c.252A>T. (B) Immunoblots demonstrating expression of the glycosylated protein with RL2 antibody in kidney and muscles of wild-type and knock-in mouse model carrying c.252A>T.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Kanbara Shunsuke, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ohta Kyotaro, Koshimizu Hiroyuki, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates progression of cervical spondylotic myelopathy in a rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70068-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Huang Kun, Li Jin, Ito Mikako, Takeda Jun-Ichi, Ohkawara Bisei, Ogi Tomoo, Masuda Akio, Ohno Kinji	4. 巻 13
2. 論文標題 Gene Expression Profile at the Motor Endplate of the Neuromuscular Junction of Fast-Twitch Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.00154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koshimizu Hiroyuki, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ota Kyotaro, Kanbara Shunsuke, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Sayo Akira, Kiryu-Seo Sumiko, Konishi Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Kiyama Hiroshi, Ohno Kinji	4. 巻 263
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118577 ~ 118577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohkawara Bisei, Shen XinMing, Selcen Duygu, Nazim Mohammad, Brill Vera, Tarnopolsky Mark A., Brady Lauren, Fukami Sae, Amato Anthony A., Yis Uluc, Ohno Kinji, Engel Andrew G.	4. 巻 5
2. 論文標題 Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e132023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.132023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Jin, Ito Mikako, Ohkawara Bisei, Masuda Akio, Ohno Kinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Differential effects of spinal motor neuron-derived and skeletal muscle-derived Rspo2 on acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31949-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 68-69
2. 論文標題 Protein-anchoring therapy to target extracellular matrix proteins to their physiological destinations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Matrix Biology	6. 最初と最後の頁 628 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matbio.2018.02.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Mikako, Ehara Yuka, Li Jin, Inada Kosuke, Ohno Kinji	4. 巻 28
2. 論文標題 Protein-Anchoring Therapy of Biglycan for Mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 428 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/hum.2015.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報学分野
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/
名古屋大学 医学系研究科 神経遺伝情報学 ホームページ
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/advanced-med/neurogenetics/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大河原 美静 (Ohkawara Bisei) (80589606)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------