

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19505

研究課題名(和文)一分子ナノイメージングによる封入体筋炎の異常蛋白凝集形成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of abnormal protein aggregation in sporadic inclusion body myositis by single molecule nanoimaging

研究代表者

青木 正志(Aoki, Masashi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70302148

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではヒト封入体筋炎(sIBM)疑い患者から筋生検時に細胞を回収し、2年間で計6ラインをストックした。長年の筋収縮の持続を再現する電気収縮培養系を用いてヒト骨格筋に細胞ストレスを負荷し、収縮ストレス前後での細胞を用いたRNAシーケンスで解析を行った。電気収縮培養における共培養系の特徴について国際誌に報告した。また一分子ナノイメージングにて凝集体の成分とされるTDP-43などを標識し、収縮培養前後での凝集体形成の有無を評価している。さらに蛋白質凝集に重要なプロテアソームを筋芽細胞において欠損させたモデル動物の解析によりp53が筋芽細胞の維持に重要であることを明らかにし国際誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には2報の論文を国際誌に掲載することができた。一つは封入体筋炎の病態に関与すると考えられる蛋白分解系であるプロテアソームの骨格筋における役割をStem Cell Reports誌に、もう一つは本研究課題の主要評価系である電気収縮培養のシステムとしての有用性についてSciRep誌に、それぞれ報告した。今後、本研究を発展させるうえで、いずれも重要な論文である。前者はプレスリリースも行い、社会的にも骨格筋生物学研究の意義について広く周知することができた。

研究成果の概要(英文): In this study, myoblasts were harvested from sporadic inclusion body myositis (sIBM) patients during muscle biopsy, and a total of six lines were stocked during these two years. Cellular stress was applied to human skeletal muscle using electro-pulse-constriction-culture-system (EPS) which reproduces long-lasting muscle contraction. Analysis was performed by RNA sequencing using cells before and after contraction stress. The characteristics of the co-culture system (EPS culture) were reported in an international journal. In addition, TDP-43, which is a component of the aggregates, is labeled by single-molecule nanoimaging, and the presence or absence of aggregate formation before and after EPS culture was evaluated. Furthermore, analysis of the myoblast specific proteasome deficient mouse revealed that p53 is important for the maintenance of myoblasts pool.

研究分野：臨床神経学

キーワード：封入体筋炎 RNAシーケンス 電気収縮培養 TDP-43 プロテアソーム 骨格筋生物学

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の指定難病は 330 疾患を数え、うち 3 分の 1 以上を神経筋疾患が占めており、一次性・二次性を含めた筋萎縮の病態解明・治療開発は社会的な要請が高まっている。数ある指定難病の中でも原因不明で治療法が無い中高年の疾患である sIBM は希少疾病ながら高齢化で患者数が増えており、病態解明に根ざした治療開発が喫緊の課題である。

sIBM の骨格筋ではアルツハイマー病や ALS などの神経変性疾患で神経細胞に蓄積するアミロイド β 蛋白や TDP-43・FUS などの異常凝集体が見られ筋の変性疾患とも呼ばれている。我々の疫学調査により sIBM では一般的に認知症が見られないことがわかった。骨格筋では中枢神経での凝集体形成を肩代わりしている可能性もある。なぜ、どのように sIBM で骨格筋のみに異常蛋白凝集が起こるかは不明である。蛋白分解能低下や加齢による長期の筋収縮刺激が sIBM の病態背景と考え、保有している sIBM の生体試料・hnRNPA1 変異封入体性ミオパチーの iPS 細胞・プロテアソーム骨格筋特異的欠損マウスを活用し新規治療標的を見出す。

近年ではアクチビン受容体拮抗薬 (BYM338) の臨床試験が行われたものの主要評価項目の統計学的に有意な改善が得られず製薬企業は開発から撤退した。申請者らも本治験に携ったが、薬剤の直接的な効果である骨格筋量の増加は得られたものの筋力の改善が得られず治験が失敗した要因として、病態を反映する適切なサロゲートマーカーが存在しない点があると分析している。今後の治療開発のためには sIBM の骨格筋特異的な異常蛋白凝集という病態を標的にすること、サロゲートマーカーによる筋力以外での評価方法の確立が必要である。

2. 研究の目的

封入体筋炎 (sIBM) は中高年にみられる慢性進行性の難治性筋疾患である。sIBM の骨格筋では異常蛋白凝集体が見られる。アルツハイマー病や ALS などの神経変性疾患で神経細胞に蓄積するアミロイド β 蛋白や TDP-43・FUS などが見られ筋の変性疾患とも呼ばれている。我々の疫学調査により sIBM では一般的に認知症が見られないことがわかった。骨格筋では中枢神経での凝集体形成を肩代わりしている可能性もある。なぜ sIBM で骨格筋のみに異常蛋白凝集が起こるかは不明である。sIBM の骨格筋特異的な異常蛋白凝集を再現し、病態進展機序を明らかにし、新規治療標的を見出す。

3. 研究の方法

我々が以前ヒト sIBM の骨格筋から樹立した筋芽細胞を用い、(1) 一分子ナノイメージングによる凝集蛋白標識により骨格筋特異的な凝集体形成の過程を観察・比較解析する。(2) 蛋白分解系の阻害や収縮培養系を用いて細胞にストレスをかけ骨格筋特異的に凝集体形成を再現するモデルを作成する。

sIBM の診断目的の筋生検の際に採取筋の一部から CD56 陽性の筋芽細胞を FACS により分離・増殖させる。継続的に培養細胞個体数を増やす。整形外科で手術操作に伴い切除が必要となる正常筋を同年代の正常コントロールとして用いる。蛋白分解能低下や加齢・持続筋収縮刺激が sIBM の病態の背景にあるという仮説の下に、異常蛋白凝集を評価しうる病態モデルを確立する。具体的には、sIBM で蓄積が見られるアミロイド β や TDP-43 の凝集体成分として知られる蛋白を量子ドットを用いて単一分子レベルで特異標識する。標識蛋白により凝集性に違いが出ることを考慮し、sIBM 患者由来筋芽細胞における RNA シークエンス・プロテオームにより新たな凝集体形成成分の探索を行う。sIBM 患者生検筋凍結サンプルや hnRNPA1 変異封入体ミオパチー患者由来 iPS 細胞から MyoD 導入により分化させた骨格筋細胞において、免疫染色し、封入体への局在の有無を確認する。

封入体成分の発現のみでは凝集体形成が再現できない場合もありうる。加齢に伴う筋疾患である sIBM において異常蛋白の除去能低下や長年の筋収縮刺激が凝集体形成の引き金になると仮説を立てた。以前の検討でマウスのプロテアソーム欠損筋において凝集体形成がみられたことからプロテアソームをはじめとした蛋白分解系の阻害剤投与下での *in vitro* の凝集体形成を観察する。さらに長年の筋収縮刺激の持続を再現するために培養容器に電位をかけて強制的・持続的に筋収縮を起こし培養筋線維の成熟を促すことができる研究協力者・神崎らが開発した電気収縮培養系を用いて細胞ストレスを負荷し標識蛋白凝集体形成を観察する。さらには骨格筋特異的な病態を確認するために sIBM 患者由来筋芽細胞を Ascl1 などの転写因子導入により神経細胞へ直接分化させ、凝集体形成能が異なることを確認する。

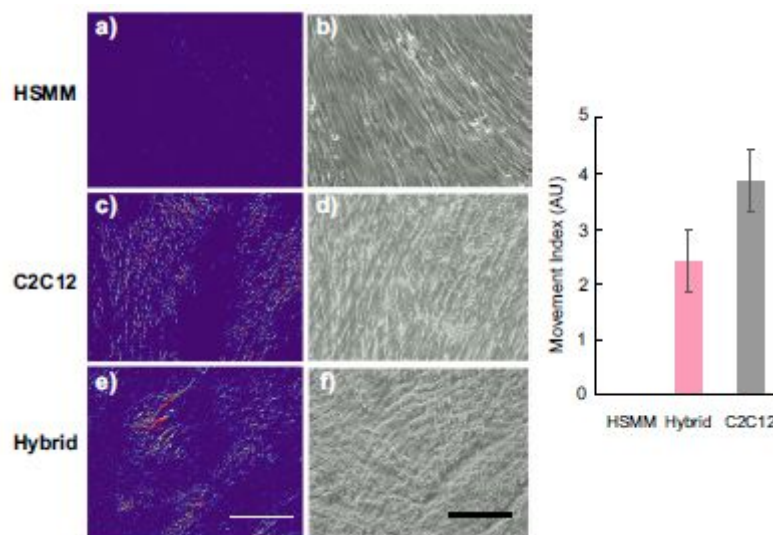
これらの解析をもとに 24/96 ウェルフォーマットの電気収縮培養系を作成し異常蛋白凝集体形成やエクソソームによる変化を 1 分子イメージングにより評価しうる薬剤スクリーニング系を確立する。sIBM 病態形成・進展のバイオマーカーおよび治療標的の同定につなげる。

4. 研究成果

本研究ではヒト封入体筋炎 (sIBM) 疑い患者から筋生検時に細胞を回収し、2 年間で計 6 ラインをストックした。長年の筋収縮の持続を再現する電気収縮培養系を用いてヒト骨格筋に細胞ストレスを負荷し、収縮ストレス前後での細胞を用いた RNA シークエンスで解析を行った。現在、結果を解析し、病態と関係する遺伝子について生物学的意義を検討している。論文化した主な成果は下記の二つである。

(1) 電気収縮培養における共培養系の特徴について国際誌に報告した。

ヒトとマウス由来の筋細胞が互いに融合したハイブリッド筋細胞を創製した。このハイブリッド筋細胞に対して、電気パルス刺激 (EPS) を付与することにより、その収縮活動能力を飛躍的に高めることに成功した。下図に、ヒトとマウス由来の筋細胞の電気収縮培養による収縮度合いの評価指標 (Movement index) 解析方法の一端を示す。運動性に障害のある筋疾患の場合でも、その疾患筋細胞をハイブリッド化することで「運動負荷テスト」などの細胞診断を行うことも可能となった。以上の結果を SciRep 誌に報告した。



(2) 蛋白質凝集に重要なプロテアソームを筋芽細胞において欠損させたモデル動物の解析により p53 が筋芽細胞プールの維持に重要であることを明らかにし国際誌に報告した。

プロテアソームを構成する Rpt3 というタンパク質の欠損を筋芽細胞でのみ誘導できるマウスを作成した。この Rpt3 を欠損したマウスではプロテアソームによるタンパク質分解が抑制され、Rpt3 欠損を誘導してから約 2 週間で筋芽細胞が減少し、筋肉の再生が正常に行われないことを明らかにした。Rpt3 の欠損により筋芽細胞の増殖および筋分化が抑制され、細胞死が誘導されることを示した。この増殖抑制や細胞死の際に、細胞増殖などに関わることを報告されている p53 というタンパク質の過剰な活性化が起こっていることを見出した。p53 の機能を人為的に抑制すると、筋芽細胞の増殖抑制が軽減されたことから、タンパク質分解系の抑制により引き起こされる筋芽細胞の機能不全に p53 が関与していることを突き止めた。本研究では蛋白質分解系が筋肉の幹細胞を維持するために必須であり、それらの破綻は筋肉の再生不全を引き起こすことを明らかにした。

また一分子ナノイメージングにて凝集体の成分とされる TDP-43などを標識し、収縮培養前後での凝集体形成の有無を評価していくこととしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Osana Shion, Yoshioka Kiyoshi, Tashiro Yoshitaka, Takahashi Ryosuke, Ono Yusuke, Aoki Masashi, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1523 ~ 1538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.10.009	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 Ono Hiroya, Suzuki Naoki, Kanno Shin-ichiro, Kawahara Genri, Izumi Rumiko, Takahashi Toshiaki, Kitajima Yasuo, Osana Shion, Nakamura Naoko, Akiyama Tetsuya, Ikeda Kensuke, Shijo Tomomi, Mitsuzawa Shio, Nagatomi Ryoichi, Araki Nobukazu, Yasui Akira, Warita Hitoshi, Hayashi Yukiko K., Miyake Katsuya, Aoki Masashi	4. 巻 -
2. 論文標題 AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.02.006	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 Chen Weijian, Nyasha Mazvita R., Koide Masashi, Tsuchiya Masahiro, Suzuki Naoki, Hagiwara Yoshihiro, Aoki Masashi, Kanzaki Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48316-9	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 Suzuki Naoki, Mori-Yoshimura Madoka, Yamashita Satoshi, ...Nishino Ichizo, Aoki Masashi	4. 巻 14
2. 論文標題 The updated retrospective questionnaire study of sporadic inclusion body myositis in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13023-019-1122-5	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	割田 仁 (Warita Hitoshi) (30400245)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	鈴木 直輝 (Suzuki Naoki) (70451599)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	