

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17007

研究課題名（和文）筋強直性ジストロフィーの骨格筋障害機構解明

研究課題名（英文）Mechanism of skeletal muscle disorders in myotonic dystrophy

研究代表者

蓮池 裕平（Hasuike, Yuhei）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90838351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：筋強直性ジストロフィー1型（DM1）は、CTG塩基繰り返し配列の異常伸長が原因の遺伝性疾患であるが、DM1の重要な症状である進行性筋萎縮の詳細な機構は解明されていない。DM患者由来筋芽細胞では早期増殖障害が報告されているが、患者由来細胞での解析には限界がある。今回われわれはこうした早期増殖障害の機序を明らかにするため、条件付きで異常伸長リピートRNAを発現させることが可能なモデル細胞を構築した。これらのモデル細胞ではテロメア短縮と直接関連しない早期老化が引き起こされた。さらに、毒性RNA発現は、ミトコンドリア機能障害、過剰なROS産生、DNA損傷応答を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DM1患者は、筋肉の衰え、認知機能障害、白内障、前頭部禿頭、内分泌異常などの早老症に類似した症状を呈する。本研究では、最適なヒトDM1細胞モデルを作成し、異常RNAの発現がテロメア非依存的なメカニズムで細胞老化を誘導することを実証した。また、その老化メカニズムの一端を明らかにした。異常伸長リピートをもつRNAに起因する老化誘導因子を標的とした介入は、DM1における早老症と類似した症状に対する治療薬につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a dominantly inherited disorder due to a toxic gain of function of RNA transcripts containing expanded CUG repeats (CUGexp). Although the involvement of cellular senescence, a critical component of aging, was suggested in studies of DM1 patient-derived cells, the detailed mechanism of cellular senescence caused by CUGexp RNA remains unelucidated. Here, we developed a DM1 cell model that conditionally expressed CUGexp RNA in human primary cells so that we could perform a detailed assessment that eliminated the variability in primary cells from different origins. Our DM1 model cells demonstrated that CUGexp RNA expression induced cellular senescence by a telomere-independent mechanism. Furthermore, the toxic RNA expression caused mitochondrial dysfunction, excessive reactive oxygen species production, and DNA damage and response. This study provides unequivocal evidence of the induction of premature senescence by CUGexp RNA in our DM1 model cells.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋強直性ジストロフィー 骨格筋障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋強直性ジストロフィー(myotonic dystrophy, DM)は、CTG や CCTG といった塩基繰り返し配列(リピート)の異常伸長が原因の遺伝性筋疾患で、筋強直や進行性の筋萎縮を呈する。DM では変異遺伝子より転写された、異常伸長リピートをもつ RNA が核内で凝集体を形成し、スプライシング制御因子を障害することで、スプライシング制御機構の破たんを来す。DM でみられる筋強直や心伝導障害は塩化物チャンネル、ナトリウムチャンネルのスプライシング異常が原因とされており、これまで DM では 400 以上のスプライシング異常が見つかったが、進行性筋萎縮の原因は解明されていない。

2. 研究の目的

前述の通り、DM で最も重要な症状である進行性筋萎縮の原因は、それが何らかのスプライシング制御異常に起因するかも含め、いまだにわかっていない。少数の DM 患者由来初代筋芽細胞を用いた研究では、筋分化障害や早期老化現象がみられるとする報告があるものの、患者由来初代筋芽細胞は各系統により大きくその特性が異なり、採取時の年齢や誘導条件に左右されることから、こうした現象の解析に供することができない。

そこで本研究では、ヒト線維芽細胞系を使用し、条件付きで異常伸長リピートを含んだ RNA を発現する DM 骨格筋障害の機構解明に最適な細胞モデルを構築する。この細胞モデルを使用し、RNA 毒性が細胞老化現象を誘導するかどうか、また、何が老化現象の引き金になるのかを明らかにするのを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DM1 モデル細胞の確立

pDWD を用いて、ADER 法により 800 リピートの CTG 塩基繰り返し配列を合成する。これを pLLC16 プラスミドコンストラクト内の DMPK 3'UTR 配列に挿入し、ヒト胎児肺線維芽細胞に導入して stable clone を確立する。

(2) DM1 モデル細胞を用いた早期細胞老化現象の解明

(1) で作成した細胞の継代培養を行い、早期細胞老化現象を評価する。また、テロメア長を測定することで、テロメア依存性老化であるかを確認する。さらに、遺伝子発現解析を行い、異常 RNA により影響を受けた因子を同定し、DM における細胞老化 pathway を明らかにする。

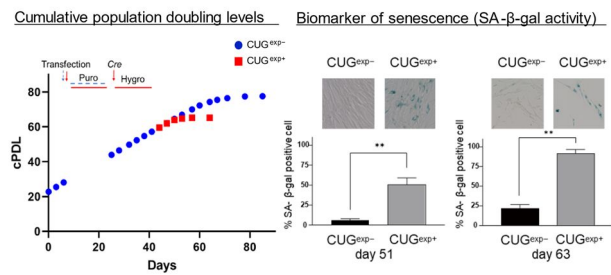
4. 研究成果

(1) DM1 モデル細胞の確立

異常伸長リピートを持つ RNA 発現が細胞老化に及ぼす影響を調べるために、DM1 細胞モデルを作成した。まず、正常ヒト肺線維芽細胞に 800CTG リピートを含む pLC16 を導入した。この細胞を Cre recombinase で処理し、DM1 モデル細胞を確立した。Expanded CUG repeat (CUG^{exp}) RNA を発現した細胞では、DM1 患者細胞と同様に、RNA 凝集体形成を認めた。

(2) DM1 細胞モデルでの早期細胞老化現象

CUG^{exp} を発現する細胞 (CUG^{exp+}細胞) と CUG^{exp} を発現していない細胞 (CUG^{exp-}細胞) を用いて各々の増殖能を比較した。CUG^{exp+}細胞では、細胞増殖が遅延し、細胞分裂が早期に停止した。老化細胞のバイオマーカー活性を調べたところ、CUG^{exp+}細胞では、CUG^{exp-}細胞と比較して、SA-beta-gal 陽性細胞が増加した(図1)。このように、DM1 モデル細胞において、CUG^{exp} の発現は細胞分裂の早期停止と老化を誘導することを見出した。



(図1) CUG^{exp+} と CUG^{exp-} 細胞における細胞増殖とSA-βgal陽性細胞率

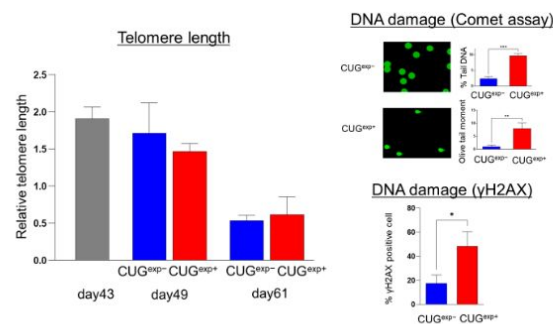
(3) CUG^{exp} RNA 発現に起因する老化誘導因子の同定

CUG^{exp} RNA が細胞老化を誘導する因子を同定するために、CUG^{exp+}細胞と CUG^{exp-}細胞を用いて RNA 解析 (RNA-seq) を実施した。p53 シグナル伝達に関わる遺伝子が特に CUG^{exp+}細胞で上昇していることが明らかになった。この経路には、PAI-1 をコードする SERPINE1 と、PAI-1 による老化の下流標的である IGFBP3 が関与し、いずれも顕著に発現が上昇した。これらの遺伝子は、ヒトおよびマウスの線維芽細胞において、老化のマーカーとしてだけでなく、老化の誘導因子としても報告されている。これらの結果から、DM1 モデル細胞において、CUG^{exp} RNA の発現により PAI-1-IGFBP3 経路が活性化されることが判明した。この結果は CUG^{exp} RNA 毒性の老化への影響を評価する上で、重要な知見と考えられる。

(4) CUG^{exp} RNA 発現に起因する老化パスウェイの解明

PAI-1 や IGFBP3 は p53 の活性化によって誘導されることが報告されている。TP53 (p53) \ CDKN1A (p21) \ CDKN2A (p16) などの細胞周期チェックポイント遺伝子は、代謝活性があるにもかかわらず細胞老化を誘導する。CUG^{exp+}細胞で TP53、CDKN1A、CDKN2A の発現レベルは有意に増加した。この結果は、CUG^{exp} RNA の発現が細胞周期チェックポイント阻害剤の発現を増加させ、DM1 モデル細胞において細胞周期停止をもたらすことを示している。

次に、DM1 モデル細胞における細胞周期阻害物質上昇の制御機構を検討した。テロメアの短縮は、細胞周期停止の重要な分子機構である。DM1 モデル細胞の継代培養時のテロメア長を qPCR で計測し、CUG^{exp-}細胞と CUG^{exp+}細胞のテロメア長は、継代により短くなったが、両細胞でテロメア長短縮の程度に有意差は認めなかった(図2:左)。このことから、テロメア短縮は、CUG^{exp} RNA 毒性による細胞老化促進とは関係しないことが示唆された。テロメア非依存性老化は、正常な増殖細胞であっても、DNA 損傷に反応して DNA 損傷応答 (DDR) が引き起こされることで起こる。DNA 損傷の程度を反映するパラメータである tail DNA、Olive tail moment(OTM) および γ-H2AX foci は、CUG^{exp+}細胞で有意に増加した(図2:右)

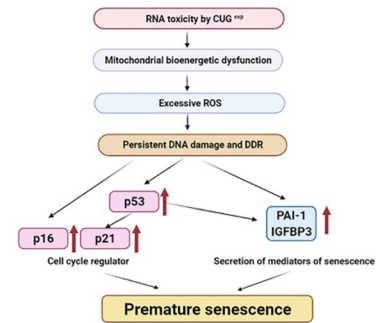


(図2) toxic CUG^{exp} RNAによるテロメア短縮、DNA damageへの影響

次に、DNA 損傷の原因としてミトコンドリア機能障害に着目した。CUG^{exp+}細胞において、ミトコンドリア活性酸素(ROS)が有意に増加し、ミトコンドリアのエネルギー機能の指標となる

細胞内 ATP レベルは CUG^{exp}+細胞で著しく低下した。したがって、今回の研究から、CUG^{exp} RNA がミトコンドリア機能障害を引き起こし、ROS 産生を介して早期の老化に寄与することを見出した。

今回の研究実績により CUG^{exp} RNA は、ミトコンドリア機能障害、ROS 産生、DDR 活性化を引き起こし、早期の老化を誘導することを明らかにした。今回明らかになった CUG^{exp} RNA に起因する老化誘導因子を標的とした介入は、DM1 における老化に類似した症状に対する新たな治療薬につながる可能性がある。



(図3) CUG^{exp} RNA 発現による早期老化現象の想定されるメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hasuike Yuhei, Mochizuki Hideki, Nakamori Masayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Expanded CUG Repeat RNA Induces Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Model Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	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） 10.3389/fgene.2022.865811	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 Hasuike Yuhei, Mochizuki Hideki, Nakamori Masayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Cellular Senescence and Aging in Myotonic Dystrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2339 ~ 2339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23042339	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hasuike Y
2. 発表標題 Expanded CUG repeat RNA induces premature senescence in myotonic dystrophy
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hasuike Y
2. 発表標題 Expanded CUG repeat RNA induces premature senescence in myotonic dystrophy
3. 学会等名 13th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------