

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16571

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による多系統蛋白質症の神経筋共通病態解明と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Elucidation of common neuromuscular pathomechanism in multisystem proteinopathy and search for therapeutic target molecules

研究代表者

井泉 瑠美子 (Izumi, Rumiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60571453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：封入体ミオパチー病理診断例を対象とした網羅的ゲノム解析により、新たに2家系3症例にhnRNPA1遺伝子変異を確認し、多系統蛋白質症3型(MSP3)の診断に至った。そのことによりMSP3型変異保有骨格筋を用いたトランスクリプトーム解析が可能となり、hnRNPA1の機能と関わる複数のパスウェイがMSP3群で有意に抑制されていた。これらのパスウェイの主要な分子について、骨格筋組織および患者由来iPS細胞を用いて発現・局在に関する評価検討を行い、病的変化を確認した。また、MSP3型変異保有骨格筋において、300を超える分子に選択的スプライスパターンの変化が認められ、筋変性との関わりが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網羅的遺伝子解析により、多系統蛋白質症の新規診断例が加わった。そのことにより骨格筋組織を用いた病理学的解析・トランスクリプトーム解析が可能となり、本症における筋変性機序の一端を明らかとすることができた。さらに、共通する新たな治療標的分子を明らかにすることができれば、神経筋に共通する変性病態解明が大きく前進し、その成果は、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、封入体形成筋疾患の治療法開発に広く応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive genomic analysis of pathologically diagnosed cases of inclusion body myopathy revealed hnRNPA1 gene mutations in 3 cases from 2 families, leading to the diagnosis of multisystem proteinopathy type 3 (MSP3). Furthermore, transcriptome analysis using MSP3 skeletal muscle specimen revealed that multiple pathways related to hnRNPA1 function were significantly suppressed in the MSP3 group. We evaluated the expression and localization of key molecules in these pathways using skeletal muscle tissue and patient-derived iPS cells, and examined their relationship with hnRNPA1 to verify their pathological significance. In addition, more than 300 molecules showed altered splice patterns in MSP3 skeletal muscle specimen, suggesting its involvement in muscle degeneration.

研究分野：脳神経内科

キーワード：多系統蛋白質症 封入体 トランスクリプトーム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MSP は、大脳皮質、運動ニューロン、骨格筋、骨組織を含む多系統の組織に、ユビキチン陽性封入体を特徴とする病的蛋白蓄積と進行性組織変性が惹き起こされる結果、いずれも神経難病で治療法の確立していない前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia : FTD)、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS)、封入体ミオパチー (inclusion body myopathy : IBM)、および骨パジェット病 (paget disease of bone : PDB) を単独もしくは 2 つ以上の組み合わせで呈する顕性遺伝性疾患である。

2013 年に疾患概念が確立されて以降、RNA 結合蛋白および蛋白分解 (autophagy) 関連蛋白の遺伝子異常が明らかとなり、それらの機能異常による病的 RNA 顆粒蓄積を伴う RNA 代謝の恒常性破綻が発生の主病態であることまでが推定されている。MSP1~5 型として原因遺伝子毎に分類され、各々の遺伝子機能を軸とした細胞・動物モデルによる病態再現や投薬研究が行われているが、何故これら複数の遺伝子が共通して多系統組織に進行性変性を引き起こすのか、これらの組織選択性は何故生じるのか、いずれも明らかとなっていない。前者の問いと関連する共通治療標的分子の存在は明らかとなっておらず、現在までに MSP に一貫した治療的効果をもたらす候補薬剤はない。

### 2. 研究の目的

MSP あるいは IBM 疑い症例を対象とした網羅的遺伝子解析により、MSP の新たな原因遺伝子および疾患修飾遺伝子の候補を抽出する。原因遺伝子候補が検出されない場合にも、骨格筋組織由来 RNA を用いたトランスクリプトーム解析を行い、その結果から新たな疾患修飾遺伝子の同定を試みる。生検骨格筋組織や MSP3 型関連 hnRNPA1 遺伝子変異患者由来 iPS 細胞を用いた検証を重ね、原因遺伝子あるいは疾患修飾遺伝子の病的意義を明らかとし、各 MSP 病型や細胞種に共通する治療標的分子を見出すことを最終目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) MSP の新たな原因遺伝子・疾患修飾遺伝子を明らかとするための遺伝子解析

罹患者ゲノム DNA を用いて、SureSelect Human All Exon kit を用いて全エクソン領域の抽出を行い、次世代シーケンサー HiSeq2500 (Illumina) で、網羅的に塩基配列を決定する。情報解析により、MSP 既知遺伝子、RNA 結合蛋白、蛋白分解系分子に注目したレアバリエーションの抽出を行う。

並行して、罹患者骨格筋組織から RNA 抽出を行い、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行う。ゲノムレベルで検出しているレアバリエーションやその他の分子について網羅的に mRNA レベルでの発現量変化の確認し、GO 解析、パスウェイ解析、スプライス変動の検出を行う。

#### (2) 新たな MSP 候補遺伝子の骨格筋組織・iPS 細胞を用いた病態再現

上記までの解析から検出した MSP 原因遺伝子の候補分子について、罹患者骨格筋組織における局在と凝集体形成の有無を免疫組織化学にて評価する。既知の関連蛋白 (RNA 結合蛋白、蛋白分解系分子) との関係にも注目し、他の神経筋疾患や hnRNPA1 変異例の骨格筋組織を比較対象とする。トランスクリプトーム解析およびウェスタンブロットングで RNA 量、蛋白量についての変動の確認を行う。上記により絞り込まれた最終候補分子、あるいはパスウェイについて、罹患者由来 iPS 細胞を樹立し検証する。

### 4. 研究成果

#### R2 年度

縁取り空胞を伴う封入体ミオパチー 5 家系 5 例を対象に次世代シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患/多系統蛋白質症関連遺伝子のターゲットリシーケンス解析を行った。2 家系 2 名の罹患者に、既報 (Izumi, et al. 2015) と同様の hnRNPA1 遺伝子, p.D314N ヘテロ接合性変異を検出し、サンガー法で確認した。上記 2 名の全エクソーム解析を追加で行うも同変異のほか、病的バリエーションを検出しなかった。この新規診断 2 例の生検筋病理評価を行ったところ、慢性筋原性変化、縁取り空胞、軽度 COX 活性低下、1 症例で軽度筋線維タイプ群化を確認した。電顕標本においては、核と隣接する自己貪食空胞、筋核と隣接するグリコーゲン・脂肪滴蓄積、筋核不整、ミトコンドリア増生、筋原線維断片化を観察した。更にこの新規診断 2 例と既診断 1 例を含めた計 3 例の hnRNPA1 遺伝子, p.D314N ヘテロ接合性変異患者由来凍結骨格筋組織より

RNA 抽出を行い、他の遺伝性封入体ミオパチー（8 検体）および疾患コントロール（5 検体）とともにトランスクリプトーム解析を行った。

#### R3 年度

解析に足る RNA シークエンスデータ量を得て、TopHat で mapping を行い、RNA 発現量群間比較は DESeq2 を用いて行った。MSP3 型/hnRNPA1 遺伝子変異群と疾患コントロール群との比較において、200 を超える発現変動遺伝子（DEG）を抽出した。それらについて、Enrichment 解析、GO term 解析を行ったところ、hnRNPA1 の機能とも関わる複数のパスウェイが MSP3 群で有意に抑制されていることが明らかとなった。qRT-PCR において、これらのパスウェイ上の主要分子の RNA 発現量の有意差の再現性について確認を行った。

#### R4 年度

最終年度は、MSP3 型群で有意に抑制がみられていた複数のパスウェイの主要な分子について、凍結骨格筋組織および患者由来 iPS 細胞における発現・局在評価、hnRNPA1 や他の多系統蛋白質症関連分子との関連について検討、検証を重ねた。また、RNA シークエンス解析データを用いて、MSP3 型群骨格筋におけるスプライス異常の検出を Leafcutter にて行った。コントロール群との比較により、300 を超える分子に選択的スプライスパターンの有意な変化を認め、Enrichment 解析、GO term 解析により、筋変性に関わりうる遺伝子セットを複数検出した。継続中の IBM 疑い症例を対象とした網羅的遺伝子解析により、新規 1 例に hnRNPA1 遺伝子、p.D314N ヘテロ接合性変異を確認した。

以上より、本研究期間において、2 家系 3 例の封入体ミオパチー患者に既知の hnRNPA1 遺伝子変異を確認し MSP3 型の診断に至った。このことにより、蓄積された筋組織検体を用いた病理学的解析と筋組織 RNA を用いたトランスクリプトーム解析が可能となり、多系統蛋白質症の病因となりうる複数のパスウェイおよび病態仮説を絞り込むに至った。今後更なる検証を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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