

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15621

研究課題名（和文）尿中細胞を用いた筋強直性ジストロフィー1型骨格筋細胞モデルの構築

研究課題名（英文）Establishment of a skeletal muscle cell model of myotonic dystrophy type 1 using urine derived cells

研究代表者

佐藤 充人 (Sato, Mitsuto)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：10816630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：DM1患者尿より分離・培養した尿中細胞は、DM1病態を反映する核内RNA凝集体（RNA foci）の形成、RNA fociとMBNL1の共在、継代に伴うCTGリピートの伸長を示した。DMPK遺伝子を標的としたsiRNAによりRNA fociは減少を認めており、尿中細胞は治療開発に用いる細胞モデルとして使用できる可能性を示した。尿中細胞が多様な細胞種からなる集団であることが筋分化誘導の妨げとなっており、本研究期間内では目的としたDM1骨格筋細胞モデルの構築には至らなかったが、尿中細胞は個々の患者の病態を反映し、個別化医療の開発に寄与する有用なツールであること提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間内では目的としたDM1骨格筋細胞モデルの構築には至らなかったが、DM1患者由来の尿中細胞は病態の根本的原因である核内RNA凝集体の形成、継代に伴うCTGリピート伸長を呈しており、患者病態を反映したバイオマーカーとしてのポテンシャルを示すことができた。尿中細胞は個々の患者の病態に応じた個別化医療の開発に寄与する有用なツールであることを提示することができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Urinary derived cells (UDCs) isolated and cultured from DM1 patients showed formation of nuclear RNA aggregates (RNA foci), co-localization of RNA foci and MBNL1, and CTG repeat elongation with passaging, reflecting DM1 pathology. siRNAs targeting the DMPK gene reduced RNA foci, indicating that UDCs showed the potential to be used as a cellular model for therapeutic development. The diverse population of UDCs hindered the induction of muscle differentiation, and the desired DM1 skeletal muscle cell model could not be established within the time frame of this study. However, we were able to show that UDCs reflect the pathology of individual patients and are a useful tool that can contribute to the development of personalized medicine.

研究分野：神経科学

キーワード：尿中細胞 筋強直性ジストロフィー 細胞モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋強直性ジストロフィー1型 (myotonic dystrophy type 1)

筋強直性ジストロフィー1型 (DM1) は常染色体優性遺伝形式の、成人で最も頻度高い難治性筋疾患である。進行性の筋力低下・筋萎縮だけでなく、白内障、心病変、内分泌異常や中枢神経症状など全身に症状を呈する。DMPK 遺伝子の3' UTRにあるCTG 3塩基繰返し配列の異常伸長が原因となり、異常 DMPK mRNA が核内で RNA 凝集体を形成して pre-mRNA スプライシング制御因子の MBNL (muscleblind like splicing regulator) が絡めとられて枯渇することで、様々な mRNA のスプライシング異常が引き起こされることで多彩な全身症状を引き起こすと考えられている。現状で治療法は開発されておらず、早急な治療薬開発が望まれている。

(2) 尿中細胞を用いたダイレクトリプログラミングによる骨格筋細胞モデル

ヒトの自然排出される尿には腎系球体や尿細管に由来すると考えられ、良好な増殖能、多分化能を有する細胞が存在し、これを尿中細胞と呼ぶ。この尿中細胞が疾患細胞モデルとして利用できることに着目し、筋制御因子である MYOD1 を導入して低分子化合物を併用することで短期間に骨格筋細胞(筋管細胞)にダイレクトリプログラミングする方法が報告されている (Takizawa, et al. Sci Rept 2019)。尿中細胞は無侵襲にくり返し採取が可能で、培養に特別な技術や設備を必要とせず、高い筋分化誘導効率と再現性を有する汎用性・拡張性の利点がある。患者から採取した尿中細胞は、個々の患者の遺伝情報やエピジェネティックな要因など病態の多様性・個別性を反映し、研究開発を大きく促進できると思われる。

(3) 個別化医療と細胞モデル

これまで先天性筋疾患領域は対症療法が主であったが、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する核酸医薬に代表されるように、発症機序の解明に基づいた根本的治療開発の可能性が拓けている。DM1 においても異常 RNA による広汎なスプライシング障害という病態が明らかとなっており、核酸医薬や低分子化合物による治療法の開発が進んでる。今後、新規の治療法が開発されていくなかで、遺伝性疾患においても、個々の患者の病態に応じた個別化 (プレシジョン) 医療の開発が進むと予想され、そのためには個々の患者の病態を反映し、患者に負担がなく、簡便で、かつ汎用性、安定性に優れた患者由来の細胞モデルの確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は DM1 患者より採取した尿中細胞に筋分化誘導因子である MYOD1 を強制発現させて骨格筋へとダイレクトリプログラミングし、病態研究・治療開発研究に用いることができる疾患細胞モデルの構築を目的とする。また DM1 骨格筋細胞モデルの表現型を指標として、核酸医薬による治療効果の評価ツールとしての有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) DM1 患者のリクルートと尿中細胞の培養

すでに遺伝子検査で DM1 と確定診断された当院受診患者で、同意が得られた患者から尿の提供を受け、尿中細胞を分離・培養した。尿中細胞の分離、培養は既報告 (Takizawa, et al. J Vis Exp 2020) の方法を基に行った。患者尿を遠心し得られた尿中細胞を含む沈渣成分は、24 ウェルプレートに播種した。それぞれのウェルで出現したシングルコロニーのうち、紡錘形の細胞集団を継代し、解析に用いた。これは経験的に、紡錘形をした尿中細胞は筋分化誘導されやすい傾向があるためである。

(2) DM1 患者尿中細胞の表現型解析

DM1 患者より採取した尿中細胞を継代し、培養初期 (Passage 3) と後期 (Passage 10) における以下の表現型解析を行った。

RNA 凝集体 (RNA foci) の核内形成と MBNL 凝集の共在の確認

RNA foci を検出するために、CTG リピートに対するペプチド核酸プローブを作成し FISH 解析を行った。また同時に MBNL1 免疫細胞染色を行い、核内における RNA foci と MBNL1 凝集体の共在を確認した。

継代に伴うリピート不安定性の評価

DM1 では同一組織でも細胞ごとに CTG リピート数にばらつきが見られ、通常のゲノム DNA でのサザンプロットではスミア状にしか解析できない。そこで、極微量なゲノム DNA で PCR を行い、1 反応において 1~数アレルのみを増幅し (これを約 50 反応行う) そのバンドサイズのばらつきをサザンプロットで解析する 'Small-pool PCR 法' を用いて CTG リピート数を評価した。

(3) mRNA リプログラミングによる尿中細胞の筋分化誘導

本研究申請時には、骨格筋細胞への分化誘導を先行研究で確立された MYOD1 レトロウイルス

ベクターを用いたダイレクトリプログラミング法を用いることを計画していたが、この方法では同一患者で採取した細胞間でも筋分化誘導効率に差が見られていた。また、筋分化誘導時にヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害薬 (3-deazaneplanocin A; DZNeP) を使用していたが、これにより筋分化に関連する遺伝子以外にも、尿中細胞のエピゲノムを大幅に変化させる可能性が考えられた。DM1 ではスプライシング異常やクロマチン構造の変化、エピジェネティックな修飾の異常が病態に関与すると報告されており (Ueki, et al. Sci Rept 2017)、このようなエピゲノム修飾薬による本来の病態に対する影響が危惧された。また諸般の理由から P2 実験施設の利用が困難となったため、ウイルスベクター以外の新規筋分化誘導法の確立を目指し、mRNA リプログラミングによる筋分化誘導を行った。筋分化誘導因子である MYOD1 の cDNA 配列を鋳型として、*in vitro* 転写合成で MYOD1 mRNA を作成した。リポフェクション法 (Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent, Thermo Fishers 社を使用) とエレクトロポレーション法 (Nucleofector 2b, Lonza 社を使用) を用いて尿中細胞に MYOD1 mRNA をトランスフェクションした。各トランスフェクション条件の検討と、筋分化誘導時の培地条件、筋分化誘導を促進する低分子化合物 (SB431542, DAPT) の添加、siRNA による筋分化誘導阻害遺伝子の抑制 (POU5F1 の発現抑制) など、複数の条件検討を行った。

(4) small interfering RNA (siRNA) による RNA foci 減少効果の確認

DM1 患者尿中細胞が薬剤の治療効果スクリーニングに有用であるかを検証するため、市販の DMPK 遺伝子を標的とした siRNA (Silencer Select siRNAs, Thermo Fisher 社) を尿中細胞にリポフェクション法 (Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent, Thermo Fisher 社) でトランスフェクションし、48 時間後に RNA foci の減少効果が得られるかを FISH で確認した。

4. 研究成果

(1) 尿中細胞の分離・培養

患者サンプル数は当初見込まれていた数よりも大幅に少なかった。遺伝子検査を実施されていない症例もあり、結果 DM1 患者 8 名から尿の提供を受け、5 例の尿中細胞の分離・培養に成功した (図 1)。また健常者 5 名の尿中細胞の採取ができた。

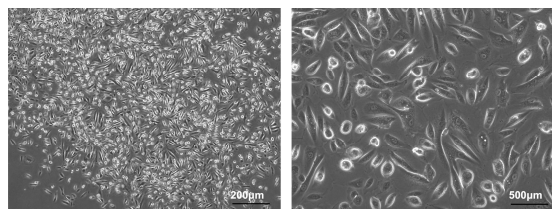


図 1 尿中細胞の初代培養 (Day 10)

(2) 尿中細胞は核内に RNA foci を形成し、継代とともに RNA foci の増加・CTG リピート伸長を示した

尿中細胞の FISH による解析では、初回の継代時からすでに RNA foci の形成が見られており、これは継代を経るごとに増加した (図 2)。MBNL1 の免疫染色では、全ての RNA foci と共存しているわけではなく、その数は継代によっても大きな変化はなかった。また CTG リピート長とも相関は見られず、おそらく尿中細胞での MBNL1 タンパクの発現量が少ないことが関与しているものと考えられた。small pool PCR を用いたザンプロットによる CTG リピート長の評価では、解析数が少ないが (N=2)、継代とともにリピート長が伸長していくことが示された。これは DM1 病態の重要な特徴の一つを示しており、リピート伸長現象の病態研究、リピート伸長をターゲットとした治療薬研究に尿中細胞が利用可能であることを示している。

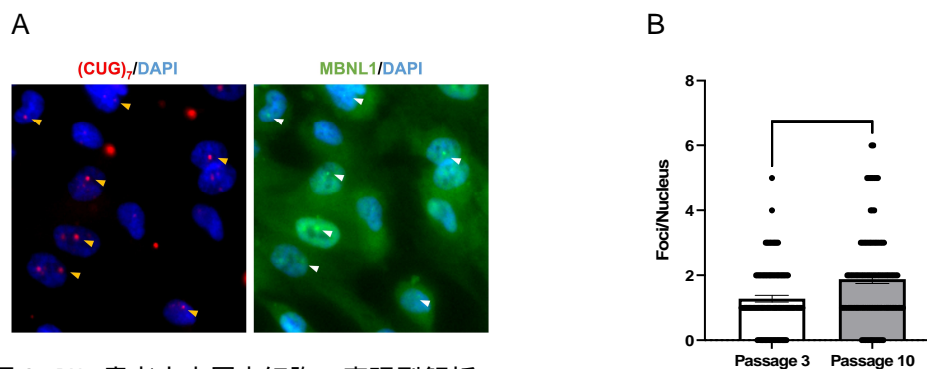


図 2 DM1 患者由来尿中細胞の表現型解析

(A) 核内に FISH 法で RNA foci (◀) が検出され、同時施行の免疫染色によって MBNL1 凝集 (◁) の共存が観察された。

(CAG)₇ probe: PNA chemistry conjugated in 5 with a fluorochrome as Cy3 (Cy3-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG), Monoclonal mouse anti-MBNL1 antibody (abcam, ab45899, 1:200)

(B) 40 歳女性 DM1 患者由来の尿中細胞の一つの核における RNA foci の数を Fiji ソフトウェア (NIH) を使用してカウントした。3 継代目、10 継代目の細胞でそれぞれ 100 個の核でカウ

ントした RNA foci の平均 ± SEM を表記。 ** $p=0.0021$ (Mann-Whitney 's U 検定)。

(3) 効率的な筋分化誘導には、尿中細胞の均質化が必要である

尿中細胞に MYOD1 mRNA をトランスフェクションし、骨格筋分化誘導を行った。mRNA のトランスフェクション量、時間、回数等の条件を検討し、また mRNA 導入後の筋分化培地に低分子化合物を投与するなど複数の条件を検討した。しかし筋分化後期マーカー (Myosin heavy chain、Myogenin) の発現は確認されたが、筋管形成に至ることはなかった (図3)。また、同一患者由来でもサンプル毎に細胞死が誘導される頻度や遺伝子発現量に違いがみられた。これまでの経験から、筋分化誘導効率が高い紡錘形の尿中細胞を選択して使用してきたが、用手的な、視覚的な方法ではヘテロな細胞集団である尿中細胞を分離することは困難で、一見形態学的に同一なように見えても細胞のエピゲノム発現が異なり、分化誘導がされ易い、され難い細胞が存在することが示唆された。このことは、本研究が患者ごとの表現型の差を検出することを目的としている上で、再現性、信頼性を担保するにあたり解決すべき最大の課題であることを強く認識させた。現在、筋分化誘導に至適な細胞集団の同定とアイソレーションを行うべく研究を継続している。

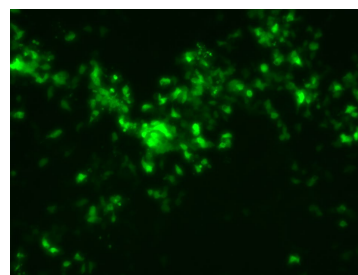


図3 MYOD1 mRNA トランスフェクションによる筋分化誘導後尿中細胞の Myosin heavy chain(MHC)免疫染色 MHC 発現を認めたが、細胞によって発現量は異なり、明らかな筋管形成 (細胞の融合) は認めなかった。

(4) DM1 患者尿中細胞は異常 RNA 凝集をターゲットとした治療薬開発において、薬剤スクリーニングに使用できる

DM1 患者尿中細胞 (Passage 10) に *DMPK* 遺伝子をターゲットとした市販 siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher 社) を用いてトランスフェクションし、48 時間後に FISH で RNA foci 数を解析したところ、siRNA 投与によって有意差を持って RNA foci は減少した (図4)。これは DM1 の治療薬開発において、異常 RNA 凝集をターゲットとした治療薬の治療効果スクリーニングに尿中細胞が有用であることを示唆している。

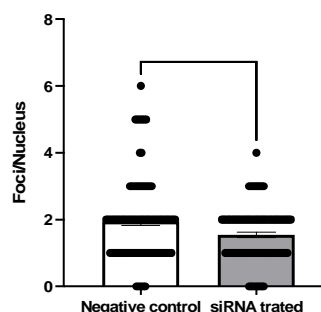


図4 *DMPK* 遺伝子を標的とした siRNA 投与後の FISH 解析

50 μ M の *DMPK* siRNA とスクランブル配列 siRNA (Negative control) をトランスフェクションした。尿中細胞の一つの核における RNA foci の数を Fiji ソフトウェア (NIH) を使用してカウントした。それぞれ 100 個の核でカウントした RNA foci の平均 ± SEM を表記。 * $p=0.04$ (Mann-Whitney 's U 検定)。

以上より、本研究期間内では目的とした DM1 骨格筋細胞モデルの構築には至らなかったが、尿中細胞の持つ患者病態を反映したバイオマーカーとしてのポテンシャルを示すことができた。尿中細胞が個々の患者の病態に応じた個別化医療の開発に寄与する有用なツールであることを提示することができたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuto Sato , Naoko Shiba , Daigo Miyazaki , Yuji Shiba , Akinori Nakamura	4. 巻 2587
2. 論文標題 Restoring Dystrophin Expression with Duchenne Muscular Dystrophy Exon 45 Skipping in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 141-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2772-3_8	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 邦武 克彦, 佐藤 充人, 滝澤 歩武, 本橋 紀夫, 青木 吉嗣
2. 発表標題 Subpopulation analysis of urine-derived cells to advance cellular model of muscle diseases
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021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
---------	---------