

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293214

研究課題名(和文)先天性筋ジストロフィーに対する画期的治療法開発

研究課題名(英文)Elucidation of molecular pathomechanism and development of therapy for collagen VI deficiency

研究代表者

西野 一三(NISHINO, Ichizo)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第一部・部長

研究者番号：00332388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：VI型コラーゲン欠損先天性筋ジストロフィーの分子病態解明を目的とした。疾患モデルマウスを2種類作成した。どちらのマウスも非進行性の筋力低下と筋重量低下を示した。また、筋病理では筋線維数の低下、大小不同、線維化の亢進を認めた。また、VI型コラーゲンを分泌する間質前駆細胞は増加し、形態も変化していた。以上の結果から、筋線維数減少と線維化が本疾患の病態であり、間質前駆細胞が治療の標的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Congenital muscular dystrophies with collagen VI deficiency are inherited muscle disorders are caused by mutations in one of COL6A1-3 genes. Muscle pathology is characterized by fiber size variation and increased interstitial fibrosis and fat infiltration. In this study, we define critical events that contribute to muscle weakness and fibrosis in mouse models with collagen VI deficiency. The Col6a1 mutant mice develop non-progressive weakness from younger age, accompanied by stunted muscle growth due to reduced IGF-1 signaling activity. In addition, these mutant mice have high numbers of interstitial mesenchymal progenitor cells, which dramatically increase with repeated myofiber necrosis/regeneration. Our results suggest that impaired neonatal muscle growth and the activation of the mesenchymal cells in skeletal muscles contribute to the pathology of collagen VI-deficient muscle diseases, and more importantly, provide the insights on the therapeutic strategies for the disease.

研究分野：筋病学

キーワード：遺伝病 骨格筋 治療 コラーゲン 間質前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

骨格筋線維は結合組織に包まれている。この結合組織は筋線維間を連絡し、運動時に筋線維に強度と弾性とを与え、運動に伴う機械的負荷から筋を守っている。その中で、太いコラーゲン線維と基底膜とを連絡する分子が型コラーゲンである。この型コラーゲン遺伝子(*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*)の変異により関節異常を伴った重篤な先天性筋ジストロフィーが引き起こされる。筋症状の他、華奢な体つきに加え、生下時より体幹近位に関節拘縮を、遠位関節には過進展を認める。本疾患は本邦では福山型に次いで先天性筋ジストロフィーの中で2番目に多い。この疾患に対する治療法は未だ確立されていない。研究代表者の西野らは、今までに、患者筋で観察される型コラーゲンの分布には完全に欠損している例と筋鞘膜のみで欠損している例があること (Neurology 2004)。前者は劣性変異であり、後者は優性または突然変異であること、を報告してきた (Neurology 2007)。また、優性変異を分子を含む型コラーゲンは基質や筋細胞への結合性が低下することを報告した (Neurology 2007, Muscle & Nerve 2008)。興味深いことに型コラーゲン分子は筋線維で合成されるのではなく、間質に存在する間質前駆細胞によって作られることが報告されている。2002年に型コラーゲンのサブユニット分子をコードする*Col6a1* 遺伝子破壊マウス (*Col6a1KO*) が報告された。このマウスは筋力低下が比較的軽度であることから、より軽症の疾患であるベスレムミオパチーのモデルとされた。また、このマウス由来の繊維芽細胞では変性したミトコンドリアからのネクロシスの誘導が観察され、ミトコンドリア膜透過性遷移ポアの阻害薬である cyclosporinA が筋細胞死の抑制に効果があるとされたが、患者への長期投与の結果ではその効果は限定的であった。その後、変性ミトコンドリアの蓄積にはオートファジー誘導の遅延が原因であることが提案されている。また、このマウスでは脂肪組織の減少が示されており、この疾患と代謝異常との関連も考えられた。我々は患者生検筋での筋病理解析と独自に作製した *Col6a1* 遺伝子欠損マウスの解析を行い、本疾患の筋病理の特徴は筋線維大小不同と線維化および進行例での脂肪化の亢進であることを明らかにしている。2010年、上住らにより、骨格筋に存在する間充織前駆細胞について、骨格筋の異所性脂肪細胞に分化しうること (Nat Cell Biol 2010)、また、この細胞は骨格筋疾患で見られる線維化と脂肪組織の起源であることを示された (J Cell Sci 2011)。このことから骨格筋に存在する間質細胞が本疾患の病態に深くかかわっているのではないかと

考えられた。このことは、本疾患の発症機序の理解には、型コラーゲンを発現する間質細胞の機能と型コラーゲン発現の意義、並びに疾患における細胞の動態を理解することが必要であり、また、遺伝子治療、細胞治療のためには、このような間質細胞を標的とした治療法の確立が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は遺伝性筋疾患の病態解析、治療法開発研究を通して、未だに不明の点が多い骨格筋の間質に存在する間質前駆細胞の役割に迫ろうとするものである。このような細胞は、骨格筋が収縮装置として働くための細胞外の環境を整えているだけではなく、骨格筋の老化、筋線維の崩壊、再生に伴う骨格筋組織の再構築に深く関わっていると推察される。将来的な骨格筋組織の再生医学や組織工学を見据えた基礎的な情報を与えるものと考えている。具体的には下記5項目の研究を行う。

- (1) *Col6a1KO*、*Col6a1* in-frame 欠失 (IFD) マウスでの骨格筋病態パラメーターを測定する。
- (2) *Col6a1KO* マウスでの代謝異常の病態への関与を明らかにする。
- (3) *Col6a1KO* マウスに対するタンパク質補充治療の有効性を明らかにする。
- (4) 成熟骨格筋での型コラーゲン発現細胞の同定と *Col6a1KO*、*Col6a1IFD* マウス骨格筋における動態を明らかにする。
- (5) 型コラーゲン欠損症モデルマウスに対する遺伝子治療の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

● *Col6a1KO Col6a1IFD* 骨格筋病態パラメーターの測定

トリプルヘリカルドメインに存在する変異部位近傍を認識する zinc finger nuclease 切断後、初期胚の中で遺伝子修復させることで、*Col6a1IFD* マウスを作製した。野生型マウスの掛け合わせにより、系統化した。他の筋疾患モデルマウスで確立した方法 (Physiol Genom 2008, Nat Med 2009) を応用することで、離乳後から1年齢までのマウスを経時的に測定した。測定項目は、トレッドミル走行能力、握力、呼吸パラメーター、心電図、自発運動量、血清CK、ex vivoでの骨格筋及び横隔膜収縮力、筋病理 (15種類のルチン染色及び筋線維径、線維化面積)、生化学試験 (ヒドロキシプロリン定量、筋萎縮関連遺伝子発現) である。

- *Col6a1*KO マウスの代謝異常の骨格筋病態への関与の解析

*Col6a1*KOマウスは脂肪組織形成が抑制され、スリムな体型と低体重を示す。16時間飢餓にしたモデルマウスに、40mgのグルコース、または、20mUのインスリンをともに与え、経時的に血中グルコース濃度を測定した。

IGF1量はELISAにて、AKT1および下流分子の活性化はウエスタンブロットにより測定した。

- *Col6a1*KO マウスに対する細胞外マトリックス分子補充治療（野口および西野が担当）

*Col6a1*KO マウスに対する治療法として、欠損した VI 型コラーゲンを補充する方法また、VI 型コラーゲン欠損患者の線維芽細胞の接着性の低下から、細胞接着因子に対するリガンドの補充も考えられる。これまでに、リコモジュリンにより患者細胞の表現型が回復されることが報告されている。リコモジュリンは旭化成から供給を受けた。*Col6a1*KO マウス骨格筋への投与後、マウスの表現型を筋病理解析により評価した。

- 成熟骨格筋での VI 型コラーゲン発現細胞の同定と *Col6a1*KO 骨格筋における動態

Col6a1 は骨格筋間質前駆細胞により分泌されていると報告されている。本実験では、骨格筋間質前駆細胞特異的抗体である PDGF 受容体抗体、TCF4 抗体を用いて、骨格筋での VI 型コラーゲン発現細胞を可視化することを目的とする。*Col6a1*KO マウス、*Col6a1*IFD マウスでの同細胞の数、形態を観察した。また、ヒト患者における同細胞の超微細形態を電子顕微鏡にて観察した。また、間充織前駆細胞単離法によりモデルマウスから細胞を単離し、*Col6a1* の発現、局在について解析した。

- *Col6a1*IFD マウスに対する遺伝子治療実験

VI 型コラーゲン欠損症は劣性変異と優性変異が存在するため、優性遺伝型 VI 型コラーゲン欠損症の治療を考えた場合、変異アリルのみを選択的に抑制する治療法が有効である。*Col6a1*IFD マウス変異配列を標的とする siRNA をデザインした。株化細胞に、レポーターコンストラクトとともに siRNA を導入して、レポーター遺伝子の発現により、変異アリルのみを選択的な発現抑制に有効な siRNA を同定した。また、効果が得られたものについて、*Col6a1*IFD マウス骨格筋由来 *Col6a1* 発現細胞に導入する。導入後、正常型及び変異 *Col6a1*mRNA の発現量を確認後、治療 *Col6a1*IFD マウスの表現型と骨格筋での VI 型コラーゲンの分布を解析した。

4. 研究成果

*Col6a1*KO マウスは生後すぐから筋量低下および筋力低下を示すものの、進行性ではなかった。主として単収縮が低下し、強縮力は維持していた。また、自発運動量は 3 割程度に低下した。呼吸のパラメーターでは、一回換気量に顕著な低下が認められた。

筋病理変化では、筋壊死 / 再生はむしろ少なく、筋の大小不同と線維化が顕著であった。これらの結果は、ヒト患者の骨格筋症状をよく再現しており、モデルマウスであることを示した。また、同マウスで筋線維数の低下が認められた。これは、生後 3 週目までの骨格筋の成長と関連していた。この期間に骨格筋に取り込まれる筋核数は野生型マウスと同様であったが、筋成長に伴う、骨格筋線維の分割が低下していた。*Col6a1*KO マウスでは、IGF1 の分泌量が低下し、筋線維では AKT1 の活性化、下流シグナルの活性化の低下が認められた。また、興味深いことに同マウスでは、血中グルコースの取り込み低下が認められたが、インスリン抵抗性は認められなかった。

さらに、骨格筋に存在する間質前駆細胞が確かに骨格筋での VI 型コラーゲン発現細胞であることを確認し、*Col6a1*KO マウスでは発現されていないことを確認した。興味深いことに、この細胞は線維化が顕著になる 10 週齢以降の *Col6a1*KO マウス骨格筋では数が増加していること、また、形態が著しく変化していることを見いだした。この結果から、骨格筋に存在する間質前駆細胞が *Col6a1*KO マウスの骨格筋病態に深く関与している可能性が考えられた。*Col6a1*KO マウス骨格筋への細胞外マトリックスタンパク質であるリコモジュリンの補充実験では、投与後の骨格筋へのリコモジュリンの局在は認められず、また、筋病理観察でも治療効果を見いだせなかった。

一方、*Col6a1* 遺伝子のアミノ酸欠失をもつマウスを作製した。特にエクソン 9 欠失の *Col6a1*IFD マウスは、ヘテロ接合において骨格筋の筋力低下を示すことを見いだした。同マウスは *Col6a1*KO マウスと同様に、筋量低下および比較的軽症の、主に単収縮に低下による、筋力低下を示した。筋病理変化では、筋線維数の低下と間質の線維化が顕著であった。これらの結果は、*Col6a1*IFD マウスが、ヒト患者の骨格筋症状を再現しており、モデルマウスとして利用しうることを示した。

VI 型コラーゲンを分泌する間質前駆細胞の解析では、*Col6a1*IFD マウスの骨格筋間質では、その数が顕著に増加していること、細胞全体が伸びた形状をとっていることがわかった。また、細胞表面で VI 型コラーゲンは

ドット状に蓄積していた。これまでの PDGFR に加え、vimentin, Tcf4 などが同細胞の特異的抗原マーカーとなることがわかり、正常筋で休止期である同細胞が、形態変化を経て、線維化、脂肪化に至る過程を解析することが可能となった。現在、電子顕微鏡による観察を続けている。また、単離した間質前駆細胞上の分布では、野生型細胞と比べ、細胞外マトリックスへの保持量が低下し、かつパールカンとの共有も低下した。これらの結果から、骨格筋に存在する間質前駆細胞と分泌される変異した VI 型コラーゲンが、病態に深く関与している可能性が考えられた。*Col6a1*IFD マウスに対する遺伝子発現抑制実験では、変異アレル特異的な siRNA を設計することができた。しかしながら、同 siRNA を *Col6a1*IFD マウス骨格筋由来間質前駆細胞に導入したが、発現抑制効果は低く、VI 型コラーゲンの発現の回復も観察されなかった。この原因としては、同細胞への siRNA の導入効率が低いことが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Noguchi S, Ogawa M, Malicdan MC, Nonaka I, Nishino I: Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy. *EBioMedicine*. 査読有、15(2017): 2017, pp.93-202
doi: [10.1016/j.ebiom.2016.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.12.011).
PMID: 28043812
2. Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsunashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saito H, Matsumoto N: Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 査読有、99(4): 2016, pp.950-961
doi: [10.1016/j.ajhg.2016.08.005](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.005).
PMID: 27666374
3. Uruha A, Suzuki S, Suzuki N, Nishino I: Perifascicular necrosis in anti-synthetase syndrome beyond anti-Jo-1. *Brain*. 査読有、139(Pt 9): 2016, e50
doi: [10.1093/brain/aww125](https://doi.org/10.1093/brain/aww125). PMID: 27267378
4. Preethish-Kumar V, Pogoryelova O, Polavarapu K, Gayathri N, Seena V, Hudson J, Nishino I, Prasad C, Lochmuller H, Nalini A: Beevor's sign: a potential clinical marker for GNE myopathy. *Eur J Neurol*. 査読有、23(8): 2016, pp.e46-8
doi: [10.1111/ene.13041](https://doi.org/10.1111/ene.13041). PMID: 27431025
5. Endo Y, Dong M, Noguchi S, Ogawa M, Hayashi YK, Kuru S, Sugiyama K, Nagai S, Ozasa S, Nonaka I, Nishino I: Milder forms of muscular dystrophy associated with *POMGN2* mutations. *Neurol Genet*. 査読有、1(4): 2015, e33, eCollection
doi: [10.1212/NXG.0000000000000033](https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000033)
ISSN: 2376-7839
6. Uruha A, Noguchi S, Sato W, Nishimura H, Mitsunashi S, Yamamura T, Nishino I: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. *Neurology*. 査読有、85(3): 2015, pp.293-294
doi:[10.1212/WNL.00000000000001767](https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000001767) PMID: 26136521

7. Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, Malicdan MC, Nishino I: Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. Mol Ther Nucleic Acids. 査読有、3: 2014, e171
doi: 10.1038/mtna.2014.22. PMID: 24959844

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Noguchi S: Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy. International Conference on Collagen VI Disorders, 2.24, 2017(2.24-2.25), Virginia (USA)
2. 野口 悟: ジストロフィン - 結合糖タンパク質複合体研究の最近の展開 . 第 2 回日本筋学会学術集会 , 8.5, 2016(8.5-8.6), 国立精神・神経医療研究センター (東京都小平市)
3. Nishino I: KGS analysis in hereditary muscle disease. 10th Japanese-French Workshop, 7.2, 2015(7.2-7.4), Paris (France)
4. Noguchi S: Two events in the pathogenesis of congenital muscular dystrophy with collagen VI deficiency. 10th Japanese-French Workshop, 7.2, 2015(7.2-7.4), Paris (France)
5. 西川敦子, 西野一三: 皮膚筋炎の筋病理診断における MxA 染色の有用性 第 56 回日本神経学会学術大会 , 5.20,2015(5.20-5.23), 朱鷺メッセ,新潟コンベンションセンター (新潟県)

6. Noguchi S, Ogawa M, Nishino I: Activation of mesenchymal progenitor cells in skeletal muscles of Collagen VI deficient mice. 19th International Congress of the World Muscle Society, 10.9, 2014 (10.7-10.11), Berlin (Germany)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部
<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/rl/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 一三 (NISHINO, Ichizo)
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部・部長
研究者番号: 0 0 3 3 2 3 8 8

(2) 研究分担者

野口 悟 (NOGUCHI, Satoru)
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 第二研究室・室長
研究者番号: 0 0 3 7 0 9 8 2

西川 敦子 (NISHIKAWA, Atsuko)
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部・流動研究員
研究者番号: 7 0 7 3 7 2 6 2

(3) 連携研究者: なし

(4) 研究協力者: なし