

令和元年6月1日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05318

研究課題名(和文) RNA顆粒生成・分解に注目した多系統蛋白質症における神経-筋共通病態の解明

研究課題名(英文) Unraveling common mechanisms underlying neuromuscular degeneration in multisystem proteinopathy

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：多系統蛋白質症(MSP)は、骨格筋、骨、大脳皮質および運動ニューロンに病的蛋白蓄積と進行性の組織変性を呈し、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、封入体ミオパチー、骨Paget病を単独あるいは2つ以上の組み合わせで生ずる遺伝性疾患で、一般的に常染色体優性遺伝を呈し、同一家系内で異なる表現型をとり得る。

MSPにおける神経細胞および骨格筋細胞に共通する変性メカニズムを解明するため本研究では、MSP3関連hnRNPA1遺伝子変異を有する純粋封入体ミオパチー患者よりiPS細胞を樹立し、運動ニューロンおよび骨格筋細胞への分化誘導に成功した。今後、ヒトMSP3細胞モデルの確立と分子病態解明をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究代表者らは1991年以来、134家系にのぼる家族性の筋萎縮性側索硬化症、および複数の遺伝性筋疾患家系を集積し、その遺伝学的背景を解明する中で本邦初のMSP3家系を見出してきた。本研究により、単なるMSPの病態解明にとどまらず、広く神経細胞-骨格筋細胞が変性する疾患群(封入体ミオパチー、骨Paget病、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症)に共通するRNA病態にせまることが可能なヒト細胞モデルを確立しつつある。このようなMSP研究は、高齢者人口が増大する中で患者数もまた増加している難治性神経筋疾患の病態解明と治療開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Multisystem proteinopathy (MSP) is an inherited neuromuscular syndrome characterized by progressive and selective degeneration of skeletal muscle, bone, cerebrocortical, and motor neuron with aberrant protein aggregates, resulting in a combination of amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, inclusion body myopathy (IBM), and Paget disease of bone. In this study, using patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs), we have developed motor neurons and skeletal muscle cells with an MSP type 3 (MSP3)-linked hnRNPA1 gene mutation. Isogenic control iPSCs are also under development. To reveal the underlying pathomechanisms particularly related to assembly/disassembly of RNA granules, we are trying to recapitulate pathological phenotypes in these human cellular models of MSP3.

研究分野：臨床神経学

キーワード：神経変性 多系統蛋白質症 封入体ミオパチー RNA結合蛋白 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多系統蛋白質症 (multisystem proteinopathy, MSP) は、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) / 前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia, FTD)、封入体ミオパチー (inclusion body myopathy, IBM)、骨 Paget 病を単独ないし 2~3 種の組み合わせで呈する優性遺伝性疾患で、単一遺伝子の変異によって神経細胞・骨格筋・骨と 3 種の異なる細胞 (臓器) 変性を生じるが、病態は未解明で有効な治療法はない。報告された MSP1~5 の原因遺伝子は、RNA 結合蛋白質またはユビキチン依存性オートファジー関連分子をコードし、いずれも RNA 顆粒の生成/クリアランス機能に与る。また、MSP に共通する罹患組織の病理学的特徴は、病因遺伝子産物だけでなく ALS/FTD の特徴的封入体構成成分 transactive response DNA-binding protein 43 kD (TDP-43) を含む複数の RNA 結合蛋白質が核内局在を減じ、細胞質内に異常凝集して封入体を形成する点である。近年、神経筋疾患に種々の RNA 結合蛋白質変異が見出され、変異 RNA 結合蛋白質による細胞変性メカニズムの解明が強く求められている。

研究代表者らは 2015 年、中年期発症・進行性の四肢筋力低下・筋萎縮を呈し、骨格筋組織で特徴的な縁取り空胞 (自己貪食空胞) 伴う遺伝性封入体ミオパチー 2 家系の遺伝子 (エクソーム) 解析から *hnRNPA1* の D314N ヘテロ接合変異を発見した (Izumi ら, *Neurol Genet* 2015)。*heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1* (*hnRNPA1*) は広く全身臓器に発現し、核-細胞質間を往来する RNA 結合蛋白質である。自験例では、他の多くの RNA 結合蛋白質同様 *hnRNPA1* も有するプリオン様ないし低複雑性ドメイン内に変異を認めた。同ドメイン内の変異は MSP3 と ALS20 を引き起こし、*in vitro* では自己凝集性を増すことが報告されていたが (Kim ら, *Nature* 2013)、新たな表現型を見出したことになる。

生理学的に生成される“RNA 顆粒”は、非翻訳 mRNA と RNA 結合蛋白質、翻訳開始に要する分子群による複合体である。限界膜を欠く細胞質内動的構造で、細胞がストレス下で可逆的に形成するストレス顆粒、分解を担う P ボディ (processing body)、そして神経細胞 (軸索・樹状突起) 内の局所的翻訳を与る輸送顆粒が知られる。その形成過程ではプリオン様/低複雑性ドメイン内を介した RNA 結合蛋白質の共重合が足場となる。そこで、変異 RNA 結合蛋白質の異常凝集による RNA 顆粒の過剰生成/クリアランス障害が主病態となり RNA 代謝の恒常性破綻をきたす gain of toxic function 仮説が注目されている。しかし、本仮説の MSP 神経-骨格筋細胞における検証は未だ不十分である (Ramaswami ら, *Cell* 2013)。

実際、プリオン様/低複雑性ドメイン内に *hnRNPA1* 変異を有する上述の自験例では、*hnRNPA1* のみならず、他の MSP 関連 RNA 結合蛋白質 (*hnRNPA2B1* や *matrin-3*)、ALS/FTD 関連 RNA 結合蛋白質 (TDP-43 や FUS) など複数の RNA 結合蛋白質が生検骨格筋の細胞質内に蓄積・凝集していた。異常蛋白質が凝集する縁取り空胞は超微構造的に自己貪食空胞と確認でき、ユビキチン依存性オートファジー関連分子 *sequestome-1/p62* や *valosin-containing protein (VCP) /p97* も共凝集していたことから、*hnRNPA1* 変異が広く RNA 結合蛋白質の機能低下や RNA 顆粒分解障害をもたらす可能性が示唆される。

MSP 動物モデルについては、変異 *VCP* 遺伝子導入マウス、変異 *hnRNPA1* 導入ショウジョウバエの報告が各々あるほか、ごく最近本邦から *MATR3* 変異 MSP5 モデルマウスが報告されているに過ぎない (Zhang ら, *J Pathol* 2019)。*hnRNP* のようなリボ核蛋白質は、単なる変異遺伝子導入・過剰発現モデルでは野生型でさえも発現量の増減により神経筋毒性が生じたり胎生致死に陥ったりするため、病態の再現に限界がありノックインが望ましい。一方、アジア人骨 Paget 病有病率は極めて低く、その合併は変異 *VCP* 関連 MSP1 日本人例にも少ない。自験例からも MSP には遺伝的背景による表現型の差異が存在すると考えられ、日本人患者由来の神経-骨格筋細胞を用いた MSP 病態再現モデル確立と、遺伝的背景を一致させた適切な対照との比較研究が急務である。

## 2. 研究の目的

MSP における神経細胞、および骨格筋に共通する変性メカニズムを解明するため、MSP3 関連 *hnRNPA1* 変異による遺伝性封入体ミオパチー患者由来 iPS 細胞をもとにヒト MSP 細胞モデルを確立し、RNA 顆粒の生成と分解を中心に RNA 代謝の恒常性破綻につながる分子基盤を解明する。

## 3. 研究の方法

変異 *hnRNPA1* がもたらす RNA 顆粒の生成・分解の異常、運動ニューロンおよび骨格筋変性機構を解明し、MSP 病態解明と治療戦略開発の基盤研究を推進するため、以下を計画した。

(1) 患者組織由来の変異 *hnRNPA1*-MSP3 疾患特異的 iPS 細胞の樹立とそれに基づく複数のヒト細胞モデルの確立

*hnRNPA1* 変異 MSP3 患者より末梢血単核球を分離採取し、エピソーマルベクターを用いて Yamanaka 四因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) を導入し、ヒト iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞株において、外来遺伝子ゲノム挿入部位の確認、未分化マーカーの発

現、多分化能を確認した。患者由来ヒト iPS 細胞から良質なクローンを数クローン選択し、維持・保管した。品質管理として3クローンを選択して染色体解析を行った。CRISPR-Cas9 によるゲノム編集のため、ピューロマイシン薬剤選択カセットを含むターゲティングベクターを作製した。

#### (2) 細胞生物学的解析

樹立した iPS 細胞株から神経細胞へ、あるいは骨格筋細胞へとそれぞれ分化誘導した。対照として、京都大学で Yamanaka らが樹立した健常者由来 iPS 細胞と共に以下の研究に用い MSP モデルとしての妥当性を検証すべく、各種ストレス下での hnRNPA1 局在変化を多重免疫細胞化学で解析した。

#### (3) 変異 hnRNPA1-MSP3 ヒト細胞モデルにおける網羅的 RNA 解析

新規治療標的分子を同定するため 2) の細胞モデル、運動ニューロンについては流体的に分離した細胞体・軸索から mRNA や non-coding RNA を抽出し、高速シーケンサーを用いた RNA sequencing (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を実施予定である。

### 4. 研究成果

本研究では、幅広く神経筋変性疾患に関わる RNA 結合蛋白質の変異により引き起こされる MSP モデル構築のため、患者由来細胞を用いて検索した。

hnRNPA1 変異 MSP3 患者 2 家系 2 名より末梢血単核球を分離採取し、そのうち 1 名で iPS 細胞樹立に成功した。樹立した MSP3 疾患特異的 iPS 細胞株の品質管理を行うため、外来遺伝子ゲノム挿入部位の確認、未分化マーカーの発現、多分化能を確認した。患者由来ヒト iPS 細胞から良質なクローンを数クローン選択し、維持・保管した。品質管理として3クローンを選択して染色体解析を行った。CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、これまでに、健常者由来の正常配列に患者と同一の変異配列が生じたことを確認した。患者由来の変異箇所のみを正常配列に戻す、あるいは健常者由来の正常配列に患者と同一の変異配列を生じる isogenic 対照株を作製中である。すなわち、患者由来の変異箇所のみを正常配列に戻すための遺伝子導入を確認し、PiggyBac トランスポゼースを用いてターゲティングベクターのみを除去した isogenic 対照株を作製中である。

樹立した iPS 細胞株から運動ニューロンへ、あるいは骨格筋細胞へとそれぞれ分化誘導した。多重免疫細胞化学を用いた解析では、酸化ストレス (arsenite) 負荷を与えると、細胞質内に RNA 顆粒の形成がみられ、一部は hnRNPA1 陽性顆粒と共局在することを見出した。酸化ストレス負荷を除くと RNA 顆粒は分解されるが、hnRNPA1 陽性顆粒の挙動については現在検討中である。また、免疫ブロッティングを用いた解析では、患者由来骨格筋細胞は健常者と比較して可溶性分画の総 hnRNPA1 蛋白質発現量に有意な差異は見出さなかった。今後は、運動ニューロンと骨格筋細胞の共培養系を確立して、より生体に近い環境で表現型を確認する。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件) 全て査読有

1. Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, Atsuta N, Nakamura R, Akiyama T, Hadano S, Aoki M, Saya H, Sobue G, Okano H. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent, Nat Med, 査読有、24(10)、2018 年、1579-1589、doi: 10.1038/s41591-018-0140-5
2. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, Ono H, Nishiyama A, Izumi R, Kitajima Y, Aoki M. Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis, Exp Neurol, 査読有、307、2018 年、164-179、doi: 10.1016/j.expneurol.2018.06.009
3. Mitsuzawa S, Akiyama T, Nishiyama A, Suzuki N, Kato M, Warita H, Izumi R, Osana S, Kato T, Suzuki Y, Aoki M. TARDBP p.G376D mutation, found in rapid progressive familial ALS, induces mislocalization of TDP-43, eNeurologicalSci, 査読有、11、2018 年、20-22、doi: 10.1016/j.ensci.2018.04.001
4. Imaizumi K, Fujimori K, Ishii S, Otomo A, Hosoi Y, Miyajima H, Warita H, Aoki M, Hadano S, Akamatsu W, Okano H. Rostrocaudal Areal Patterning of Human PSC-Derived Cortical Neurons by FGF8 Signaling, eNeuro, 査読有、5(2)、2018 年、e0368-17.2018、doi: 10.1523/ENEURO.0368-17.2018
5. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Kitajima Y, Ikeda K, Akiyama T, Ono H, Mitsuzawa S, Nishiyama A, Izumi R, Aoki M. Aberrant astrocytic expression of chondroitin sulfate proteoglycan receptors in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis, J Neurosci Res, 査読有、96(2)、2018 年、222-233、doi: 10.1002/jnr.24127
6. Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, Aoki M. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis, Neurobiol Aging, 査読有、53、2017 年、194.e1-194.e8

7. Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, Honda D, Yokoi S, Endo K, Ikenaka K, Takagi S, Iguchi Y, Sahara N, Takashima A, Okano H, Yoshida M, Warita H, Aoki M, Watanabe H, Okado H, Katsuno M, Sobue G. Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTL-like Phenotypes. Cell Reports、査読有、18(5)、2017年、1118-1131、doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.013
8. Nishiyama A, Warita H, Takahashi T, Suzuki N, Nishiyama S, Tano O, Akiyama T, Watanabe Y, Takahashi K, Kuroda H, Kato M, Tateyama M, Niihori T, Aoki Y, Aoki M. Prominent sensory involvement in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the L8V *SOD1* mutation. Clin Neurol Neurosurg、査読有、150、2016年、194-196、doi: 10.1016/j.clineuro.2016.08.008

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 井泉瑠美子, 割田 仁, 新堀哲也, 高橋俊明, 豎山真規, 鈴木直輝, 西山亜由美, 城田松之, 舟山 亮, 中山啓子, 三橋里美, 西野一三, 青木洋子, 青木正志. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. 第 57 回日本神経学会学術大会、2016 年 5 月 18 日~21 日、神戸(神戸コンベンションセンター)
2. 井泉瑠美子, 割田 仁, 新堀哲也, 高橋俊明, 豎山真規, 鈴木直輝, 西山亜由美, 城田松之, 舟山 亮, 中山啓子, 三橋里美, 西野一三, 青木洋子, 青木正志. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3-7, 2016, Kyoto, Japan (国立京都国際会館)

〔図書〕(計 1 件)

青木正志, 鈴木則宏. 中外医学社、運動ニューロン疾患 (神経内科 Clinical Questions & Pearls)、2017 年、352 (総ページ数)

〔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

東北大学神経内科

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

researchmap

<https://researchmap.jp/read0191461/?lang=japanese>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

割田 仁 (WARITA HITOSHI)

東北大学・病院脳神経内科・院内講師

研究者番号：30400245

鈴木 直輝 (SUZUKI NAOKI)

東北大学・病院脳神経内科・助教

研究者番号：70451599

### (2) 研究協力者

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。