

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15474

研究課題名(和文) 筋収縮培養系と次世代シーケンサーを駆使した封入体筋炎の分子病態の解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular pathology of inclusion body myositis using novel culture system and next generation sequencer

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：sIBMに関しては患者検体収集を行うと共に、臨床情報についてもまとめて論文化した。また患者血清における自己抗体の病態意義に関して、ヒト血清およびマウスを用いた実験で解析し、熊本大学との共同研究で論文を発表した。sIBMの臨床診断の時に必須である骨格筋生検の際に一部の骨格筋からCD56陽性の骨格筋芽細胞をあわせて8例から樹立した。sIBMの4例についてRNAシーケンスを行った。遺伝子異常を認める封入体性ミオパチー9例との比較も含め、疾患関連既報告変異およびレアバリエントの抽出を行った。プロテアソーム機能不全仮説に基づくマウスモデルに関して骨格筋幹細胞特異的発現抑制マウスの解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：As for sIBM, patient samples were collected and clinical information was also collected at the same time. The significance of autoantibody pathology in patient serum was analyzed by human serum and mouse experiment in collaboration with Kumamoto University. CD56 positive skeletal myoblasts from some skeletal muscles were collected and established from 8 sIBM cases. RNA sequencing was performed on 4 cases of sIBM. Including comparison with 9 hereditary inclusive body myopathies, disease-related reported mutations and rare variants were extracted. We are also analyzing mice model based on proteasome dysfunction hypothesis.

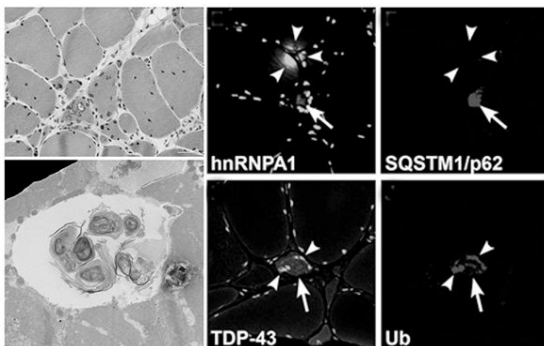
研究分野：神経内科学

キーワード：封入体筋炎

1. 研究開始当初の背景

東北大学では封入体筋炎(sIBM)の全国調査を通じ、日本人患者の臨床情報・検体を収集してきた。sIBMは骨格筋に縁取り空胞と呼ばれる特徴的な組織変化を生じ炎症細胞浸潤を伴う難治性疾患である。東北大学神経内科を中心にsIBMの全国的なアンケートを用いた臨床調査を行い高齢化に伴い患者数が増えていることを報告した(J Neurol 2011)。臨床的な実態を把握すると共にゲノムDNAや筋組織を含めた検体を蓄積してきた。

さらに自験例である封入体形成性ミオパチー家系で次世代シーケンサーにより原因遺伝子 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)-A1を同定した。sIBMと類似の筋病理所見を呈し(下図)常染色体優性遺伝形式をとる家系であった(Neurol Genet 2015)。VCPやhnRNPの変異例では蛋白凝集体の蓄積が骨格筋に加えて運動ニューロンや脳にも見られ multisystem proteinopathy という概念で捉えられるようになってきている。遺伝子解析技術の進歩により希少難治性筋疾患の病態解明が加速度的に早まっており、病態解明の手掛かりになると考えられた。



図：hnRNPA1変異例の病理像

また独自の視点として筋ホメオスタシスの維持に重要なプロテアソームに着目した。骨格筋恒常性維持のためにはユビキチンプロテアソーム系に代表される不要蛋白処理機構が重要である。私たちはプロテアソームの機能低下が筋封入体形成に寄与するとの作業仮説を立て pmsc4/Rpt3 の骨格筋特異的欠損マウスを作成し、異常蛋白蓄積や筋萎縮の表現型を見出した(J Cell Sci 2014)。sIBMでも蛋白分解系の異常が分子病態の背景にあると考えられる。

2. 研究の目的

sIBM患者の筋生検時に採取可能な骨格筋芽細胞を用いて in vitro での病態モデル確立とエクソソーム分泌小胞の解析を行なうこと

を第一の目標とした。次世代シーケンサーによるRNAseq解析を組み合わせsIBMの疾患修飾遺伝子を同定することを第二の目標とした。これらで得られた知見をsIBMやhnRNP-A1変異自験例のiPS細胞から分化させた骨格筋細胞やモデルマウス由来の筋芽細胞、sIBM生体試料で検証し、バイオマーカーや新規治療標的を見出したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨格筋細胞と電気刺激による筋収縮培養系を用いた新規病態モデルの確立

sIBMの臨床診断の時に必須である骨格筋生検の際に、患者同意を得た上で一部の骨格筋からCD56陽性の骨格筋芽細胞を分離・増殖・分化させることで、筋収縮培養系での培養を試みる。既に倫理申請も承認されており、一例目から骨格筋細胞の分化に成功している。さらに5例を目標に培養細胞数を増やす。電気刺激による収縮運動培養系は東北大学医学研究科・工学部との連携により確立されている。加齢・筋収縮刺激がsIBMの病態の背景にあるという仮説の元に、新規培養系による in vitro での封入体形成を評価しうる病態モデルを確立する。

(2) 次世代シーケンサーを活用したRNAseq解析により病態関連遺伝子を明らかにする

sIBM患者由来の骨格筋培養細胞を筋収縮培養系で維持し、健常者細胞と共にRNAを抽出する。次世代シーケンサー(Illumina社のMiSeqおよびHiSeq)を用いてRNAseq解析を行ない、in vitro 表現型の分子機構について詳細に解析する。解析は細胞増殖制御学分野のバイオインフォマティクス専門家の協力を得て行う。さらに骨格筋細胞外に分泌されるエクソソーム分泌小胞にも注目し、筋変性疾患であるsIBMの病態の進展機構についても分子機構を明らかにする。

(3) 疾患特異的ヒトiPS細胞の樹立

sIBM患者およびhnRNPA1変異患者より血球系細胞を採取し、エピゾーマルベクターを用いてOCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, shP53を導入しiPS細胞を樹立する。外来遺伝子のゲノムへの挿入、未分化マーカーの発現、3胚葉系への分化能解析、染色体検査を行ない、良質なクローンを選択する。

(4) 骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスおよび由来筋芽細胞を用いた検証実験

以前確立したプロテアソーム機能不全マウ

スでは骨格筋の成長障害が見られた。これはプロテアソームが骨格筋幹細胞でも重要な働きを持つことを示す。病態の理解を一步進めるためタモキシフェン誘導 PAX7-Cre マウスとの掛け合わせを行い、骨格筋幹細胞でのプロテアソームの役割を明らかにする。マウス由来筋芽細胞の筋収縮培養系での検討を行なうと共に、個体レベルでの遺伝子発現変化について培養系と比較検討する。

(5) sIBM 生体試料での検証：生検筋での免疫染色およびゲノム DNA での疾患感受性遺伝子の検討

凍結保存してある生検筋においてこれまでに同定した疾患感受性分子に関して骨格筋組織内での局在や発現量などについて蛋白レベルで検討する。また sIBM 患者ゲノム DNA を用いて既知の病因遺伝子についてターゲットリシークエンスを行なうと共にエクソ-ムシークエンスにより新規原因・感受性遺伝子についても探索し、培養系で見出した変化と比較検証する。また血清学的なバイオマーカーについても探索する。

4. 研究成果

(1) ヒト sIBM 由来骨格筋筋芽細胞の樹立

sIBM の臨床診断の時に必須である骨格筋生検の際に、患者同意を得た上で一部の骨格筋から CD56 陽性の骨格筋芽細胞を分離・増殖・分化させた。これまでにあわせて 8 例の sIBM 患者由来の筋芽細胞を樹立できた。電気収縮培養系に関しては、マウス骨格筋での条件ではヒト骨格筋が十分収縮しないことを見出しており、電圧等の条件検討を行う必要がある。

(2) 次世代シークエンサーを用いたバリエーションの検出

次世代シークエンサーを用いた遺伝子解析も進めており、孤発例 4 例について RNA シークエンスを行った。遺伝子異常を認める封入体性ミオパチー 9 例との比較も含め、エクソおよびスプライス領域の疾患関連既報告変異の有無およびレアバリエーションの抽出を行った。引き続き、結果を解析していく。

(3) hnRNPA1 変異家系からの iPS 細胞の樹立と筋分化

また骨格筋に封入体形成を来すミオパチーの hnRNPA1 変異家系から慶應義塾大学の支援の下で iPS 細胞を樹立した。未分化性・分化能・染色体異常が無いことを確認している。

(4) 個体レベルでの解析とバイオマーカーの検索

sIBM に関しては患者検体収集を行うと共に、臨床情報についてもまとめて論文化することができた (Orphanet J Rare Dis 2016)。また患者血清における自己抗体の病態意義に関して、ヒト血清およびマウスを用いた実験で解析し、熊本大学との共同研究で論文を発表した (Ann Neurol 2016)。プロテアソーム機能不全仮説に基づくマウスモデルに関しても Pax7Cre の骨格筋幹細胞特異的発現抑制マウスの解析を進めており、本マウスでは筋再生が顕著に障害されることを明らかにしてきている。現在、ターゲット分子のノックアウトマウスのかげあわせ実験を解析しており、論文にまとめている。

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 5 件)すべて査読有。

1. Tawara N, Yamashita S, Zhang X, Korogi M, Zhang Z, Doki T, Matsuo Y, Nakane S, Maeda Y, Sugie K, Suzuki N, Aoki M, Ando Y. Pathomechanisms of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. Ann Neurol 2017;81:512-525.
2. Shibata S, Izumi R, Hara T, Ohshima R, Nakamura N, Suzuki N, Kato K, Katori Y, Tateyama M, Kuroda H, Aoki M. Five-year history of dysphagia as a sole initial symptom in inclusion body myositis. J Neurol Sci 2017;381:325-327.
3. Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. Orphanet J Rare Dis 2016;11:146.
4. Klionsky DJ, ...Suzuki N, ...Zughaier SM. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 2016;12:1-222.
5. Suwa Y, Suzuki N, Soga T, Harada R, Shibui A, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Nakashima I, Sonoo M, Aoki M. Sporadic Inclusion Body Myositis Manifesting as Isolated Muscle Weakness of the Finger Flexors Three Years after Disease Onset. Intern Med. 2016;55(23):3521-3524.

〔学会発表〕(計 2 件)

1 . 21st International Congress of the World Muscle Society 2016

Proteasomal proteolysis is indispensable for the maintenance of skeletal muscle and muscle stem cells

Naoki Suzuki, Yasuo Kitajima, Yoshitaka Tashiro, Hiroya Ono, Risa Ando, Shion Osana, Aki Nunomiya, Ryoichi Nagatomi, Ryosuke Takahashi, Masashi Aoki

2 . World Congress of Neurology 2017

Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan.

Naoki Suzuki, Madoka Mori-Yoshimura, Satoshi Yamashita, Satoshi Nakano, Ken-ya Murata, Yukie Inamori, Naoko Matsui, En Kimura, Hirofumi Kusaka, Tomoyoshi Kondo, Itsuro Higuchi, Ryuji Kaji, Maki Tateyama, Rumiko Izumi, Hiroya Ono, Masaaki Kato, Hitoshi Warita, Toshiaki Takahashi, Ichizo Nishino and Masashi Aoki

〔図書〕(計 1 件)

1. Yasuo Kitajima and Naoki Suzuki. Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Skeletal Muscle. Springer Nature Singapore Ltd 2017. K. Sakuma (ed.) The Plasticity of Skeletal Muscle. DOI 10.1007/978-981-10-3292-9-2. P 37-54 (18 pages)

〔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

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青木 正志 (AOKI, Masashi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70302148

(2)研究分担者

鈴木 直輝 (SUZUKI, Naoki)
東北大学・病院・助教
研究者番号：70451599

割田 仁 (WARITA, Hitoshi)
東北大学・病院・院内講師