

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07897

研究課題名(和文)多系統蛋白質症 - ALSにおける神経筋選択的な細胞変性メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular pathogenesis of selective degeneration in multisystem proteinopathy and amyotrophic lateral sclerosis.

研究代表者

割田 仁 (Warita, Hitoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30400245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多系統蛋白質症(MSP)と筋萎縮性側索硬化症(ALS)における細胞選択的な変性メカニズムを解明することを目的とし、自験MSP3原因遺伝子HNRNPA1のユニークな変異に注目し、患者由来人工多能性幹細胞(iPSC)を樹立した。MSP3特異的iPSC、およびゲノム編集で遺伝学的背景を揃えた対照細胞より運動ニューロン、骨格筋細胞へ分化誘導し比較解析を行った。骨格筋細胞への分化誘導効率、および長期培養法の改善の後、ストレス負荷試験を加え、細胞生物学的評価と分子細胞病理の比較解析を実施した。その結果、骨格筋細胞の病的表現型としてhnRNPA1の細胞質への局在変化を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果をふまえ、スペクトラムを形成しつつある多系統蛋白質症(MSP)-筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子変異がもたらす細胞種選択的な変性メカニズムの解明と治療標的分子の発見につなげることで、治療法が未確立のこれら神経変性疾患のみならず、他の運動ニューロン疾患や骨格筋変性疾患の治療法開発にもつながる意義がある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the cell-selective degeneration mechanism in multisystem proteinopathy (MSP) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we established multiple lines of MSP3 patients-derived pluripotent stem cells (iPSCs). Motor neurons and skeletal muscle cells differentiated from the MSP3-specific iPSCs and isogenic control cells were subjected to this study. After improving the efficiency of induction and differentiation into skeletal muscle cells and the long-term culture method, a comparative analyses was performed to reveal molecular cell pathology. As a result, we found that hnRNPA1 was localized to the cytoplasm under oxidative stress as a pathological phenotype of skeletal muscle cells.

研究分野：神経内科学

キーワード：多系統蛋白質症 筋萎縮性側索硬化症 骨格筋 RNA結合蛋白 hnRNP

## 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~3つの組み合わせで呈する成人発症の優性 (顕性) 遺伝性疾患である<sup>1</sup>。単一遺伝子変異が脳皮質および脳幹・脊髄運動ニューロン、骨格筋に変性を生ずる病態だが、欧米人と異なり本来有病率の低いアジア人で骨 Paget 病は本邦 MSP に合併の報告がない。MSP はその構成疾患 ALS や IBM 同様、診断バイオマーカーがない上に症状改善・進行抑止いずれの治療法もない遺伝性の症候群であり、いまだ不明な病態の解明と治療法開発の必要性が高い。

MSP は RNA 代謝や蛋白質分解系に関連する遺伝子の点突然変異による5つの病型がある。興味深いことに、純粋に ALS/FTD あるいは IBM のみを呈する家系や孤発性 ALS にも MSP 関連遺伝子変異が報告されていることから、MSP と ALS や IBM は、共通する発症メカニズムに基づく一連のスペクトラムを形成している可能性がある。しかし、単一遺伝子の変異がなぜ家系ごと・家系内に表現型の多様性を生じるのかは不明である。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと本研究では、MSP と ALS における細胞選択的な変性メカニズムを解明することを目的とし、自験 MSP3 原因遺伝子 *HNRNPA1* のユニークな変異に注目し、MSP/ALS 患者由来人工多能性幹細胞 (iPSC) から分化誘導した種類の異なる細胞間で細胞生物学的特徴とトランスクリプトームを比較解析して病態関連分子の発見をめざした。

## 3. 研究の方法

既存の p.D314N 変異 *HNRNPA1* 関連 MSP3 自験2家系<sup>2</sup>に加え、所属施設にて新規診断家系を検索した<sup>3</sup>。新規診断患者より末梢血単核球から常法に則り iPSC を樹立することで、複数ラインの MSP3 特異的 iPSC 株を準備した。遺伝学的背景を同じくした (アイソジェニック) 対照細胞を得るため、MSP3 患者由来 iPSC に対してゲノム編集を行い、Sanger 法でその結果を確認した。これらの iPSC に対してテトラサイクリン応答性ヒト *MYOD* 発現ベクターを遺伝子導入して骨格筋細胞に、あるいは既報に則り運動ニューロンへと分化誘導し<sup>4</sup>、細胞生物学的評価に供した。さらに長期培養もしくは培養下ストレス負荷試験による分子細胞病理の比較解析を行った。

## 4. 研究成果

変異 *HNRNPA1* 関連 MSP3 型の新規診断2家系 (自験例) を見出し、そのうち1家系1例より新たに iPSC 細胞を樹立した。その結果、3家系に由来する複数ラインの MSP3 特異的 iPSC 株を得て、そのゲノム編集正常化対照株、そして健康成人由来対照株と共に品質管理をおこないつつ、新規 MSP 家系の集積を継続している。同時にこれら iPSC から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、異なる iPSC に由来する疾患感受性細胞間での比較および再現性確認が向上した。

この間、運動ニューロンおよび骨格筋細胞の分化誘導効率と生存率改善に成功し、これまでより長期培養が可能となって細胞表現型解析が容易となった (図1)。実際、骨格筋細胞分化誘導法<sup>5</sup>を一部改良し、高効率な骨格筋分化誘導と筋管形成を実現できた (図2)。また、ゲノム編集によるアイソジェニック対照 iPSC 細胞株の作製に multisite gateway technology で構築したターゲットベクターを用いた手法も導入した<sup>6</sup>。

本 MSP3-iPSC 由来骨格筋細胞においては、亜ヒ素酸ナトリウム投与による酸化ストレス負荷により、生理的条件下で主に核内に局在している hnRNPA1 が G3BP1 陽性ストレス顆粒形成細胞の一部では細胞質にび慢性に局在変化するを見出した (図3)。現在、他の細胞種への iPSC 分化誘導法も確立し、これら細胞間でのトランスクリプトーム比較解析を予定している。

本研究成果をふまえ、今後 hnRNPA1 と相互作用する RNA 種・タンパクを明らかにし、細胞種選択的な変性メカニズムの解明と治療標的分子の発見をめざす。

図 1. MSP3-iPSC から 2 種の細胞（上段：運動ニューロン，下段：骨格筋細胞）を誘導

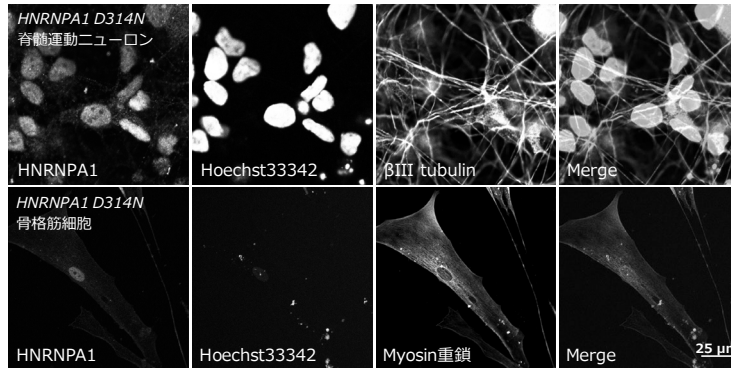


図 2. 従来法(左)より骨格筋細胞誘導効率化(右)

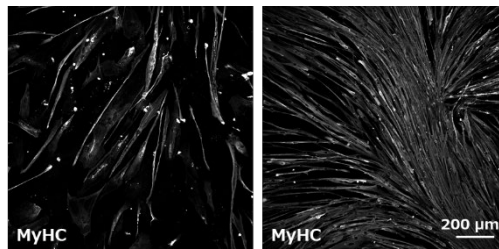
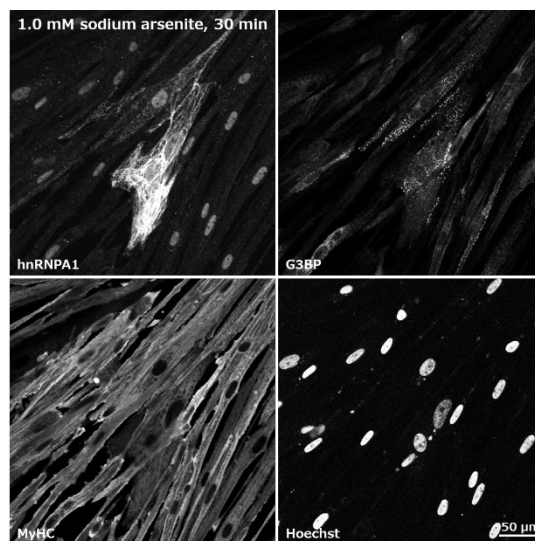


図 3. 酸化ストレス下に hnRNPA1 の細胞質局在変化



<引用文献>

1. Taylor JP. Multisystem proteinopathy: intersecting genetics in muscle, bone, and brain degeneration. *Neurology*. 85(8), 2015, 658-660.
2. Izumi R, Warita H, *et al*. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. *Neurol Genet*. 1(3), 2015, e23.
3. 割田 仁ら、RNP 顆粒生成・分解からみた多系統蛋白質症、*脳神経内科* 95(1)、2017、112-120.
4. Akiyama T, *et al*. Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. *EBioMedicine*. 45, 2019, 362-378.
5. Uchimura T, *et al*. A muscle fatigue-like contractile decline was recapitulated using skeletal myotubes from Duchenne muscular dystrophy patient-derived iPSCs. *Cell Rep Med* 2(6), 2021, 100298.
6. Yoshimatsu S, *et al*. A versatile toolbox for knock-in gene targeting based on the Multisite Gateway technology. *PLoS One* 14(8), 2019, e0221164.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Inoue-Shibui Aya, Niihori Tetsuya, Kobayashi Michio, Suzuki Naoki, Izumi Rumiko, Warita Hitoshi, Hara Kenju, Shiota Matsuyuki, Funayama Ryo, Nakayama Keiko, Nishino Ichizo, Aoki Masashi, Aoki Yoko	4. 巻 66
2. 論文標題 A novel deletion in the C-terminal region of HSPB8 in a family with rimmed vacuolar myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 965 ~ 972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00916-y	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 -

1. 著者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shiota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Osana S, Nakagawa T, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1527 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.04.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa H, Kato H, Oba K, Kawahara T, Okubo Y, Saito T, Naito M, Urushitani M, Tamaoka A, Nakamagoe K, Ishii K, Kanda T, Katsuno M, Atsuta N, Maeda Y, Nagai M, Nishiyama K, Ishiura H, Toda T, Kawata A, Abe K, Yabe I, Takahashi-Iwata I, Sasaki H, Warita H, Aoki M, Sobue G, Mizusawa H, Matsuyama Y, Haga T, Kwak S.	4. 巻 269
2. 論文標題 Randomized phase 2 study of perampanel for sporadic amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 885 ~ 896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-021-10670-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Y, Ohyama A, Kubota T, Ikeda K, Kaneko K, Takai Y, Warita H, Takahashi T, Misu T, Aoki M.	4. 巻 13
2. 論文標題 MOG Antibody-Associated Disorders Following SARS-CoV-2 Vaccination: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 845755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2022.845755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Soga T, Suzuki N, Kato K, Kawamoto-Hirano A, Kawauchi Y, Izumi R, Toyoshima M, Mitsuzawa S, Shijo T, Ikeda K, Warita H, Katori Y, Aoki M, Kato M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Long-term outcomes after surgery to prevent aspiration for patients with amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-022-02619-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koshihara Y, Ikeda R, Suzuki J, Honkura Y, Funayama Y, Ikeda K, Warita H, Aoki M, Kawase T, Katori Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Malignant otitis externa presenting cerebral infarction from pseudoaneurysm: A case report and a review of the literature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 e05276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.5276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 割田仁, 池田謙輔, 青木正志	4. 巻 95
2. 論文標題 RNP顆粒生成・分解からみた多系統蛋白質症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 112 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Inoue-Shibui A, Niihori T, Kobayashi M, Suzuki N, Izumi R, Warita H, Hara K, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Nishino I, Aoki M, Aoki Y.	4. 巻 Mar 20.
2. 論文標題 A novel deletion in the C-terminal region of HSPB8 in a family with rimmed vacuolar myopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00916-y	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 -

1. 著者名 Leventoux N, Morimoto S, Hara K, Nakamura S, Ozawa F, Mitsuzawa S, Akiyama T, Nishiyama A, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H.	4. 巻 47
2. 論文標題 Generation of an ALS human iPSC line KE10i001-A from peripheral blood of a Charcot disease-affected patient carrying TARDBP p.N345K heterozygous SNP mutation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 101896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Y, Nakagawa T, Akiyama T, Nakagawa M, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Nakayama K.	4. 巻 23(9)
2. 論文標題 An Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Mutant of C21ORF2 Is Stabilized by NEK1-Mediated Hyperphosphorylation and the Inability to Bind FBXO3.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience.	6. 最初と最後の頁 101491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Suzuki N, Kawada J, Akiyama T, Mitsuzawa S, Kato M, Warita H, Fujii T, Eggen K, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Motor nerve organoid is useful tool to analyze axonal degeneration of ALS.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会(62st Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Mitsunashi H, Nishiyama A, Ikeda K, Shijo T, Nakamura N, Ono Y, Ono R, Izumi R, Ohno A, Nakagawa T, Nakayama K, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Axonal growth impairment in iPSC-derived motor neurons with TARDBP mutations.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会(62st Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Nishiyama A, Izumi R, Kato M, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations.
3. 学会等名 PACTALS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with ALS-linked TARDBP mutations.
3. 学会等名 ISSCR 2021 Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shirota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Kato M, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations were mediated by PHOX2B downregulation.
3. 学会等名 32th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 割田 仁
2. 発表標題 ALSに対する肝細胞増殖因子 (HGF) 脊髄腔内反復投与の第II相試験
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 割田 仁, 青木正志 (分担執筆, 園生雅弘・北川一夫・青木正志 共同編集)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 368
3. 書名 脳神経疾患最新の治療2021-2023	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学神経内科 <a href="http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html</a> Researchmap <a href="https://researchmap.jp/warita_2012">https://researchmap.jp/warita_2012</a> ResearchGate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi-Warita">https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi-Warita</a> ORCID <a href="https://orcid.org/0000-0001-7934-3863">https://orcid.org/0000-0001-7934-3863</a> 東北大学神経内科 <a href="http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html</a> Researchmap <a href="https://researchmap.jp/warita_2012">https://researchmap.jp/warita_2012</a> ResearchGate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi-Warita">https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi-Warita</a> ORCID <a href="https://orcid.org/0000-0001-7934-3863">https://orcid.org/0000-0001-7934-3863</a>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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