

平成 29 年 5 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461265

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた封入体筋炎筋発現プロファイルによる炎症と変性の病態解明

研究課題名(英文) Expression profiling of inclusion body myositis by massive parallel sequencing

研究代表者

後藤 順 (Goto, Jun)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：10211252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的発現プロファイリングにより封入体筋炎の病態解明を目標とした。計79検体(対照11例、PM11例、IBM47例、非PM非IBM CD8-MHC-1 complex陽性10例)の解析を行った。RIN>5以上の71例について解析した。クラスター分析で、病理学的分類と発現プロファイルによるクラスターとの対応・相関が示唆された。発現量変化について、IBMではPMや対照と比較し、細胞接着因子や炎症に関わる経路や、オートファジー・リソソーム系、スプライソソームに関わる遺伝子の発現量が増加していた。一方IBMでは酸化的リン酸化やクエン酸回路、電子伝達系などに関わる遺伝子の発現量が低下していた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate pathophysiology of inclusion body myositis by comprehensive expression profiling. Seventy-nine samples (11 controls, 11 PM, 47 IBM and 10 non-PM, non-IBM MHC-1 complex positive cases) were subjected to RNA-seq analysis. Seventy-one cases, of which RIN were more than 5, were statistically analyzed. Cluster analysis suggested that there was correlation between morphological classification and expression profile cluster. In IBM expression of cell adhesion molecules, inflammatory system, autophagy-lysosome system, and splicesome system were up-regulated. Expression of oxidative phosphorylation, citric cycle and electron transport genes was down-regulated.

研究分野：神経内科学

キーワード：炎症性筋疾患 封入体筋炎 縁取り空胞変性 RNA-seq 発現プロファイリング レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

特発性炎症性筋疾患 (MII) すなわち筋炎には臨床的に、皮膚筋炎、多発筋炎、封入体筋炎など特徴を有するサブグループが存在する。組織学的な筋線維破壊機序により、補体やサイトカインの関与した皮膚筋炎 (DM)、細胞傷害性機序である多発筋炎 (PM)、封入体筋炎 (IBM)、壊死性筋炎 (NAM) に分類される。さまざまな自己抗体が認められ、抗 ARS 抗体 (間質性肺炎合併) をはじめ、異なる臨床像に関連する様々な自己抗体が明らかにされている。さらに免疫遺伝学的背景として、組織適合性抗原 (HLA) との関連が明らかにされている (*Medicine* 2005;84:338-349, *ibid.* 2006;85:111-127)。同じ筋を標的とする炎症でありながら、さまざまな臨床的、組織学的、免疫機序的な特徴、免疫遺伝学的背景を有しており、炎症性筋疾患 (筋炎) はさまざまな病態機序の関与する疾患群である。治療の観点からも例外もあるもののステロイド治療によく反応する皮膚筋炎、多発筋炎などがある一方、封入体筋炎のように治療に抵抗性で難治性の病態が存在し、治療法の開発・進歩の待ち望まれる病態も少なくない。

筋炎のなかで封入体筋炎は、上記のような分類・位置づけにあり、慢性進行性で、組織学的に特徴的な骨格筋の縁取り空胞変性を呈し、有効で確実な治療法のない難治性の疾患である。組織学的に炎症を伴い、多発筋炎と共通した HLA との関連及び CD8 陽性細胞浸潤が示唆されるとともに、変性骨格筋にはβアミロイドたんぱく質の沈着など変性過程が認められ、特徴的な病理像を呈している (図 1)。病態は解明されていない部分が多い。病態の解明には、大きな枠組みとして、詳細な臨床情報及び骨格筋病理形態を基盤として、様々な観点からの検討が必要であるが、封入体筋炎骨格筋の発現プロファイリングによって、特に炎症反応と変性過程との関係を解明することが期待され、病態の理解、治療法開発のヒントを見出すのに有用と考えられる。

解析技術の進歩には目覚ましいものがあり、次世代シーケンサーによって大容量の塩基配列を短時間に解析可能である。ゲノム DNA の配列決定のみならず、網羅的に RNA の塩基配列の解析が可能で、発現プロファイルの解析への応用が行える (RNA-seq)。従来のアレイチップによる発現解析と比べ、原理的により網羅的な発現プロファイルの解析が行える。骨格筋病変は、均一というわけではなく、部位により病変の程度が異なっている。分子レベルのプロファイリングにおいては、解析に必要な一定量の試料を分析する必要がある。骨格筋試料のままの

分析では、正常から様々な程度の病変が混在した状態での分析となり、分析精度の限界を避けられない。十分量の均質な病変試料による分析が必要である。均質な病変試料の調整には、レーザーマイクロダイセクション (LMD) による顕微標本の裁切が応用可能である。

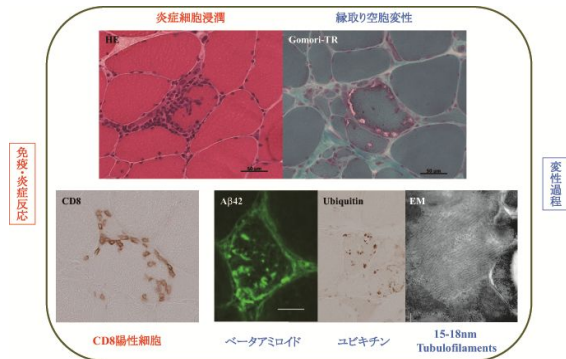


図 1. 封入体筋炎 (IBM) の骨格筋病理；炎症と変性とを同時に認める。

2. 研究の目的

特発性炎症性筋疾患 (MII)、筋炎には臨床的に、皮膚筋炎 (DM)、多発筋炎 (PM)、封入体筋炎 (IBM) など特徴を有するサブグループが存在する。そのうちで封入体筋炎は、慢性進行性で、組織学的に骨格筋の炎症及び縁取り空胞変性を呈し、有効で確実な治療法のない難治性の疾患である。炎症反応と変性過程との関係を解明することは、病態の理解、治療法開発のヒントを見出すのに有用と考えられる。次世代シーケンサー及びレーザーマイクロダイセクションによる封入体筋炎生検骨格筋の網羅的な発現プロファイリングによる解析を行い、本症における炎症反応と変性過程との関係を分子レベルで、明らかにし、病態を解明する。

3. 研究の方法

既存および新規生検骨格筋試料を用いて以下の手法にて、骨格筋試料の網羅的な発現プロファイリングを行う。解析を行う組織試料として、病理診断の確定している骨格筋の一定量を対象とする解析及び、組織のなかで病変ごとの試料を対象とする解析を行う。

A) 封入体筋炎 (IBM) 等の生検骨格筋の RNA-seq

病理学的に確定診断を得ている骨格筋凍結試料について以下にて解析する。

(ア) Trizol を用いて Total RNA 抽出する。厚さ 50µm 切片 × 15 枚 (~ 30mg) から 1~1.5µg/mg 組織の Total RNA が抽出される。1回の解析に必要な出発組織量を別途検討し、試料の使用を最適化する。

(イ) Total RNA から cDNA ライブラリ

- ーを作成する。2種類のライブラリーを作成する。ひとつは polyA+ RNA を鋳型とする mRNA ライブラリー (TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit) と coding RNA と non-coding RNA とを鋳型とする Total RNA ライブラリー (TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit) とを作成する。ライブラリー作成にあたって必要な Total RNA 量については 1 μg から初めて、低減をはかるための検討を行い、試料の使用を可能な限り少なくする。
- (ウ) 各ライブラリーについて qPCR にて定量する。
- (エ) 次世代シーケンサー HiSeq2000 にてペアエンド法 (100 塩基) で配列解析を行う。1/3 レーンを用いて約 1.5×10^8 リードのデータが得られる。
- (オ) 得られたリード (配列) について、以下の解析処理を行う。
TopHat2 を用いて transcriptome 及び参照ゲノム配列にアラインする。Cufflinks を用いて各転写産物の量、新規スプライシング産物の同定を行う。
- B) レーザーマイクロダイセクション (LMD) による病変部位ごとなし筋線維ごとの RNA-seq による発現プロファイリング
骨格筋の病変は均一ではなく、部位ないし筋線維によって異なる病理変化が混在しており、それら病理変化の異なる部位ないし筋線維ごとの発現プロファイルと病理変化との対応の検討が必要である。レーザーマイクロダイセクション (LMD) (ライカ社製) によって、凍結切片標本から任意の病変部位や筋線維を裁切し、均一な病変部位ないし筋線維試料を調整することができる。
- C) データ解析
個々の試料の解析によって得られた発現プロファイルデータについて以下のような観点からの解析を加え、封入体筋炎の骨格筋病理に特徴的な炎症と変性過程との関係等を分子レベルで明らかにする。
- (ア) 正常骨格筋との比較
(イ) 他の病型の筋炎、特に CD8 陽性多発筋炎との比較
(ウ) 中枢神経系の変性過程 (アルツハイマー病 etc.) との比較
(エ) 病変部位ないし筋線維間での発現プロファイルの変化
(オ) クラスタ分析による注目すべき遺伝子、遺伝子群の抽出
(カ) 関心遺伝子、遺伝子群についてのオントロジー、パスウェイに焦点

を絞った解析

(キ) ENCODE、トランスクリプトームデータベースなどを参照した関心遺伝子、遺伝子群の解析。

4. 研究成果

- (1) 解析検体数：本研究費とゲノム支援 (平成 26 年度) によって、平成 26 年度、27 年度、28 年度の 3 年間で、計 79 検体の解析を行った。内訳は、以下のとおりである：
- | | |
|----------------------------------|------|
| コントロール | 11 例 |
| PM | 11 例 |
| IBM | 47 例 |
| 非 PM, 非 IBM CD8-MHC-1 complex 陽性 | 10 例 |
- (2) 試料の quality: RIN>5 が 71 検体でこれらの試料について RNA-seq を行った。コントロール 2 例、PM 2 例、IBM 4 例は RIN<5 で、解析から除外した。
- (3) 配列：検体当たりの短鎖長配列リード数は平均 107 メガリード、ヒトの参照配列への mapping 率はいずれも 80% 以上であった。
- (4) クラスタ分析：封入体筋炎は独立したクラスターをなし、多発筋炎の一部、残りの多発筋炎中間群が独立したクラスターを形成し、病理学的分類と発現風プロファイルによるクラスターとの対応・相関が示唆された。
- (5) 発現量変化：IBM では PM やコントロールと比較し、細胞接着因子や Nod-like receptor signaling pathway などの炎症に関わる経路や、オートファジー・リソソーム系、スプライソソームに関わる遺伝子の発現量が増加していた。
一方 IBM では酸化的リン酸化やクエン酸回路、電子伝達系などに関わる遺伝子の発現量が低下していた。炎症に関わる経路の遺伝子の発現量が増えていたことはマイクロアレイによる既報告 (Greenberg *et al.* *Neurology* 2002;59:1170-1182) と合致していたが、オートファゴソーム膜の形成に必須な LC3 と相互作用する p62 の mRNA は、real-time PCR を用いた既報告 (Nogalska *et al.* *Acta Neuropathol* 2009;118:407-413) では上昇していたのに対し、本研究ではコントロールと PM、IBM の間で有意な発現量の変化は認めなかった。
- (6) レーザーマイクロダイセクションによる解析は、予備実験までで、解析については、本研究期間内には達成できなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 順 (GOTO, Jun)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：10211252

(2)研究分担者

清水 潤 (SHIMIZU, Jun)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40260492

(3)連携研究者

石浦 浩之 (ISHIURA, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40632849

(4)研究協力者

池永 知誓子 (IKENAGA, Chiseko)

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学

専攻・博士課程院生