

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670436

研究課題名(和文) 封入体筋炎における疾患感受性遺伝子の探索およびin vitro疾患モデルの確立

研究課題名(英文) Genetic analysis and establishment of in vitro model for inclusion body myositis

研究代表者

青木 正志 (Aoki, Masashi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70302148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：IBM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。26S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た(JCS 2014)。次世代シーケンサーを用いた解析によりhnRNPA1遺伝子に変異を持つ家系を見出し、Neurology Genetics誌に報告した。IBM患者骨格筋より筋芽細胞培養を行なう方法を確立し、症例を積み重ねている。さらに報告したhnRNPA1変異家系の患者より同意を取り、iPS細胞の樹立を行なった。

研究成果の概要(英文)：Sporadic inclusion body myositis (sIBM) is an intractable and progressive skeletal muscle disease of unknown etiology and without effective treatment. Muscle biopsy typically reveals endomysial inflammation, invasion of mononuclear cells into non-necrotic fibers and rimmed vacuoles, suggesting inflammation and degeneration co-exist as part of the pathomechanism. We made muscle specific proteasomal deficient mice and reported in JCS paper. We also found familial case of inclusion body myopathy with the mutation in hnRNPA1. We also established iPS cells from these patients.

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

当科で診療を続けている常染色体優性遺伝形式をとる Myofibrillar myopathy (MFM) の家系では、下垂足を初発症状とし、遠位筋、胸郭、肩甲帯を主体とした慢性進行性の筋萎縮と筋力低下を呈するが、比較的早期に呼吸不全を合併する点に特徴がある。本家系の中の罹患者 5 名、非罹患者 5 名の計 10 名について次世代シーケンサーによる原因遺伝子解析を行い TTN の変異 c.90263G>T, p.W30088L を同定した (Izumi et al. J Hum Genet 2013)。Genetics のアプローチにより稀少難治性筋疾患の病態解明が加速度的に早まっている。

IBM 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。平成 21 年度より当科を中心に IBM の全国的な臨床調査を開始し DNA を含めた臨床検体を蓄積してきている。また当科から稀有な IBM の姉妹例を報告しており (Tateyama et al. 2003)、病態の根本に迫るには家族歴のある症例を中心とした疾患関連遺伝子の解析が重要と考えられる。

東北大学では IBM の病態における免疫応答を重視し病態研究を進めてきた (Tateyama J Neurol Sci 2009)。一方で細胞の恒常性維持のためにはオートファジーや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。我々は京都大学神経内科との共同研究でミスフォールド蛋白質の分解に関わると考えられる 26S 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、このマウスで筋萎縮がみられることを確認した。MFM や IBM で

は蛋白分解の異常が分子病態の背景にあると考えられる。

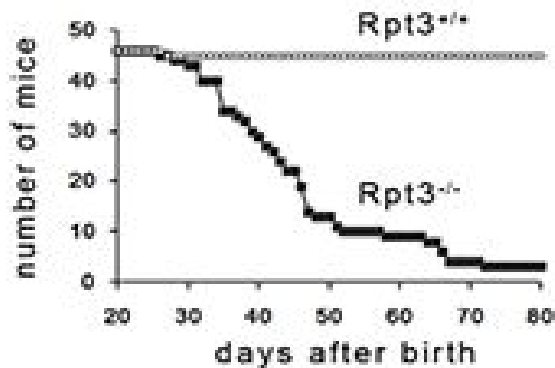
2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスおよび RNA シーケンスにより IBM の疾患原因・感受性遺伝子の同定を 1 つの目標とする。患者由来 iPS から骨格筋細胞を分化させ細胞モデルの確立を目指す。骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスとの比較検討を行い、異常蛋白が蓄積する機序について考察する。

3. 研究の方法

IBM 患者 3~4 例より皮膚線維芽細胞を採取し、エピゾーマルベクターを用いて、OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, shP53 を導入し、IBM 特異的ヒト iPS 細胞を樹立する。樹立したヒト iPS 細胞クローンは、外来遺伝子のゲノムへの挿入、未分化マーカーの発現、疾患感受性細胞への分化能解析などにより、各患者由来ヒト iPS 細胞ごとに、良質なクローンを 2-3 クローン選択する。また、選択したヒト iPS 細胞クローンについては、染色体解析によるゲノム異常の有無の解析を行い、末梢血や、iPS 細胞樹立前の線維芽細胞での解析結果と比較検討する。また、コントロールとして健常者 3 名から採取した線維芽細胞を用いて、同様の方法によりヒト iPS 細胞を樹立し、以下の解析のコントロールとして用いる。

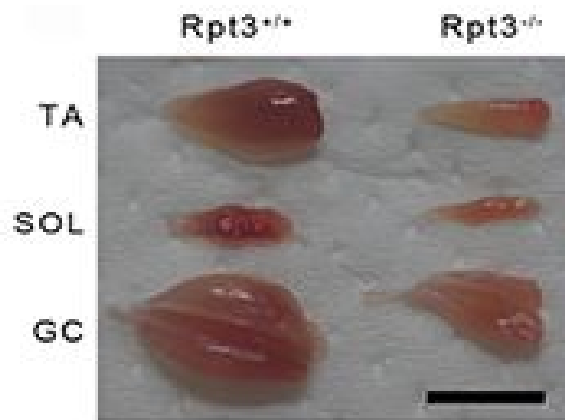
Embryoid body を介した骨格筋への分化誘導 (Darabi et al. Cell Stem Cell 2012) を用う。骨格筋特異的に発現する PAX7 の制御下に蛍光タンパクである GFP を発現するレポーターを用いることで PAX7 陽性骨格筋筋芽



細胞を可視化し、フローサイトメーター (FACS)により純化を行うことも可能である。iPS 以外に、診断目的で筋生検を行なう IBM 疑い患者から筋芽細胞を分収し、培養する。生検後保存筋において 26 年度に同定した疾患感受性遺伝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。

Embryoid body からの運動ニューロンへの分化方法は確立されている。4 日目から SMAD 阻害、10 日目からレチノイン酸(RA)と sonic hedgehog(SHH)経路をそれぞれ小分子アゴニストで阻害し、24 日目に embryoid body を分離し運動ニューロンを接着細胞として維持するというプロトコールである。この方法で Islet 陽性の運動ニューロンが 4-15%に見られるようになる。

Hickman JJ ら (University of Central Florida) は運動ニューロンと骨格筋細胞を共培養させ神経筋接合部が形成され 30 日という長期間にわたって in vitro で維持できることを報告した(Biomaterials 2010)。この方法を用いてヒト運動ニューロンとヒト骨格筋細胞を共培養させ in vitro での IBM 病態の再現を目標とする。さらに Chamber slide を用いて二者の混在を防ぎ、三次元的な検討を行うことも検討したい。骨格筋萎縮、



プロテアソーム阻害剤を用いた封入体形成がみられるかを検討する。

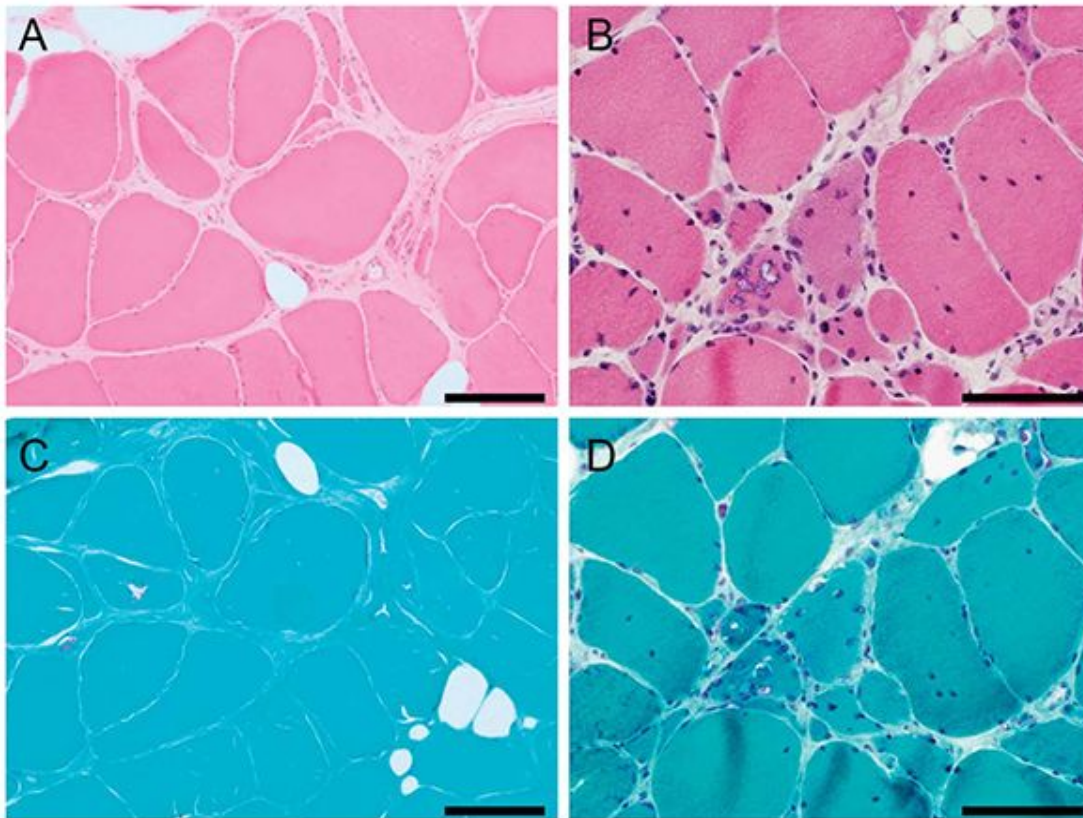
4. 研究成果

26S 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た(上図: Kitajima et al. J Cell Sci 2014)。次世代シーケンサーを用いた解析により hnRNPA1 遺伝子に変異を持つ家系を見出し、Neurology Genetics 誌に報告した(筋病理が次ページ図: Izumi et al. Neurology Genetics 2015)。IBM 患者骨格筋より筋芽細胞培養を行なう方法を確立し、症例を積み重ねている。さらに、報告した hnRNPA1 変異家系の患者より同意を取り、iPS 細胞の樹立を行なった。運動ニューロン・骨格筋への分化には成功した。共培養系の確立や病態解析を行なっている。

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4件)



1. Klionsky DJ ...Suzuki N...Zughaier SM. Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd edition) *Autophagy* 2016;12:1-222. PMID: 26799652.

2. Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, Nishiyama A, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Mitsuhashi S, Nishino I, Aoki Y, Aoki M. A mutation in hnRNPA1 causes isolated inclusion body myopathy in two families with multisystem proteinopathy. *Neurology Genetics* MS ID#: NG/2015/000729

3. Izumi R, Niihori T, Takahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watanabe C, Sugie K, Nakanishi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M. Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing. *Neurology Genetics* 2015;1:e36; doi:

10.1212/NXG.0000000000000036

4. Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato H, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R, Aoki M*. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci.* 127:5204-17, 2014. doi: 10.1242/jcs.150961.

〔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〕
ホームページ等
東北大学神経内科
<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

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

加藤 昌昭 (Kato, MASA AKI)
東北大学・病院・助教
研究者番号：50622479

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

割田 仁 (Hitoshi, WARITA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30400245