

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860674

研究課題名(和文)封入体筋炎をモデルとした異常蛋白凝集体病の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation the pathomechanisms of conformational diseases through analyzing the model mice of sporadic inclusion myositis

研究代表者

俵 明恵 (Tawara, Akie)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00726333

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)：孤発性封入体筋炎の筋病理学的特徴には炎症所見と縁取り空胞を含む変性所見があげられる。近年、TDP-43が孤発性封入体筋炎の変性筋において凝集することが報告されているが、筋形質内でのTDP-43の凝集が一次的に筋変性を生じるのか、副次的に筋変性の結果生じる現象なのか明らかになっていない。そこで骨格筋特異的にTDP-43を過剰発現するマウスを作成し、TDP-43が筋変性を生じさせるか検証した。TDP-43過剰発現マウスにおいては体重減少、CK上昇に加えTDP-43の筋形質内凝集、空胞様変化を認めた。またTDP-43は蛋白分解経路関連蛋白や小胞体ストレス蛋白と関連し筋変性を生じる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Sporadic inclusion body myositis (sIBM) demonstrates inflammatory findings and degenerative features. Recently, TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) has been reported to be accumulated within degenerative myofibers of sIBM. At this point, it remained unclear whether the sarcoplasmic accumulation of TDP-43 is a primary trigger of muscle degeneration. The aim of our study is to dissolve whether muscle-dominant overexpression of TDP-43 can primarily cause muscle degeneration. We generated mice with muscle-dominant TDP-43 expression, and analyzed the phenotypes using biochemical, histological, and proteomic techniques including laser microdissection with LC-MS/MS. TDP-43 transgenic mice showed increased levels of CK. Myopathology demonstrated vacuolar formation and aggregation of TDP-43. Proteomic analysis using aggregated materials in degenerative myofibers identified increased levels of chaperons recognizing misfiled proteins. TDP-43 expression indeed caused myofiber degeneration.

研究分野：神経内科

キーワード：孤発性封入体筋炎 TDP-43 LC-MS/MS NT5C1A

1. 研究開始当初の背景

近年アルツハイマー病やプリオン病、パーキンソン病を始めとする『異常蛋白凝集体病』において、その伝播や進展のメカニズムが注目されているが、その詳細は不明である。『異常蛋白凝集体病』の一つである封入体筋炎(IBM)は、緩徐進行性の経過で四肢、特に大腿部や手指・手首屈筋、嚥下に関する筋群を障害する難治性筋疾患であるが、近年日本において患者数が急増している。今日まで有効な治療法はなく、数年で寝たきり状態となる難病である。筋病理学的に筋への炎症性細胞浸潤に加えて、筋線維の縁取り空胞(封入体)の存在を特徴とする。このIBM骨格筋に含まれる封入体の構成成分としてアルツハイマー病で蓄積するアミロイドが同定され、IBMの病因において骨格筋の蛋白凝集症としての側面が注目されている。最近、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄前角細胞や、前頭側頭型認知症にみられる凝集体であるTDP-43も、IBM生検筋において封入体に検出されるとする報告が相次いで発表された。我々のグループはこれまでALSの病態解明および根本的治療法の開発に向けた臨床研究と基礎研究を続けており、運動ニューロン疾患の変性脱落に小胞体ストレスが関与することなどを解明した(Mori et al. Neurochem Int. 2011、Yamashita et al. J Neurochem. 2010)。さらにALSと封入体筋炎の臨床的類似性に着目し、弧発性IBM、眼咽頭筋ジストロフィー(OPMD)、多発筋炎(PM)、皮膚筋炎(DM)、健常コントロールなどの骨格筋生検標本を用いて、家族性ALS関連蛋白、TDP-43およびFUS/TLS、SOD1、OPTNの発現と局在について免疫組織化学的手法で以下の如く詳細に検討した。TDP-43およびOPTNはPMやDM、コントロールに比較してより高頻度にIBMおよびOPMD患者筋形質に蓄積した。FUS/TLSはその頻度が減少する傾向がみら

れた。さらに二重染色では、TDP-43はOPTNと共局在を示したが、FUS/TLSとは共局在は見られなかった。以上よりOPTNはTDP-43と共同して、縁取り空胞を伴うミオパチーの病態機序に關与する可能性を明らかにした(Yamashita et al. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013)。しかしながらTDP-43の筋形質内凝集が筋変性の原因となるか、筋変性の結果TDP-43の筋形質内凝集を生じるかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究ではIBMの骨格筋変性において、TDP-43蛋白凝集が発症や進展に関わるメカニズムを明らかにし、治療法を開発することを目的とする。さらにアルツハイマー病やALSなどの神経筋異常蛋白凝集体病に関わる本質的な病態を明らかにすることによって、IBMのみならず多くの『神経筋異常蛋白凝集体病の治療法開発』に展開させることを目的とした。

3. 研究の方法

1) IBMモデルマウスの確立

IBMモデルマウスとしては、これまでいくつかのモデルが提唱されているが、中でも骨格筋特異的にアミロイド前駆蛋白を過剰発現するトランスジェニックマウスでは表現系の再現が見られている。我々は今回初めてIBM患者の骨格筋に高頻度に蓄積するTDP-43に着目し、このTDP-43の過剰発現が病態発現に必要十分であるか否かを明らかにするために、完全長ヒトTDP-43遺伝子を骨格筋特異的なプロモーターを用いて過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、表現型を筋病理学的、生化学的、行動解析学的に確認した。

2) IBMモデルマウス凝集部位の構成成分に対するプロテオミクス解析

IBMモデルマウス蛋白凝集部位より、レーザーマイクロダイセクターを用いて封入体部分、封入体を除く変性筋

細胞質、封入体のない筋線維における筋細胞質成分を回収し、蛋白を溶出後、LC-MS/MSによるプロテオミクス解析を行うことにより、封入体の構成成分を明らかにすると共に、それぞれの凝集蛋白形成に重要な働きを持つ蛋白質を同定する。

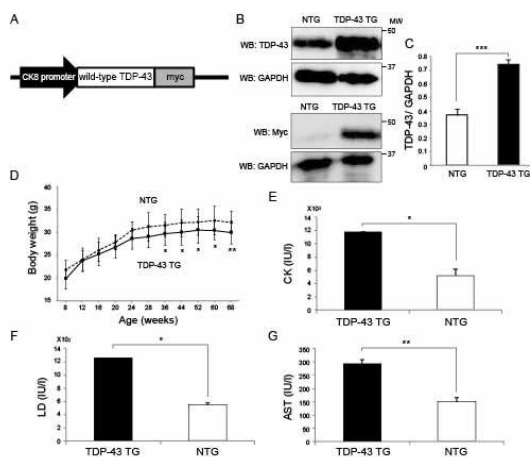
3)。

4. 研究成果

1) IBM モデルマウスの確立

CK8-TDP-43-myc フラグメントを精製後、C57BL/6 系統の受精卵へマイクロインジェクションし、ジェノタイピング解析を実施した。125 匹中 21 匹が PCR 陽性であり、ファウンダーマウス (F0) が得られた。F0 マウスを野生型 C57BL/6 系統マウスに戻し交配を行い、ジェノタイピングを行ったところ、113 匹中 22 匹が PCR 陽性の F1 マウスが得られた。得られた 22 系統の F1 マウスについて、骨格筋での TDP-43 蛋白発現量を GAPDH 蛋白で補正することによって、同胞コントロールマウスと比較した。以下の実験で使用した F1 マウスでは TDP-43/GAPDH = 0.748 であり、一方同胞コントロールマウスでは TDP-43/GAPDH = 0.372 であることから、F1 マウスでは内在性 TDP-43 に比較して約 2 倍の蛋白発現量であることが示された (図 1B,C)。また、体重は骨格筋量を反映することから、経時的に野生型ヒト TDP-43 トランスジェニックマウスと同胞コントロールマウスの体重を計測し、両者を比較した。36 週齢までは有意な体重変化は見られないが、36 週齢以降において野生型ヒト TDP-43 トランスジェニックマウスは低体重を呈することが示された (図 1D)。18 月齢の TDP-43 トラン

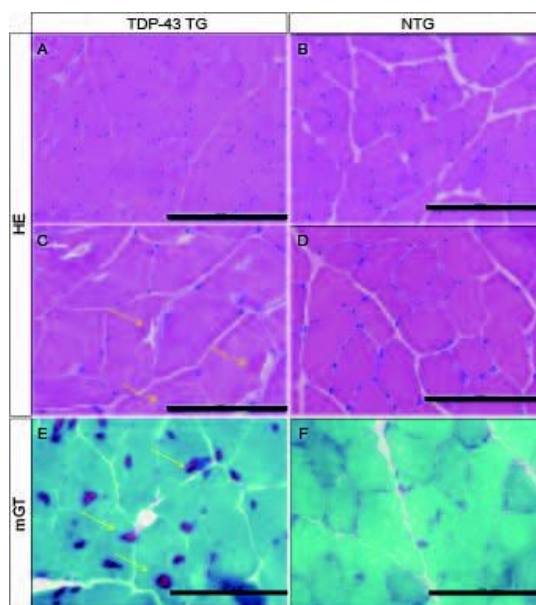
スジェニックマウスと同胞コントロールについて、血清 CK や LD、AST などの筋逸脱酵素の発現量を比較した。CK および LD、AST いずれにおいても、TDP-43 発現トランスジェニックマウスでは有意な上昇を認めた (図 1E,F,G)。



(図 1)

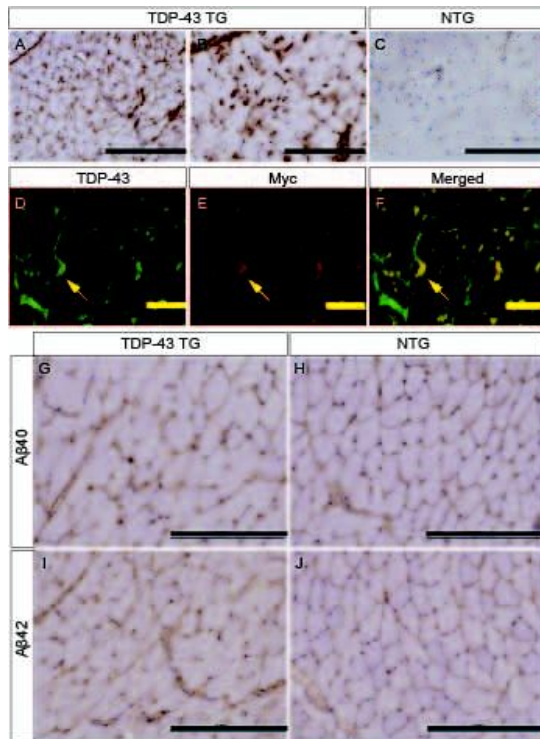
3) IBM モデルマウス病理解析と凝集部位の構成成分に対するプロテオミクス解析

18ヶ月齢の IBM モデルマウス骨格筋の病理解析を行った。HE 染色および Gomori-trichrome 染色では図 2C,E のような Tubular aggregate に類似した空胞変化を認め、野生型マウスではみられなかった。



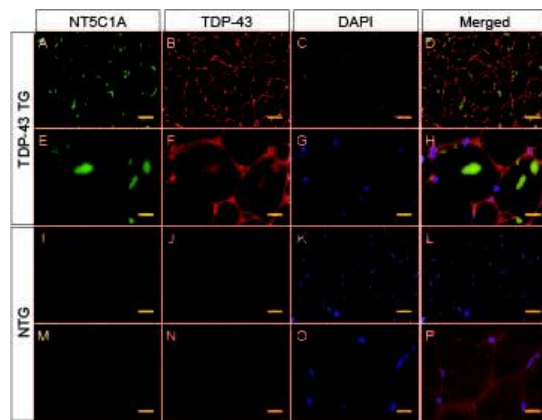
(図 2)

またモデルマウスにおいては筋形質内に TDP-43 の凝集を認め、Myc と共局在をとっていたことから外因性に導入したヒト TDP-43 が過剰発現により凝集しているものと考えられた(図 3A, D) IBM で特徴的とされるアミロイド の凝集は認めなかった(図 3G) 以上から TDP-43 を骨格筋に過剰発現することで、筋変性を生じている可能性があると考えられた。

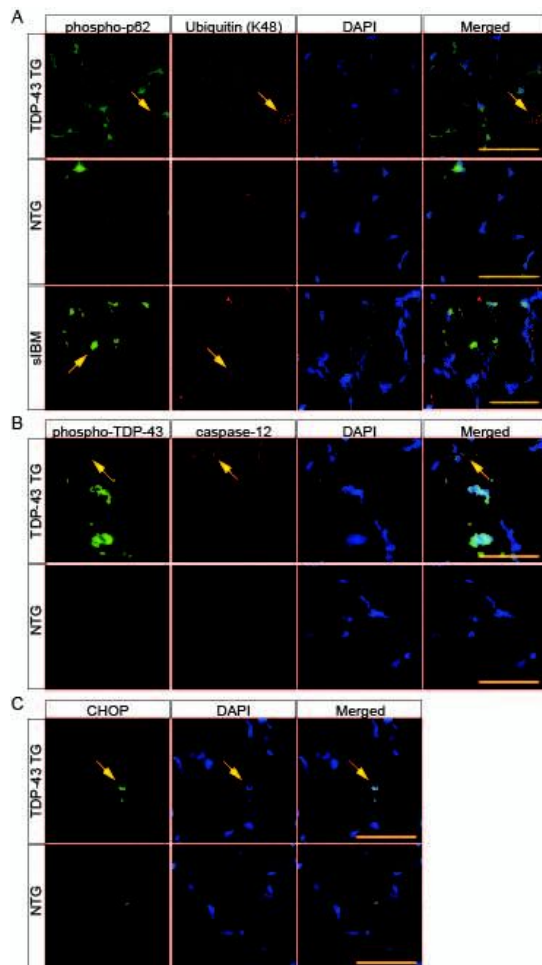


(図 3)

次に Gomori 染色で認めた凝集部位をレーザーマイクロダイセクションで切り取り、抽出し LC-MS/MS で質量分析を行ったところ、ミトコンドリア関連蛋白とともに NT5C1A が検出された(図 4)。変性機序と自己免疫的な機序の関連性を示す興味深い結果と考えられた。



また p62 やユビキチンといったユビキチン-プロテアソーム系に関連した蛋白および選択的オートファジーに関連した蛋白と TDP-43 とが IBM も出るマウスにおいて共局在をとり(図 4A) caspase-12 や CHOP とも一部で共局在を示していることから蛋白分解経路の障害および小胞体ストレス関連のアポトーシスにより筋変性を生じている可能性が示された。



以上から TDP-43 の筋形質での過剰発現は

CK 上昇で示される通り筋毒性を生じ、骨格筋萎縮に体重減少を誘導する可能性があると考えられる。また TDP-43 は蛋白分解経路や小胞体ストレスと関連し、筋変性を生じる機序が推察された。

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 7 件)

<2017 年>

1. Nozomu Tawara, 他 12 名 . Pathomechanisms of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol.*, 81, 512-525, 2017.

<2015 年>

3. Satoshi Yamashita et al., Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a *MATR3* mutation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 41, 391-398, 2015.

<2014 年>

4. Satoshi Yamashita, et al., Concomitant accumulation of α -synuclein and TDP-43 in a patient with corticobasal degeneration. *J. Neurol.*, 261, 2209-2217, 2014.
5. Hiroko Hori, Nozomu Tawara, (3 番目), 他 6 名. Clinical features of Japanese patients with inclusion body myositis. *J Neurol Sci.*, 346, 133-137, 2014. 査読有り
6. Kurisaki R., Yamashita S. Decision making of amyotrophic lateral sclerosis patients on noninvasive ventilation to receive tracheostomy positive pressure

ventilation. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 125, 28-31 (2014).

7. Yamashita S., Ando Y.

Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.*, 4, 13 (2015).

8. Hori H., Yamashita S., A carrier with de novo mutation in the dystrophin gene whose myopathic symptoms became seriously progressive after pregnancy and delivery. *Muscle Nerve.*, 52, 913-914 (2015).

[学会発表](計 2 件)

Nozomu Tawara, (1 番目), 他 7 名. Effect of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A (NT5C1A) antibody on cultured muscle cells and muscle fibers of mice. 20st International Congress of the World Muscle Society. Oct 6. 2016. Granada.

7. Nozomu Tawara, (1 番目), 他 8 名. A single center analysis of the clinicopathological findings of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1a antibody-positive sporadic inclusion body myositis. 19st International Congress of the World Muscle Society. Oct 4. 2015. Brighton.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俵 明恵 (TAWARA Akie)

熊本大学医学部附属病院 医員

研究者番号：00726333

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

安東 由喜雄 (ANDO Yukio)

山下 賢 (YAMASHITA Satoshi)

俵 望 (TAWARA Nozomu)

道鬼 つかさ (Doki Tsukasa)