

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））  
多系統蛋白質症（MSP）の疾患概念確立および診断基準作成、診療体制構築に関する研究班  
分担研究報告書

## MSP5 型関連変異 MATR3 発現マウスの病態解析と治療法開発

研究分担者 安東 由喜雄 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学

共同研究者 山下 賢<sup>1</sup>、原 健太郎<sup>1</sup>、張 霄<sup>1</sup>、道鬼 つかさ<sup>1</sup>、俵 望<sup>1</sup>、池田 徳典<sup>1</sup>、  
三隅 洋平<sup>1</sup>、張 子微<sup>1</sup>、松尾 圭将<sup>1</sup>、永井 真貴子<sup>2</sup>、倉重 毅志<sup>3</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学

<sup>2</sup>北里大学神経内科

<sup>3</sup>国立病院機構呉医療センター神経内科

**研究要旨** *Matrin 3 (MATR3)* 遺伝子変異は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy: VCPDM) の原因として同定されている。本研究は、変異 MATR3 が ALS や VCPDM を含む多系統蛋白質症 (multisystem proteinopathy: MSP) を引き起こすメカニズムを解明することを目的とする。はじめにヒト野生型もしくは変異型 (S85C) MATR3 を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターをマウス骨格筋に接種し、病理変化を解析した。次に CAG プロモーターを用いて変異型 (S85C) MATR3 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、臨床病理学的特徴を評価した。野生型もしくは変異型 (S85C) MATR3 を発現する AAV ベクターを骨格筋に接種すると、両者は同様に筋原性変化を誘導し、筋線維の小径化や内在核線維、p62 や LC3-II の発現亢進を認めた。変異 MATR3 トランスジェニックマウスは経時的に体重減少や運動機能の低下を示した。筋病理解析では筋線維の大小不同や内在核線維、縁取り空胞などの筋原性変化を認め、脊髄病理解析では運動ニューロン数の減少とミクログリアやアストロサイトの増生がみられた。AAV モデルに対してオートファジー促進薬であるラパマイシンを腹腔内投与したところ、骨格筋内 p62 発現レベルが減少し、MATR3 や p62 凝集を有する筋線維が減少した。野生型および変異型 MATR3 は同様に筋毒性をもたらす、MSP の臨床病理学的特徴を再現した。これらのモデルは MSP の病態を解析し、MATR3 の機能を解明するための有用なツールとなることが期待される。

### A. 研究目的

多系統蛋白質症 (multisystem proteinopathy: MSP) は、筋や骨、中枢神経系など多臓器に蛋白凝集体を認める遺伝性疾患である。以前から封入体ミオパチーや骨パジェット病、前頭側頭葉変性症が合併する「IBMPFD」という疾患群が認識されていたが、運動ニューロン疾患など多彩な神経症状も呈し、近年 MSP と称する疾患概念が提唱されたが (Taylor, 2015) 国際的コンセンサスには至っていない。本疾患の原因遺伝子として *VCP* や *hnRNPA2B1*、*hnRNPA1*、*SQSTM1*、*MATR3* 遺伝子

が同定されている。

*MATR3* は RNA 保持や DNA 修復、選択的スプライシング、神経細胞死に關与する多彩な機能を有する (Giordano et al., 2005; Salton et al., 2011; Salton et al., 2010)。*MATR3* のホモ接合性機能欠失変異はマウスの胎性致死をもたらす、ヘテロ接合性変異体では心臓左室流出路欠損の表現型を呈すると報告されているが (Quintero-Rivera et al., 2015) 骨格筋や運動ニューロン障害の報告はない。種々のマウス組織における *MATR3* の発現解析では、生殖臓器において発現が高い一方、骨格

筋や脊髄などの ALS や VCPDM で障害される臓器ではもっとも発現が低いことが明らかとなっている (Rayaprolu et al., 2016)。しかし MATR3 変異が、多臓器を障害するメカニズムは不明である。

本研究の目的は、変異 MATR3 が多臓器障害を引き起こす病態を解析し、治療法を探索することである。

## B. 研究方法

- 1) 野生型および変異型 MATR3 を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターをマウス骨格筋内に接種し骨格筋毒性を比較した。
- 2) 種々の組織における変異 MATR3 の影響を解明するために、変異 MATR3 トランスジェニックマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

承認番号 26-028 号「声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (VCPDM) の病態モデルの確立と治療法開発」として、平成 26 年 9 月 22 日熊本大学学長より遺伝子組換え生物等第二種使用等計画が承認されている。また承認番号 C29-150 号「声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (VCPDM) の病態モデルの確立と治療法開発」として、平成 29 年 5 月 16 日熊本大学学長より動物実験計画が承認されている。

## C. 研究結果

- 1) 野生型および変異型 MATR3 発現 AAV ベクターの骨格筋接種

野生型および変異型 MATR3 を発現する AAV ベクターをマウス前脛骨筋内に接種すると、投与 2 週後に野生型および変異型ともに筋線維の有意な小径化を認めた。しかし野生型と変異型 MATR3 ベクターを接種した骨格筋では有意差は見られなかった。MATR3 の発現は野生型 MATR3 あるいは GFP 発現骨格筋では筋核に局在したが、野生型 MATR3 発現骨格筋では筋核の腫大が見られた。一方、変異型 MATR3 発現骨格筋では、筋核の腫大とともに MATR3 のドット様筋線維内凝集を認めた。さらに p62 の筋線維内凝集は、野生型よりも変異型 MATR3 発現骨格筋で高頻度に見られた。

AAV 接種筋におけるオートファジー関連蛋白の発現を比較すると、p62 および LC3-II の発現レ

ベルは変異型 MATR3 発現骨格筋で有意に増加していた。また MATR3 の発現レベルは、野生型および変異型 MATR3 発現骨格筋で約 10 倍上昇していたが、125 kDa の全長型のみならず 90 kDa や 70 kDa の断片型のバンドが検出された。

- 2) 変異 MATR3 トランスジェニックマウス作成

骨格筋や運動ニューロンにおける変異 MATR3 の毒性を評価するために、CAG プロモーターを用いて変異 MATR3 (S85C) cDNA を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。少なくとも 3 系統のトランスジェニックマウスを樹立し得たが、最も重症な #523 系統では平均生存期間が 36.3 週であり、中等度の #3113 および #3116 系統では 68.9 週と 85.6 週であり、健常同胞マウスの 134.1 週と比較して有意に生存期間が短縮していた。#3113 系統のマウスでは、12 週齢より後肢の異常反射が出現し、11 週齢より経時的に体重が減少し、ロータロッドやフットプリントテストによる運動機能低下がみられた。終末期のマウスでは呼吸状態が悪化し、横隔膜の高度の菲薄化と筋原性変化が見られたことより呼吸不全により死に至ることが明らかとなった。

20 週齢マウスの腓腹筋の病理解析では、筋線維の大小不同、内在核線維、縁取り空胞などの筋原性変化を認め、一部には脂肪置換や群性萎縮、連鎖状筋核もみられた。また MATR3 や p62、LC3、TDP-43 の筋線維内凝集を認め、全長型に加えて断片化あるいは高分子複合体を形成した MATR3 と TDP-43 の発現がみられた。

さらに 20 週齢マウスの脊髄病理解析では、脊髄前角の SMI-32 陽性運動ニューロンの減少と GFAP 陽性アストロサイトや Iba-1 陽性ミクログリアの増生を認めた。また脊髄前角運動ニューロンにおいて、核内 MATR3 発現の喪失と細胞質内 MATR3 および TDP-43 凝集がみられた。骨格筋と同様に、全長型に加えて断片化した MATR3 と TDP-43 の発現も認められた。心臓や肺、脾臓、肝臓、腎臓、大脳皮質など他の臓器には形態学的異常を認めなかった。

- 3) AAV モデルに対するラパマイシン投与

AAV モデルに対してオートファジー促進薬であるラパマイシンを腹腔内投与したところ、骨格筋内 p62 発現レベルが減少し、MATR3 や p62 凝集

を有する筋線維が減少した。

#### D. 考察

本研究において野生型および変異型 MATR3 発現 AAV の骨格筋接種は、同様に筋線維内異常蛋白凝集やオートファジーマーカーの上昇を伴う筋原性変化をもたらすことを明らかにした。最近の研究では、MATR3 関連ミオパチー患者骨格筋では MATR3 蛋白の発現や局在には変化がなく、ストレス顆粒形成の障害が本疾患の病態に重要との報告がある (Mensch et al., 2018)。しかし我々が樹立した 3 系統のマウスの解析では、生存期間短縮の表現型は MATR3 mRNA の発現量に依存している可能性が示されており、今後 MATR3 発現量と表現型の重症度との関連性を慎重に評価する必要がある。

MATR3 は TDP-43 と相互作用し、その反応は変異型 MATR3 (S85C) によって増強されることが報告されている (Johnson et al., 2014)。本トランスジェニックマウスにおいて、筋線維内および運動ニューロン細胞質内に TDP-43 陽性凝集体が形成され、また断片化 TDP-43 および MATR3 とともに高分子複合体が形成されていた。これらの断片化 TDP-43 および MATR3 は全長型蛋白の分解過程の中間産物と推測されるが、本疾患の病態との関連性について更なる解析が不可欠である。

ラパマイシンは ALS をはじめとする様々な神経変性疾患の治療薬となることが期待されている。Valosin containing protein (VCP) 遺伝子変異による MSP に対するラパマイシンの有効性は議論の余地が残っており (Ching and Weihl, 2013; Nalbandian et al., 2015)。今後変異型 MATR3 トランスジェニックモデルを用いた本薬の有効性の検証が必要である。

#### E. 結論

野生型および変異型 MATR3 は同様に筋毒性をもたらし、VCPDM や ALS を含む MSP の臨床病理学的特徴を再現した。これらのモデルは MSP の病態を解析し、MATR3 の機能を解明するための有用なツールとなることが期待される。またラパマイシンは MATR3 変異による MSP5 型の治療薬候補となることが期待された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tawara N, Yamashita S, Kawakami K, Kurashige T, Zhang Z, Tasaki M, Yamamoto Y, Nishikami T, Doki T, Zhang X, Matsuo Y, Kimura E, Tawara A, Maeda Y, Hauschka SD, Maruyama H, Ando Y: Muscle-dominant wild-type TDP-43 expression induces myopathological changes featuring tubular aggregates and TDP-43-positive inclusions. *Exp Neurol* 309: 169-180, 2018.
- 2) Mukaino A, Tsuda M, Yamashita S, Kosaka T, Wada K, Ando Y: Cerebrotendinous xanthomatosis presenting with extensive cerebral cortex symptoms: A case report. *Clin Neurol Neurosurg* 174: 217-219, 2018.
- 3) Okada M, Yamashita S, Ueyama H, Ishizaki M, Maeda Y, Ando Y: Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *eNeurologicalSci* 11: 11-14, 2018.
- 4) Yamashita S, Nakama T, Ueda M, Honda S, Kimura E, Konagaya M, Ando Y: Tongue strength in patients with subacute myelo-optico-neuropathy. *J Clin Neurosci* 47: 84-88, 2018.
- 5) Yamashita S, Tawara N: Determination of cN1A autoantibodies by cell-based immunofluorescence cytochemistry. *Methods Mol Biol* 1901: 89-94, 2019.
- 6) Kurisaki R, Ueyama H, Maeda Y, Sakamoto T, Nakahara K, Nakane S, Yamashita S, Ando Y; 2016 Kumamoto Earthquake PD Study Group. Impact of major earthquakes on Parkinson's disease. *J Clin Neurosci*: 61, 130-135, 2019.
- 7) Doki T, Yamashita S, Wei FY, Hara K, Yamamoto T, Zhang Z, Zhang X, Tawara N, Hino H, Uyama E, Kurashige T, Maruyama H, Tomizawa K, Ando Y: Mitochondrial localization of PABPN1 in oculopharyngeal muscular

- dystrophy. *Lab Invest*, in press, 2019.
- 8) Zhang X, Yamashita S, Hara K, Doki T, Tawara N, Ikeda T, Misumi Y, Zhang Z, Matsuo Y, Nagai M, Kurashige T, Maruyama H, Ando Y: Mutant MATR3 mouse model to explain multisystem proteinopathy. *J Pathol*, in press, 2019.
  - 9) Kumai Y, Samejima Y, Yamashita S, Ando Y, Orita Y, Miyamoto T, Matsubara K: Assessment of oropharyngeal swallowing dysfunction in myasthenia gravis patients presenting with difficulty in swallowing. *Auris Nasus Larynx*, in press, 2019.
  - 10) 山下 賢, 安東由喜雄 . 封入体筋炎と自己抗体 . *BRAIN and NERVE* 70: 449-457, 2018.
  - 11) 山下 賢 . ALS 患者の薬物療法選択における意思決定支援 . *難病と在宅ケア* 24: 18-21, 2018.
  - 12) 山下 賢 . 10 章 遺伝子、その他難病における診断・治療の現状と求める医薬品・医療機器・再生医療像 第 5 節 封入体筋炎 . 希少疾患用医薬品の適応拡大と事業性評価 No. 1969 . 東京: 技術情報協会; 465-471, 2018.
  - 13) 山下 賢 . 封入体筋炎における自己抗体の意義は? *週刊日本医事新報* 4940: 54-55, 2018.
2. 学会発表
- 1) Yamashita S, Ikeda T, Tawara N, Zhang X, Doki T, Matsuo Y, Zhang Z, Hara K, Ando Y: Clinical differences between sporadic inclusion body myositis with and without intramuscular amyloid-like deposits. The XVI International Symposium on Amyloidosis, KKR Hotel Kumamoto, Kumamoto, Japan, March 26, 2018.
  - 2) Hara K, Yamashita S, Zhang X, Tawara N, Doki T, Zhang Z, Matsuo Y, Nagai M, Ando Y: Intramyofiber amyloid deposits of transgenic mice overexpressing mutant Matrin 3 are involved in the pathogenesis of Vocal Cord Pharyngeal Distal Myopathy. The XVI International Symposium on Amyloidosis, KKR Hotel Kumamoto, Kumamoto, Japan. March 26, 2018.
  - 3) 山下 賢: 封入体筋炎. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌 (シンポジウム), May 23, 2018.
  - 4) Yamashita S, Tawara N, Ikeda T, Zhang X, Doki T, Matsuo Y, Zhang Z, Hara K, Ando Y: Clinical characteristics of sporadic inclusion body myositis with anti-NT5C1A antibodies. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌, May 23, 2018.
  - 5) Tawara N, Yamashita S, Zhang Z, Zhang X, Hara K, Doki T, Matsuo Y, Nakane S, Ando Y: Generation of novel active immunization model of sporadic inclusion body myositis. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌, May 23, 2018.
  - 6) Zhang X, Yamashita S, Tawara N, Doki T, Hara K, Zhang Z, Ando Y: Overexpression of mutant MATR3 recapitulates clinicopathological features of VCPDM and ALS in mice. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌, May 24, 2018.
  - 7) 栗崎玲一、上山秀嗣、前田 寧、阪本徹郎、中原圭一、中根俊成、山下 賢、安東由喜雄: 熊本地震を経験したパーキンソン病患者の地震に対する思い-多施設共同アンケート調査-. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌, May 26, 2018.
  - 8) Hara K, Zhang X, Yamashita S, Tawara N, Doki T, Zhang Z, Ando Y: Similarity of pathological features between patients with VCPDM and mice injected with AAV vectors. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌, May 26, 2018.
  - 9) Zhang Z, Yamashita S, Tawara N, Doki T, Zhang X, Hara K, Ando Y: The relationship between myofiber necrosis and CD59 levels in immune mediated necrotizing myopathy. 第 59 回日本神経学会総会, 札幌, May 26, 2018.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし