

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業
多系統蛋白質症 (MSP) 患者の全国実態調査と診療体制構築に関する研究班
分担研究報告書

オートファジー促進薬を用いた多系統蛋白質症治療効果の検証

研究分担者 山下 賢 熊本大学大学院生命科学研究部 脳神経内科学

共同研究者 原 健太郎¹、俵 望¹、田中 つかさ¹、植田 光晴¹

¹熊本大学大学院生命科学研究部 脳神経内科学

研究要旨 多系統蛋白質症 (multisystem proteinopathy: MSP) は、骨格筋や骨、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。本疾患の原因遺伝子として、VCP に加えて、*hnRNPA2B1* や *hnRNPA1*、*SQSTM1*、*MATR3* 遺伝子が同定されているが、多臓器が障害されるメカニズムは不明である。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すると、野生型、変異型ともに筋線維の小径化を認めた。変異 *MATR3* トランスジェニックマウスでは、後肢の異常反射や経時的体重減少、運動機能低下、生存期間の短縮がみられた。骨格筋病理では筋線維の小径化とともに、縁取り空胞、TDP-43 や p62 などの筋形質内凝集を認め、脊髄前角では運動ニューロンの減少とグリオーシス、核内 *MATR3* 発現の低下がみられた。AAV モデルおよびトランスジェニックマウス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、筋線維径が改善し、骨格筋内 p62 発現レベルが減少し、p62 凝集を有する筋線維が減少した。変異 *MATR3* モデルでは封入体ミオパチーと運動ニューロン疾患が複合した病態が再現され、骨格筋では核機能とタンパク分解機構の異常が示唆された。ラパマイシンは p62 陽性凝集体の減少をもたらし、MSP の治療薬となる可能性が示された。

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、神経細胞死に関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し、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筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (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* による MSP が主要な蛋白分解機構の一つであるオートファジーの障害によって発症するという仮説に基づいて、MSP5 型モデルマウスに対して、オートファジー

促進薬であるラパマイシンを投与し、その治療効果を検証することである。

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、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する。

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、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する。

上記 1) および 2) のマウスについて、行動学および筋病理学的解析を行う。

(倫理面への配慮)

承認番号 26-028 および 2-062 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 および A2019-020 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モデルにおける検証

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。

AAV モデルに対してラパマイシンを腹腔内投与したところ、野生型、変異型ともに筋線維の小径化を認めた。変異型 MATR3 を発現するマウスでは、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。

2) 変異 MATR3 トランスジェニックマウスにおける検証

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。

10 週齢マウスに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、p62 凝集を有する筋線維が減少した。

D. 考察

我々は既に、野生型および変異型 MATR3 発現 AAV の骨格筋接種が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報告している (Zhang et al., 2019)。さらに我々が樹立した変異型 MATR3 トランスジェニックマウスの解析では、経時的体重減少や運動機能低下、生存期間短縮などの表現型を認めた (Zhang et al., 2019)。筋病理学的解析では VCPDM 患者と同様に、筋線維の小径化、内在核および縁取り空胞などの筋原性変化が見られ、核での MATR3 の染色性が低下し、p62 や LC3、TDP-43、MATR3 の筋線維内凝集を認めた。脊髄病理では運動ニューロン数の減少、ミクログリアやアストロサイトの増生に加えて、MATR3 や TDP-43 の運動ニューロン内細胞質凝集が見られた。骨格筋の網羅的プロテオミクス分析では、シヤペロン、ストレス反応、蛋白質分解、および核機能に関連する蛋白質の発現亢進を示した。すなわち、本マウスモデルでは、封入体ミオパチーと運動ニューロン疾患が複合した病態が再現され、骨格筋では核機能と蛋白分解機構の異常が示唆された。

ラパマイシンは、ALS や封入体筋炎などの蛋白分解機構の異常を伴う神経筋変性疾患の治療薬となることが期待されている。しかし VCP 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)、今後さらに本マウスモデルを用いた有効性の詳細な検証が必要である。

E. 結論

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) Nakahara K, Ikeda T, Takamatsu K, Tawara N, Hara K, Enokida Y, Tanoue N, Narita S, Fujii A, Yamanouchi Y, Morinaga J, Yamashita S: A randomized phase 2 trial of antibiotic prophylaxis versus no intervention for muscle biopsy in department of neurology. *Acta Med. Okayama* 74(3): 261-264, 2020.
- 2) Shimazaki R, Uruha A, Kimura H, Nagaoka U, Kawazoe T, Yamashita S, Komori T, Miyamoto K, Matsubara S, Sugaya K, Nagao M, Isozaki E: Rimmed vacuoles in myositis associated with anti-mitochondrial antibody. *J. Clin. Neurol.* 16(3): 510-512, 2020.
- 3) Oyama M, Ohnuki Y, Inoue M, Uruha A, Yamashita S, Yutani S, Tanboon J, Nakahara J, Suzuki S, Shiina T, Nishino I, Suzuki S: HLA-DRB1 allele and autoantibody profiles in Japanese patients with inclusion body myositis. *PLoS One* 15(8): e0237890, 2020.
- 4) Hara K, Nozaki K, Matsuo Y, Tawara N, Yamashita S: Biological significance of target fibers in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 91(11): 1241-1242, 2020.
- 5) Amato AA, Hanna MG, Machado PM, Badrising UA, Chinoy H, Benveniste O, Karanam AK, Wu M, Tankó LB, Schubert-Tennigkeit AA, Papanicolaou DA, Lloyd TE, Needham M, Liang C, Reardon KA, de Visser M, Ascherman DP, Barohn RJ, Dimachkie MM, Miller JAL, Kissel JT, Oskarsson B, Joyce NC, den Bergh PV, Baets J, De Bleecker JL, Karam C, David WS, Mirabella M, Nations SP, Jung HH, Pegoraro E, Maggi L, Rodolico C, Filosto M, Shaibani AI, Sivakumar K, Goyal NA, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Suzuki N, Aoki M, Katsuno M, Morihata H, Murata K, Nodera H, Nishino I, Romano CD, Williams VSL, Vissing J, Auberson

- LZ, the RESILIENT Study Extension Group: Efficacy and safety of bimagrumab in sporadic inclusion body myositis: Long-term extension of RESILIENT. *Neurology* 96(12): e1595-e1607 2021.
- 6) Tawara N, Yamashita S, Takamatsu K, Yamasaki Y, Mukaino A, Nakane S, Farshadyeganeh P, Ohno K, Ando Y: Efficacy of salbutamol monotherapy in slow-channel congenital myasthenic syndrome caused by a novel mutation in CHRND. *Muscle Nerve* 63(4): E30-E32, 2021.
- 7) Yamashita S: Recent Progress in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *J Clin Med*. 10(7): 1375, 2021.
- 8) Tawara N, Yamashita S, Nagatoshi C, Nakajima M, Ichimura Y, Okiyama N, Ando Y: Anti-NXP2 antibody-positive dermatomyositis with aortic thrombus in normal aortic wall. *Rheumatology (Oxford)* 60(5): e159-e161, 2021.
- 9) 山下賢: 変性と炎症がクロストークする封入体筋炎の病態メカニズム. *難病と在宅ケア* 26: 43-46, 2020.
- 10) 山下賢: 指定難病最前線 封入体筋炎. *新薬と臨床* 69: 80-86, 2020.
- 11) 山下賢: 眼咽頭型筋ジストロフィーと患者レジストリの意義. *難病と在宅ケア* 26: 26-29, 2020.
- 12) 山下賢, 青木正志: 運動ニューロン疾患. *Clinical Neuroscience* 39: 91-94, 2021.
- 13) 山下賢: 一目でわかる筋病理～筋疾患を正しく診断するために～. *神経治療学* 37: in press, 2021.

2. 学会発表

- 1) Yamashita S, Hara K, Nozaki K, Matsuo Y, Tawara N: Target fibers in ALS are associated with selective autophagy-mediated clearance of denervated fibers. 31st International Symposium on ALS/MND, Virtual, Dec 9-11, 2020.
- 2) 山下賢: ALS に対する医療ケアの進歩と在宅診療 (招待講演). 第2回日本在宅医療連合学会大会, 名古屋 (オンライン講演), Jun 27, 2020.
- 3) Yamashita S, Mukaino A, Yamasaki Y, Hara K, Tawara N, Kakimoto A, Ueyama H: Clinical features of inclusion body myositis associated with Sjögren's syndrome. 第61回日本神経学会総会, 岡山 (口演), Aug 31-Sep 2, 2020.
- 4) Hara K, Yamashita S, Nozaki K, Matsuo Y, Tawara N: Clinicopathological investigation of target fiber in amyotrophic lateral sclerosis. 第61回日本神経学会総会, 岡山 (ポスター), Aug 31-Sep 2, 2020.
- 5) 向野晃弘, 山下賢, 山崎義宗, 竹内陽介, 俵望, 吉田遼司, 本田由美, 山下太郎, 柿本麻子, 上山秀嗣, 安東由喜雄, 植田光晴: シェーグレン症候群を合併した封入体筋炎における免疫治療有効性因子の臨床的探索 (ワークショップ). 第32回日本神経免疫学会学術集会, 金沢 (口演), Oct 1, 2020.
- 6) 山下賢, 俵望, 高松孝太郎, 山崎義宗, 向野

晃弘、中根俊成、大野欽司: 新規 CHRND 遺伝子変異を有するスローチャンネル症候群に対するサルブタモール単剤投与の有効性. 第 38 回日本神経治療学会学術集会, 東京(口演), Oct 29, 2020.

7) 大山宗徳、大貫優子、井上道雄、漆葉章典、山下賢、湯谷佐知子、Jantima Tanboon、中原仁、鈴木進悟、椎名隆、西野一三、鈴木重明: 第 38 回日本神経治療学会学術集会, 東京(口演), Oct 28-30, 2020.

8) 山下賢: 多系統蛋白質症から解き明かす神経筋変性疾患の多様性. 第 25 回日本難病看護学会・第 8 回日本難病医療ネットワーク学会

合同学術集会, web (教育講演), Nov 20-21, 2020.

9) 山下賢: 多系統蛋白質症における前頭側頭型認知症. 第 39 回日本認知症学会学術集会, 名古屋 web(シンポジウム), Nov 26-28, 2020.

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