

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム  
(疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 多系統タンパク質症に伴う封入体ミオパチーの病態解明と治療法の開発  
(英語) Elucidation of pathomechanism and development of therapeutic strategy for inclusion body myopathy in multisystem proteinopathy

研究開発実施期間: 令和 5 年 7 月 6 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 櫻井 英俊  
(英語) SAKURAI Hidetoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 京都大学・iPS 細胞研究所・准教授  
(英語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Associate Professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文:

多系統タンパク質症 (MSP) は中年期以降に緩徐に発症し、多彩な症状を呈する全身性の疾患である。封入体ミオパチー (90%以上)、骨パジェット病 (約 50%)、前頭側頭型認知症 (約 30%) などを発症し、約 15%においては筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病型を示す。封入体ミオパチーでは骨格筋に VCP やユビキチン、TDP-43 陽性の封入体が発見することが特徴で、病態との関連が注目されている。しかし VCP 変異によりどのような機序で病気が発症するかは不明であり治療法もない。本研究は、多系統タンパク質症 (MSP) に伴う封入体ミオパチー (IBM) の病態解明と治療法の開発を目的とし、疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析を実施した。特に、VCP 遺伝子変異が引き起こす細胞内タンパク質品質管理機構の異常に注目し、研究開発項目 1～3 と技術移転計画 1・2 を中心に取り組んだ。

研究開発項目 1: 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と分化誘導

封入体ミオパチー患者（VCP R191Q 変異）の末梢血単核球から、エピゾーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立。核型解析を含むバリデーションを行った上で、3 クローンを理研 BRC に寄託し、分担研究機関へ提供した。

筋分化については MyoD ベクターを導入し、90%以上の効率で筋管への分化を達成。また、骨格筋幹細胞（iMuSC）への分化誘導および CDH13 陽性細胞の FACS による純化も実施し、凍結ストックを分担機関に送付。これらの幹細胞からの筋管誘導は病態再現にも成功しており、本項目の目的は全て達成された。

#### 研究開発項目 2：ゲノム編集による Isogenic Control 細胞の作製

疾患特異的 iPS 細胞に HDR 法を用いたゲノム編集を行い、VCP 遺伝子の変異修復を実施。14 クローンのうち増殖性良好な 3 クローンを選別し、Isogenic Control 細胞として確立した。これらは骨格筋幹細胞作製にも使用された。

当初予定していた off-target 効果の解析は、ゲノム編集法に RNP を用いたことでリスクが低くなったため省略された。また、研究の重点を病態解明に移したことも理由である。

#### 研究開発項目 3：iPS 細胞を用いた病態研究

##### 3-1. オートファジー解析

飢餓刺激および阻害剤を用いたオートファジーフラックスの解析を LC3 を指標として実施した。この結果、分化前の iMuSC では VCP 変異細胞（R191Q）と isogenic control 細胞の間に明らかな差異はなかったが、分化誘導後の細胞では VCP 変異細胞においてオートファジーフラックスが亢進している傾向を認めた。一方、VCP 変異細胞（R191Q）では、ヒートショック（43℃）の際に時間とともに凝集タンパク質の細胞内への蓄積が認められた。VCP 変異細胞では、変性・凝集したタンパク質の除去機能が低下していると考えられた。

##### 3-2. RNA 結合タンパク質の局在変化

VCP ミオパチーの筋線維では RNA 結合タンパク質 TDP-43 が封入体内に認められる。そこで TDP-43 の細胞内局在を免疫染色法を用いて解析した。通常の培養条件では TDP-43 は主に核内に局在していたが、ストレス下では VCP 変異細胞において、①TDP-43 の核から細胞質へ局在が大きく変化し、②その発現レベルが低下することを明らかにした。加えて、RNA-seq により VCP 変異細胞で発現変動する遺伝子群を同定した。変異 VCP と相互作用する因子の同定に向け、Spot-Tag 付加 iPS 細胞も新たに作製した。

##### 3-3. ストレス顆粒形成と分解能

VCP 変異（R191Q）及び isogenic control 細胞から分化誘導した骨格筋細胞に、ヒートショックや亜ヒ酸塩を用いてストレス顆粒を形成させ、その形成や分解をストレス顆粒のマーカーである G3BP1 染色を用いて評価した。いずれのストレス誘導系でも、VCP 変異（R191Q）はストレス顆粒の分解を遅らせた。一方でストレス顆粒形成能に対する影響はなかった。

#### 技術移転計画 1：筋細胞誘導技術の移転

代表機関が開発したテトラサイクリン応答性 MyoD ベクターを分担機関に提供し、筋分化誘導技術を移転した。さらに、iPS 由来の骨格筋幹細胞を凍結保存して分担機関に提供し、成熟筋管誘導も実施された。これにより、病態再現に最適な分化誘導プロトコールの共有が実現した。

#### 技術移転計画 2：iPS 由来骨格筋幹細胞分化誘導技術の移転

分担機関にて、発生段階を模した分化プロトコールにより健常者および患者由来 iPS 細胞から骨格筋

幹細胞の誘導に成功した。FACS 機器の制約により純化は達成できなかったが、代替として Sphere 法を用いて筋細胞を得ることに成功した。ただし、純粋な幹細胞の供給には至らなかったため達成度は部分的であった。

#### 本研究の意義

VCP 変異による封入体ミオパチーの病態には不明な点が多いが、本共同研究により、VCP 変異はストレス顆粒の分解を遅延させ、またヒートショックなどのストレス下ではタンパク質の凝集体形成を促進することが明らかになった。病態メカニズム解明に向けた第一歩となる成果である。この成果は iPS 細胞の樹立や分化誘導法に豊富な経験のある研究者と疾患研究者が共同研究を実施することで初めて得られたものである。また、疾患特異的 iPS 細胞由来の骨格筋細胞は、タンパク質凝集体の分解系に着目した病態解明を行うのに優れた系であることも示された。更に本共同研究により、ゲノム編集による Isogenic Control 細胞作製も非常にスムーズに実施できた。実際の患者と同じ遺伝的バックグラウンドを持つ正常細胞は非常に有用な実験コントロールである。これまで用いられてきた患者筋生検サンプルからの初代筋芽細胞を用いた実験系では作製できないものであり、iPS 細胞を用いる優位性と考えられる。今回の共同研究の成果は、疾患研究者が患者由来 iPS 細胞を研究材料とすることの有用性を証明し、そのハードルを下げたといえる。

#### 英文：

Multisystem proteinopathy (MSP) is a systemic degenerative disorder with adult onset, presenting various clinical manifestations. It includes inclusion body myopathy (IBM) in over 90% of cases, Paget's disease of bone in ~50%, frontotemporal dementia (FTD) in ~30%, and ALS-like symptoms in ~15%. A hallmark of IBM is the presence of VCP-, ubiquitin-, and TDP-43-positive inclusions in skeletal muscle, yet the pathomechanism remains unclear and there is no effective treatment.

This study aimed to elucidate the disease mechanism of IBM associated with MSP and to develop therapeutic strategies using disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs). The research focused on the effects of VCP mutations on intracellular protein quality control, and included three research components and two technology transfer plans.

#### 【Research Item 1: Establishment and Differentiation of Disease-Specific iPSCs】

iPSCs were successfully established from a patient with a VCP R191Q mutation using an episomal vector. After karyotype validation, three clones were deposited at the RIKEN BRC and distributed to collaborators. Muscle differentiation using a MyoD vector achieved over 90% efficiency. Additionally, skeletal muscle stem cells (iMuSCs) were derived and purified via CDH13+ FACS sorting, cryopreserved, and used to successfully model disease phenotypes.

#### 【Research Item 2: Generation of Isogenic Control Cells via Genome Editing】

Using HDR-based CRISPR editing with RNP complexes, the VCP mutation was corrected in 14 clones, of which three with good proliferative capacity were selected and used for iMuSC generation. The planned off-target analysis was omitted due to the high specificity of the method and a strategic shift toward pathomechanistic analysis.

#### 【Research Item 3: Disease Modeling Using iPSCs】

Autophagy (3-1): Autophagic flux was elevated in differentiated VCP-mutant myotubes compared to controls. Under heat stress, these myotubes showed significant accumulation of protein aggregates, indicating impaired clearance mechanisms.

RNA-Binding Proteins (3-2): TDP-43 was mis-localized from the nucleus to the cytoplasm under stress in mutant myotubes, with reduced expression levels. RNA-seq revealed VCP mutation-dependent gene expression changes, and new iPSCs with C-terminal Spot-Tags were generated for interactome analysis.

Stress Granules (3-3): Mutant myotubes displayed delayed degradation (but not formation) of stress granules induced by heat shock or arsenite, suggesting a mechanistic link to disease pathology.

**【Technology Transfer Plan 1: Muscle Cell Induction】**

The doxycycline-inducible MyoD vector developed by Kyoto university was successfully transferred to Teikyo university, enabling efficient myotube induction. Cryopreserved iMuSCs were also provided and used for disease modeling, validating their utility.

**【Technology Transfer Plan 2: iMuSC Differentiation Protocol】**

Muscle stem cells were induced from both healthy and patient-derived iPSCs using a developmentally inspired protocol. Although FACS-based purification was limited by equipment access, sphere culture methods allowed the collection of differentiated muscle cells, achieving partial success.

This study revealed that VCP mutations impair stress granule clearance and promote protein aggregation under stress, offering new insights into IBM pathology. The collaborative approach using disease-specific iPSCs and genome-edited controls demonstrated the power and feasibility of iPSC-based disease modeling, particularly for rare neuromuscular disorders.