

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05352

研究課題名(和文) ヒト神経筋接合部のin vitro構築とその応用

研究課題名(英文) Development and application of human neuromuscular junctions

研究代表者

齋藤 潤 (Saito, Megumu)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：90535486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、本研究において、多能性幹細胞から運動神経、骨格筋、シュワン細胞を同時に誘導し、機能的・形態的に神経筋接合部を構築する系を構築した。(Lin CY, JCI insight 2019, 特許出願中)。また脊髄性筋萎縮症をプロトタイプとして、この系でNMJ病変のモデル構築と解析が可能であることを示した。今後は、この独自の系を用いて、特異的治療法が存在しない先天性筋無力症候群や、疾患原因分子の機能解析が十分進んでいない脊髄性筋萎縮症の解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した分化系は機能的なNMJを誘導することができ、形態的あるいは細胞生物学的にNMJの発達を模倣することができることから、疾患モデリングに非常に有用であると考えられる。近年、神経筋疾患の多くが神経筋接合部の異常を伴うことが見いだされつつある。今回の成果は、従来は不可能であったヒトNMJ疾患の病態解析をin vitroでヒトの細胞を用い研究を可能にし、これらの疾患の病態解明や治療法開発に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we constructed a pluripotent-cell based system that simultaneously induces neuromuscular junctions (NMJs) which contain motor neurons, skeletal muscle, and Schwann cells (Lin CY, JCI insight 2019, patent pending). We also showed that spinal muscular atrophy can be used as a prototype for model construction and analysis of NMJ lesions in this system. In the future, we plan to use this unique system to analyze congenital myasthenic syndrome for which no specific treatment exists and spinal muscular atrophy for which the functional analysis of the disease-causing molecule has not been sufficiently advanced.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：多能性幹細胞 神経筋接合部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部(Neuromuscular junction:NMJ)は運動神経終末と筋肉の接合部であり、シナプスが形成されている。NMJでは神経終末からアセチルコリンが放出され、筋収縮が引き起こされる。NMJ構成分子の異常は様々な疾患を引き起こすが、ヒトにおける解析手法は *in vivo* の電気生理学的解析や病理学的解析に限られている。ヒトNMJ(hNMJ)の細胞生物学的な機能解析のためには、*in vitro* でNMJを構築させる系が必要である。我々は、ヒト多能性幹細胞を運動ニューロンへ分化誘導した後に、マウス筋細胞株と共培養することにより、*in vitro* でNMJを形成させることに成功した。代表的な先天性神経筋疾患である脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy: SMA)患者さんよりiPS細胞を樹立し、同様の検討を行うと、NMJ形成能が著しく低下することを発見し、これが細胞死に先行すること、アンチセンスオリゴなどの治療により改善することを示した(Yoshida, Stem Cell Reports, 2015)。この研究では、脊髄性筋萎縮症が運動ニューロン疾患というよりはむしろNMJ疾患であることを示すとともに、*in vitro* でのNMJを標的とした治療薬探索のプラットフォームを提供することに成功した。しかし、hNMJ疾患の病院には、神経側・神経側それぞれの要因があり、病態生理が不明のものや、孤発例で原因そのものが不明のものもある。これらの疾患の詳細な病態解析のためには、ヒト-マウスのハイブリッド系でなく、ヒト運動ニューロンとヒト骨格筋細胞からhNMJを構築する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞より機能的なhNMJを構築し、これを疾患解析・創薬へ応用することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト多能性幹細胞より機能的なhNMJを構築・評価する、hNMJを用いた疾患モデリングと病態解析を実施するの2項目を実施する。

ヒト多能性幹細胞の機能的なhNMJ構築と評価

ヒトiPS細胞由来運動ニューロンと骨格筋細胞を誘導し、hNMJを構築する系を確立する。培養条件等を検討し、hNMJ形成能が安定して高効率となる条件を確定する。hNMJ形成は α BTXによるアセチルコリン受容体(AChR)クラスターリングの染色によって評価し、必要に応じてAChRの免疫染色を併用する。また、NMJの成熟状態の評価として、透過電顕による微細構造の評価を実施する。機能評価として、系の性質上電気生理学的な評価が困難であるため、Caイメージングによる筋肉の活動の評価、筋収縮の程度の評価を実施し、これらの活動がNMJのシナプス遮断によって抑制されるかどうかを確認する。また、筋収縮能については、ソニー(株)との共同研究により、筋収縮能を画像解析から評価する系を構築しておりこれを用いる。

hNMJを用いた疾患モデリングと病態解析

SMAをモデルとし、hNMJを構築させ、上記の機能評価を行って疾患モデリングが可能かを検討する。

4. 研究成果

ヒト多能性幹細胞にMYOD1遺伝子を強制発現させて骨格筋細胞を誘導する分化系を改変し、細胞培養の条件を神経細胞・筋細胞の双方に適合させることにより、hNMJを簡便に誘導することに成功した(Lin, JCI insight 2019; 特許出願中)。この分化系では、

従来のように、複数の細胞を混合したり、細胞を選別したりすることなく、培養を続けるだけで hNMJ を作ることが出来る。hNMJ は分化誘導開始 20 日ごろから出現し始め、当初は胎児型の NMJ だが、次第に成熟し成人型へと切り替わり、100 日以上維持することが出来る。完成した NMJ は、ヒトの生体内のものと類似した形態を示す(図 1)。

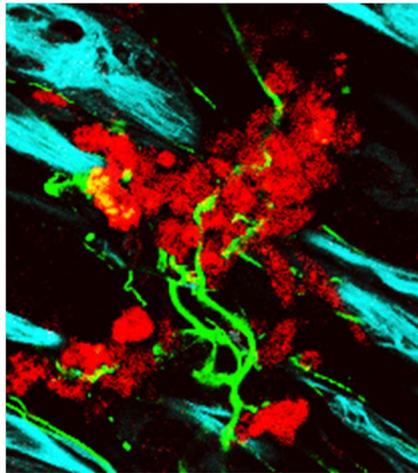


図 1 : hNMJ の免疫染色像 (培養開始 60 日後)
赤 : NMJ、水色 : 筋肉細胞、緑 : 神経細胞

また、電子顕微鏡で詳細に形態を観察すると、生体内の NMJ と同様に、神経細胞の末端と筋肉細胞の結合部を Schwann 細胞が覆っており、NMJ 周辺にミトコンドリアが集まっている様子が観察できた(図 2)。

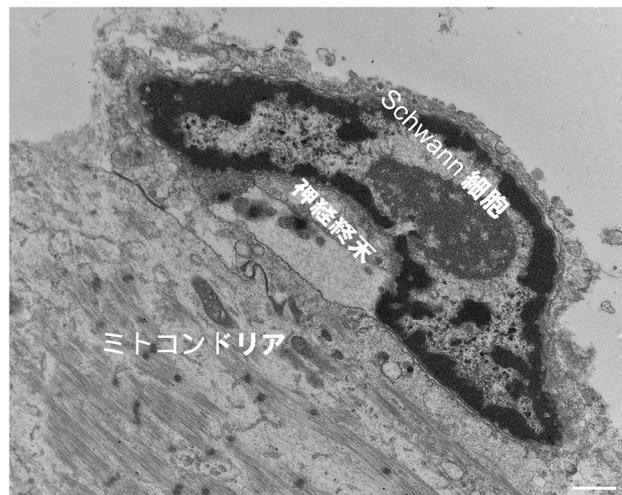


図 2 : hNMJ の走査電子顕微鏡像

作製した hNMJ が神経細胞からの興奮伝達を行っているかを調べるため、Synapsin プロモーター下に光受容イオンチャネルを発現するベクターを構築し、iPS 細胞に導入して hNMJ を形成させた。実際に青色レーザーを当てると、筋肉の収縮が確認でき、筋収縮は NMJ の機能を阻害する薬剤である Curare を添加することにより、完全に抑制された。これらの結果から、今回作製した hNMJ は in vitro で機能を発揮し、神経細胞の興奮を筋肉に伝えることができることが判明した。

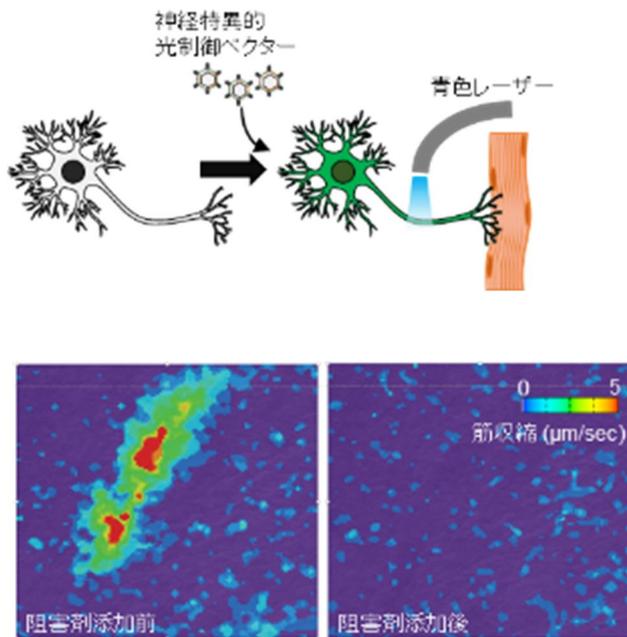


図3：(上) 神経細胞の刺激システム。

(下) 筋肉細胞の収縮の記録。緑や赤の部分が刺激で動いている部分。NMJの機能を阻害すると(右) 筋収縮が起こらなくなる。

最後に、作製したhNMJを用いて、SMAのモデルを構築した。SMAはSMN遺伝子の欠損によって発症する疾患で乳児期の先天異常による死亡の第一位を占める重要な疾患である。患者さんは運動神経とNMJの機能不全により筋肉の萎縮を起こし、重症例では呼吸不全で死亡する。

健常人のiPS細胞からSMN遺伝子をノックダウンしたiPS細胞(SMN^{KD}細胞)を作製し、この細胞からhNMJを作製すると、NMJの数が正常対照に比べて減少していた。また、SMN^{KD}細胞では、神経細胞依存性の筋収縮が確認されず、NMJの機能も著しく低下していた。以上より、SMA患者さんでは、神経筋接合部の異常が疾患発症にかかわっていることが示唆された。

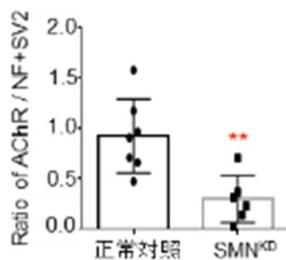


図4：SMNの機能を抑制した細胞(SMN^{KD})ではNMJの形成能が低下する。

本研究では、ヒトiPS細胞を用い、hNMJを簡便に誘導する分化系を構築することに成功した。作製したhNMJは形態的、機能的に生体内のものに類似した複雑な構造を形

成し、in vitro で成熟させることが出来る。近年、SMA や筋萎縮性側索硬化症などの神経筋疾患において NMJ 病変が早期に現れることが注目されており、本システムはこれらの疾患の病態解明や治療法開発に有用である。また、in vitro hNMJ の構築により、hNMJ の形成過程の解明などの生物学的な研究にも貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suga Mika, Kondo Takayuki, Imamura Keiko, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Sagara Yukako, Tsukita Kayoko, Enami Takako, Furujo Mahoko, Saijo Kaoru, Nakamura Yukio, Osawa Mitsujiro, Saito Megumu K., Yamanaka Shinya, Inoue Haruhisa	4. 巻 36
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi001-A, derived from a patient with mucopolysaccharidosis type I	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101406 ~ 101406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichisima Jose, Suzuki Naoya M., Samata Bumpei, Awaya Tomonari, Takahashi Jun, Hagiwara Masatoshi, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Verification and rectification of cell type-specific splicing of a Seckel syndrome-associated ATR mutation using iPS cell model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 445 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0574-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Karagiannis Peter, Yamanaka Shinya, Saito Megumu K.	4. 巻 71
2. 論文標題 Application of induced pluripotent stem cells to primary immunodeficiency diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 43 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2019.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Megumu K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Disease modeling of immunological disorders using induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 68 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13497413.2018.1481583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Boisson B, Honda Y, Ajiro M, Bustamante J, Bendavid M, Gennery AR, Kawasaki Y, Ichishima J, Osawa M, Nihira H, Shiba T, Tanaka T, Chrabieh M, Bigio B, Hur H, Itan Y, Liang Y, Okada S, Izawa K, Nishikomori R, Ohara O, Heike T, Abel L, Puel A, Saito MK (co-last author), Casanova JL, Hagiwara M, Yasumi T.	4. 巻 129
2. 論文標題 Rescue of recurrent deep intronic mutation underlying cell type-dependent quantitative NEMO deficiency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 583 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI124011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Karagiannis Peter, Takahashi Kazutoshi, Saito Megumu, Yoshida Yoshinori, Okita Keisuke, Watanabe Akira, Inoue Haruhisa, Yamashita Jun K., Todani Masaya, Nakagawa Masato, Osawa Mitsujiro, Yashiro Yoshimi, Yamanaka Shinya, Osafune Kenji	4. 巻 99
2. 論文標題 Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reviews	6. 最初と最後の頁 79 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physrev.00039.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kirino Kosuke, Nakahata Tatsutoshi, Taguchi Tomoaki, Saito Megumu K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Efficient derivation of sympathetic neurons from human pluripotent stem cells with a defined condition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31256-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 齋藤潤
2. 発表標題 iPS 細胞を用いた病態解析と創薬
3. 学会等名 第45回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤潤
2. 発表標題 iPS細胞を使って 病気の仕組みを知る
3. 学会等名 摂南大学薬学部公開講座（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤潤
2. 発表標題 iPS 細胞の医学応用へ向けた研究の現状について
3. 学会等名 京都私立病院協会講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤潤
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞樹立のための 基盤形成事業について
3. 学会等名 東京女子医科大学公開シンポジウム「自閉症・発達障害の成因解明と将来の治療に向けて」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Megumu K. Saito
2. 発表標題 PRULIPOTENT STEM CELL DERIVED MYELOID CELL LINES FOR DISSECTING THE MECHANISM OF AUTOINFLAMMATION.
3. 学会等名 ISSAID2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Megumu K. Saito
2. 発表標題 Disease Modeling of Pediatric Diseases with iPSCs
3. 学会等名 The 4th TMU International Symposium for Cell Therapy and Regenerative Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤潤
2. 発表標題 疾患iPS細胞の病態解析と創薬への応用について
3. 学会等名 再生医療JAPAN
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤潤
2. 発表標題 iPS細胞を用いた小児疾患の解析について
3. 学会等名 産学情報交流会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 多能性幹細胞から人工神経筋接合部を得る方法	発明者 齋藤潤/吉田路子/林 壮宇	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-201364	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 神経堤細胞および交感神経細胞の製造方法	発明者 中畑龍俊/齋藤潤/桐 野浩輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-088926	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉田 路子 (Yoshida Michiko) (70754571)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	