

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：83712

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08360

研究課題名（和文）多数の患者iPS細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の薬剤応答性の個人差の解明

研究課題名（英文）Elucidation of individual variation of the responsiveness to therapy for spinal muscular atrophy using a large number of disease-specific iPS cells

研究代表者

船戸 道德（Funato, Michinori）

独立行政法人国立病院機構長良医療センター（臨床研究部）・長良医療センター臨床研究部・再生医療研究室長 / 療養診療部長

研究者番号：30420350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄性筋萎縮症（SMA）は、現在までのところ有効な治療法の開発までには至っていない。本研究では、遺伝的背景の異なる多数のSMA患者の疾患特異的iPS細胞由来の神経細胞を用いて複数の試験管内疾患モデルを構築し、SMAの標準的な治療法を開発することを目的とする。現在までに、遺伝的背景の異なる計19名のSMA患者から線維芽細胞を作製し、さらには患者iPS細胞の樹立を行った。また、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン類似薬（TRH）、フリーラジカルスカベンジャー（エダラボン）、ドコサヘキサエン酸、 $\alpha$ -セクレターゼ阻害剤、ルフィナミドなどの治療効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMAは難治性の希少疾患ではあるが、背景にひそむ病態は多種多様である。本研究によって、薬剤の応答性の個人差が解明されれば、希少疾患におけるテーラーメイド医療へのさらなる道筋を提示することになる。

研究成果の概要（英文）：Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by the degeneration of spinal motor neurons. This disease is caused by the deletion of the survival motor neuron protein. Currently, there are no curative agents for SMA, although some research groups have developed treatments based on the molecular pathophysiology of this disease. Our purpose in this study is to establish a number of human SMA with different genetic background-derived induced pluripotent stem cells (SMA-iPSCs) disease model and develop a standard treatment for SMA. Before now, we established SMA-iPSCs disease models derived from 19 SMA patients with different genetic background. In addition, we confirmed the therapeutic efficiency of thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog, a free radical scavenger (edaravone), a docosahexaenoic acid,  $\alpha$ -secretase inhibitor, and rufinamide.

研究分野：小児神経学、再生医療学

キーワード：疾患モデル iPS細胞 薬剤反応性 治療薬開発

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA) は、脊髄の運動神経細胞 (脊髄前角細胞) の変性による筋萎縮と進行性の筋力低下を主徴とする常染色体劣性遺伝病であり、難病の患者に対する医療等に関する法律に規定される指定難病の一つである [1]。主たる原因は *SMN1* (survival motor neuron 1) 遺伝子と *SMN2* 遺伝子によってコードされる SMN 蛋白質の減少にある。*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子はともに第 5 染色体長腕に位置し、*SMN1* 遺伝子は完全長 SMN 蛋白質を、*SMN2* 遺伝子はエクソン 7 と 8 に座位する 5 塩基の違いによって大部分がエクソン 7 を欠く不安定な短縮型 SMN 蛋白質を合成する。約 95% の患者ではこの *SMN1* 遺伝子が欠失し、*SMN2* 遺伝子のみによる不安定な短縮型 SMN 蛋白質と少量の完全長 SMN 蛋白質しか合成出来ないことで発症する [1]。

SMA の治療手段として、これまでに多くの研究グループが、*SMN2* 遺伝子の転写活性やスプライシングの調節、SMN 蛋白質の安定化、欠失する *SMN1* 遺伝子の導入、神経保護などの方法を開発してきたが、現在までのところ、全ての患者に確実に有効な治療法の開発までには至っていない [1]。現在、我が国で保険収載されている治療薬としては、アンチセンス核酸医薬品であるヌシネルセン (スピンラザ®)、遺伝子治療薬であるオナセムノゲンアベパルボベク (ゾルゲンスマ®)、経口治療薬であるリスジプラム (エプリスディ®ドライシロップ) の 3 つがある。ヌシネルセンとリスジプラムは内因性 *SMN2* 遺伝子のスプライシング修飾剤であり、オナセムノゲンアベパルボベクはアデノ随伴ウイルスベクターを用いた外因性の *SMN1* 遺伝子補充治療薬である [2]。いずれも理論的には優れた治療薬であるが、進行した段階の患者においてはその治療効果が限定的であったり、患者間で治療効果にばらつきがあったりと課題も多い [2]。

疾患特異的人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) を用いた研究は、その問題点を解決する一つのツールと考えられている。これまでの患者の線維芽細胞や動物モデルを用いた研究では、種差や個体差、細胞株の違い等による薬物代謝・動態関連分子や薬物標的分子の相違並びにそれらの発現に影響する環境要因などを詳細に解析することが困難であった。このため、患者疾患特異的 iPS 細胞を用いた医薬品の開発や薬物動態の解明には大きな期待が寄せられており、実際、これまでに SMA においても、バルプロ酸ナトリウムや N-アセチルシステインなどの治療薬が実際に解析可能であることや細胞株間で薬剤の応答性に違いがあること等が報告されている。しかしながら、これまでに薬剤応答性の個人差の解明を目指して、多数の患者 iPS 細胞を用いて薬剤の有効性を統計学的に解析した報告はない。

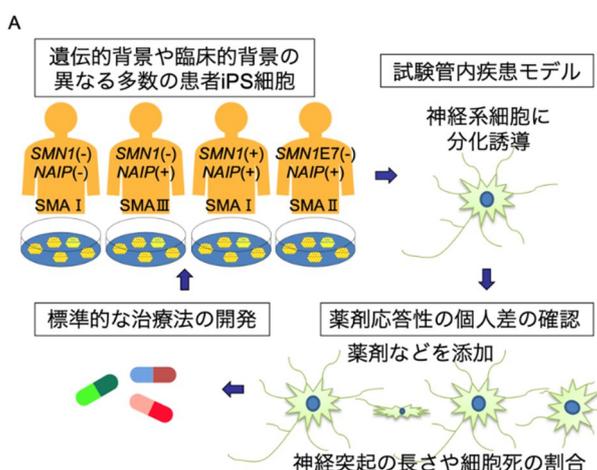
本研究は、iPS 細胞技術を用いた疾患の治療制御事例に繋がる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺伝的背景や臨床的背景の異なる多数の SMA 患者の iPS 細胞由来の神経細胞を用いて、複数の試験管内疾患モデルを構築し、薬剤応答性の個人差の要因を解明することなどによって、SMA の標準的な治療法を開発することが目的である。最終的には SMA モデルマウスを用いて非臨床試験を行い、医師主導治験に繋げることを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、SMA に対して確実に効果のある治療法を開発を目指して、まずは患者 iPS 細胞を用いた SMA の試験管内疾患モデルを構築し、SMA の病態や薬剤の有効性を検証する。次に、遺伝的背景の異なる多数の患者 iPS 細胞から複数の試験管内疾患モデルを構築する。このモデルを用いて、既報の開発候補薬剤や独自に開発中の薬剤等を添加することによって薬剤応答性の個人差を確認する。その後、その薬剤応答性の個人差の要因の解明や各種薬剤の添加条件を検討することなどによって、SMA に対する汎用性の高い治療法を確立する。研究計画を図 A に示す。



### 4. 研究成果

SMA の患者からエピゾーマルベクターによる初期化誘導 6 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-

*MYC*, *LIN28*, *p53shRNA*) の遺伝子導入にて患者 iPS 細胞を樹立した (図 B)。既報の無血清凝集浮遊培養法による分化誘導法を改良し、SMA 患者 iPS 細胞由来の脊髄運動神経細胞及び星状膠細胞を試験管内で作製した。

正常コントロールの iPS 細胞として 201B7 株[3]を用いて比較検討したところ、患者 iPS 細胞由来の神経系細胞において、(1)SMN 蛋白質の減少、(2)運動神経突起の伸長の低下、(3)星状膠細胞数の増加、(4)脊髄運動神経細胞の細胞死の増加、(5)脊髄運動神経細胞数の減少が認められ、試験管内で SMA の病態が模倣出来ることを確認した (図 C)。

構築した SMA の試験管内疾患モデルの有用性を確認する目的で、申請者らが臨床試験等で開発を進めてきた甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン類似薬 (Tyrotropin-releasing hormone analog, TRH) の薬効評価を行ったところ、TRH が患者 iPS 細胞由来の運動神経細胞の完全長の SMN 蛋白質を増加するだけでなく、神経突起の伸長にも寄与することを見出した (図 D)。

TRH の完全長 SMN 蛋白質の上昇メカニズムは *SMN2* 遺伝子の転写活性の上昇と GSK-3 のリン酸化による SMN 蛋白質の安定化が寄与していることを多方面からの解析で見出した。

試験管内への TRH 添加では効果を示さなかった脊髄運動神経細胞の細胞死の抑制についても、フリーラジカルスカベンジャー (エダラボン) に着目して薬効評価を行ったところ、同薬剤に脊髄運動神経細胞の細胞死の抑制作用があることを確認した (図 E)。

エダラボンの細胞死の抑制効果は、エダラボンがミトコンドリア内の酸化ストレスを抑制していることを見出した (図 F)。さらに、エダラボンは、酸化ストレスの抑制を介して核内の SMN 蛋白質を増加させ、神経保護作用や神経突起の伸長作用を有することも見出した。

臨床現場で抗てんかん薬として用いられているレベチラセタムについても SMA の試験管内疾患モデルを用いて解析を行ったところ、核内の SMN 蛋白質は増加させないものの、レベチラセタムはミトコンドリア機能の回復を介して神経保護作用や神経突起の伸長作用を有することも見出した。

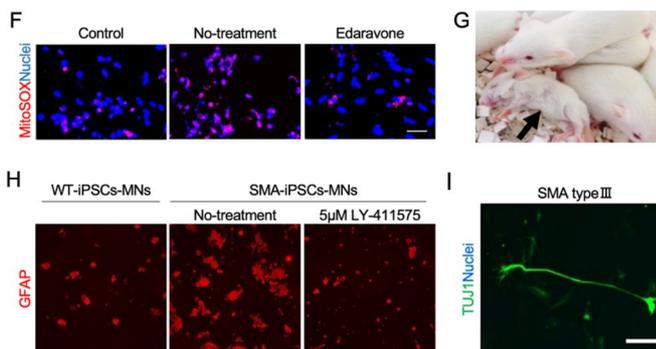
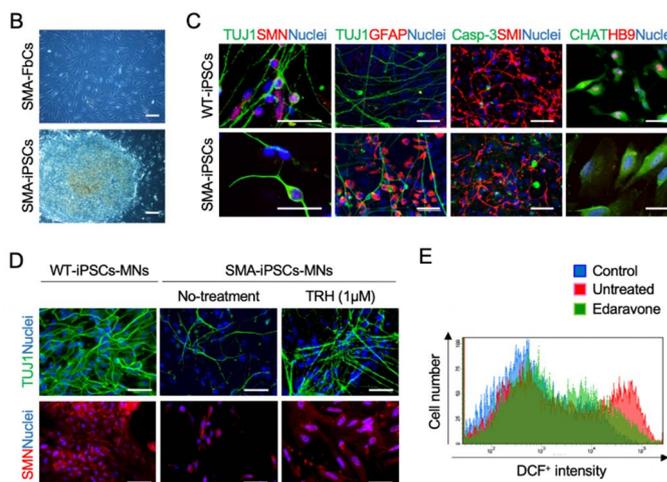
SMA モデルマウス (*mSnn*<sup>-/-</sup>, *SMN2*<sup>+/+</sup>, *SMN*<sup>7</sup><sup>+/+</sup>) (図 G) を用いて、酸化ストレスの抑制作用により強い神経保護作用を有する新規ドコサヘキサエン酸誘導体について、その薬効を評価したところ、同薬剤によって SMA モデルマウスの運動機能が改善することを確認した。

SMA 病態の一つである星状膠細胞の増加についても SMA の試験管内疾患モデルや SMA モデルマウスを用いて検討を行った。結果、星状膠細胞は脊髄中心管周囲に増加していることが見出され、この星状膠細胞の増加・局在は  $\alpha$ -セクレターゼ阻害剤により改善され、さらに  $\alpha$ -セクレターゼ阻害剤が SMA モデルマウスの運動機能の改善に繋がることを世界で初めて見出した (図 H)。

同様に、SMA 病態における希突起膠細胞の役割についてもこれまで不明のままであったが、希突起膠細胞の分化・増殖が SMA 病態で障害され、 $\alpha$ -セクレターゼ阻害剤によりその病態が回復することをこれも世界で初めて見出した。

薬剤応答性の個人差の要因等を解明するために、遺伝的背景や臨床的背景の異なる計 19 名

の SMA 患者から線維芽細胞及び iPS 細胞の樹立を行った。臨床病期分類は、0 型 0 名、 型 5 名、 型 9 名、 型 5 名、 型 0 名で、遺伝学的には *SMN* 遺伝子のエクソン 7,8 の欠失及び *NAIP* 遺伝子のエクソン 5,6 の欠失 3 名、*SMN* 遺伝子のエクソン 7,8 のみの欠失 12 名、



*SMN* 遺伝子のエクソン 7 のみの欠失 2 名、*SMN* 遺伝子のエクソン 7,8 及び *NAIP* 遺伝子のエクソン 5,6 とともに欠失なし 2 名である。

I 型 3 名と III 型 2 名の線維芽細胞にルフィナミドを添加したところ、ルフィナミドが I 型の患者の *SMN* 遺伝子を上昇させることを確認した。また、ルフィナミドは、I 型の患者 iPS 細胞由来の運動神経細胞の神経突起を伸長させることも確認した (図 1)。

遺伝的背景や臨床的背景の異なる計 19 名の SMA 患者の線維芽細胞を用いて、各種抗てんかん薬の完全長 *SMN* 遺伝子の転写活性を網羅的に調べたところ、ルフィナミドが I 型や III 型の患者の *SMN* 遺伝子を上昇させることを見出した。

#### <引用文献>

1. Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI et al. Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials. *Ann Hum Genet* 2013 77:435-463.
2. Messina S, Sframeli M. New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges. *J Clin Med*. 2020 9:2222.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 126:663-76.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ando S, Sato A, Funato M, Ohuchi K, Inagaki S, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H.	4. 巻 10
2. 論文標題 The effects of rufinamide on in vitro spinal muscular atrophy model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacology & Pharmacy.	6. 最初と最後の頁 159-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ohuchi K, Funato M, Ando S, Inagaki S, Sato A, Kawase C, Seki J, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H.	4. 巻 30
2. 論文標題 Impairment of Oligodendrocyte Lineages in Spinal Muscular Atrophy Model Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroreport.	6. 最初と最後の頁 350-357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001206.	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 Ando S, Funato M, Ohuchi K, Inagaki S, Sato A, Seki J, Kawase C, Saito T, Nishio H, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H.	4. 巻 44
2. 論文標題 The Protective Effects of Levetiracetam on a Human iPSCs-Derived Spinal Muscular Atrophy Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Res.	6. 最初と最後の頁 1773-1779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-019-02814-4.	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 Ohuchi K, Funato M, Yoshino Y, Ando S, Inagaki S, Sato A, Kawase C, Seki J, Saito T, Nishio H, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Notch Signaling Mediates Astrocyte Abnormality in Spinal Muscular Atrophy Model Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39788-w.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 船戸道徳.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 pp.61-64.
3. 書名 多数の患者 iPS 細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の薬剤応答性の個人差の解明に向けて.	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------