

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03586

研究課題名（和文）ALS共通病態としての軸索変性と軸索再生：細胞種選択的な治療法開発

研究課題名（英文）Axonal degeneration and regeneration as common cell type-selective therapeutic targets in ALS

研究代表者

青木 正志（Aoki, Masashi）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70302148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,600,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）関連変異TDP-43遺伝子を有する患者由来の人工多能性幹（iPS）細胞株より運動ニューロンを分化誘導し、健康成人対照と比較して軸索長が有意に短く、その軸索でPHOX2B遺伝子発現の低下を網羅的RNA解析と生物情報学により見出した。ゼブラフィッシュにおいてphox2b遺伝子をノックダウンすると神経突起長の減少と運動機能の低下がもたらされた。さらにiPS細胞から感覚および自律神経細胞へと分化誘導するプロトコルを改良した結果、マイクロ流体デバイス上で異なる細胞種の軸索分画を得ることができ、網羅的RNA解析による治療標的分子の探索が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ALS関連変異TDP-43患者由来iPS細胞から脊髄運動神経細胞に分化誘導することで、軸索におけるPHOX2B遺伝子発現の低下を初めて見出した。さらにゼブラフィッシュにおいてphox2b遺伝子をノックダウンすることで神経突起長の減少と運動機能の低下といった表現型を再現することができた。さらに、異なる種類の神経細胞の軸索で発現する遺伝子を網羅的に比較解析することが可能となった。このようなヒトALS由来細胞モデルを活用し、PHOX2B関連因子および下流因子を同定することで、細胞種選択的な軸索変性と軸索伸長不全のメカニズムを解明し、ALS治療標的分子を発見することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) harboring familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutant TARDBP were differentiated into motor neurons. The neurite length of the TARDBP mutant motor neurons (MNs) were significantly shorter than that of healthy control. In transcriptome analysis of the axonal compartment of motor neurons, PHOX2B showed lower expression in the TARDBP mutant axons in comparison with healthy control subjects. In addition, phox2b knockdown in zebrafish resulted in short spinal axons and impaired motor function. Furthermore, we improved previously reported protocols for the differentiation from iPSCs into sensory and noradrenergic neurons, which enabled to measure the neurite length or separate the axons using microfluidic devices. The bioinformatic analysis of RNA-sequencing to identify small molecule candidates is now in progress.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 運動ニューロン 軸索変性 軸索再生 オミックス

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は運動野を主とした大脳皮質、脳幹の運動神経核、そして脊髄の前角細胞にほぼ選択的な成人発症の神経変性疾患である。国内約1万人の患者数は高齢化にともない増加している。本症では骨格筋の萎縮と筋力低下が全身に拡がり、発症から数年で呼吸筋麻痺にいたるが、進行を防止する治療法は未確立である。

ALS 全体の約10%で家族性発症があり、日本人家族性 ALS では2番目・3番目に変異頻度の高い *FUS* および *TARDBP*<sup>1</sup> は DNA / RNA 結合蛋白をコードし、病理学的に細胞質内異常凝集と核からの脱失という病理学的な共通点がある。さらに、孤発性 ALS においても同様に TDP-43 蛋白の局在異常が共通してみられるほか、RNA 結合蛋白をコードする ALS 原因遺伝子が続々と発見されていることから、ALS 共通の分子病態として RNA 代謝異常が有力視されている。

ALS 患者および ALS マウスモデルでは早期から軸索変性が生じることが従来から複数の報告されており、申請者らも ALS 患者由来人工多能性幹細胞 (iPSC) から運動ニューロンモデルを確立し軸索形態異常を報告してきた<sup>2</sup>。しかし、これらの軸索形態異常が真に成人発症の ALS 神経変性につながるか、投射先とシナプス形成していない環境下での表現型が神経変性につながるかは不明である。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと本研究では、ALS 軸索の変性病態を解明することを目的とし、軸索再生不全に注目し、ALS 患者由来 iPSC から分化誘導した複数の細胞種、複数の ALS 関連遺伝子変異の比較解析を主体とし、これらの知見を動物モデルで検証することで確度の高い治療標的の発見をめざした。

## 3. 研究の方法

既存の *FUS* 変異 ALS-iPS 細胞株に加えて、*TARDBP* 変異、*HNRNPA1* 変異、*SOD1* 変異ヒト iPSC 細胞株、健常者由来 iPSC 細胞株を準備した。これらの iPSC を脊髄運動神経細胞と同様に長大な軸索を有する感覚神経細胞、自律神経細胞に分化誘導し、マイクロ流体デバイスを用いた培養系で軸索分画と細胞体分画および異なる細胞種間で RNA シークエンス比較解析を行った。

## 4. 研究成果

ALS 関連変異 *FUS* 遺伝子を有する患者、および変異 *TARDBP* 遺伝子を有する患者由来の iPSC 細

胞株より運動ニューロンを分化誘導し、とくに後者では健康成人対照由来の運動ニューロンと比較して軸索長が有意に短く、その軸索では *PHOX2B* 遺伝子発現が低下していることを RNA シークエンスとバイオインフォマティクスにより見出した<sup>3</sup>。さらにゼブラフィッシュにおいて *PHOX2B* 遺伝子をノックダウンすると神経突起長の減少と運動機能の低下がもたらされた。同時に iPSC から感覚神経細胞および自律神経細胞に分化誘導するプロトコルを改良し、マイクロ流体デバイス内で軸索の伸長を捉えることができた。これらにより、軸索分画と細胞体・樹状突起分画間に分取し、トランスクリプトーム比較解析が可能になった。現在、バイオインフォマティクスにより *PHOX2B* 遺伝子と相互作用し、軸索変性病態に関連する候補分子の絞り込みを行っている。

本研究成果をふまえ、変異 *TARDBP* 遺伝子による ALS 軸索変性の病態解明のみならず、複数の ALS 遺伝子変異の比較解析を行うことで、ALS に共通の軸索変性メカニズムの解明と治療標的分子の発見をめざす。

#### <引用文献>

1. Nishiyama A, et al. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 53, 2017, 194.e1-194.e8.
2. Akiyama T, et al. Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. *EBioMedicine* 45, 2019, 362-378.
3. Mitsuzawa S, et al. Reduced *PHOX2B* stability causes axonal growth impairment in motor neuron with *TARDBP* mutations. *Stem Cell Reports* 16, 2021, 1527-1541.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Inoue-Shibui A, Niihori T, Kobayashi M, Suzuki N, Izumi R, Warita H, Hara K, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Nishino I, Aoki M, Aoki Y.	4. 巻 66(10)
2. 論文標題 Inoue-Shibui A, Niihori T, Kobayashi M, Suzuki N, Izumi R, Warita H, Hara K, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Nishino I, Aoki M, Aoki Y. A novel deletion in the C-terminal region of HSPB8 in a family with rimmed vacuolar myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 965-972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-021-00916-y	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 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shirota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Osana S, Nakagawa T, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M.	4. 巻 16(6)
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 1527-1541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.04.021	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 Nakajima T, Sankai Y, Takata S, Kobayashi Y, Ando Y, Nakagawa M, Saito T, Saito K, Ishida C, Tamaoka A, Saotome T, Ikai T, Endo H, Ishii K, Morita M, Maeno T, Komai K, Ikeda T, Ishikawa Y, Maeshima S, Aoki M, Ito M, Mima T, Miura T, Matsuda J, Kawaguchi Y, Hayashi T, Shingu M, Kawamoto H.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Cybernic treatment with wearable cyborg Hybrid Assistive Limb (HAL) improves ambulatory function in patients with slowly progressive rare neuromuscular diseases: a multicentre, randomised, controlled crossover trial for efficacy and safety (NCY-3001).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis.	6. 最初と最後の頁 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-021-01928-9	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 Nogami M, Ishikawa M, Doi A, Sano O, Sone T, Akiyama T, Aoki M, Nakanishi A, Ogi K, Yano M, Okano H.	4. 巻 155
2. 論文標題 Identification of hub molecules of FUS-ALS by Bayesian gene regulatory network analysis of iPSC model: iBRN.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis.	6. 最初と最後の頁 105364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105364	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 Li Y, Chen W, Ogawa K, Koide M, Takahashi T, Hagiwara Y, Itoi E, Aizawa T, Tsuchiya M, Izumi R, Suzuki N, Aoki M, Kanzaki M.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Feeder-supported in vitro exercise model using human satellite cells from patients with sporadic inclusion body myositis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05029-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 -

1. 著者名 Soga T, Suzuki N, Kato K, Kawamoto-Hirano A, Kawauchi Y, Izumi R, Toyoshima M, Mitsuzawa S, Shijo T, Ikeda K, Warita H, Katori Y, Aoki M,	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Long-term outcomes after surgery to prevent aspiration for patients with amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurol.	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-022-02619-z	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 Aizawa H, Kato H, Oba K, Kawahara T, Okubo Y, Saito T, Naito M, Urushitani M, Tamaoka A, Nakamagoe K, Ishii K, Kanda T, Katsuno M, Atsuta N, Maeda Y, Nagai M, Nishiyama K, Ishiura H, Toda T, Kawata A, Abe K, Yabe I, Takahashi-Iwata I, Sasaki H, Warita H, Aoki M, Sobue G, Mizusawa H, Matsuyama Y, Haga T, Kwak S.	4. 巻 269(2)
2. 論文標題 Randomized phase 2 study of perampanel for sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 885-896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-021-10670-y	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14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 青木 正志
2. 発表標題 ALS治療の現状とこれから 改訂中のガイドラインについて
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（東京）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 四條 友望, 池田 怜吉, 鈴木 直輝, 太田 淳, 鈴木 淳, 平野 愛, 加藤 健吾, 池田 謙輔, 井泉 瑠美子, 光澤 志緒, 割田 仁, 加藤 昌昭, 青木 正志, 香取 幸夫
2. 発表標題 Videofluoroscopic dysphagia scale estimates the gastrostomy timing in amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田 謙輔, 四條 友望, 鈴木 直輝, 割田 仁, 川内 裕子, 光澤 志緒, 井泉 瑠美子, 黒田 宙, 加藤 昌昭, 青木 正志
2. 発表標題 ALS発症から診断までの期間は疾患進行の予測因子となりうる.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平山 剛久, 柳橋 優, 渋川 茉莉, 森岡 治美, 蝦名 潤哉, 辰野 良亮, 津田 浩史, 割田 仁, 木田 耕太, 熱田 直樹, 山中 宏二, 鷺澤 尚宏, 海老原 寛, 狩野 修
2. 発表標題 Investigation of non-motor symptoms in patients with amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suzuki N, Kawada J, Akiyama T, Mitsuzawa S, Kato M, Warita H, Fujii T, Eggan K, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Motor nerve organoid is useful tool to analyze axonal degeneration of ALS.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会 (京都)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Mitsuhashi H, Nishiyama A, Ikeda K, Shijo T, Nakamura N, Ono Y, Ono R, Izumi R, Ohno A, Nakagawa T, Nakayama K, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Axonal growth impairment in iPS-derived motor neurons with TARDBP mutations
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会 (京都)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Nishiyama A, Izumi R, Kato M, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations.
3. 学会等名 PACTALS 2021 (Web) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with ALS-linked TARDBP mutations.
3. 学会等名 ISSCR 2021 (Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shirota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Kato M, Warita H, Okano H, Aoki M.
2. 発表標題 Axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations were mediated by PHOX2B downregulation.
3. 学会等名 32th international symposium on ALS/MND (Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久原 真, 津田 笑子, 鈴木 秀一郎, 松村 晃寛, 石川 亜貴, 櫻井 晃洋, 西山 亜由美, 元池 育子, 青木 正志, 青木 洋子, 下濱 俊.
2. 発表標題 FUS遺伝子変異のmosaicismが示唆された家族性ALSの親子例.
3. 学会等名 第106回日本神経学会北海道地方会(札幌)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾我 天馬, 井泉 瑠美子, 鈴木 直輝, 川内 裕子, 加藤 健吾, 香取 幸夫, 青木 正志, 加藤 昌昭.
2. 発表標題 当院におけるALS患者に対する誤嚥防止術5例の長期経過.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会(岡山)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 有史, 石橋 渚子, 関本 聖子, 遠藤 久美子, 鈴木 直輝, 加藤 昌昭, 青木 正志, 永野 功.
2. 発表標題 在宅侵襲的人工呼吸器装着筋萎縮性側索硬化症患者の施設間情報共有の試み.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会(岡山)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 昌昭, 鈴木 直輝, 井泉 瑠美子, 曾我 天馬, 川内 裕子, 青木 正志.
2. 発表標題 入院終末期対応を行ったALSの現状と問題点について.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会(岡山)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 正志
2. 発表標題 ALSの新たな展開 ALSの病態および治療法の開発.
3. 学会等名 第50回 日本臨床神経生理学会学術大会・日本神経治療学会・日本神経学会との関連学会合同シンポジウム(京都)(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 園生雅弘, 北川一夫, 青木正志	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 380
3. 書名 脳神経疾患最新の治療2021-2023	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap <a href="https://researchmap.jp/masashi-Aoki">https://researchmap.jp/masashi-Aoki</a> 東北大学医学部神経内科 <a href="http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html</a> 東北大学研究者紹介 <a href="http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/119bc328fed69a823c07afbc79037dda.html">http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/119bc328fed69a823c07afbc79037dda.html</a> 東北大学脳科学センター <a href="http://www.bsc.tohoku.ac.jp/researchers/aoki_m/">http://www.bsc.tohoku.ac.jp/researchers/aoki_m/</a> 東北大学病院臨床研究推進センター <a href="https://www.crieto.hosp.tohoku.ac.jp/president/aoki.html">https://www.crieto.hosp.tohoku.ac.jp/president/aoki.html</a>
---

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	割田 仁  (Warita Hitoshi)  (30400245)	東北大学・大学病院・助教    (11301)	
研究分担者	鈴木 直輝  (Suzuki Naoki)  (70451599)	東北大学・大学病院・助教    (11301)	

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