

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16611

研究課題名（和文）疾患iPS細胞による神経・筋共培養を活用した神経変性疾患の病態解析システムの開発

研究課題名（英文）Development of a pathological analysis system for neurodegenerative diseases using disease-specific iPS cell-based neuromuscular co-cultures.

研究代表者

伊藤 卓治（ITO, Takuji）

愛知医科大学・加齢医科学研究所・助教

研究者番号：30794151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞を用いた神経変性疾患の病態解析システムの開発と応用：構築したシステムを応用し、運動ニューロン疾患の発症に關与する可能性がある分子を、トランスクリプトーム解析により複数同定した。イメージングサイトメーターを用いた薬剤スクリーニングを行い、それぞれの分子に対する阻害剤を添加することにより、一部の表現型の改善傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築するシステムを、様々な運動ニューロン疾患、筋疾患、そして神経筋接合部疾患の疾患特異的iPS細胞に応用することで、患者由来運動ニューロンや骨格筋を用いた解析が可能になる。また、本解析で進める解析法は、神経・筋病態の解明に応用可能であり、神経・筋疾患における新たな病態解明と治療開発へと発展する。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of molecular pathogenesis and drug screening using disease-specific iPS cells: several molecules were identified that may be involved in disease pathogenesis. A trend towards improvement of some phenotypes was observed with the addition of the respective inhibitors.

研究分野：神経科学

キーワード：運動ニューロン 骨格筋 iPS細胞 運動ニューロン疾患 タイムラプスイメージング オプトジェネティクス

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動ニューロン疾患では、運動ニューロンにおける病態のみならず、骨格筋との相互作用が病態に大きく寄与すると考えられている。そのため、神経筋接合部 (Neuromuscular junction; NMJ) を介した運動ニューロンと骨格筋の相互作用を詳細に解析できるモデルの開発が求められてきた。しかし、運動ニューロンと骨格筋の相互作用を一つの機能単位 (神経筋ユニット) として捉えた疾患モデルの報告は乏しく、その分子病態は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞から誘導した運動ニューロンと骨格筋を共培養することで、神経・筋疾患の分子メカニズムの解明と新たな治療標的の探索につながる機能的神経・筋モデルを構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS 細胞由来骨格筋の成熟促進

NMJ の効率的形成には、骨格筋の成熟分化が必要不可欠である。Hu5/E18 からの myotube 形成には Ultrosor-G を添加した培地で未分化状態を維持することが必須である (Tanaka et al., in prep)。また、C2C12 では myotube 形成開始後に TGF $\beta$  を阻害すると myotube 形成が亢進する (Watt et al., 2010)。そこで、Ultrosor-G や TGF $\beta$  阻害剤 (SB431542) を使用し myotube 形成の促進効果を検討し、骨格筋の成熟分化条件を検討する。

#### (2) NMJ レポーターを用いた NMJ の可視化と動的変化の解明

申請者は NMJ レポーターを作成し、NMJ 形成を可視化・定量化することに成功している。iPS 細胞由来骨格筋にレンチウイルスを用いて NMJ レポーターを導入し、HB9<sup>e438</sup>::mRFP により可視化したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと共培養し、HB9<sup>e438</sup>::mRFP 陽性軸索の投射部位での NMJ レポーターのクラスタリングが検出できるかどうか検討する。さらに共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700) を用いたタイムラプスイメージングにより NMJ 形成を経時的に捉えることができるかどうか検討する。

#### (3) NMJ 機能評価システムの構築

##### ① Microelectrode array (MEA)

機能的な NMJ が形成されているかどうか検討するため、MEA プローブ上で運動ニューロンと骨格筋の共培養を行い、運動ニューロン刺激により誘発される骨格筋の活動電位を記録し NMJ のシナプス機能異常を明らかにする。

##### ② カルシウムイメージングを用いた解析

光感受性タンパク ChrimsonR-mKate2 を導入した運動ニューロンと、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を可視化する蛍光プローブ (G-CaMP6s) を導入した骨格筋とを共培養し (作成済のレンチウイルスで導入)、600nm の赤色光で運動ニューロンの活動電位を誘発し、所属研究室に導入済みの Ca<sup>2+</sup>イメージングシステム (IX83-ORCA Flash) により骨格筋における筋活動を検出する。

#### (4) 神経・筋疾患の分子病態解析システムの構築

トランスクリプトーム解析 (RNAseq) を行うことで、神経・筋病態を担う分子変化や細胞内シグナル変化 (パスウェイ解析) を同定する。同定した分子を標的としたノックダウンや細胞内シグナルに対する阻害剤を用いたレスキュー実験を行い、神経・筋病態を担う分子メカニズムを明らかにする。

#### (5) 神経・筋共培養システムを用いた薬剤スクリーニングシステムの開発

神経・筋相互作用を標的とした新規治療法の開発を行う。HB9<sup>e438</sup>::mRFP により標識された運動ニューロンと NMJ レポーターを導入した骨格筋とを 96well イメージングプレート上で共培養し、イメージングサイトメーター (IN Cell Analyzer 6000) を用いて一括解析することで、NMJ 形成と神経細胞死 (AnnexinV-Alexa647) を指標とした High content analysis (HCA) によるスクリーニングシステムを構築する。

#### (6) 疾患 iPS 細胞を用いた NMJ 病態の解明

##### ① NMJ の動態と機能性評価

構築したシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロン疾患の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態の解析を行う。特に、NMJ レポーターを指標とした AChR の clustering (成熟 NMJ の形成) の定量解析を行い、NMJ 形成能 (NMJ の形成と退縮、形態や数) についての解析を行う。また、オプトジェネティクスのモデルを用いた機能的検証、電子顕微鏡による終板の微細構造解析による形態学的検証を行い、NMJ の病態を明らかにする。また、変異遺伝子を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で正常化し (SBMA においては構築済)、遺伝的バックグラウンドが同一の (isogenic) コントロール iPS 細胞を作製し (Footprint-free system)、病態をレスキューできるか検討する。

##### ② 分子病態の解明と薬剤スクリーニング

構築したシステムを用いて、同定した分子変化やシグナルを標的とした薬剤、あるいは既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、神経・筋病態を標的とした治療薬探索を行う。有効性がみられた候補薬剤については、iPS 細胞を用いたモデルでの有効性、安全性を検証し、最終的にはモデルマウスへ投与してその有効性、安全性を検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) TGFβシグナルに着目した iPS 細胞由来骨格筋の成熟促進

Ultrosor-G や TGFβ阻害剤 (SB431542) を使用することで、myotube 形成の促進効果が認められ、骨格筋の成熟分化条件を決定した。

##### (2) NMJ レポーターを用いた NMJ の可視化と動的変化の解明

申請者は NMJ レポーターを作成し、NMJ 形成を可視化・定量化することに成功している。iPS 細胞由来骨格筋にレンチウイルスを用いて NMJ レポーターを導入し、HB9<sup>e438</sup>::mRFP により可視化したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと共培養したところ、HB9<sup>e438</sup>::mRFP 陽性軸索の投射部位で NMJ レポーターのクラスタリングが検出された。さらに共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700) を用いたタイムラプスイメージングにより NMJ 形成を経時的に捉えることに成功した。このシステムを神経・筋疾患の疾患特異的 iPS 細胞に応用することで NMJ がそもそも形成されないのか、一旦形成された NMJ が退縮するのかを明らかにできる。

##### (3) NMJ 機能評価システムの構築

光感受性チャネルロドプシン (ChR2-EGFP) 発現 iPS 由来運動ニューロンを、MEA 上で骨格筋細胞と共培養したところ 460nm の青色光による神経刺激で誘導される活動電位が AChR 遮断薬ベクロニウムにより抑制されたため、機能的な NMJ が形成されていることを確認した。

##### (4) 神経・筋共培養システムを用いた薬剤スクリーニングシステムの開発

神経・筋相互作用を標的とした新規治療法の開発を行った。HB9<sup>e438</sup>::mRFP により標識された運動ニューロンと NMJ レポーターを導入した骨格筋とを 96well イメージングプレート上で共培養し、イメージングサイトメーター (IN Cell Analyzer 6000) を用いて一括解析することで、NMJ 形成 (NMJ レポーター) を指標とした High content analysis (HCA) によるスクリーニングシステムを構築した。

##### (5) 疾患 iPS 細胞を用いた NMJ 病態の解明

###### ① NMJ の動態と機能性評価

構築したシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の運動ニューロン疾患の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態の解析を行った。特に、NMJ レポーターを指標とした AChR の clustering

(成熟 NMJ の形成) の定量解析を行い、NMJ 形成能 (NMJ の形成と退縮、形態や数) についての解析を行った。また、オプトジェネティクスのモデルを用いた機能的検証、電子顕微鏡による終板の微細構造解析による形態学的検証を行い、NMJ の病態の一端を明らかにした。

###### ② 神経・筋疾患の分子病態の解析

トランスクリプトーム解析 (RNAseq) を行うことで、神経・筋病態を担う分子変化や細胞内シグナル変化 (パスウェイ解析) を同定した。同定した分子を標的としたノックダウンや細胞内シグナルに対する阻害剤を用いたレスキュー実験を行い、神経・筋病態を担う分子メカニズムの一端を明らかにした。

###### ③ 分子病態の解明と薬剤スクリーニング

構築したシステムを用いて、同定した分子変化やシグナルを標的とした薬剤を用いたスクリーニングを行い、神経・筋病態を標的とした治療薬探索を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 2件）

1. 著者名 Muhammad Irfanur Rashid, Takuji Ito, Fuyuki Miya, Daisuke Shimojo, Kanae Arimoto, Kazunari Onodera, Rina Okada, Takunori Nagashima, Kazuki Yamamoto, Zohora Khatun, Rayhanul Islam Shimul, Jun-Ichi Niwa, Masahisa Katsuno, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Hidetoshi Sakurai, Kazunori Shimizu, Manabu Doyu, Yohei Okada	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and efficient differentiation of human iPSCs into contractible skeletal muscles for muscular disease modeling.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 8146-8146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-34445-9	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 Yokoi S, Ito T, Sahashi K, Nakatochi M, Tohnaï G, Nakamura R, Fujioka Y, Ishigaki S, Udagawa T, Izumi Y, Morita M, Kano O, Oda M, Sone T, Okano H, Atsuta N, Katsuno M, Okada Y*, Sobue G*	4. 巻 42
2. 論文標題 The SYNGAP1 3'UTR variant in ALS patients causes aberrant SYNGAP1 splicing and dendritic spine loss by recruiting HNRNPK	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8881-8896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0455-22.2022	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 Yamamoto K, Yamaoka N, Imaizumi Y, Nagashima T, Furutani T, Ito T, Okada Y, Honda H, Shimizu K	4. 巻 21
2. 論文標題 Development of a Human Neuromuscular Tissue-on-a-Chip Model on a 24-Well-Plate-Format Compartmentalized Microfluidic Device	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 1897-1907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1lc00048a.	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 Rashid MI, Ito T, Shimojo D, Arimoto K, Onodera K, Okada R, Nagashima T, Yamamoto K, Khatun Z, Okano H, Sakurai H, Shimizu K, Doyu M, Okada Y	4. 巻 11.22.468571
2. 論文標題 Simple and efficient differentiation of human iPSCs into contractible skeletal muscles for muscular disease modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
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 無
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 *Jahan M, *Ito T, Ichihashi S, Masuda T, Bhuiyan M, Takahashi I, Takamatsu H, Kumanogoh A, Tsuzuki T, Negishi T, Yukawa K.	4. 巻 Oct 22;9
2. 論文標題 PlexinA1 deficiency in BALB/cAJ mice leads to excessive self-grooming and reduced prepulse inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IBRO reports	6. 最初と最後の頁 276 - 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibror.2020.10.004	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 Onodera K, Shimojo D, Ishihara Y, Yano M, Miya F, Banno H, Kuzumaki N, Ito T, Okada R, de Araujo Herculano B, Ohyama M, Yoshida M, Tsunoda T, Katsuno M, Doyu M, Sobue G, Okano H, Okada Y	4. 巻 Feb 19
2. 論文標題 Unveiling synapse pathology in spinal bulbar muscular atrophy by genome-wide transcriptome analysis of purified motor neurons derived from disease specific iPSCs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 13(1):18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-0561-1.	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 -

1. 著者名 Okada R, Onodera K, Ito T, Doyu M, Okano HJ, Okada Y.	4. 巻 Feb;163
2. 論文標題 Modulation of oxygen tension, acidosis, and cell density is crucial for neural differentiation of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 34-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.01.015	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 Hyodo T, Rahman ML, Karnan S, Ito T, Toyoda A, Ota A, Wahiduzzaman M, Tsuzuki S, Okada Y, Hosokawa Y, Konishi H.	4. 巻 Jan 28;30(4)
2. 論文標題 Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1195-1207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.064.	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17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤卓治、ランシッド ムハンマド イルファヌール、ジャミー ファラー ウルファト、小野寺一成、岡田梨奈、勝野雅央、祖父江元、道勇学、岡野栄之、岡田洋平
2. 発表標題 疾患iPS細胞由来神経・筋共培養モデルを用いた運動ニューロン疾患の治療薬シーズの探索
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（新潟）誌上発表
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Farah Ulfat Jamee, Takuji Ito, Muhammad Irfanur Rashid, Hidetoshi Sakurai, Yohei Okada
2. 発表標題 The effects of small molecule compounds on the maturation of iPSC-derived skeletal muscle
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（新潟）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤卓治、ランシッド ムハンマド イルファヌール、小野寺一成、岡田梨奈、下門大祐、田中智史、勝野雅央、祖父江元、道勇学、岡野栄之、岡田洋平
2. 発表標題 疾患iPS細胞由来神経・筋共培養モデルを用いた運動ニューロン疾患の病態関連分子の探索
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（神戸）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Farah Ulfat Jamee, Takuji Ito, Muhammad Irfanur Rashid, Yohei Okada
2. 発表標題 The effects of small molecule compounds on the differentiation and maturation of iPSC-derived skeletal muscle.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（神戸）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Khatun Z, Onodera K, Yamaguchi S, Okada R, Ito T, Rashid MI, Inoue H, Aoki M, Okano H, Doyu M, Okada Y
2. 発表標題 Establishment of a more efficient disease model for ALS using feeder-free disease specific iPSCs
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (神戸)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野寺一成, 下門大祐, Bruno De Araujo Herculano <sup>1</sup> , 石原康晴, 依田真由子, 太田明伸, 矢野真人, 宮冬樹, Rashid Muhammad Irfanur, 伊藤卓治, 岡田梨奈, 角田達彦, 細川好孝, 道勇学, 祖父江元, 勝野雅央, 岡野栄之, 岡田洋平
2. 発表標題 Elucidating early pathophysiology of spinal-bulbar muscular atrophy using disease-specific iPSCs
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤卓治, ラシッド ムハンマド イルファヌール, 小野寺一成, 岡田梨奈, 下門大祐, 田中智史, 勝野雅央, 祖父江元, 道勇学, 岡野栄之, 岡田洋平
2. 発表標題 疾患iPS細胞由来神経・筋共培養モデルを用いた運動ニューロン疾患の非細胞自律的神経変性を担う分子病態の解明
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Khatun Z, Onodera K, Yamaguchi S, Okada R, Ito T, Rashid MI, Inoue H, Aoki M, Okano H, Doyu M, Okada Y
2. 発表標題 Establishment of a more efficient disease model for ALS using feeder-free disease specific iPSCs
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤卓治、ラシッド ムハンマド イルファヌール、小野寺一成、岡田梨奈、下門大祐、田中智史、勝野雅央、祖父江元、道勇学、岡野栄之、岡田洋平
2. 発表標題 疾患iPS細胞由来神経・筋共培養モデルを用いた運動ニューロン疾患の非細胞自律的神経変性を担う分子病態の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Khatun Z, Onodera K, Yamaguchi S, Okada R, Ito T, Rashid MI, Inoue H, Aoki M, Okano H, Doyu M, Okada Y
2. 発表標題 Establishment of a more efficient disease model for ALS using feeder-free disease specific iPSCs
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rashid MI, Ito T, Miya F, Shimojo D, Arimoto K, Onodera K, Okada R, Nagashima T, Yamamoto K, Khatun Z, Okano H, Sakurai H, Shimizu K, Doyu M, Okada Y
2. 発表標題 Bulk differentiation of iPSCs into contractible muscles for muscular disease modeling
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤卓治、ラシッド ムハンマド イルファヌール、小野寺一成、岡田梨奈、下門大祐、田中智史、勝野雅央、祖父江元、道勇学、岡野栄之、岡田洋平
2. 発表標題 疾患iPS細胞由来神経・筋共培養モデルを用いた運動ニューロン疾患の非細胞自律的神経変性を担う分子病態の解明
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Khatun Z, Onodera K, Yamaguchi S, Okada R, Ito T, Rashid MI, Inoue H, Aoki M, Okano H, Doyu M, Okada Y
2. 発表標題 Establishment of a more efficient disease model for ALS using feeder-free disease specific iPSCs
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺一成、下門大祐、石原康晴、太田明伸、Muhammad Irfanur Rashid、伊藤卓治、岡田梨奈、細川好孝、道勇学、祖父江元、勝野雅央、岡野栄之、岡田洋平
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を用いた球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の早期病態解明と治療開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 卓治、ラシッド ムハンマド、イルファヌール、田中 智史、下門 大祐、岡野 栄之、道勇 学、岡田、洋平
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来運動ニューロンと骨格筋を用いた機能的神経筋共培養モデルの構築
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会 / CJK第1回国際会議（神戸）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuji Ito, Muhammad Irfanur Rashid, Satoshi Tanaka, Daisuke Shimojo, Hideyuki Okano, Manabu Doyu, Yohei Okada
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF IPSC-DERIVED NEUROMUSCULAR CO-CULTURE MODEL FOR THE ANALYSIS OF NON-CELL AUTONOMOUS NEURODEGENERATION IN MOTOR NEURON DISEASES
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤卓治, 小野寺一成, 小野寺一成, 下門大祐, 下門大祐, 田中智史, 田中智史, 岡田梨奈, RASHID Muhammad Irfanur, 道勇学, 岡野栄之, 岡田洋平
2. 発表標題 疾患iPS細胞による神経・筋共培養を活用した神経変性疾患の病態解析
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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