

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：奨励研究

研究期間：2021～2021

課題番号：21H04161

研究課題名 マイクロデバイスを用いた筋萎縮性側索硬化症(ALS)細胞モデルの構築と機能評価

研究代表者

内藤 佳津子 (Naitou, Katsuko)

東海大学・メディカルサイエンスカレッジオフィス(生命科学統合支援担当)・大学技術職員(東海大学メディカルサイエンスカレッジオフィス技術職員)

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 430,000円

研究成果の概要：神経筋接合部を(neuromuscular junction:NMJ)を有するALS(筋萎縮性側索硬化症)のin vitro細胞モデルを確立し、それらの機能評価を行うことを目的として、下位運動ニューロンと骨格筋の共培養によるNMJの形成を試みた。分化誘導された骨格筋細胞において神経細胞からのアセチルコリンによる筋収縮を確認できた。分化誘導した骨格筋と下位運動ニューロンの共培養を行った結果、共培養開始後21日目から骨格筋の収縮が認められ、その収縮はアセチルコリン依存的事であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは上位及び下位運動ニューロンの変性を伴う進行性の神経変性疾患である。難病指定されており、有効な治療薬は数少ない。今回、健常者及びALS患者iPSCs由来下位運動ニューロンと骨格筋の共培養を用いてALSのin vitro細胞モデルの構築のための培養条件の設定を行った。本研究では、神経筋接合部(neuromuscular junction: NMJ)を有するALS細胞モデルを確立し、それらの機能評価を行うことを目的とした。将来的には、それらを用いてALSの治療のスクリーニングや開発に貢献できると考える。

研究分野：分子レベルから細胞レベルの生物学

キーワード：神経筋接合部 神経筋共培養 in vitro

1. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis : ALS) は、大脳皮質の上位運動ニューロン (Upper Motor Neurons : UMNs) と脊髄前角の下位運動ニューロン (Lower Motor Neurons : LMNs) の選択的変性を伴う進行性の神経変性疾患である。疾患の進行に伴い、運動ニューロン (Motor Neurons : MNs) の機能変性や細胞死が生じ、脳から骨格筋への命令が伝わらなくなる。その結果、骨格筋が萎縮し、呼吸困難により死に至る、難病である。2006 年に人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells : iPSCs) 技術が開発されて以降、ALS 患者 iPSCs 由来の LMNs の単独培養が ALS の細胞モデルとして用いられ、新規薬剤の開発が進行している。一方患者では、ALS 発症初期に、LMNs と骨格筋の神経終末の接合が失われることが知られている。この疾患初期の神経筋接合部 (Neuro Muscular junction : NMJ) の動態を *in vitro* で再現することができれば、現行の LMNs 単独培養による ALS 細胞モデルよりも優れた、ALS 疾患を模倣する ALS 細胞モデルを構築できると考える。そこで、本研究では、健常者及び ALS 患者由来 iPSC から分化誘導した LMNs と培養筋芽細胞から分化誘導した骨格筋細胞を共培養することで生理的 NMJ を構築する。iPSCs 由来 LMNs と骨格筋の共培養には、市販の培養容器ではなく、共同研究者の同大学工学部の木村らが開発したマイクロデバイスを用いる。ALS 細胞モデルの NMJ の形態と機能を経時的に観察し、その動態を健常者の動態と比較する。

2. 研究成果

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に侵される進行性の神経変性疾患である。ALS 発症初期には、下位運動ニューロン (LMNs) と骨格筋の神経終末の接合が失われることが知られている。この疾患初期の神経筋接合部 (Neuromuscular junction : NMJ) の動態変化を *in vitro* で再現することができれば、ALS 疾患の初期症状を模倣する新たな ALS 細胞モデルを構築することができる。本研究では、ALS の *in vitro* 細胞モデルの構築を目指し、マウス筋芽細胞 (myoblast) から分化誘導した骨格筋と健常者人工多能性幹細胞 (iPSCs) 由来 LMNs の共培養を行い、NMJ 形成の誘導を試みた。それらの機能評価を行うことを目的として、下位運動ニューロンと骨格筋の共培養による NMJ の形成を試みた。神経筋接合部を有する ALS (筋萎縮性側索硬化症) の *in vitro* 細胞モデルを確立し、分化誘導した骨格筋と下位運動ニューロンの共培養を行った結果、共培養開始後 21 日目から骨格筋の収縮が認められ、その収縮はアセチルコリン依存的事であることを確認した。Alexa594 標識 プンガロトキシンを培地に添加し、細胞表面のアセチルコリン受容体をラベルし、シナプトフィシンとの共存を解析した結果、両者が陽性の神経筋結合部のクラスタを確認した。よって、ヒト由来 iPSCs を用いて *in vitro* での分化誘導した骨格筋及び下位運動ニューロンとの共培養において、機能的な神経筋結合部形成誘導が可能であることが示された。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------