

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19489

研究課題名（和文）運動ニューロン疾患の初期軸索病態の解明

研究課題名（英文）Understanding of early axonal pathology in motor neuron diseases

研究代表者

佐橋 健太郎（Sahashi, Kentaro）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90710103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：運動ニューロン疾患では運動ニューロン死による進行性筋萎縮がおこるが、先行して軸索萎縮が認められ、発生期の障害が想定されているが、詳細は不明である。我々はマウス脊髄を用い、発現異常が明らかとなった遺伝子が運動ニューロンに限定して発現することを見出した。また遺伝子由来タンパク質が疾患の変異RNAに結合し、モデルマウス組織の培養において軸索伸長障害をきたすことが明らかとなった。またモデルマウス胎子の運動ニューロンの遺伝子発現解析により、運動ニューロンの発生・分化に必須の遺伝子の発現異常を同定した。さらに関連して軸索形態異常が確認されており、運動ニューロンの特異的脆弱性機序の解明につなげた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性神経難病である運動ニューロン疾患において、原因遺伝子の解明に続き、有用なモデルマウスの開発などにつながっているが、運動ニューロン特異的な障害機序については十分な理解に至っていない。また各疾患に共通したメカニズムを明らかにすることにより、根治治療法の確立への発展も期待される。本研究では、これまでにない、マウス胎子毎の脊髄の運動ニューロンの単離・解析、またマウス胎子脊髄の組織培養も組み合わせ、網羅的な遺伝子の発現解析を通じて、運動ニューロン死が起こる以前の、神経突起の発達障害をもたらす、分子レベルでの原因を突き止めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：In genetic motor neuron diseases including spinal and bulbar muscular atrophy and spinal muscular atrophy, motor axon degeneration precedes the occurrence of motor neuronal death, although the underlying mechanism of motor neuron vulnerability remains elusive. Our gene expression analysis of spinal cords or motor neurons derived from the model mice identified developmental dysregulation of motor neuron-specific genes, in part, through interacting with the mutant RNA of the causative gene. Experiment using cultured embryonic motor neurons or spinal cords from the mice unveiled that these genetic perturbations lead to defective axonal pathfinding, indicative of a potential cell-autonomous process that directs motor neuron degeneration.

研究分野：運動ニューロン疾患

キーワード：運動ニューロン疾患 脊髄性筋萎縮症 球脊髄性筋萎縮症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、脊髄性筋萎縮症(SMA)は脊髄や脳幹の下位運動ニューロン変性による進行性筋萎縮をきたす遺伝性運動ニューロン疾患である。モデルマウスにおいて、運動ニューロン変性に先行した運動軸索萎縮や神経筋接合部脱神経が認められ、発生期の軸索形成障害に起因すると考えられているが分子機序は不明である。一方、生体マウスを用いた軸索動態の解析は困難であり、新たな実験系が必要と考えられる。研究代表者らはマウス脊髄をスライス培養し、運動ニューロン周辺の微小環境を維持した *ex vivo* 組織モデルを構築しており、初代培養胎仔由来細胞を組み合わせ活用し、神経変性初期の軸索病態にせまるという研究構想に至った。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞自律的な運動ニューロン疾患病態に関し、発達期遺伝子発現制御や RNA 結合タンパク質の解析を通じ、運動ニューロン特異的な変性を規定する、早期のメカニズムの解明を目指していく。初代培養胎仔運動ニューロン、*ex vivo* 脊髄培養系を用いて、軸索新生/伸長異常の形態学的評価も組み合わせ、SBMA、SMA における、初期神経病態の起点理解を目指す。

### 3. 研究の方法

マウス個体系と比し、軸索形態観察の面で優位性がある、運動ニューロン培養、*ex vivo* 脊髄培養系を用いて軸索病態を解析する。その際、ウイルスベクターを用いた疾患修飾因子の解析系を組み合わせる。また確立している SBMA あるいは SMA モデルマウスを活用し、個体毎のシングルセル網羅的遺伝子発現解析を行う。

### 4. 研究成果

はじめに SBMA モデルマウス脊髄を用いた網羅的遺伝子発現解析データより、アセチルコリン作動性の運動ニューロン特異的に発現し、かつ SBMA において発現変化する遺伝子、Mid1 に注目した。Mid1 発現上昇は脊髄を用いた qPCR でも示され、運動ニューロンに局在することが判明した(図1)。Mid1 は微小管関連ユビキチン E3 リガーゼであり、また RNA 結合タンパク質として CAG リピート配列にリピート長依存的に結合することが報告されている。Mid1 は PP2A のユビキチン化と分解を介し、mTOR と S6K を活性化し、CAG リピート RNA 翻訳を促進する。我々は RNA プルダウンで、Mid1 が SBMA 原因遺伝子 AR の正常 24 リピートより、異常 97 リピートにより結合することを確認した。また His タグを用いた Mid1 プルダウンでも同様に異常 97 リピートの AR mRNA の方により結合することが示され(図2)。運動ニューロン様細胞 NSC-34 の系では、Mid1 は男性ホルモンであるジヒドロテストステロン(DHT)依存的に異常 AR タンパク質発現を上昇させるのに対し、正常 AR の発現には影響しなかった(図3)。Mid1 はマウス胎仔の脊髄運動ニューロンにおいても共局在し発現していることが分かった(図4)。また SBMA マウス胎仔の脊髄運動ニューロンにて異常 AR の核内集積がみられており、この時期で循環男性ホルモンの暴露下であることが示された(図5)。続いて我々はマウス胎仔脊髄を用いたスライス培養系を立ち上げており、本プラットフォームは DHT 依存的な AR タンパク質の発現誘導と AR の運動ニューロン核内集積誘導を再現しており(図6)。グリアや細胞外マトリックスといった運動ニューロン周囲の環境が保有された状態で、運動ニューロン及び軸索の解剖学的評価を行った。脊髄スライス培養では、SBMA マウスの軸索伸長が DHT 依存的に障害

されることが分かった。軸索伸長定量は既報告に習い、脊髄周囲の各同心円と交叉する軸索数を定量し、その最大値  $N_{max}$  を指標とした(図7)。ニューロフィラメント染色により培養脊髄の軸索は運動ニューロン由来であることを確認し(図8)、軸索障害とは対照的に、DHT 添加条件下では運動ニューロンの細胞死をもたらさないことが、アポトーシスマーカーCleaved caspase 3の発現上昇がないことにより確認された(図9)。よって脊髄培養系では細胞体より、軸索が先行し障害されることが示唆された。軸索伸長障害はDHT 添加下でも、メスマウスと比べオスマウスで強くみられることが判明し、定量は  $N_{max}$  と各同心円上の軸索数を評価した(図10)。脊髄培養系では、Mid1 過剰発現によりAR タンパク質発現が上昇し、Mid1 ノックダウンによりAR タンパク質発現が低下した(図11)。次に、軸索障害が顕著でないメスのSBMA マウスの脊髄培養系では、DHT 添加により軸索障害が悪化し、Mid1 過剰発現によりさらに軸索障害が著明になることが認められた(図12)。一方、SBMA オスマウス脊髄ではAR ノックダウンにより軸索障害がレスキューされ、また Mid1 ノックダウンでもレスキューされた。さらにAR とMid1 の同時ノックダウンでは単独AR ノックダウン効果を上回らなく、この系ではMid1 ノックダウン効果はAR を介すると考えられた(図13)。尚、Mid1 ノックダウンは野生型マウスの軸索伸長に影響しなかった。以上得られた知見より、SBMA における運動軸索障害の機序のモデルとして、男性ホルモンが低い状態では、異常ARの核内移行はみられず、Mid1の発現上昇もなかったが、男性ホルモンが高いというSBMA にとってのストレス状態では、異常ARの核内集積と運動ニューロン特異的なMid1 発現上昇がおこり、続いてMid1 が異常CAG リピートRNA と結合し、男性ホルモン依存的に異常AR タンパク質発現とその核内集積をさらに亢進させる。その結果、発達早期に、微小管障害による軸索伸長障害がもたらされ、最終的に運動ニューロン変性に至る機序が想定された(図14)。

またSMN タンパク質欠乏下の発達病態が想定されるSMA に対し、モデルマウスと同胞コントロールマウス各胎仔の脊髄運動ニューロンを同時に単離し、RNA-Seq による遺伝子発現解析を行い、有意な発現変動遺伝子群のうち、運動ニューロン分化・増殖に重要なAldh1a2 に注目した。Aldh1a2 はレチノイン酸合成に関わり、胎生期に発現上昇・活性化するが、SMA モデルマウス運動ニューロン特異的なAldh1a2 発現低下が明らかとなった(図15)。運動ニューロンの初代培養系を用いてAldh1a2 発現低下がSMN 発現低下と相関することを見出し、Aldh1a2 発現低下がSMN 発現低下と同様に軸索形態異常(膨化)及び細胞生存能低下に影響することが認められた(図16)。またSMA 運動ニューロン病態に対し、Aldh1a2 によるレチノイン酸依存的な改善が示された(図17, 18)。軸索膨化機序について、p62 集積によるオートファジーの異常の関与が示され(図18)、SMA におけるSMN 欠乏下の発達期Aldh1a2 発現異常が、軸索運動ニューロン脆弱性をもたらす機序が明らかとなった。

以上、運動ニューロン疾患であるSBMA とSMA に関し、軸索関連遺伝子発現制御解析を通じて細胞自律的な運動ニューロン変性を規定する発達異常病態を解明し、以下国際誌上での報告につなげた。

Ogura Y, **Sahashi K\***, Hirunagi T, Iida M, Miyata T, Katsuno M\*. Mid1 is associated with androgen-dependent axonal vulnerability of motor neurons in spinal and bulbar muscular atrophy. *Cell Death Dis.* 13(7):601, 2022.

Kataoka M, **Sahashi K\***, Tsujikawa K, Takeda JI, Hirunagi T, Iida M, Katsuno M\*. Dysregulation of Aldh1a2 underlies motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy. *Neurosci Res.* 194:58-65. 2023.

\*Corresponding author

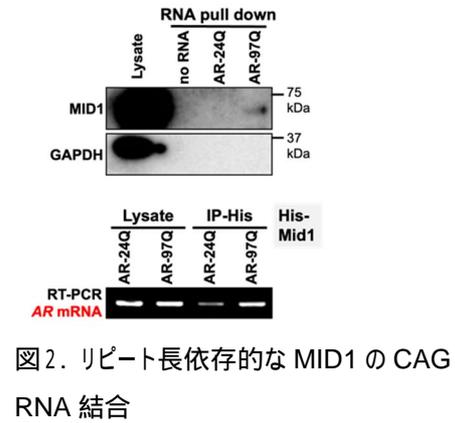
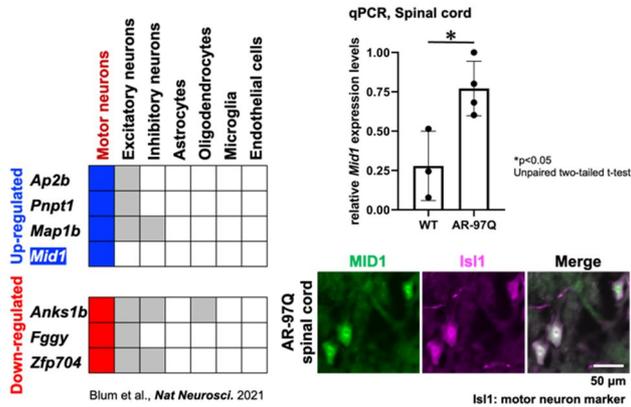
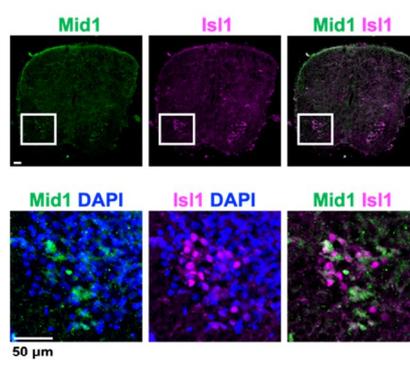
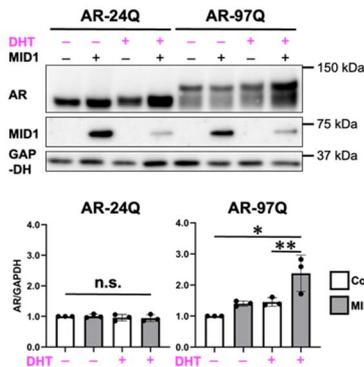


図1. SBMA 運動ニューロン特異的な MID1 の発現上昇  
AR-97Q: 異常 97CAG リピートを有する SBMA モデルマウス.

図2. リピート長依存的な MID1 の CAG RNA 結合



左: 図3. MID1 による変異 AR 発現亢進

右: 図4. 胎仔脊髄運動ニューロンにおける MID1 発現

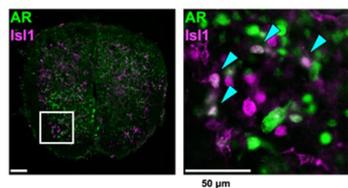


図5. 胎仔期のアンドロゲン暴露

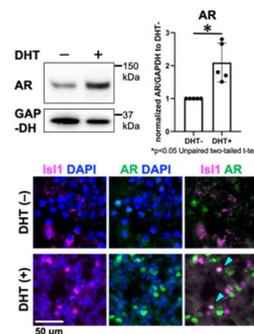


図6. 脊髄スライス培養系

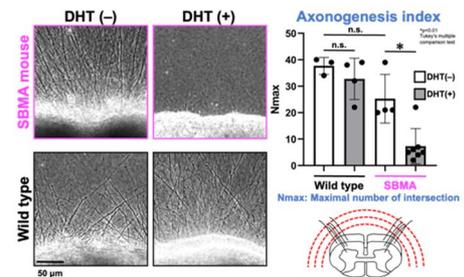


図7. 男性ホルモン依存的な軸索障害

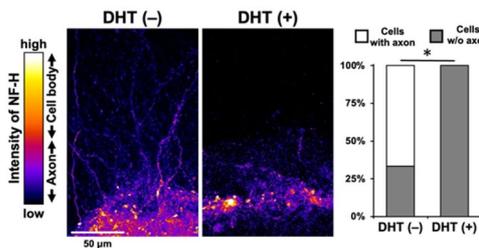


図8. 運動ニューロン由来の軸索障害

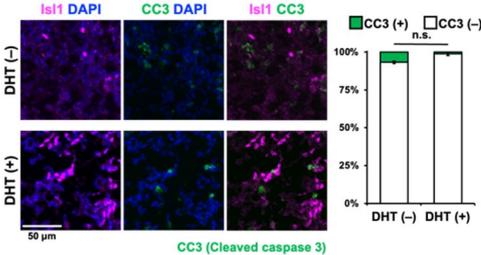
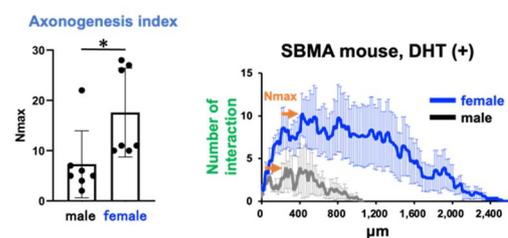
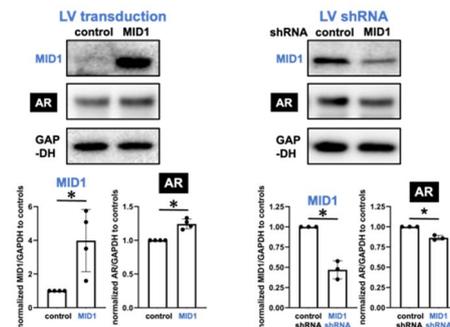


図9. 軽度運動ニューロン細胞体障害



左: 図10. SBMA オスマウスにおける軸索伸長障害



右: 図11. MID1 による変異 AR 発現増加

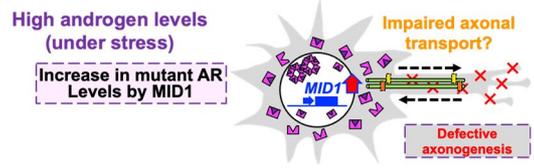
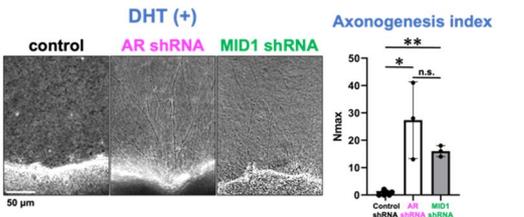
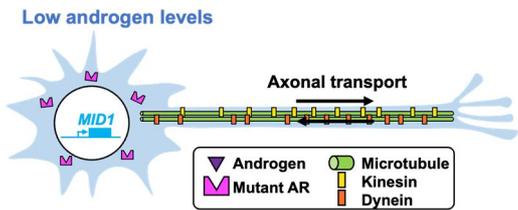
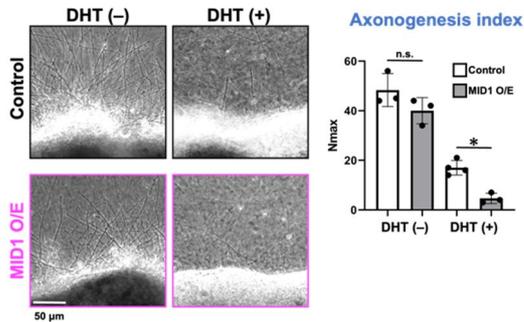


図14. SBMAにおけるMID1 依存的軸索障害

上: 図12. MID1 過剰発現による軸索病態悪化

下: 図13. MID1 ノックダウンによる軸索障害改善

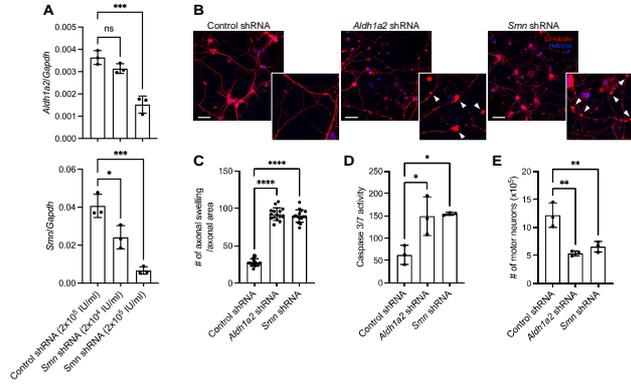
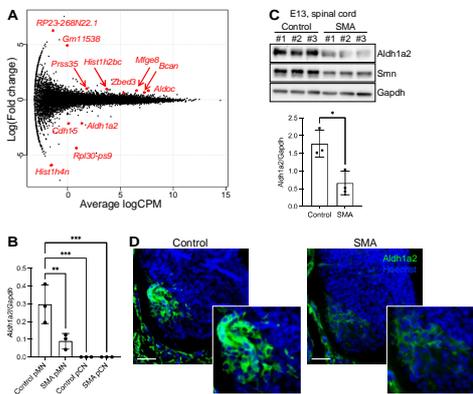
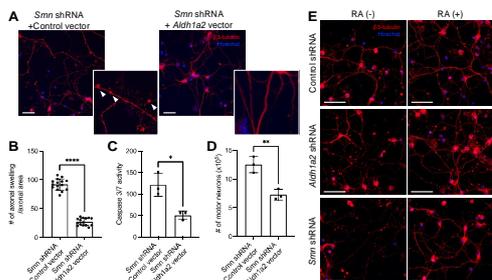
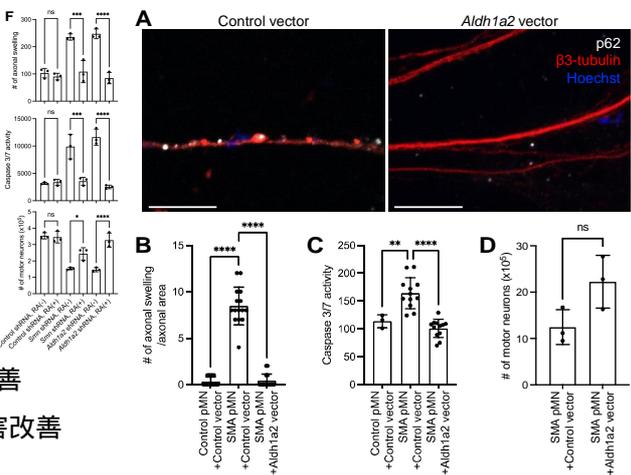


図15. 運動ニューロンにおけるAldh1a2 低下

図16. Aldh1a2 低下による軸索・細胞体障害



左: 図17. Aldh1a2 による SMA 軸索障害改善



右: 図18. Aldh1a2 による p62 陽性軸索障害改善

## 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 3件）

1. 著者名 Kataoka Mayumi, Sahashi Kentaro, Tsujikawa Koyo, Takeda Jun-ichi, Hirunagi Tomoki, Iida Madoka, Katsuno Masahisa	4. 巻 194
2. 論文標題 Dysregulation of Aldh1a2 underlies motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 58 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.04.007	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 Hirunagi Tomoki, Nakatsuji Hideaki, Sahashi Kentaro, Yamamoto Mikiyasu, Iida Madoka, Tohnai Genki, Kondo Naohide, Yamada Shinichiro, Murakami Ayuka, Noda Seiya, Adachi Hiroaki, Sobue Gen, Katsuno Masahisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Exercise attenuates polyglutamine mediated neuromuscular degeneration in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 159 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.13344	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 Yosuke Ogura, Kentaro Sahashi, Tomoki Hirunagi, Madoka Iida, Takaki Miyata, Masahisa Katsuno	4. 巻 13
2. 論文標題 Mid1 is associated with androgen-dependent axonal vulnerability of motor neurons in spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-022-05001-6	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 Sahashi Kentaro, Hashizume Atsushi, Kuwatsuka Yachiyo, Chinen Madoka, Saotome-Nakamura Ai, Ando Masahiko, Katsuno Masahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 The Japan Registry for Adult Subjects of Spinal Muscular Atrophy (jREACT-SMA): Protocol for a Longitudinal Observational Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JMIR Research Protocols	6. 最初と最後の頁 e38878 ~ e38878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/38878	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kentaro Sahashi, Toshio Saito, Hiroshi Takashima, Fumiaki Tanaka, Yachiyo Kuwatsuka, Atsushi Hashizume, Taihei Homma, Hiromitsu Kawata, Masahiko Ando, Masahisa Katsuno, jREACT Study Group
2. 発表標題 Japan REgistry for Adult subjeCTs of Spinal Muscular Atrophy (jREACT-SMA): 1-Year Interim Results
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐橋 健太郎, 齊藤 利雄, 高嶋 博, 田中 章景, 鍬塚 八千代, 橋詰 淳, 本間 泰平, 川田 洋充, 安藤 昌彦, 勝野 雅央, jREACT study group
2. 発表標題 Japan REgistry for Adult subjeCTs of Spinal Muscular Atrophy(jREACT-SMA):登録から1年間の間集計
3. 学会等名 第41回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Sahashi, Toshio Saito, Hiroshi Takashima, Fumiaki Tanaka, Yachiyo Kuwatsuka, Atsushi Hashizume, Taihei Homma, Hiromitsu Kawata, Masahiko Ando, Masahisa Katsuno, jREACT Study Group
2. 発表標題 Japan REgistry for Adult subjeCTs of spinal muscular atrophy (jREACT-SMA): Baseline characteristics
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kentaro Sahashi, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 A longitudinal cohort study of adults with spinal muscular atrophy (jREACT-SMA)
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Kentaro Sahashi, Toshio Saito, Hiroshi Takashima, Fumiaki Tanaka, Yachiyo Kuwatsuka, Atsushi Hashizume, Taihei Homma, Hiromitsu Kawata, Masahiko Ando, Masahisa Katsuno, jREACT Study Group
2. 発表標題	Japan REgistry for Adult subjeCTs of SMA (jREACT-SMA): ベースライン解析
3. 学会等名	第40回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	小椋 陽介, 佐橋 健太郎, 蛭薙 智紀 飯田 円, 宮田 卓樹, 勝野 雅央
2. 発表標題	球脊髄性筋萎縮症におけるアンドロゲン依存的な軸索脆弱性へのMID1の関与
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	佐橋 健太郎, 小椋 陽介, 蛭薙 智紀, 飯田 円, 宮田 卓樹, 勝野 雅央
2. 発表標題	神経特異的タンパク質による リピート病における細胞変性機序
3. 学会等名	第16回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	齊藤利雄, 竹島泰弘, 水野勝広, 橋口昭大, 佐橋健太郎, 平川晃弘, 川田洋充, 勝野雅央
2. 発表標題	PRIME-SMA: 脊髄性筋萎縮症患者を対象とした手の作業能力に対するリスジプラムの有効性評価方法に関する研究プロトコル
3. 学会等名	第64回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 橋口昭大, 竹島泰弘, 水野勝広, 齊藤利雄, 佐橋健太郎, 平川晃弘, 川田洋充, 勝野雅央
2. 発表標題 SMA患者の手の作業能力に対するリハビリの有効性評価方法: 研究プロトコル
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

#1. プレスリリース「球脊髄性筋萎縮症の運動ニューロン病態の鍵を握るMID1タンパク質」 <a href="https://www.youtube.com/watch?v=4rfBlzHZZo">https://www.youtube.com/watch?v=4rfBlzHZZo</a>
#2. 第63回日本神経学会学術大会 学生・研修医演題 最優秀ポスター賞 球脊髄性筋萎縮症におけるアンドロゲン依存的な軸索脆弱性へのMID1の関与 小椋 陽介 (名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学)
#3. Neuroscience Research (NSR) 論文賞 “Dysregulation of Aldh1a2 underlies motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy” Mayumi Kataoka, Kentaro Sahashi, Koyo Tsujikawa, Jun-ichi Takeda, Tomoki Hirunagi, Madoka Iida, Masahisa Katsuno

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	勝野 雅央  (Katsuno Masahisa)  (50402566)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	
研究分担者	横井 聡  (Yokoi Satoshi)  (30815460)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教   (13901)	
研究分担者	蛭雑 智紀  (Hirunagi Tomoki)  (00927527)	名古屋大学・医学部附属病院・医員   (13901)	

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
---------	---------