

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830040

研究課題名(和文) 家族性筋萎縮性側索硬化症2型疾患 iPS細胞の樹立とALS2疾患モデル細胞の作出

研究課題名(英文) Establishment and Characterization of iPS cell lines from Japanese ALS2 patients

研究代表者

大友 麻子 (OTOMO, Asako)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50535226

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)：本研究を通じて、日本国内の2名の家族性筋萎縮性側索硬化症2型(ALS2)患者からiPS細胞を樹立し、それらを運動ニューロンへと分化誘導させることによりALS2疾患モデル細胞を作出した。そのALS2疾患モデル細胞特異的にみられる機能異常を同定することを目的とし、それらの細胞の網羅的な遺伝子発現解析を行った。現在、健常者由来運動ニューロンの解析結果とデータを比較することによりALS2疾患特異的に障害を受けるシグナル伝達経路の同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：ALS2 is a juvenile recessive form of ALS. We and others reported that loss of function of the ALS2 protein (ALS2) accounts for motor neuron degeneration (MND) in the patients. However, the underlying mechanism of MND in the patient is not fully understood. Recently, Japanese ALS2 cases were reported. In this study, to further analyze the pathogenesis of ALS2, we established iPS cell lines of Japanese ALS2 patients and analyzed the character of a motor neuron model of ALS2 differentiated from the iPS cells. We succeeded to generate iPS cell lines from two independent ALS2 patients. Further, by the treatment of several inhibitors, we differentiated the iPS cells to HB9/11et-1-positive motor neurons, which allowed us to explore the cellular phenotype. Currently, a comparison of RNA-seq data from the ALS2 model cells with those from non-patient derived motor neurons is in progress. Further analysis may uncover the signal pathway specifically disturbed in ALS2.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：ALS ALS2 iPS cell

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 2 型 (ALS2) は、劣性遺伝形式をとる若年発症型の ALS である。そのため、ALS2 遺伝子産物 (ALS2/Alsin) の細胞内機能は運動ニューロンの生存にとって必須であると考えられる。ALS2 遺伝子の同定後、我々は、一連の生化学的及び細胞生物学的機能解析を行い、ALS2 タンパク質が細胞内膜動態調節機能を介してオートファジー・リソソーム経路によるタンパク分解効率の調節を行う分子であることを明らかにしてきた (Otomo et al., 2003; Kunita et al., 2007; Hadano et al., 2009; Otomo et al., 2011)。しかし、これまでに明らかにしてきた ALS2 タンパク質の基本的特性には細胞種特異性が認められず、ヒト運動ニューロンの生存・機能維持に必須の ALS2 タンパク質の分子機能は未だ明らかにされていない。運動ニューロンにおける ALS2 タンパク質の分子機能を迅速かつ簡便に解析するためには、ALS2 疾患に見られる運動ニューロンの機能異常を再現する *in vitro* 細胞モデル系の構築が必要である。その問題点を解決するために、本研究では、本邦の ALS2 患者及び非患者であるその家族の協力を得て iPS 細胞を樹立することを計画した。

2. 研究の目的

本研究は、日本国内で初めて同定された 2 名の ALS2 患者から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞から運動ニューロンを分化誘導することによって、ALS2 疾患モデル細胞を作出すること、さらに、その細胞表現型を非患者由来運動ニューロンの細胞表現型と比較し、ALS2 疾患モデル細胞特異的にみられる機能異常を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

ALS2-iPS 細胞の樹立

東海大学医学部及び共同研究機関の浜松医科大学、並びに慶應義塾大学医学部の倫理委員会での承認を得て、同意の後に ALS2 患者 2 名より全血サンプルと、皮膚生検サンプルを得た。iPS 細胞の樹立の際には、採取した全血より分離した T 細胞及び線維芽細胞を用いた。これらの細胞に、山中ファクター 4 種 (Oct3/4, SOX2, KLF4, c-Myc) を発現させ初期化を誘導した。各患者、20 から 50 の iPS 細胞株を取得し、幹細胞マーカーの発現レベルの確認後、神経細胞への分化誘導効率を確認した後に以降の研究に供した。

ALS2-iPS 細胞の運動ニューロンへの分化誘導

選択した iPS 細胞株を神経細胞誘導培地で処理し、Neurospheres 形成後、運動神経細胞分化誘導培地で処理し、motor neuron precursor を得た。motor neuron precursor を分散させ、poly-D-Lysine (PDL) 及びラミニ

ンコートしたカバーガラス上に撒き、さらに分化誘導を継続した。最終分化した細胞を固定し、各種運動ニューロンのマーカーの発現を免疫抗体染色によって確認した。ウエスタンブロットに用いた motor neuron precursor は、神経幹細胞を誘導後に、低分子化合物 (Purmorphamine, Retinoic Acid, Dorsomorphin) を添加することによって誘導した。

ALS2 疾患モデル細胞の細胞表現型の評価

現在までに、ALS2 の機能研究を通じて明らかにされてきた細胞内機能に着目して、ALS2 モデル細胞の細胞表現型を評価した。常に比較対象として Control-iPS 細胞 (非患者) 由来の運動ニューロン細胞を用いた。

(1) motor neuron precursor における LC3 の動態解析

iPS 細胞株を神経細胞誘導培地で処理し、Neurospheres 形成後、motor neuron precursor を誘導した。それらの細胞を、Nutrients rich medium 及び Nutrients Free medium で培養し、24 時間後にサンプルを回収した。其々のサンプルから、whole cell extract を調整した。それらのサンプルのウエスタンブロットを行い、anti-ALS2 (Otomo et al., 2003), anti-LC3 抗体 (MBL) 及び anti-beta tubulin (Millipore) を用いて化学発光法により目的タンパクを可視化した。

(2) ALS2 モデル細胞特異的に変調をきたすシグナル伝達経路の同定

iPS 細胞株を神経細胞誘導培地で処理し、Neurospheres 形成後、運動神経細胞分化誘導培地で処理し、motor neuron precursor を得た。motor neuron precursor を分散させ BDNF, GDNF, IGF-1, cAMP, CompoundE を添加した運動神経細胞分化誘導培地で培養し、PDL 及びラミニンコートしたカバーガラス上に撒き、さらに分化誘導を継続した。分化誘導後、14 日-21 日に細胞を回収し、mRNA を抽出した。Total RNA の quality を bioanalyzer 2000 を用いて解析後、Ribosomal index number (RIN) が 9 以上の total RNA から、Encore Complete RNA-Seq Library System (NuGen) を用いてライブラリーを作製した。それらのライブラリーを、Mi-Seq (Mi-Seq ver3 kit) を用いて、シーケンシングした。

4. 研究成果

ALS2-iPS 細胞の樹立

2 名の ALS2 患者由来 T 細胞から iPS 細胞株の樹立を試みたが、十分なクローン数が得られなかった。繊維芽細胞を用いて、再度 iPS クローンの樹立を試みたところ、其々の患者から十分なクローンを取得することが出来た。

ALS2-iPS 細胞の運動ニューロンへの分化誘導

2名の患者より、iPS細胞株を各2クローン選択し、運動ニューロンへ分化誘導した。いずれの患者由来の神経幹細胞も健常者由来神経幹細胞の増殖能には大きな違いがなかった(図1)。また、患者由来iPS細胞からも運動ニューロンマーカーであるHB9/11et-1陽性細胞への分化誘導も可能であった。

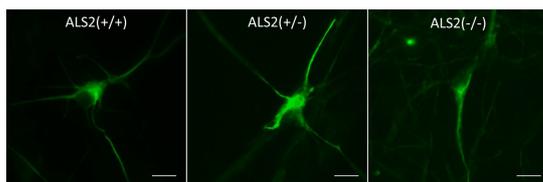


図1. 運動ニューロン分化誘導後、14日目の細胞を示す。細胞は、固定後に運動ニューロンマーカーであるSMI-32抗体を用いて染色した。スケールバーは10μmを示す。

ALS2 疾患モデル細胞の細胞表現型の評価

(1) motor neuron precursor における LC3 の動態解析

運動ニューロンにおける、オートファジー・リソソーム経路の異常の有無を検出するため、motor neuron precursor を用いて、ウエスタンブロッティングによるオートファゴソームマーカー分子 LC3 の動態を解析した。その結果、motor neuron precursor における LC3 型の存在量が、ALS2 患者由来の幹細胞において減少する傾向がみられた(図2)。それに伴って、2型の存在比は増加する傾向がみられた(図2)。しかし、リソソーム阻害剤の添加によって、蓄積する LC3 の量は、健常者由来の神経幹細胞と比較しても変わりがなかった(data not shown)。よって、ALS2 患者由来の神経幹細胞において、オートファジー・リソソーム経路の変調がみられることが示唆された。しかし、これらの結果は、ALS2 ノックアウトマウスから得られた知見である、2型 LC3 の蓄積量の増加と一部一致しないため、さらにクローン数を増やして検討する計画である。

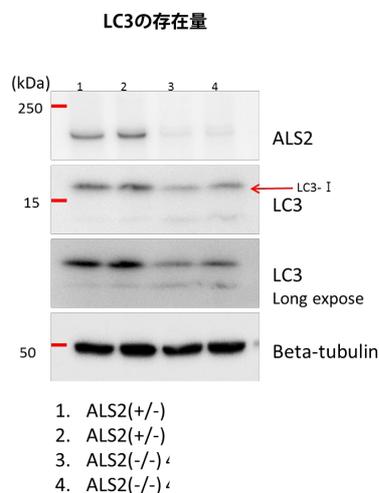


図2. ALS2 疾患及び健常者由来運動 motor neuron precursor における LC3 の存在量の比較を示す。神経幹細胞を Nutrients rich medium で処理した後に、whole cell extract を調整し、それらを用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、ALS2 患者由来 motor neuron precursor において LC3- のシグナル強度が低下する傾向がみられた。それに伴って、2型の存在比は増加する傾向がみられた。

(2) ALS2 モデル細胞特異的に変調をきたすシグナル伝達経路の同定

ALS2 患者由来クローンを培養後、サンプルを回収し、total RNA からライブラリーを作製した。そのライブラリーを用いて、mRNA-Seq 解析を行っている。ALS2 疾患特異的に発現変動がみられる遺伝子を同定し、それらから ALS2 疾患において変調を受けるシグナル伝達経路を推定する計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Fujitani K, Otomo A, Wada M, takamatsu N, Ito M. Sexually dimorphic expression of Dmrt1 and H2AX in germ stem cells during gonadal development in *Xenopus laevis*. FEBS Open bio, 査読有, 2016年, 6巻, 276-284.
2. Suyama K, Watanabe M, Sakabe K, Otomo A, Okada Y, Terayama H, Imai T, Mochida J. GRP78 suppresses lipid peroxidation and promotes cellular antioxidant levels in glial cells following hydrogen peroxide exposure. PLoS One, 査読有, 2014年, 9巻, e86951.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Pan, L., Otomo, A., Koike, M., Uchiyama, Y., Aoki, M., Abe., K., Ishii, T., Yanagawa, T., Shang, H.F., Yoshii, F., Hadano, S., 62/sqstm1 deficiency accelerates motor neuron degeneration in sod1^{h46r} transgenic mice 5-7 December 2014.
2. Ono, S., Otomo, A., Onodera, W., Sato, K., Mitsui, S., Fukuda, M., Hadano, S., The novel ALS2-interacting small G protein Rab17 colocalizes with ALS2 in recycling endosomes. 2015 (26th International Symposium on ALS/MND), 11-13 December, 2015, Orland/USA.

〔図書〕(計 1 件)

1. 大友麻子、白川健太郎、宮嶋裕之、秦野伸二、すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患(祖辻省次,父江元編集),山中出版,2013年,157-165,(分担執筆).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mls.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

<http://www.mnc.u-tokai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大友 麻子 (OTOMO Asako)

東海大学・医学部・助教

研究者番号:50535226