

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05667

研究課題名(和文) 遺伝的背景を揃えたコントロールiPS細胞を用いたALSの細胞種特異的な病態の解明

研究課題名(英文) Elucidating cell type-specific pathology of ALS using isogenic iPS cells

研究代表者

鈴木 直輝 (Suzuki, Naoki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70451599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：家族性ALS家系の集積により13家系のFUS遺伝子変異を同定した。2例のFUS変異ALS患者より皮膚生検から初代培養線維芽細胞を樹立し、連携研究者の施設にてiPS細胞樹立を行った。運動ニューロン分化後にRNAsequenceなどの解析を行ない、2016年にStemCell Reports誌に報告した。さらにゲノム編集技術を用いたアイソジェニックラインの作出も行った。作出したiPS細胞を用いて、運動ニューロンの特徴的な長い軸索突起を培養環境中で再現することを目的として新規マイクロ流体デバイスを活用しRNAseq解析により、細胞体および軸索に発現している遺伝子プロファイルを同定した。

研究成果の概要(英文)：FUS gene mutation in 13 families was identified by accumulation of familial ALS families. Among them, skin biopsy of FUS-related ALS (FUS-ALS) in two families was carried out with consent in accordance with the procedure approved by the Ethics Committee of the University. From this, primary culture fibroblasts were established and iPS cells were established at a collaborating researcher's facility. We analyzed RNA sequence after motor neuron differentiation and reported to Stem Cell Reports in 2016. We also produced isogenic lines using genome editing technology. In order to reproduce the characteristic long axon protrusions of motor neurons in the culture environment using the iPS cells produced, we also examined the condition in a novel microfluidic device. By RNAseq analysis, gene profiles expressed in cell bodies and axons were identified.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

ALS は上位および下位運動ニューロンを選択的・系統的に障害し、呼吸筋を含む全身の筋萎縮をきたす致死性の進行性疾患である。東北大学では superoxide dismutase 1 (SOD1) 変異 ALS モデルラットを開発し、病態の主座である脊髄運動ニューロンに対して髄腔内投与により肝細胞増殖因子(HGF)が ALS 進行抑制効果を持つことを明らかにし、ヒトでの第一相治験を実施中である。また家族性 ALS 遺伝子バンクとして 100 以上の家系の DNA を収集しており、ALS の原因遺伝子としての optineurin の発見(Nature 2010)にも寄与した。剖検例の蓄積も行っており FUS 変異が日本人の家族性 ALS の 11% を占めることを明らかにし、臨床・病理学的な検討(J Hum Genet 2010、J Neuropathol Exp Neurol 2012)を行い病態解明に寄与してきた。

申請者は 2011 年から 3 年間、ハーバード大学幹細胞再生生物学分野の Kevin Eggan 教授の研究室に留学し、運動ニューロンマーカーである HB9 レポーターヒト ES/iPS ラインを運動ニューロンに分化させ FACS で純化し、アストログリアと共培養させる病態モデルを用いた研究を行った。プロスタグランジン系の DP1 阻害剤がヒト運動ニューロンの生存を促進させることを示し、薬剤の効果をマウスでも証明した(Sci Trans Med 2014)。また欧米で最も頻度の高い孤発性および家族性 ALS の原因遺伝子である C9ORF72 の発現解析や表現型解析をマウスを用いて行い(Nat Neurosci 2013)、ヒト細胞・マウスモデルの両面から ALS の治療標的の探索を続けてきた。

モデル動物を用いた病態・治療研究においては遺伝的背景が同一の系統を対照として多くの成果を挙げたが、動物とヒトとの種差が問題であった。ヒト iPS 細胞の樹立は特に神経疾患研究において大きなブレイクスルーとなったが、一方でヒト細胞・組織を用いた研究に根源的に付随している個体の遺伝的背景の違いによるノイズという問題は残った。Eggan 研究室ではゲノム編集技術を用いた相同組み換えにより患者由来 iPS 細胞の変異箇所のみを正常配列に戻したアイソジェニックラインを作成した。患者細胞とともに運動ニューロンに分化させ、細胞死や電気生理学的異常という表現型を *in vitro* でも見出した。同様のストラテジーでアイソジェニックラインを作成し運動ニューロン・アストログリア・骨格筋へと分化させ、正常化した細胞とペアで比較することで、疾患遺伝子による病態をノイズを抑えて検出することが可能になる。

ALS は運動ニューロンの変性が病態の主座

であるが、申請者ら(Sci Trans Med 2014)も含めグリア細胞も病態に関与することが明らかになった。Valocin containing protein (VCP) や heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) の変異例では運動ニューロンに加えて蛋白凝集体の蓄積が骨格筋や脳にも見られ multisystem proteinopathy (MSP) という概念で捉えられるようになってきている。Eggan 研究室は世界で初めてヒト ALS 患者由来 iPS から運動ニューロンを分化させて *in vitro* での表現型を報告した研究室であり、申請者は効率的な運動ニューロンの分化・純化に精通している。更にアストログリアや骨格筋への分化プロトコルの最適化も行ってきた。運動ニューロン及びアストログリア・骨格筋といった個々の細胞種特異的な変化に着目することで ALS および MSP の病態の全体像を捉えることができる。

ALS では DNA/RNA 結合蛋白質の細胞質内異常蓄積が見られ RNA 代謝異常が病態の鍵になると考えられている。FUS は hnRNPA2B1/A1 とともに hnRNP ファミリーに分類され、RNA 代謝の主要な機能分子である。また VCP は蛋白分解経路の重要な分子であり異常蛋白質分解機構の破綻も ALS 病態に共通した機序であると考えられる。申請者らは蛋白分解系のプロテアソームの骨格筋特異的欠損マウスを作成し、プロテアソームが骨格筋のホメオスタシスの維持に必須であることを示してきた実績がある(J Cell Sci 2014)。RNA 代謝異常や蛋白分解異常は神経筋疾患に共通した重要な治療標的になると考えられ、これらの経路に焦点を当てて解析を進めることとした。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロンおよびグリアや骨格筋など病態関連細胞の分子病態を明らかにする。日本で頻度が高く我々が症例を蓄積してきている fused in sarcoma (FUS) 変異 ALS 患者および Multisystem Proteinopathy (MSP) 患者由来の iPS 細胞およびゲノム編集により変異箇所のみを修復したコントロール (アイソジェニックライン) を各種細胞に分化させ、細胞種特異的な病態関連因子をトランスクリプトームおよびプロテオーム解析で抽出する。動物モデルおよびヒト剖検組織との比較により新規病態関連因子の検証を行う。運動ニューロンと他の細胞種の差異に着目することで治療ターゲットとなる新規病態関連因子を見出す。

3. 研究の方法

(1) FUS 変異例および MSP 患者由来 iPS 細胞の樹立

生検皮膚組織より初代培養線維芽細胞を樹立し、OCT4・SOX2・KLF4・L-Myc・shP53等をエピソーマルベクターによって遺伝子導入してiPS細胞を樹立する。既にFUS変異例のiPS細胞樹立に成功しており、東北大学で遺伝子変異同定済みの10家系のFUS変異例を順次樹立する。

(2) 樹立した疾患特異的iPS細胞の品質管理
樹立した複数のiPS細胞株において、外来遺伝子ゲノム挿入部位の確認、未分化マーカーの発現、多分化能を確認する。その結果により各患者由来ヒトiPS細胞ごとに良質なクローンを数個ずつ選択する。マイクロアレイによる比較ゲノムハイブリダイゼーションや一塩基多型を用いたゲノム異常の有無、染色体解析、そして由来患者と同一の遺伝子変異の確認を行う。

(3) アイソジェニックラインの作成
樹立したiPS細胞に対し、変異部位を相同組み換えによって正常配列に置き換えたアイソジェニックラインを研究協力施設との共同で作成する。オフターゲット効果の有無も次世代シーケンサーを用いて確認する。健常者細胞に対する変異導入も試みる。

(4) ヒトiPS細胞から運動ニューロン、アストログリア、骨格筋細胞への分化誘導と表現型の観察
樹立したiPS細胞から運動ニューロンへの分化方法を用いる(Nat Biotech 2011)。骨格筋は胚様体を介した分化誘導法(Cell Stem Cell 2012)を、アストログリアはEggan研究室で開発したヒト細胞分化のプロトコルを用いる。表現型を見出しにくい場合は蛋白分解系の抑制剤やストレス誘導試薬を用いて細胞内封入体形成や細胞死を定量する。電気生理学的評価も行う

(5) 純化した細胞を用いた次世代シーケンサーおよびプロテオミクスによる病態関連分子の探索
細胞種特異的な病態を高感度に検出するため、疾患iPS細胞およびペアとなるアイソジェニックラインから得られた運動ニューロン、アストログリアおよび骨格筋細胞のトランスクリプトームを次世代シーケンサーを用い、線維芽細胞を含めて比較解析する。RNA代謝や蛋白分解経路に着目しつつ病態および組織特異的な標的分子を見出し、免疫染色やウエスタンブロットなど蛋白レベルでも検証する。さらに培養スケールを増やして蛋白量を確保し、プロテオーム解析を行う。見出した変化はノックダウンやレスキュー実験により生物学的意味を解明する。

4. 研究成果

これまで、家族性ALS家系の集積により13家系のFUS遺伝子変異を同定した。そのうち、

1家系2例のFUS関連ALS(FUS-ALS)罹患者より本学倫理委員会で承認された手順に則り同意を得て、皮膚生検を行った。これより初代培養線維芽細胞を樹立し、連携研究者の施設にてiPS細胞樹立に成功した。

樹立したFUS-ALS疾患特異的iPS細胞株の品質管理を行うため、外来遺伝子ゲノム挿入部位の確認、未分化マーカーの発現、多分化能の確認を実施、良質なクローンを選択した。また、由来した罹患者と同一のFUS遺伝子変異確認も行った。運動ニューロン分化後にRNAsequenceなどの解析を行ない、StemCell Reports誌に報告した。

独自の取り組みとして樹立した細胞を用い、運動ニューロンの特徴的な長い軸索突起を培養環境中で再現することを目的として新規マイクロ流体デバイスの条件検討を行った。RNAsequence解析により、細胞体および軸索に発現している遺伝子プロファイルを同定した。さらにFUS変異病態において変化の見られる遺伝子に着目し、機能解析に進んでいる。機能解析での評価項目について、再現性を見るために、酸化的ストレス負荷などをかけて評価における最適条件を調整した。またライブセルイメージングを用いて、FUSが結合するRNAの動きについても評価を行っている。注目した遺伝子の一つXについては、siRNAや阻害剤実験により軸索形態異常が改善することも見出している。ゼブラフィッシュを用いた遺伝子Xの過剰発現実験も行い、個体レベルでの表現型の変化も見出している。

新規マイクロ流体デバイスの利点を活かし、プロテオミクスを含めたオミックス解析を追求し、さらなる新規治療標的を見出していきたい。

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11件)すべて査読あり

1. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Kitajima Y, Ikeda K, Akiyama T, Ono H, Mitsuzawa S, Nishiyama A, Izumi R, Aoki M. Aberrant astrocytic expression of chondroitin sulfate proteoglycan receptors in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res 2017;96:222-233.
2. Tawara N, Yamashita S, Zhang X, Korogi M, Zhang Z, Doki T, Matsuo Y, Nakane S, Maeda Y, Sugie K, Suzuki N, Aoki M, Ando Y. Pathomechanisms of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. Ann Neurol 2017;81:512-525.

3. Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, Aoki M. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2017;53:194 e191-194 e198.
 4. Tian F, Yang W, Mordes DA, Wang JY, Salameh JS, Mok J, Chew J, Sharma A, Leno-Duran E, Suzuki-Uematsu S, Suzuki N, Han SS, Lu FK, Ji M, Zhang R, Liu Y, Strominger J, Shneider NA, Petrucelli L, Xie XS, Eggan K. Monitoring peripheral nerve degeneration in ALS by label-free stimulated Raman scattering imaging. *Nat Commun* 2016;7:13283.
 5. Aizawa H, Hideyama T, Yamashita T, Kimura T, Suzuki N, Aoki M, Kwak S. Deficient RNA-editing enzyme ADAR2 in an amyotrophic lateral sclerosis patient with a FUS(P525L) mutation. *J Clin Neurosci* 2016;32:128-129.
 6. Burberry A, Suzuki N, Wang JY, Moccia R, Mordes DA, Stewart MH, Suzuki-Uematsu S, Ghosh S, Singh A, Merkle FT, Koszka K, Li QZ, Zon L, Rossi DJ, Trowbridge JJ, Notarangelo LD, Eggan K. Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci Transl Med* 2016;8:347ra393.
 7. Intoh A, Suzuki N, Koszka K, Eggan K. SLC52A3, A Brown-Vialetto-van Laere syndrome candidate gene is essential for mouse development, but dispensable for motor neuron differentiation. *Hum Mol Genet* 2016;25:1814-1823.
 8. Ichiyangi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2016;6:496-510.
 9. Akiyama T, Warita H, Kato M, Nishiyama A, Izumi R, Ikeda C, Kamada M, Suzuki N, Aoki M. Genotype-phenotype relationships in familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS/TLS mutations in Japan. *Muscle Nerve* 2016;54:398-404.
 10. Klionsky DJ, ...Suzuki N, ...Zughaier SM. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12:1-222.
 11. Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, Nishiyama A, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Mitsunashi S, Nishino I, Aoki Y, Aoki M. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. *Neurol Genet* 2015;1:e23.
- 〔学会発表〕(計 1 件)
- 第 69 回日本細胞生物学会大会 S12-06 マイクロ流体デバイスを用いた運動ニューロンの軸索病態の解析. 鈴木直輝, 秋山徹也, 川田治良, 舟山亮, 岡野栄之, 中山啓子, 藤井輝夫, 青木正志 (2017 年 6 月 13 日・仙台)
- 〔図書〕(計 1 件)
- 神経内科 Clinical Questions and Pearls 運動ニューロン疾患 鈴木直輝 iPS 細胞を用いた研究や細胞移植療法はどのように行われていますか? 中外医学社 P168-179, 2017 年
- 〔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 該当なし
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
鈴木 直輝 (SUZUKI, Naoki)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号 : 70451599