

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20686

研究課題名(和文) シングルセル解析による球脊髄性筋萎縮症の早期病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of spinal and bulbar muscular atrophy by single cell RNA-seq analysis

研究代表者

飯田 円 (Iida, Madoka)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40815437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体(AR)のCAGリピート伸長による進行性の遺伝性神経筋疾患である。本研究課題では、シングルセル解析を用いてSBMAマウスモデル(AR-97Q)の脊髄における細胞種ごとの遺伝子発現情報を発症前から経時的(3、6、9、13週齢)に取得し、SBMAの早期病態解明を目指した。野生型マウスとAR-97Qマウスを比較すると、発症前の3週齢から特にオリゴデンドロサイトでの変化が大きく、シナプスやイオンチャネル活性に関連する遺伝子の上昇をみとめた。細胞の興奮毒性がSBMAの病態に関与しておりそれが治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はそのアンドロゲン依存性病態に基づき、治療薬として抗アンドロゲン療法であるリュープロレリン酢酸塩が2017年に薬事承認されたが臨床における効果は限定的である。また性機能抑制などの副作用から、発症前のSBMAキャリア男性への使用は困難であり、新たな治療薬開発が望まれている。本研究によりSBMAの発症前にニューロンよりもオリゴデンドロサイトにおいて遺伝子発現変化が大きいことが判明し、従来は知られていなかった病態が明らかとなった。オリゴデンドロサイトの異常が運動ニューロンの変性の起始に強く関わっていると考えられ、疾患に対する新たな治療アプローチを提案することができた。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a progressive hereditary neuromuscular disease caused by the expansion of CAG repeat in androgen receptor (AR). We aimed to elucidate the early pathogenesis of SBMA using single cell analysis. We obtained gene expression profile of each cell type in spinal cords of mouse model of SBMA (AR-97Q) from four different disease stages (3, 6, 9, and 13 weeks of age). Comparing wild-type mice with AR-97Q mice at each week, we found significant changes in oligodendrocytes, from 3 weeks: before onset of disease. It is also revealed that genes related to synapse and ion channel activity were up-regulated in oligodendrocytes of AR mice, suggesting that cellular excitotoxicity is involved in the pathogenesis of early stage of SBMA and that it could be a therapeutic target for SBMA.

研究分野：神経内科学

キーワード：球脊髄性筋萎縮症 シングルセル解析 オリゴデンドロサイト イオンチャネル シナプス 興奮毒性

1. 研究開始当初の背景

運動ニューロン疾患は運動ニューロンの選択的変性と脱落により進行性の筋力低下をきたす難病である。成人発症の運動ニューロン疾患の大多数は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と SBMA であり、いずれの疾患も呼吸不全などにより致命的な経過をたどる。SBMA はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG 繰り返し塩基配列 (CAG リピート) の異常伸長により運動ニューロン変性を呈する遺伝性の神経筋疾患である。変異 AR が運動ニューロンや骨格筋細胞の核内に蓄積し、転写障害を惹起することが病態の中心と考えられているが、分子病態は未だ不明な点が多い (Fig.1)。治療薬としてリユープロレリン酢酸塩が唯一薬事承認されているが、その臨床における効果は限定的である。SBMA は従来下位運動ニューロン疾患として知られてきたが、ニューロンと非神経細胞 (グリアや骨格筋など) の相互作用が病態の形成に重要であることが明らかになっており、有効性の優れた治療法開発に向けて分子病態に対する多面的なアプローチが求められている。

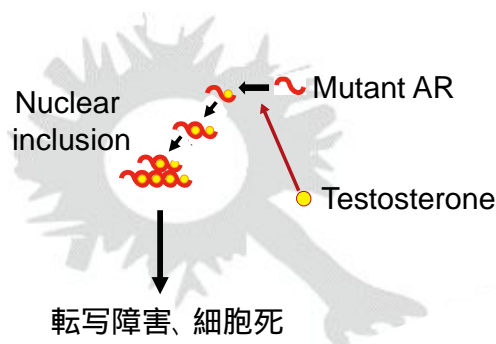


Fig. 1 SBMAの病態

bulk RNA 解析は細胞集団の平均値を示しており、個々の細胞の状態とは異なる場合がある。シングルセル解析では細胞集団内における非一様性の定量化、希少な細胞集団や新しい細胞型の特定が可能となる。また細胞集団間の関連が明らかとなり、多種多様な細胞で構成される神経組織の研究に有用である。これまでの報告の多くは、SBMA の病態について脊髄全体の bulk RNA 解析や蛋白発現解析により検討している。脊髄ではグリア細胞が多くを占めており、蛋白発現に強く影響していると考えられる。SBMA の病態の主座であるニューロンの変化および各細胞腫の変化を同定するために、シングルセル解析を行う。

2. 研究の目的

SBMA マウスモデル (AR-97Q) の脊髄を発症前から経時的に収集して、シングルセル解析により 1 細胞遺伝子発現情報を取得し、特に SBMA の超早期の病態を解明し治療を開発する。神経変性疾患は発症後に治療介入しても病態の改善が難しいことが知られており、SBMA では運動症状が明らかになる前の超早期からの治療介入が望まれる。また神経疾患では、表現型が出現する以前に分子病態が大きく進行していることも近年明らかになってきている。各細胞群を超早期から経時的に解析することにより、早い時期に変化する細胞種と遺伝子が、後にどのように表現型に影響を与えているか解明することが可能となる。

3. 研究の方法 (Fig.2)

発症前 (3 週齢) 発症直前 (6 週齢) 発症前期 (9 週齢) 発症後期 (13 週齢) において SBMA マウスモデルと野生型マウスの脊髄を採取し、シングル核の RNA-seq 解析を行う。各条件についてマウス 4 匹の脊髄を使用する。初期から大きく変化していた細胞種に注目し、その細胞種で大きく変動している遺伝子を SBMA の初期病態に関わる key molecule として同定する。本研究課題ではオリゴデンドロサイトが発症前から野生型と比較して AR-97Q マウスで大きく変化を認めたと。この結果に基づき、マウスのオリゴデンドロサイト前駆細胞である Oli-neu cell にレンチウイルスを用いて AR-97Q もしくは AR-17Q を導入し、オリゴデンドロサイトへと分化させ、さらに 5 α -dihydrotestosterone (DHT) を投与し SBMA オリゴデンドロサイトモデルならびにそのコントロールモデルを作成する。それらの遺伝子発現を解析し、シングルセル解析の結果と比較する。

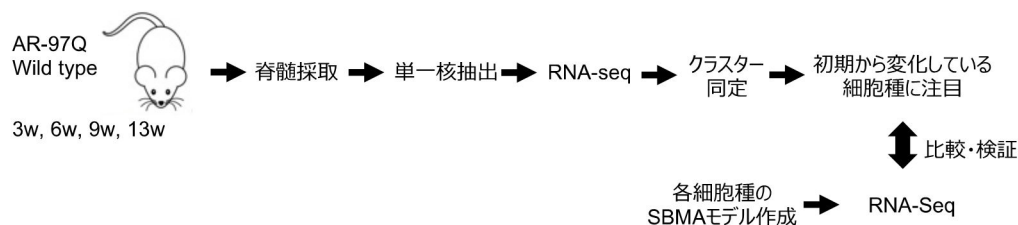


Fig. 2 方法

4. 研究成果

(1) マウス脊髄のシングルセル RNA-seq 解析

10x Genomics 社のキットを用いてシングルセル RNA-seq を行った。合計約 70,000 個の核のデータを取得し、Quality Control の後、クラスタリング、発現変動遺伝子抽出、細胞種の同定を行った (Fig. 3A)。解析した全細胞のうち約 50% がオリゴデンドロサイトであり、既報告と一致していた。また、オリゴデンドロサイトは全ての週齢で野生型マウスと比較して SBMA マウスモデルにおいて全細胞に占める割合が低く、ニューロンは全ての週齢で野生型マウスと比較して SBMA マウスモデルにおいて全細胞に占める割合が高かった (Fig. 3B)。

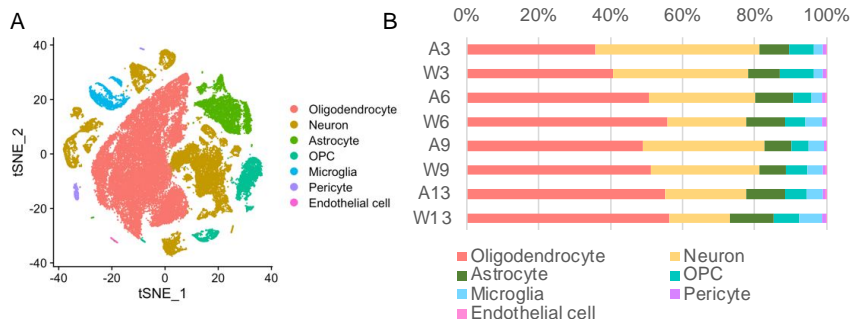


Fig. 3 Single cell解析の概要

(2) 各週齢における各細胞種の変化

各週齢において各細胞種の変化を比較すると、3 週齢から特にオリゴデンドロサイトでの変化が大きいことが明らかとなった (Fig. 4A)。オリゴデンドロサイトのサブクラスタリングを行い、サブクラスタ間において GO 解析と KEGG パスウェイ解析を行った (Fig. 4B)。AR-97Q マウスにおいて特に population が高い OL_1 は、channel activity に関わるサブクラスタであった (Fig. 4C)。また AR-97Q マウスと野生型マウスにおけるオリゴデンドロサイトを比較し発現変動解析を行うと、Asic2 や Kcnp4、DPP6 などのナトリウムもしくはカリウムチャンネルに関わる分子や、Nrxn3 や Grip1 などのシナプスに関わる分子が AR-97Q マウスにおいて上昇していた。

同様の解析を他の週齢のオリゴデンドロサイトでも行うと、6 週齢と 9 週齢においても AR-97Q マウスでシナプスやチャンネル活性に関連する遺伝子の上昇をみとめた。Asic2 や Kcnp4、DPP6 などの遺伝子は引き続き有意に上昇しており、SBMA の病態における key molecule と考えられた。一方、シナプスやチャンネル活性は進行期の 13 週齢で低下していた。

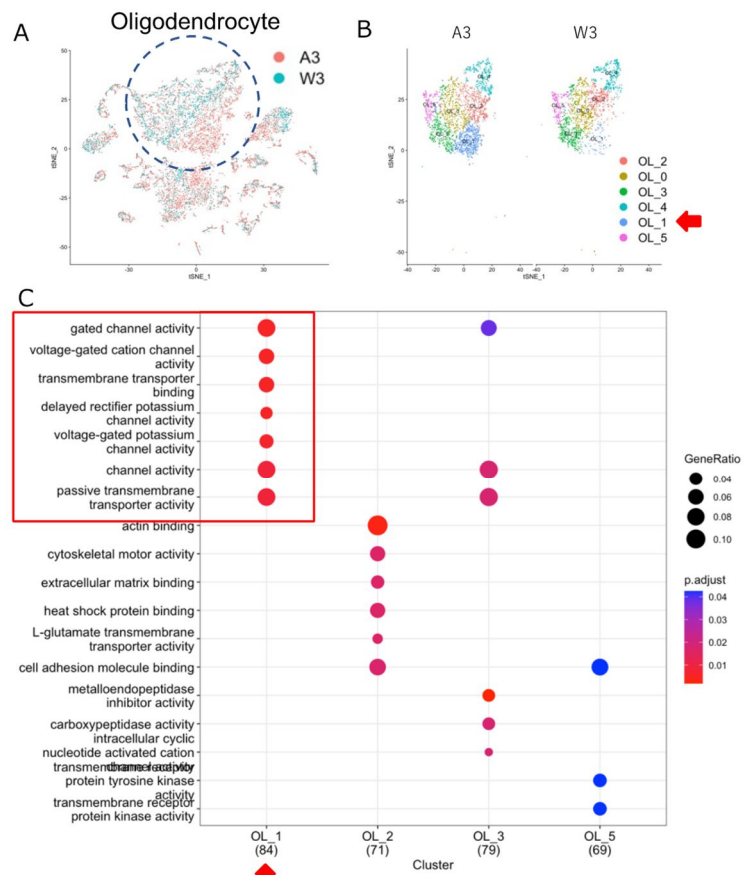


Fig. 4 3週齢におけるオリゴデンドロサイトの変化

(3) SBMA 細胞モデルを用いた検討

SBMA マウスモデルの脊髄を用いたシングルセル解析での結果を検証すべく、Oli-neu Mouse Oligodendroglial Precursor Cell Line にレンチウイルスで AR-17Q もしくは AR-97Q を導入し SBMA オリゴデンドロサイトモデルを作成した。これらの細胞モデルの RNA-seq を行ったところ、AR-97Q 細胞モデルでは AR-17Q 細胞モデルと比較してシナプスに関連する遺伝子が上昇しており、シングルセル解析で SBMA 初期のオリゴデンドロサイトで見られた変化と合致していた。また、SBMA の病態における key molecule と考えられた Asic2 や DPP6、Grip1 は、AR-17Q 細胞と比較して AR-97Q 細胞で上昇していた。

本研究では SBMA マウスモデルの脊髄を用いて、経時的に各細胞の変化を解析した。発症前にニューロンよりもオリゴデンドロサイトにおいて遺伝子発現変化が大きいことが判明し、従来は

知られていなかった病態が明らかとなった。SBMA の神経病理所見における主要所見は脊髄運動ニューロンの脱落であり臨床症状に大きく寄与していることから、オリゴデンドロサイトの異常が運動ニューロンの変性の起始に強く関わっていることが推測された。また、SBMA の初期病態におけるシナプスやチャネル活性の上昇は、SBMA の治療標的となり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Noda Seiya, Murakami Ayuka, Kazuta Tomoyuki, Hirano Satoko, Kimura Seigo, Nakanishi Hiroataka, Matsuo Koji, Tsujikawa Koyo, Yamada Shinichiro, Iida Madoka, Koike Haruki, Kuru Satoshi, Katsuno Masahisa	4. 巻 439
2. 論文標題 Clinical implication of denervation in sporadic inclusion body myositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 120317 ~ 120317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2022.120317	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 Imai Yuta, Iida Madoka, Kanie Kei, Katsuno Masahisa, Kato Ryuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Label-free morphological sub-population cytometry for sensitive phenotypic screening of heterogenous neural disease model cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12250-0	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 Ogura Yosuke, Sahashi Kentaro, Hirunagi Tomoki, Iida Madoka, Miyata Takaki, Katsuno Masahisa	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 Murakami Ayuka, Noda Seiya, Kazuta Tomoyuki, Hirano Satoko, Kimura Seigo, Nakanishi Hiroataka, Matsuo Koji, Tsujikawa Koyo, Iida Madoka, Koike Haruki, Sakamoto Kazuma, Hara Yuichiro, Kuru Satoshi, Kadomatsu Kenji, Shimamura Teppei, Ogi Tomoo, Katsuno Masahisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolome and transcriptome analysis on muscle of sporadic inclusion body myositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 1602 ~ 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.51657	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 Kataoka Mayumi, Sahashi Kentaro, Tsujikawa Koyo, Takeda Jun-ichi, Hirunagi Tomoki, Iida Madoka, Katsuno Masahisa	4. 巻 -
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 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirunagi T, Sahashi K, Tachikawa K, Leu AI, Nguyen M, Mukthavaram R, Karmali PP, Chivukula P, Tohna G, Iida M, Onodera K, Ohyama M, Okada Y, Okano H, Katsuno M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Selective suppression of polyglutamine-expanded protein by lipid nanoparticle-delivered siRNA targeting CAG expansions in the mouse CNS.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.02.007.	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 Yamada S, Hashizume A, Hijikata Y, Ito D, Kishimoto Y, Iida M, Koike H, Hirakawa A, Katsuno M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Ratio of urinary N-terminal titin fragment to urinary creatinine is a novel biomarker for amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurol Neurosurg Psychiatry .	6. 最初と最後の頁 1072-1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2020-324615.	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 Mitra S, Gobira PH, Werner CT, Martin JA, Iida M, Thomas SA, Erias K, Miracle S, Lafargue C, An C, Dietz DM.	4. 巻 26
2. 論文標題 A role for the endocannabinoid enzymes monoacylglycerol and diacylglycerol lipases in cue-induced cocaine craving following prolonged abstinence.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Addict Biol.	6. 最初と最後の頁 e13007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/adb.13007.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Madoka Iida
2. 発表標題 Single cell analysis reveals oligodendrocyte heterogeneity in spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Madoka Iida
2. 発表標題 Single cell analysis reveals oligodendrocyte heterogeneity in spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 CAG Triplet Repeat Disorders Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------