

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07519

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来神経オルガノイドを用いた筋萎縮性側索硬化症の軸索病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of axonal pathomechanism in amyotrophic lateral sclerosis using human iPS cell-derived nerve organoid.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経オルガノイド培養の軸索部分から抽出したRNAシーケンス解析によりFUS変異病態に関連する遺伝子Fos-Bを見出した。遺伝子Fos-Bが運動ニューロンにおけるFUS変異に伴う異常突起の形成に関わっていることを証明し、さらにゼブラフィッシュとヒト剖検脊髄を用いて、Fos-BとALS病態との関連性を示した。これらの成果はEBioMedicine誌に2019年に報告した。2021年にはALSの原因遺伝子であるTARDBP変異iPS細胞を用いてPhox2Bの発現低下を見出しStem Cell Reports誌に受理された。運動ニューロン脆弱性の基盤となる軸索病態について、今後も検討を重ねていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALS患者は日本で約1万人、世界で約35万人と想定され、高齢化に伴い増加傾向にある。人工呼吸器を使用しなければ2-5年で呼吸不全により死亡する予後不良の難病である。根本的な治療法が確立されていない。本研究はALSの初期から病変がみとめられる軸索の病態にフォーカスすることで早期治療介入が可能となると考えた。ALS軸索病態の鍵分子を明らかにすることで、新規治療法開発への道筋がつけられたと考えている。

研究成果の概要(英文)：RNA sequencing analysis of axonal fraction of nerve organoid revealed a gene, Fos-B, associated with the pathogenesis of FUS mutations. We demonstrated that Fos-B is involved in the formation of abnormal axon branching associated with FUS mutations in motor neurons using overexpression and inhibition experiments. Furthermore, using zebrafish overexpression of Fos-B and human autopsy spinal cord, we clarified the relationship between Fos-B and ALS pathology. These results were reported in EBioMedicine in 2019. We wrote a review on omics analysis of axons, which was published in Frontiers in Neuroscience in 2020. In 2021, we found decreased expression of Phox2B using TARDBP mutant iPS cells, the causative gene of ALS, and it was accepted by Stem Cell Reports. We will continue to investigate the axonal pathology underlying motor neuron vulnerability.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 iPS細胞 軸索

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態解析における RNA 結合蛋白の重要性

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。ALS の 10%前後は家族性に発症する。1993 年に superoxide dismutase (SOD1) が ALS の原因遺伝子として同定・臨床遺伝学的解析 (青木ら Nat Genet 93 など) が行われモデル動物を用いた病態研究が盛んとなった。次いで発見された TARDBP (コード蛋白は TDP-43)、FUS は hnRNPA1 とともに RNA 代謝の主要な機能分子である。TDP-43 や FUS は ALS の剖検脳の多くの例で神経細胞内凝集体が認められることから RNA 代謝異常や凝集蛋白毒性は ALS に共通する病態機序であると考えられている。

運動ニューロンを特徴づける長い軸索の機能障害に着目する重要性

これまでの細胞・動物モデルを用いた研究では主に脊髄前角にある運動ニューロンの細胞体における病態が注目されていた。申請者らは ALS の早期治療介入を目指し、運動ニューロン変性がどこから始まるのかを ALS モデル動物を用いて検討した。誘導ラマン散乱顕微法による無染色生体イメージング解析を行い、ALS では脊髄前角の運動ニューロンの病理学的な減少が起こるはるか以前に軸索の形態異常が起こることを見出した (Nat Commun 16)。上記の RNA 結合蛋白は軸索局所にも発現が確認されており、RNA 輸送・局所翻訳障害といった結合分子に伴う異常が想定された。軸索病態に着目することで ALS の新規病態が明らかになると考えた。

ヒト iPS 細胞を用いて遺伝的背景を揃えたゲノム編集細胞同士を比較解析する重要性

動物とヒトの種差の問題を解消したヒト iPS 細胞の樹立は特に生検が難しい神経変性疾患研究において大きなブレイクスルーとなった。一方でヒト細胞・組織を用いた研究に根源的に付随す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。慶應義塾大学・岡野研究室との共同研究によりゲノム編集技術を用いた相同組み換えによって FUS 変異患者由来 iPS 細胞の変異箇所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。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できる。実際に申請者らは FUS 変異 iPS 細胞から誘導した運動ニューロンをエクソアレイで解析し、アイソジェニックライン比較による RNA 発現異常を見出している (Stem Cell Reports 16)。

2. 研究の目的

独自開発した広流路マイクロ流体デバイスを用いたヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの軸索束 (神経オルガノイド) 作成により軸索のみの高収量回収が可能となり、ALS の軸索特異的・運動ニューロン選択的な細胞障害の機序が明らかにできる。ALS の運動ニューロン脆弱性の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

A. FUS 変異における運動ニューロン・軸索部位特異的病態の解明

樹立済みの FUS 変異 ALS 患者由来 iPS 細胞のアイソジェニックラインを用いて運動ニューロンに分化させ、広 (200 μ m)・長 (>1mm) 流路の新規開発したデバイスを用いて軸索の束を形成させる。従来の培養法で得られなかった高収量の軸索サンプルを回収し RNA シークエンスおよびプロテオーム解析を行い、軸索特異的な FUS 変異病態関連分子を見出す。既に樹立している TARDBP および hnRNPA1 変異 iPS 細胞との比較解析による ALS 共通の軸索病態を同定する。さらに運動ニューロン特異的な異常を明らかにするために iPS 細胞を運動ニューロン、ドーパミンニューロン、介在ニューロン等に分化させ、神経オルガノイド培養により ng レベルでの高収量可能な利点を生かしプロテオームで比較解析する。脂質成分の多い軸索からの蛋白抽出においては界面活性剤などの前処理を工夫し、さらに LC-MS のカラム長を伸ばすことで同定できるペプチド数を増やすことに成功している。

B. 運動ニューロンの軸索病態に対する介入実験

培養運動ニューロンの軸索形態異常の評価、変異細胞における病的過興奮の電気生理学的評価についてはマルチ電極アレイ (MEA) による電位定量化法を確立している。局所翻訳異常は複数のエピトープタグおよび抗体をもとにした蛍光プローブを用いることにより、生細胞において 1 分子の mRNA からの翻訳を可視化・定量化する 1 分子ナノイメージングで定量可視化する。上記オミックス解析で見出した標的因子に対する siRNA や阻害剤・活性化剤を用いて変異運動ニューロン病態を改善できるか検討する。予備実験の結果、遺伝子 X に関しては FUS 変異に伴う軸索形態の異常を siRNA で修復できることを見出している。

C. 個体レベルでの検証実験：剖検脊髄およびゼブラフィッシュモデルの活用

運動ニューロン特異的 HB9 プロモータ下に GFP を組み込んだ軸索可視化ゼブラフィッシュモデルを用いる。治療標的候補因子を過剰発現させ運動ニューロン軸索形態の異常や運動機能との相関について検討し、神経オルガノイドで見出した異常が個体の表現型にどのように影響を与えるか明らかにする。FACS により GFP 陽性細胞を分取し運動ニューロンのみを純化することも可能である。さらに FUS 変異を持つ家族性 ALS や孤発性 ALS (自施設例 13 例) の剖検脳を用いて ALS 病態における運動ニューロン変性との関連性についても検討する。

4 . 研究成果

独自開発した広流路マイクロ流体デバイスを用いたヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの軸索束 (神経オルガノイド) 作成により軸索のみの高収量回収が可能となり、ALS の軸索特異的・運動ニューロン選択的な細胞障害の機序が明らかにできるようになった。

パイロット実験では神経オルガノイド培養の軸索部分から抽出した RNA シークエンス解析により FUS 変異病態に関連する遺伝子 X = Fos-B を見出していた。さらに FUS 変異 iPS 細胞由来運動ニューロンの軸索形態異常が遺伝子 Fos-B のノックダウンで改善することを確認し神経オルガノイド培養を用いた軸索病態の解析はアプローチとして有用であることを見出していた。遺伝子干渉だけでなく、遺伝子 Fos-B の機能阻害剤を用いても FUS 変異運動ニューロンにおける軸索の異常突起本数が減少した。一方で、正常運動ニューロンにおいて遺伝子 Fos-B を過剰発現すると軸索の異常突起本数が増加した。これらのことから、遺伝子 Fos-B は運動ニューロンにおける FUS 変異に伴う異常突起の形成に関わっていると考えられた。

さらに個体レベルでの軸索形態異常を評価するため、遺伝子 Fos-B をゼブラフィッシュに過剰発現させて、表現型の変化を検討した。インジェクション後のゼブラフィッシュの脊髄軸索を計測すると異常な軸索のブランピングが見出された。重要なことにゼブラフィッシュの運動機能を Coiling movement で評価したところ、遺伝子 Fos-B の過剰発現により運動機能が低下することを明らかにした。さらにヒト剖検脊髄を用いて、Fos-B と ALS 病態との関連性について明らかにした。これらの成果は EBioMedicine 誌に 2019 年に報告した。神経オルガノイド培養を用いた軸索病態の解析はアプローチとして有用であることを明らかにした。

さらにこの論文をベースとして、軸索のオミックス解析に関する総説を書き、2020 年に Frontiers in Neuroscience 誌に掲載された。2021 年には ALS の原因遺伝子である TARDBP の変異 iPS 細胞を用いて同様な手法により Phox2B の発現が低下していることを見出し Stem Cell Reports 誌に受理された。軸索の耐久性(レジリエンス)の基盤となる恒常性維持機構について、今後も検討を重ねていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suzuki Naoki, Akiyama Tetsuya, Warita Hitoshi, Aoki Masashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Omics Approach to Axonal Dysfunction of Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00194	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 Ono Hiroya, Suzuki Naoki, Kanno Shin-ichiro, Kawahara Genri, Izumi Rumiko, Takahashi Toshiaki, Kitajima Yasuo, Osana Shion, Nakamura Naoko, Akiyama Tetsuya, Ikeda Kensuke, Shijo Tomomi, Mitsuzawa Shio, Nagatomi Ryoichi, Araki Nobukazu, Yasui Akira, Warita Hitoshi, Hayashi Yukiko K., Miyake Katsuya, Aoki Masashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1133-1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjthe.2020.02.006	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 Hayashi Naoki, Atsuta Naoki, Yokoi Daichi, Nakamura Ryoichi, Nakatochi Masahiro, Katsuno Masahisa, Izumi Yuishin, Kanai Kazuaki, Hattori Nobutaka, Taniguchi Akira, Morita Mitsuya, Kano Osamu, Shibuya Kazumoto, Kuwabara Satoshi, Suzuki Naoki, Aoki Masashi, Aiba Ikuko, Mizoguchi Kouichi, Oda Masaya, Kaji Ryuji, Sobue Gen	4. 巻 91
2. 論文標題 Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis patients undergoing tracheostomy invasive ventilation therapy in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 285-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2019-322213	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 鈴木 直輝、西山 亜由美、加藤 昌昭、割田 仁、青木 正志	4. 巻 71
2. 論文標題 増大特集 ALS2019 家族性ALS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1169 ~ 1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201427	査読の有無 無
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 Yu Yujiao, Nakagawa Tadashi, Morohoshi Akane, Nakagawa Makiko, Ishida Noriko, Suzuki Naoki, Aoki Masashi, Nakayama Keiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Pathogenic mutations in the ALS gene C9orf72 cause cytoplasmic mislocalization of Cyclin F and elevated VCP ATPase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3486 ~ 3497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz119	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 Akiyama Tetsuya, Suzuki Naoki, Ishikawa Mitsuru, Fujimori Koki, Sone Takefumi, Kawada Jiro, Funayama Ryo, Fujishima Fumiyoshi, Mitsuzawa Shio, ...Okano Hideyuki, Aoki Masashi	4. 巻 45
2. 論文標題 Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 362 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2019.06.013	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 Takeda Takahiro, Iijima Mutsumi, Shimizu Yuko, Yoshizawa Hiroshi, Miyashiro Mayu, Onizuka Hiromi, Yamamoto Tomoko, Nishiyama Ayumi, Suzuki Naoki, Aoki Masashi, Shibata Noriyuki, Kitagawa Kazuo	4. 巻 39
2. 論文標題 p.N345K mutation in TARDBP in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis: An autopsy case	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 286 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12559	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 Inoue-Shibui Aya, Kato Masaaki, Suzuki Naoki, Kobayashi Junpei, Takai Yoshiki, Izumi Rumiko, Kawauchi Yuuko, Kuroda Hiroshi, Warita Hitoshi, Aoki Masashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Interstitial pneumonia and other adverse events in riluzole-administered amyotrophic lateral sclerosis patients: a retrospective observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 N.A.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-019-1299-1	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 Eura Nobuyuki, Sugie Kazuma, Suzuki Naoki, Kiriya Takao, Izumi Tesseki, Shimakura Naoko, Kato Masaaki, Aoki Masashi	4. 巻 398
2. 論文標題 A juvenile sporadic amyotrophic lateral sclerosis case with P525L mutation in the FUS gene: A rare co-occurrence of autism spectrum disorder and tremor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 67 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.01.032	査読の有無 無
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 Shijo Tomomi, Warita Hitoshi, Suzuki Naoki, Ikeda Kensuke, Mitsuzawa Shio, Akiyama Tetsuya, Ono Hiroya, Nishiyama Ayumi, Izumi Rumiko, Kitajima Yasuo, Aoki Masashi	4. 巻 307
2. 論文標題 Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2018.06.009	査読の有無 無
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 Mitsuzawa Shio, Akiyama Tetsuya, Nishiyama Ayumi, Suzuki Naoki, Kato Masaaki, Warita Hitoshi, Izumi Rumiko, Osana Shion, Koyama Shingo, Kato Takeo, Suzuki Yoshihiro, Aoki Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 TARDBP p.G376D mutation, found in rapid progressive familial ALS, induces mislocalization of TDP-43	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 20 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ensci.2018.04.001	査読の有無 無
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 Watanabe Yasuaki, Nakagawa Tadashi, Akiyama Tetsuya, Nakagawa Makiko, Suzuki Naoki, Warita Hitoshi, Aoki Masashi, Nakayama Keiko	4. 巻 23
2. 論文標題 An Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Mutant of C21ORF2 Is Stabilized by NEK1-Mediated Hyperphosphorylation and the Inability to Bind FBX03	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101491 ~ 101491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101491	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経軸索分岐異常の改善剤	発明者 国立大学法人東北大学等	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019- 60876	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東北大学神経内科 http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/

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	割田 仁 (Warita Hitoshi) (30400245)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	青木 正志 (Aoki Masashi) (70302148)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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