

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03545

研究課題名(和文) 発達期遺伝子制御の異常に基づいた運動ニューロン変性機序の解明

研究課題名(英文) Understanding of defective developmental gene regulation responsible for motor neuron degeneration

研究代表者

佐橋 健太郎 (Kentaro, Sahashi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90710103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)の運動神経障害は、発達異常の機序が想定されている。本研究では、モデルマウス胎仔の運動神経細胞の解析を行い、発生に重要な遺伝子Aの発現低下が見出された。遺伝子Aはモデルマウス培養細胞でみられる障害を改善した。また患者iPS細胞を作成し、同様に検証している。さらに患者髄液中で変化がみられた核酸を見出し、変化は治療により正常化方向に改善し、効果判定の指標となる可能性があった。これに付随し神経発生・伝達に関わる遺伝子の神経障害への寄与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデルマウスや患者サンプルを用いて、脊髄性筋萎縮症(SMA)の発症機序に迫る、神経関連の遺伝子群の変化が見出されており、重症度を規定する因子の同定や、治療効果を判定する指標の開発に今後つながる可能性がある。さらに患者iPS細胞の活用を通じ、上記遺伝子を標的とした新たな治療法の開発と、この知見が、運動神経細胞が障害される他の疾患に対しても応用されることが期待され、学術的・社会的意義の高い成果が上がっている。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of death of spinal motor neurons in SMA remains elusive. Considering a potential developmental component of SMA pathogenesis, we performed gene expression analysis of the neurons isolated from model mouse embryos, and found dysregulation of motor neuron-specific Gene A. Overexpression of Gene A rescued axonal defects and cell death observed in the mouse cell model. Mechanistic analysis using patient iPS cells are ongoing. Next, using patients' CSFs, we identified a cluster of nucleic acids whose expressions are perturbed in SMA and are partially normalized by treatment; so, these may stand as therapeutic biomarkers. Based on this finding, we further uncovered that genes associated with neuronal development and transmission may confer motor neuron vulnerability in SMA.

研究分野：神経内科

キーワード：脊髄性筋萎縮症 運動ニューロン 核酸 髄液

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患では神経細胞内外のタンパク質凝集体の蓄積が機能獲得型の毒性を発揮することが知られているが、近年 RNA レベルでの病態も重要視され、変異 RNA の核内封入体、原因遺伝子アンチセンス RNA、開始コドン有さない複数の読み枠の翻訳による毒性や、ncRNA 異常による発達異常、神経変性が挙げられている。ncRNA は翻訳されないが生理機能を有する RNA であり、遺伝子発現制御に重要であり、そのうちマイクロ RNA (miRNA)、長鎖 ncRNA (lncRNA) は神経発達に関わっている。miRNA は細胞外分泌小胞であるエクソソームにも内包されており、その他 mRNA、タンパク質もエクソソーム中に含まれる。宿主細胞からのエクソソームは別細胞に取込まれ、内包 RNA、タンパク質を介して取り込み先局所の遺伝子発現を制御することで細胞間コミュニケーションを担う。エクソソームによる神経変性タンパク質の伝播機序が知られているが、RNA 介在性の神経病態伝播は見出されていない。またエクソソーム中の分子はバイオマーカーとしての利用価値が注目されているが、神経変性疾患ではエクソソーム中 RNA マーカーは未だ開発されていない。

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は主に SMN1 遺伝子のホモ接合型欠失により発症する、予後不良の常染色体劣性遺伝疾患であり、出生約 1/11,000 人にみられる。ヒトは SMN1 パラログ遺伝子である SMN2 を有するが、エクソン 7 のスプライシングにより全長 mRNA が 10% しか産生されなく、SMA における SMN タンパク質不足を補うことができない。SMA では SMN タンパク質の不足による、snRNP 異常及びスプライシング異常の病態重要性が提唱されている。SMN はユビキタスに発現し全ての細胞の生存に、特に胎生期に不可欠である。単一遺伝子疾患である SMA では SMN 回復治療が可能であり、アンチセンス核酸 (ASO) や低分子化合物による SMN2 スプライシング是正や、ウイルスベクターによる SMN 遺伝子治療が有望な治療戦略とされ、特に ASO 医薬 (薬剤名: ヌシネルセン) は SMA 初の疾患修飾薬として近年認可を受けている。しかしヌシネルセンでは疾患完治には至らず、治療効果が乏しい症例も存在し、SMN 以外の治療標的分子の追求と、疾患進行度や治療反応を判定するバイオマーカーの創出が喫緊の課題である。SMA では、病態の中心である下位運動ニューロン死をもたらす特定の遺伝子スプライシング異常、ncRNA も含め、SMN 欠乏下流の分子経路は明らかになっていない。スプライシング機構、ncRNA は発達遺伝子発現の制御に深く関わり、SMA ではこれらの破綻による神経変性基盤が示唆されているが、胎生 RNA 病態を想定した、胎仔下位運動ニューロンにおける ncRNA (miRNA、lncRNA など)、mRNA 発現及びスプライシングの網羅的解析を通じての発達遺伝子異常や遺伝子発現制御の異常の報告はこれまでない。

2. 研究の目的

本研究では、SMA の細胞自律的な運動ニューロン病態を、従来提唱されているスプライシング異常に加え、発生期異常による神経変性、選択的細胞脆弱性という側面を踏まえた、ncRNA 介在性も含めた遺伝子発現障害に基づく機序の解明を目的とする。特に miRNA による、mRNA の階層的発現制御に注目し、RNA ネットワーク解析を行うことで、病態の端緒となる miRNA、その標的 mRNA、スプライシングの変化を探索する。SMA モデルマウスや患者髄液を用いて、この発症基盤を明らかにし、さらに SMA の RNA バイオマーカーの模索につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SMA 発達期下位運動ニューロンにおける RNA 病態解析

下位運動ニューロンの発達早期での細胞自律的な遺伝子発現破綻に起因する病態の検討に、SMA モデルマウス胎仔下位運動ニューロンの mRNA 発現、mRNA スプライシングの網羅的解析を行い、続いて miRNA-mRNA インタラクトーム解析を通じて、RNA ネットワーク、中心的な病態関連 RNA 分子を同定し、RNA 介在性遺伝子発現制御の異常からの病態解明を目指す。

使用する重症 SMA モデルマウスはマウス内因性 Snn1 遺伝子ノックアウトのもと、ヒト SMN2 導入遺伝子を有しており (Snn1^{-/-} hSMN2Tg/0)、生後早期より運動障害、発育異常がみられ、生後約 10 日で死亡する。胎仔期に脱神経がみられるなど、病態及び治療反動的に SMA を反映し、研究上有用である。モデルマウスは交配にて同胞無症状 Snn1 ヘテロマウス (Snn1^{+/-} hSMN2Tg/0) と 50% ずつの割合で得られ、ヘテロマウスはコントロールとして使用できる利点がある。胎生期 13 日目の胎仔毎より下位運動ニューロンを高純度に回収し、遺伝子型判定後、得られたニューロンの mRNA 発現・スプライシング、miRNA 発現のプロファイリングを網羅的に獲得する。研究代表者らは胎仔下位運動ニューロンの各転写因子の発現上、神経発達が同胞間で必ずしも均一でないことを見出しており、発達段階を考慮に入れた群間比較の必要性が考えられた。また RNA シークエンスによる mRNA 発現・スプライシング解析を開始しており、前者のプロファイリングの獲得が完了し、少なくとも神経、シナプス発生関連遺伝子の、疾患群での有意な発現変化が認められており、実験手法の有効性が確認されている。スプライシング解析を進めるとともに、マイクロアレイによる miRNA の網羅的解析を行い、これらの結果をもとにバイオインフォマティクス手法も応用しつつ、miRNA-mRNA インタラクトーム解析により SMA 病態の RNA パスウェイを見出す。運動ニューロン変性の鍵となる、発達期 mRNA 分子、その制御 miRNA、またスプライ

シング異常及び、RNA 依存的な遺伝子発現制御の予測を行う。次に、RNA の種保存性を確認の上、その動態、機能性について解析する。マウス胎仔下位運動ニューロン RNA 発現及びスプライシング異常を qPCR や RT-PCR で確認し、ニューロンの初代培養系で RNA ノックダウン、遺伝子過剰発現により、RNA 発現変化、神経突起伸長の変化などを観察する。

(2). 患者検体を用いたバイオマーカー開発

SMA 患者における RNA 病態の確認と、検体試料を用いた疾患バイオマーカー開発研究を行う。SMA 患者髄液中エクソソームを分離し、特に病態関連 miRNA の解析を中心に行う。病態関連 mRNA 発現、マイクロアレイによる miRNA の網羅的解析も進め、SMA 重症度、疾患進行度、治療反応性、あるいは予後を判定する生化学的バイオマーカーの創出を目指す。

(3). 患者 iPS 細胞由来下位運動ニューロンにおける RNA 病態検討

iPS 細胞由来分化下位運動ニューロンを樹立し、RNA 病原性機序及び運動ニューロン保護的な RNA 分子の同定を目指す。SMA 研究の優位性として、SMA は単一遺伝子疾患であり、モデルマウスの実用性に加えて、幼弱な表現形質を有する iPS 細胞とその分化ニューロンが、発達病態を検証する上で有用なモデルとなる点にある。そこでマウス胎仔運動ニューロンで得た知見をもとに、個体を利用した研究では困難な、純化したヒト細胞における RNA 病態を、SMA 患者 iPS 細胞由来分化下位運動ニューロンを用いて検証する。マウスと比較し、本モデルは純粋なヒト SMA 遺伝子型を有しており、より臨床に即した情報が取得しやすいと考えられる。本ヒト細胞モデルを用いて、細胞集団の不均一性の可能性や RNA の種保存性を考慮しつつ、マウス胎仔運動ニューロンで見出された病態関連 miRNA の発現と、標的 mRNA の発現・スプライシング変化を、種々の成熟段階において検証を行い、RNA 発現制御の異常を明らかにする。続いて RNA 機能解析あるいは治療研究目的に、アンチセンス核酸やウイルスベクターを用いての標的 RNA ノックダウンあるいは遺伝子導入により、RNA 動態に加え、細胞分化能、細胞形態などに対する影響を評価する。

4. 研究成果

(1). 胎生期 13 日齢のモデルマウス胎仔より脊髄運動ニューロンを回収し、RNA シークエンスによる RNA 発現及びスプライシング解析を行なった。我々は運動ニューロンの胎仔毎のプロファイリング獲得に成功し(SMA 及び同胞正常ヘテロマウス[コントロールマウス]、各 4 匹)、mRNA 発現解析から進めた。予想に反し、SMA において統計学的に有意な発現変化のみられたタンパク質コード遺伝子は 10 種程度しか確認されていないが、脊髄肢節運動ニューロンに特異的に発現し、ニューロン発生・分化に重要な A 遺伝子の発現低下が見出された。単離運動ニューロン及び脊髄を用いてのウェスタンブロットにより、SMA における A 遺伝子産物の発現低下を確認し、胎仔脊髄の免疫染色により前角運動ニューロン特異的な発現低下を確認した(図 1)。また脊髄運動ニューロンの特殊培地下の初代培養では、野生型マウス胎仔脊髄運動ニューロンの A 遺伝子あるいは内因性 Snn1 のノックダウン系において、また SMA マウス胎仔脊髄運動ニューロンにおいて、共通して特徴的な軸索変性が確認され(図 2)、同部におけるオートファジー関連マーカーの亢進の可能性を示す所見がみられた。さらに SMA マウス胎仔脊髄運動ニューロンに対し、A 遺伝子の発現誘導による、軸索変性及びアポトーシス誘導の抑制が観察され(図 3)、SMN 欠乏下流の、細胞自律的な発達障害～神経変性機序を示唆

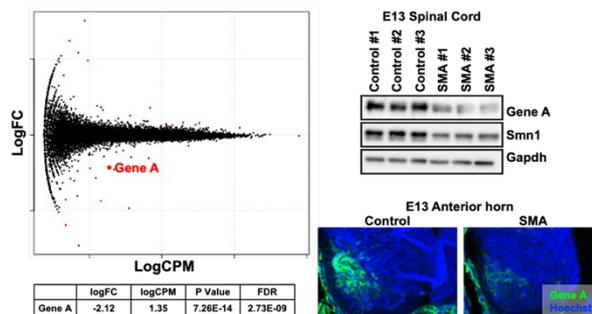


図1. SMAモデルマウス運動ニューロンにおけるGene A異常
左図: RNA-seqにより同定されたGene A発現低下
右図: マウス脊髄及び前角運動ニューロンにおけるGene A発現低下

また脊髄運動ニューロンの特殊培地下の初代培養では、野生型マウス胎仔脊髄運動ニューロンの A 遺伝子あるいは内因性 Snn1 のノックダウン系において、また SMA マウス胎仔脊髄運動ニューロンにおいて、共通して特徴的な軸索変性が確認され(図 2)、同部におけるオートファジー関連マーカーの亢進の可能性を示す所見がみられた。さらに SMA マウス胎仔脊髄運動ニューロンに対し、A 遺伝子の発現誘導による、軸索変性及びアポトーシス誘導の抑制が観察され(図 3)、SMN 欠乏下流の、細胞自律的な発達障害～神経変性機序を示唆

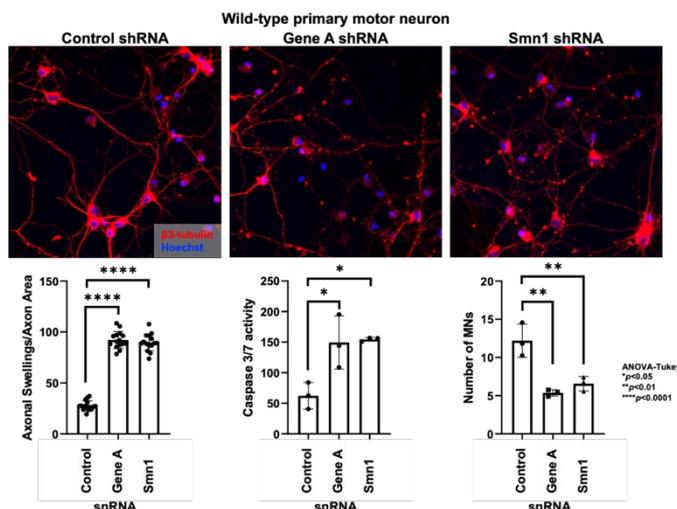


図2. 初代培養マウス運動ニューロンにおける軸索異常
上段: Gene A抑制、Snn1抑制に共通し確認された軸索異常
下段: 軸索局所膨化、カスパーゼ活性上昇、生細胞数低下の定量

する結果が得られた。

(2). ヒト髄液を利用した RNA プロファイリングの取得に関し、ナノワイヤデバイスを用いた RNA 単離方法の改良を行い、パイロット解析当初と比し、高いクオリティ及び収集量の髄液中エクソソーム中 RNA 分画の抽出に成功しており、ほぼ全ての患者髄液検体 (24 例中 26 例) の RNA をマイクロアレイ解析に利用することができた。続いて、アレイ取得データとして global normalization 値が 100 以上の発現を示す数多くの miRNA 群が、ほぼ全ての検体から抽出できており、想定より有意な統計解析の実行が可能となった。

試験的な限定期間 (15 ヶ月) での治療前後の RNA 解析では、ベースライン SMA で発現変化がみられた 18 種もの miRNA 群が、治療によってその全てが正常化方向に発現変化するという、注目すべき結果が確認された (図 4, 5)。

この知見はベースライン解析結果と経時的解析結果との高い関連性を示しており、さらに miRNA 標的遺伝子のエンリッチメント解析では神経新生・発達、シグナル・代謝制御に関する遺伝子群が、アンチセンス核酸医薬の神経治療反応性に寄与することが見出されており (図 6)、この時点で miRNA バイオマーカー候補の妥当性が裏付けられた。以上より、今後、解析症例数の蓄積と長期的な経時的解析を進めていく上で、既に候補 miRNA 群の同定という観点から、期待以上のバイオマーカー開発研究の大きな進展が得られた。

(3). また、iPS 研究に関して、パンデミック下で見込みより遅延していた倫理審査委員会の承認が得られており、研究協力者により複数の患者及び健康者コントロールより iPS 細胞の樹立が行われ、運動ニューロンへの分化誘導が進められており、今後遺伝子発現解析を計画している。

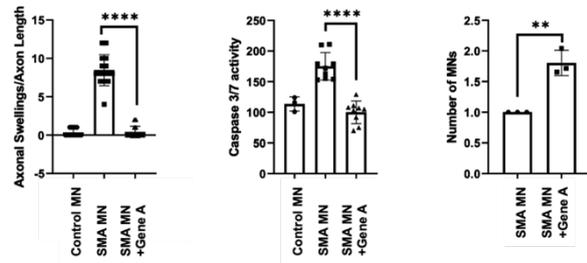


図3. 初代培養SMAマウス運動ニューロンに対するGene A効果
Gene A発現誘導による軸索形態異常、生存能の改善

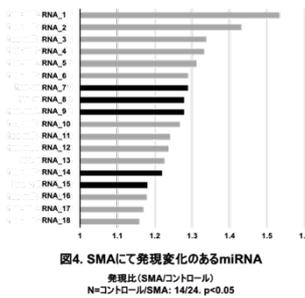


図4. SMAにて発現変化のあるmiRNA
発現比(SMA/コントロール)
N=コントロールSMA: 14/24, p<0.05

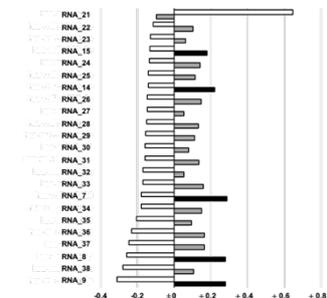


図5. 治療にて発現変化のあるmiRNA
白: 発現変化度(ベースライン治療後)
N=ベースライン治療後: 24/22, p<0.05
黒, グレー: 発現変化度(SMAコントロール)
N=コントロールSMA: 14/24, 黒, p<0.05, グレー, p<0.05

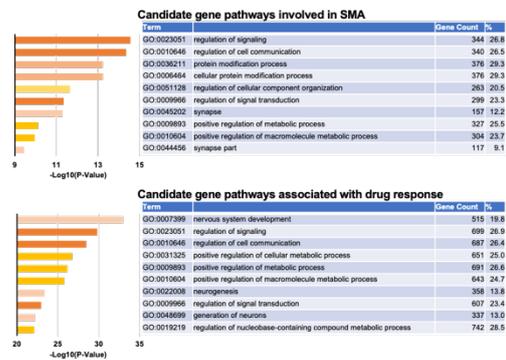


図6. RNA関連の遺伝子エンリッチメント解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐橋健太郎
2. 発表標題 SMAの核酸治療開発とその先
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐橋健太郎
2. 発表標題 Japan REgistry for Adult subjeCTs of spinal muscular atrophy (jREACT-SMA): A study protocol
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐橋健太郎
2. 発表標題 Japan REgistry for Adult subjeCTs of spinal muscular atrophy (jREACT-SMA): A study protocol
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐橋健太郎
2. 発表標題 A longitudinal cohort study of adults with spinal muscular atrophy (jREACT-SMA)
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐橋健太郎
2. 発表標題 Japan REgistry for Adult subjeCTs of spinal muscular atrophy (jREACT-SMA): Baseline characteristics
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
2. 発表標題 神経スプライシング治療に向けた核酸開発
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐橋 健太郎
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症の核酸治療研究から臨床適用へ
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐橋健太郎, 勝野雅央	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 380
3. 書名 脳神経疾患最新の治療2021-2023	

〔産業財産権〕

〔その他〕

脊髄性筋萎縮症（SMA）診療ガイドライン（予定）
 （厚）神経変性疾患領域における基盤的調査研究班
 策定時期：2022年度の発行予定（関連班会議・学会との調整に時間を要しており、発行が遅れている）
 以下ガイドライン項目の作成を担当し、知見を反映させている。
 ・成人発症SMA（IV型）の臨床症状と診断
 ・SMAの治療
 CQ2 SMAに対してヌシネルセン髄腔内投与は有用ですか
 CQ2.2 長期経過アドバンストの患者に対して有用ですか
 CQ2.4 成人の患者に対して有用ですか
 CQ2.6 副作用は何ですか

市民向け公開講座（あいちサイエンスフェスティバル）における講演会。2021.10.15.
 動画公開：<https://www.youtube.com/watch?v=ji0Bb7NmDD8>
 医療Webメディア（メディカルノート）を通じた啓蒙活動。2021.5.11.
<https://medicalnote.jp/contents/200427-002-SE>

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 (Masahisa Katsuno) (50402566)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	井口 洋平 (Yohei Iguchi) (80790659)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (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