

令和 6 年 4 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07411

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症モデルにおける軸索分岐異常の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Molecular Basis of Axonal Branching Abnormalities in Amyotrophic Lateral Sclerosis Models

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では自律神経・感覚神経への分化培養プロトコルを最適化し、マイクロ流体デバイス内での軸索束形成を確認した。マイクロ流体デバイスを用いて細胞体と軸索を分離して運動ニューロンとのAxon-seq比較解析を行い、ALSの病態で障害の少なさと関係する16遺伝子を絞り込んだ。またin vivoの実験系としては、FUS変異ノックインマウスを樹立し、バッククロスの上、安定したコロニーを樹立した。神経筋接合部をプロテオミクスで解析し、新たな病態関連蛋白を見出すことができた。細胞および個体レベルの知見を積み重ねて、ALSの新規治療標的となりうる分子を同定していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのALS病態研究は神経細胞体に注目したものが多く、ニューロンの特徴的な構造である軸索病態に真正面から取り組んだ研究はほとんどなかった。本研究はiPS細胞活用における問題点である発生と老化病態の違いにも留意しつつ、マウスやヒト剖検脳も駆使し、形態と機能の相関を検討し、軸索における恒常性維持機構の各機序の相互作用についても解析を進める。ALSの病態を軸索という構造・機能から捉えなおすことで、新たな治療法開発へとつなげることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we optimized a differentiation culture protocol for autonomic and sensory neurons and confirmed axon bundle formation within microfluidic devices. Utilizing microfluidic devices, we conducted Axon-seq comparative analysis by separating cell bodies and axons to identify 16 genes associated with minimal impairment in motor neurons in the pathogenesis of ALS. Additionally, as an in vivo experimental model, we established FUS mutation knock-in mice and established stable colonies through backcrossing. By analyzing the neuromuscular junctions using proteomics, we were able to identify novel disease-related proteins. By accumulating insights at both cellular and organismal levels, we aim to identify molecules that could serve as novel therapeutic targets for ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS

## 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 RNA 結合蛋白である 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。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。軸索病態に注目することで ALS の新規病態が明らかになると考えた。

ALS 疾患特異的 iPS 細胞由来運動ニューロン解析により軸索病態と鍵分子を発見

申請者らはこれまでに FUS 変異 iPS 細胞由来運動ニューロンを解析し、個体毎の遺伝的背景の違いによるノイズを軽減しうるゲノム編集ラインペアを比較し、異常蛋白凝集が軸索を含む細胞質で起こること、軸索異常分岐という構造異常を発見した (Stem Cell Reports 2016、EBioMedicine 2019)。独自開発したマイクロ流体デバイスを用いて神経オルガノイドを作成することに成功し、AP-1 が過剰発現しており AP-1 阻害剤により軸索病態が改善することを明らかにした (EBioMedicine 2019)。さらに TARDBP 変異 iPS 由来運動ニューロンにおいても軸索分岐異常が見られ、軸索病態の鍵分子も同定している (in revision)。軸索形態の異常は、変異蛋白を過剰発現したゼブラフィッシュでも認めており、ALS の早期病態を反映している可能性がある。一方、軸索形態の異常は軸索発生時期を捉えている可能性もあり、成人発症の神経変性疾患である ALS の病態を本当に反映しているのか、という疑問が残った。

### 2. 研究の目的

共に RNA 結合蛋白である FUS と TARDBP という ALS の重要な二つの遺伝子の変異 iPS 細胞のゲノム編集ペアを活用し、細胞表現型として軸索分岐異常を発見した。また独自開発した広流路マイクロ流体デバイスを用いた軸索束 (神経オルガノイド) により病態の鍵分子を自らの手で明らかにしてきた。細胞種特異性・軸索構造特殊性に注目し、培養系で神経変性病態を再現すること、軸索分画の解析手法を確立し、個体レベルの評価も視野に入れている。

### 3. 研究の方法

A. FUS と TARDBP の変異共通病態：樹立済みの FUS および TARDBP 変異 ALS 患者由来 iPS 細胞のゲノム編集ペアを活用し、広 (~200um)・長 (> 1mm)流路の独自開発した培養デバイスを用いて運動ニューロン軸索の束を形成させ従来の培養法では不可能な ug レベルの高収量の軸索分画で RNA シークエンス (軸索 RNA-seq) を行った。

B. 運動ニューロン特異的病態の解析：iPS 細胞を運動ニューロン・感覚ニューロン・自律神経等に分化させ、軸索 RNA-seq で比較解析し、運動ニューロン特異的な軸索病態を絞り込む。

C. 個体レベルでの検証実験

作成済み・作成中の FUS・TARDBP 変異ノックインマウスモデルを投与実験に供し、AP-1 阻害剤の中枢神経移行性・治療効果を検討する。FUS 変異ノックインマウスが作成不能な場合は他施設で樹立した Tau-ON-hFUS-P525L マウスを研究協力者から導入する。

### 4. 研究成果

これまでに共に RNA 結合蛋白である FUS と TARDBP という ALS の重要な二つの遺伝子の変異 iPS 細胞のゲノム編集ペアを活用し、細胞表現型として軸索分岐異常を発見し報告してきた。また独自の広流路マイクロ流体デバイスを用いた軸索束 (神経オルガノイド) により病態の鍵分子を

自らの手で明らかにしてきた。本研究では自律神経・感覚神経への分化培養プロトコルを最適化し、マイクロ流体デバイス内での軸索束形成を確認した。マイクロ流体デバイスを用いて細胞体と軸索を分離して運動ニューロンとの Axon-seq 比較解析を行い、ALS の病態で障害の少ない ClusterB 内で PHOX2B と同様の変動を呈する 16 遺伝子を絞り込んだ。レンチウイルスベクターを用いたノックダウンによる軸索分岐・神経突起長計測などを行い、軸索における役割を解析中である。また *in vivo* の実験系としては、FUS 変異ノックインマウスを樹立し、バッククロスの上、安定したコロニーを樹立した。神経筋接合部をプロテオミクスで解析し、新たな病態関連蛋白を見出すことができた。さらに FUS マウスをフランスから輸入し、ノックインマウスと比較解析を行い、共通する病態について解析を進めている。さらに FUS 変異を持つ家族性 ALS や孤発性 ALS (自施設 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検討している。細胞および個体レベルの知見を積み重ねて、ALS の新規治療標的となりうる分子を同定していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki Naoki, Nishiyama Ayumi, Warita Hitoshi, Aoki Masashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: seeking therapeutic targets in the era of gene therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 131 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01055-8	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 Suzuki Naoki, Mori-Yoshimura Madoka, Katsuno Masahisa, Takahashi Masanori P., Yamashita Satoshi, Oya Yasushi, Hashizume Atsushi, Yamada Shinichiro, Nakamori Masayuki, Izumi Rumiko, Kato Masaaki, Warita Hitoshi, Tateyama Maki, Kuroda Hiroshi, Asada Ryuta, Yamaguchi Takuhiro, Nishino Ichizo, Aoki Masashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Phase II/III Study of Aceneuramic Acid Administration for GNE Myopathy in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neuromuscular Diseases	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JND-230029	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 Mitsuzawa Shio, Suzuki Naoki, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1527 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.04.021	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 Morimoto Satoru...Suzuki Naoki...Okano Hideyuki.	4. 巻 30
2. 論文標題 Phase 1/2a clinical trial in ALS with ropinirole, a drug candidate identified by iPSC drug discovery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 766 ~ 780.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2023.04.017	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 Li Dan...Suzuki Naoki...Nakanishi M.	4. 巻 3
2. 論文標題 LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-023-00464-4	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	割田 仁  (Hitoshi Warita)  (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
---------	---------