

「神経変性疾患の発症機序及び治療法・治療薬開発に関する研究」

【研究概要】

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) は、上位運動ニューロン (Upper Motor Neuron; UMN) 及び下位運動ニューロン (Lower Motor Neuron; LMN) の選択的変性を特徴とする進行性の神経変性疾患である。ALS 患者の5 ~ 10%は家族性であり、大多数は孤発性である。現在、ALS の発症機序は不明であり、有効な治療法・治療薬はない。疾患に対する効果的な治療法・治療薬を開発するためにも、ALS の発症及び進行の分子機構を解明することは喫緊の課題である。ALS マウスモデル等を用いた分子病態解析により、これまでに酸化ストレス、興奮毒性、アポトーシス、ミトコンドリア機能異常、ER ストレス、RNA 分子動態の異常、グリア細胞活性化、脳血管系異常、凝集タンパク質の集積、細胞内物質移送異常等、様々な発症ならびに疾患進行要因が提唱されてきた。しかし、個別機構のみでALSの発症を説明しようとする試みは全く成功していない。そのため、現在では、ALS は多数の機能的異常が複雑に絡み合って発症するものと想像されているが、実際にはそのような多因子間の相互連関及び各種要因の発症への寄与率等の実態については全く不明である。本研究では、多因子の変調と疾患発症について未だ体系的な解析が全くなされていない現状を打破するため、重要な発症要因の中から、酸化ストレス、タンパク質分解異常、及び細胞内物質移送異常に焦点を絞り、生体レベルでの複数の疾患発症要因の相互連関を明らかにし、最終的にALS 発症の包括的分子機構の解明ならびに治療法の開発を目指す。具体的には、因子間の相互連関及び各種要因の発症への寄与率を明らかにするために、ALS マウスモデル、ならびにiPS細胞由来の神経細胞モデルを用い、分子生物学、生化学及び細胞生物学手法を中心とした解析を遂行することにより、運動ニューロンの機能異常や変性及び細胞死の背景にある分子メカニズムを明らかにする。

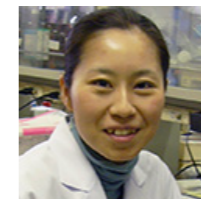
【研究成果】

ALSは、その疾患症状から、四肢の筋力の低下や筋萎縮を伴う典型型、構音障害、嚥下障害を顕著とする球麻痺型、腱反射亢進や痙攣が顕著にみられるUMN型に加え、呼吸筋の麻痺顕著とする呼吸筋型などのサブタイプに分類される。特に、LMNについては、発生学的な分化誘導シグナルを模倣し分化誘導が可能であるため研究に汎用されている。一方で、ALS疾患では共通してLMNのみならず、UMNの変性も伴うが、ALSの疾患研究において、UMNの機能やその分子病態に着目した研究は稀である。そこで我々は、UMN型ALSである常染色体劣性遺伝形式を示す2型ALS (ALS2) に着目し、UMN型ALSの疾患症状を再現するモデル系を構築することを目的として研究を遂行した。まず、均一な遺伝的背景におけるALS2の機能喪失モデルを作製するために、健常者由来のiPS細胞株 (201B7) を用いて、ゲノム編集によってALS2ノックアウト株 (201B7_ ALS2-KO) を作製した。作製した201B7_ ALS2-KO株におけるALS2タンパク質の発現をウエスタンブロットによって解析したところ、タンパク質発現の消失を確認した。次に、201B7及び201B7_ ALS2-KOを用いて、UMNを含む興奮性の大脳皮質神経細胞 (以降iCNとする) と下位運動ニューロン (以降iLMNとする) の分化誘導を可能とするため、それぞれの運命決定にかかわる転写因子を、テトラサイクリンの添加依存的に発現誘導する遺伝子配列を導入し、iCNとiLMNの分化誘導を試みた。テトラサイクリン添加14日後の細胞を神経細胞マーカーで染色した結果、iCN及びiLMNともに、90%以上が神経細胞マーカー (NFH) を発現することを確認した。今回の方法を用いたiCN誘導は、過去に報告がないため、iCNに含まれる細胞種をRNA-sequencing によって解析した結果、その遺伝子発現プロファイルから大脳のグルタミン酸作動性ニューロンが含まれることが示唆された。続いて、201B7及び201B7_ ALS2-KOをそれぞれ、iCNとiLMNに分化誘導し、その細胞生存率を解析した。その結果、iLMNの細胞生存率は、両者の間に違いが見られなかったが、201B7_ ALS2-KOのiCNにおいて、細胞生存率が低下していた (図1)。同時に細胞形態を評価した結果、201B7_ ALS2-KOのiCN においては、スフェロイド様の変性した神経突起が認められた (図2)。よって、ALS2の機能喪失はiLMNよりも、iCNの細胞生存や機能維持に大きな影響を与えることが示唆され、201B7_ ALS2-KOのiCNがUMN型ALSの疾患モデルとなることが示された。

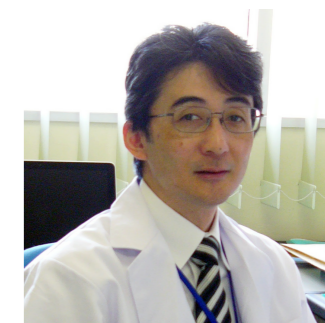
【今後の展望】

本研究を通じて、ALS2の機能喪失は、iLMNよりも、iCNの細胞生存や機能維持に大きな影響を与えることが示された。今後は、神経細胞種特異的なALS2の機能喪失引き起こすシグナル伝達経路を解析するため、RNA-sequencing による網羅的発現解析を行うとともに、iCNとiLMNの神経細胞移動や極性管理を可能とし、共培養を可能とするマイクロデバイスを用い、共培養による神経細胞機能に着目した機能解析を試みる。それらを通じて、iCNの細胞生存や機能維持に重要な役割を果たす分子やシグナル伝達経路の同定を試みる。

創薬・病態解析研究部門



大友麻子
Otomo Asako
生体機能学 講師



プロジェクトリーダー：秦野伸二
Hadano Shinji

医学部医学科基礎医学系生体機能学 教授
大学院医学研究科 研究科長
大学院医学研究科脳・神経疾患研究センター センター長
医学部 副学部長
医学部医学科基礎医学系 学系長

西島恵子 生体機能学 技術職員
高橋博美 生体機能学 技術補助員
大野喜美子 生体機能学 技術補助員
山田優子 生体機能学 事務職員
山口千沙 生命科学統合支援室 技術職員
島倉健人 医学研究科 大学院生 博士課程
村上裕太 工学研究科 大学院生 修士課程

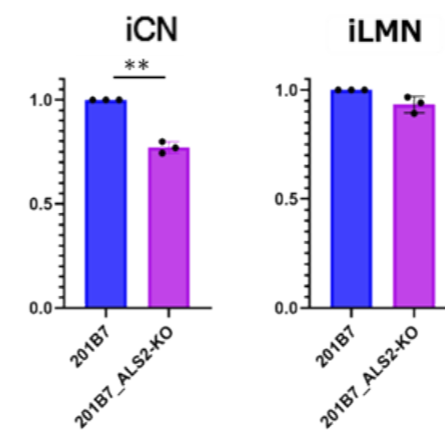


図1 ALSの機能喪失によって、上位運動ニューロンモデル細胞の生存率が低下する。健常者由来iPS細胞株201B7を用いて、ALS2-KO株を作製し、それらに上位運動ニューロン、または下位運動ニューロンの運命決定に関わる転写因子をそれぞれに発現させ、両者のモデル細胞を作製した。分化誘導後、14日後にその細胞生存率をコントロール株とALS2-KO株の細胞生存率を解析した結果を示す。コントロール株のiCNと比較して、ALS2-KO由来iCN細胞の生存率が有意に低下していた。**p<0.01

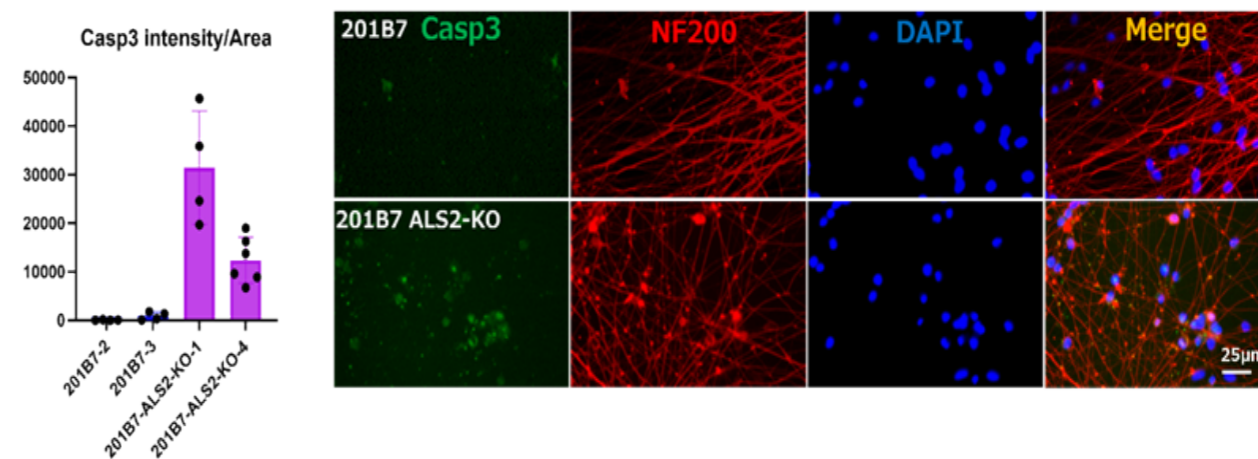


図2 ALS2機能喪失によって、上位運動ニューロンモデル細胞の神経変性とアポトーシスが加速する。健常者由来iPS細胞株201B7を用いて、ALS2-KO株を作製し、それらに上位運動ニューロン、または下位運動ニューロンの運命決定に関わる転写因子をそれぞれに発現させ、両者のモデル細胞を作製した。右のイメージは、分化誘導後、14日後に上位運動ニューロンモデル表現型を免疫抗体染色によって解析した結果を示す。左のグラフは緑色蛍光で染色された、活性化型Caspase-3のシグナルを定量化したグラフを示す。ALS2-KO由来iCN細胞において、Caspase-3の顕著な活性化が認められた。

Selected Papers,

- Sato, K., Suzuki-Utsunomiya, K., Mitsui, S., Ono, S., Shimakura, K., Otomo, A., and Hadano, S. (2023) Central nervous system specific high molecular weight ALS2/alsin homophilic complex is enriched in mouse brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 638, 168-175.
- Jiang, Q., Lin, J., Wei, Q., Li, C., Hou, Y., Zhang, L., Ou, R., Liu, K., Yang, T., Xiao, Y., Hadano, S., and Shang, H. -F. (2023) Genetic and clinical characteristics of ALS patients with NEK1 gene variants. *Neurobiol. Aging.* 123, 191-199.
- Motosugi, N., Sugiyama, A., Otomo, A., Sakata, Y., Araki, T., Hadano, S., Kumasaka, N., and Fukuda, A. (2024) Effect of PCDH19 missense mutation on cell-to-cell proximity and neuronal development under heterotypic condition. *PNAS nexus* 3 (3), pgae060.
- 秦野伸二 (2024) FTD-ALS疾患スペクトラムにおけるオートファジー・エンドリソソーム分解系の異常. *Dementia Japan* 38 (1), 140-147.
- Oka, A., Hadano, S., Ueda, M. T., Nakagawa, S., Komaki, G., and Ando, T. (2024) Rare CRHR2 and GRM8 variants identified as candidate factors associated with eating disorders in Japanese patients by whole exome sequencing. *Heliyon* 10 (8), e28643.