

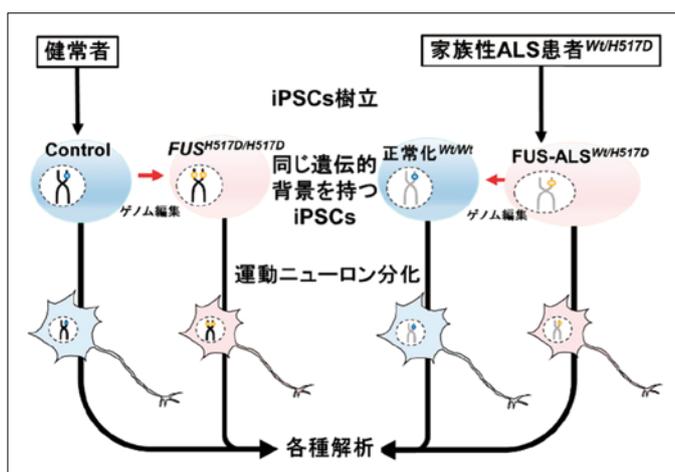
## 軸索の機能障害に着目した 筋萎縮性側索硬化症の病態解明



東北大学神経内科 助教 鈴木 直輝

### 1. 背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は大脳皮質から脊髄、脊髄から骨格筋に至る上位・下位の運動ニューロン（神経）を障害し、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す。東北大学ではALSの原因遺伝子として初めて同定されたsuperoxide dismutase 1（SOD1）遺伝子に変異を持つALSモデルラットを開発し、病態の中心である脊髄運動ニューロンに対して髄腔内投与により肝細胞増殖因子（HGF）という成長因子がALSの病態進行を抑制する効果があることを明らかにしました。現在、ヒトでの第II相治験を実施しています。このようなトランスレーショナルリサーチ（橋渡し研究）の前段階として基礎研究が重要です。京都大学の山中伸弥先生の発見したヒトiPS細胞は特に神経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遺伝的な個人差の違いによるノイズという問題が残っていました。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ました。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することが可能となりました（右図）。



### 2. 研究の目的

私達はALSモデル動物の解析を通じて前角細胞の病理学的な減少が起こる以前に運動ニューロン特有の構造である非常に長い軸索の異常が起こることを見出しました。比較的病初期から変性がみられる軸索の病態に注目することで新たなALSの治療開発が可能となると考えました。またALSの剖検脳での細胞質内凝集物が見られることからFUSやTDP43などのRNA結合蛋白質は病態の鍵になると考えられていました。RNA代謝異常や蛋白分解異常は神経筋疾患に共通した重要な治療標的になると考えられましたので、これらの経路に焦点を当てて軸索障害の病態解析を進めていくこととしました。

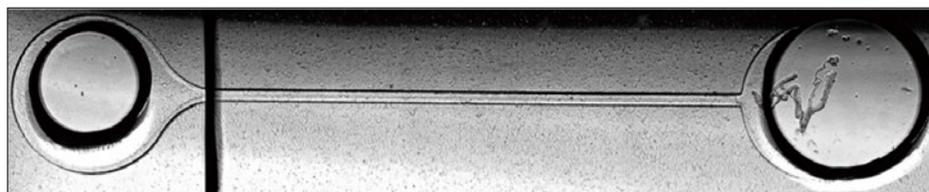
### 3. 方法

FUS遺伝子変異iPS細胞のアイソジェニックラインは樹立していました。ウイルスベクターを用いたレポーター導入により運動ニューロンをFACSで純化する方法も確立していました。今回注目したALS

原因遺伝子産物FUSはTDP43と共にRNA結合蛋白として知られており、ストレス顆粒形成や転写制御に関わると共にmRNAの細胞体・軸索での局在決定にも関与すると考えられていました。今回は神経細胞死に先行する軸索の機能異常に着目し、次世代シーケンサーを用いてALS病態特異的な遺伝子発現変化を網羅的に捉えると共に、ライブセルイメージングを用いた培養環境下での表現型を確立し、新規治療標的の発見につなげることにしました。

#### 4. 研究成果

ヒト運動ニューロン特異的な現象を観察するため、FUS変異ALS患者由来のiPS細胞を用い、正常人との比較では個体間での遺伝的背景の影響が除去できないため、変異部位以外の遺伝的背景を揃えた、TALENによるゲノム編集済み正常化細胞を比較対象としました。FUS変異患者由来のiPS細胞は既に樹立されており、さらに変異部位以外の遺伝的背景を揃えたゲノム編集済み正常化細胞も作成済みでしたので、ストレス負荷による細胞質の異常凝集体形成が再現できることを確認しました。さらに、軸索構造を培養条件下で再現するために、新規開発したマイクロ流体デバイスを用いて運動ニューロンに神経突起伸長を起こさせることに成功しました。長経路 (>400um) スリットデバイスにより樹状突起を区別した上で神経細胞体と軸索とを分離し長期間 (20-40日) 培養することで、神経変性疾患の病態を培養下で再現することとしました。このデバイスにより細胞体・軸索各々からサンプルを回収することができます (下図)。mRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンス解析により、FUS変異のみで見られる遺伝子発現変化を同定することに成功しました。そのうちの遺伝子Xについては特に変異体で発現増加がみられており、この遺伝子Xの発現調整による細胞表現型の変化を現在評価しています。



図：新規マイクロ流体デバイスにより軸索部分のみを回収可能

#### 展 望

今回の研究により筋萎縮性側索硬化症の軸索病態に着目した新たな治療標的を同定して行うことができました。今後は治療標的として有用であることの証明を個体レベルの実験で証明していきたいと思えます。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人難病医学研究財団の皆様により御礼申し上げます。