

主論文の要旨

Unveiling synapse pathology in spinal bulbar muscular atrophy by genome-wide transcriptome analysis of purified motor neurons derived from disease specific iPSCs

疾患特異的 iPSC 細胞から誘導した純化した運動ニューロンにおける
ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析による
球脊髄性筋萎縮症のシナプス病態の解明

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：勝野 雅央 教授)

小野寺 一成

【緒言】

球脊髄性筋萎縮症 (Spinal bulbar muscular atrophy, SBMA) は、成人発症の緩徐進行性の運動ニューロン疾患である。アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG リピートの伸長が原因で発症する。モデルマウスや細胞モデルの解析により、リガンド (テストステロン) 依存的に変異 AR が凝集体を形成し、運動ニューロンを変性させることが示されている。しかしモデルマウスと実際の患者には相違があり、根本的な病態メカニズムは未だ不明である。正確な病態の解析・治療法の開発のためには、より正確に SBMA 患者の病態を反映する疾患モデルが必要とされてきた。この研究では、SBMA 患者から iPS 細胞を樹立し、運動ニューロンに分化誘導・純化して、新しい疾患モデルを作成する。さらに網羅的トランスクリプトーム解析を行い、SBMA における運動ニューロンの病態を明らかにする。

【対象及び方法】

4 名の SBMA 患者と 3 名の健常者の皮膚線維芽細胞から、エピゾーマルベクターを用いて、*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *shTP53* を導入し、iPS 細胞クローンを複数樹立した (Table 1)。樹立した iPS 細胞は運動ニューロンに分化誘導し、解析に用いた。運動ニューロン特異的な解析を行うために、運動ニューロン特異的レンチウイルスレポーター-*HB9^{e438}::Venus* に感染させ、4 週間培養後、フローサイトメトリーを用いて運動ニューロンを純化した。SBMA 患者 iPS 細胞 4 クローン、健常者 iPS 細胞 4 クローンをを用いて、純化前後の運動ニューロンにおいて RNA シークエンスを行い、発現変動遺伝子群 (DEGs) の抽出、遺伝子オントロジー (GO) ・パスウェイの遺伝子セットを用いた Gene set enrichment analysis (GSEA) を行い、SBMA の運動ニューロンにおける病態を探索した。

【結果】

樹立した iPS 細胞は未分化マーカー (Nanog, Oct4) の発現と、奇形腫形成による 3 胚葉分化 (多分化能) により品質評価を行った (Fig. 1)。また、フラグメント解析とサンガーシークエンスにより、樹立した iPS 細胞のほとんどの株で AR 遺伝子の CAG リピート数が変化していないことを確認した (Fig. 2A)。iPS 細胞を運動ニューロンに分化誘導したところ (Fig. 3A)、全ての株で運動ニューロンマーカー (*HB9*, *ISL-1*)、成熟マーカー (*ChAT*, *AR*) の発現が観察され、運動ニューロンへの分化が確認された (Fig. 3B, C)。次に、運動ニューロン特異的レンチウイルスレポーターを感染させ、4 週間後にフローサイトメトリーを用いて、Venus を高発現する High positive fraction (HPF) を分取したところ (Fig. 4A)、運動ニューロンマーカー (*HB9*, *ISL-1*, *ChAT*) は Negative fraction (NF) と比較して有意に高発現し、アストロサイトのマーカー (*GFAP*) は有意に発現が低下し、健常者と患者でほぼ同等の発現レベルを示したことから、運動ニューロンの純化と分化誘導効率のクローン間差の軽減に成功したと考えられた (Fig. 4B, C)。そこで、SBMA 患者・健常者由来運動ニューロン (純化前・後)

で RNA シークエンスを行い、DEGs の抽出 (Fig. 5)、GO・パスウェイ遺伝子セットで GSEA を行ったところ、SBMA において、シナプス、神経伝達物質、エキソサイトーシス、エピジェネティクス関連カテゴリの発現上昇と、小胞体関連カテゴリの発現低下が認められた (Fig. 6A, B, C)。各カテゴリから特に発現の倍率変化の高い遺伝子群に着目すると、シナプス機能に関わる遺伝子群 (*SYT6*, *SYT9*, *RSPO2*, *WNTs*) が抽出され、SBMA の病態にシナプスが深く関わることを示唆された (Fig. 6D)。

【考察】

SBMA では、体細胞、生殖細胞における AR 遺伝子の CAG リピート数にほぼ変化はなく、表現促進現象もまれである。また iPS 細胞の樹立過程では CAG リピート数の変化は認めず、その安定性は患者とよく一致していた。一方で Huntingtin 遺伝子の CAG リピート伸長により発症するハンチントン病 (HD) や、DMPK 遺伝子の CTG リピート伸長により発症する筋強直性ジストロフィー (DM1) では、体細胞におけるリピートの不安定性と表現促進現象が知られているが、iPS 細胞の樹立過程において必ずしもリピートの不安定性を示すわけではなく、iPS 細胞の樹立と患者におけるリピートの不安定性の相関ははっきりしない。

RNA シークエンスで有意差のあった遺伝子群には、過去に SBMA の病態への関与が報告されている *CALCA*、*FAM135B* が含まれており、SBMA の疾患モデルとしての再現性が確認された。IGF-1 は SBMA モデルマウスや細胞において表現型を改善することが報告されており、NT-3 は運動ニューロンの生存を促進し得ることから、SBMA 患者由来運動ニューロンでの発現上昇は、代償的なネガティブフィードバック機構によると考えられた。SBMA モデルマウスでは神経筋接合部 (NMJ) の病態が示されている。今回の GO やパスウェイ解析では、SBMA でのシナプス関連分子の発現上昇がみられ、NMJ の病態への関与が示された。また、グルタミン酸受容体 (*GRID2*, *GRIK1*, *GRM2*) や、G タンパク質共役受容体のシグナルを不活化する RGS タンパク質 (*RGS4*, *RGS5*) の発現上昇が示され、病態への関与が示唆された。さらに、シナプス小胞の形成に必要な不可欠なシナプトタグミン (*SYT6*, *SYT9*)、NMJ の形成に必要なアセチルコリン受容体のクラスターリングを促す *RSPO2* や WNT リガンドの発現上昇、また NMJ の形成を抑制的に制御する *WNT3A* の発現上昇がみられ、NMJ 形成異常の原因となっている可能性が示唆された。これらの変化は、NMJ 変性の結果、ネガティブフィードバック機構によりもたらされている可能性も考えられる。これらの結果から、運動ニューロン側から NMJ の病態に関与する分子変動が明らかになり、SBMA における NMJ 病態の重要性が示唆された。

【結論】

SBMA 患者由来 iPS 細胞由来運動ニューロンを用いた疾患モデルを作成し、トランスクリプトーム解析により、未だ詳細な検討が行われていない SBMA のシナプス病態が浮き彫りになった。今後は NMJ に着目した病態解明や治療法の開発が期待される。