

2021年5月28日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学  
慶應義塾大学医学部

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の新しい病態関連候補因子を発見  
- 患者由来 iPS 細胞を用いた運動ニューロン選択的変性のメカニズム解明へ期待 -

【発表のポイント】

- 家族性筋萎縮性側索硬化症患者から樹立したヒト iPS 細胞<sup>注1</sup> 由来の運動ニューロンにおいて、*PHOX2B*<sup>注2</sup> 遺伝子の発現が減少していることを見出した。
- モデル動物(ゼブラフィッシュ)において *PHOX2B* の発現を抑制すると、神経突起長が短縮し、運動機能が低下した。
- *PHOX2B* 遺伝子およびその関連分子が筋萎縮性側索硬化症の新しい治療標的となる可能性が示された。

【研究概要】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、全身の運動や呼吸に必要な筋肉がやせて弱っていく成人発症の疾患です。呼吸補助をしなければ3~5年で死にいたる重篤な疾患であるにもかかわらず、根本的な治療法はなく、病態解明が求められています。東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野の光澤志緒(みつざわ しお)大学院非常勤講師、鈴木直輝(すずき なおき)助教、割田仁(わりた ひとし)院内講師、青木正志(あおき まさし)教授および、慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之(おかの ひでゆき)教授らの研究グループは、ほとんどのALS患者の脳・脊髄で蓄積するTDP-43タンパク質を産生する*TARDBP*遺伝子に変異を持つ家族性ALS患者から樹立したiPS細胞由来のALS運動ニューロンにおいて、発現が減少している新しい遺伝子*PHOX2B*を発見しました。*PHOX2B*の発現を人為的に抑制すると、健常者iPS細胞由来の運動ニューロンの神経突起の長さが減少し、ゼブラフィッシュでは脊髄運動ニューロン軸索の短縮と運動機能の低下も起きました。ALSにおいて運動ニューロンが選択的に変性してしまうメカニズムの一端が*PHOX2B*の発現減少で説明できると考えられます。

本研究結果は2021年5月27日午前11時(現地時間、日本時間5月28日午前1時)で、オープンアクセス学術誌「Stem Cell Reports」に掲載されました。

## 【研究内容】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、全身の運動ニューロンが変性する疾患です。呼吸筋を含めた全身の筋肉がやせ衰えて、呼吸不全で死に至る重篤な疾患ですが、病態は解明されておらず、根本的治療法は確立されていません。10%の患者が遺伝子に変異を持つ家族性 ALS であり、多くの原因遺伝子が特定されています。

今回、本研究グループは、家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞を用いて ALS 運動ニューロンで発現が減少している新しい因子を発見しました。

2019 年に、本研究グループは、ALS 患者の運動ニューロンの細胞体から筋肉へ伸びる軸索 (電気信号を伝える神経線維部分) と呼ばれる突起部分が発症早期から障害される点に着目し、日本人で 2 番目に多い家族性 ALS の原因遺伝子である *FUS* 遺伝子に変異を持つ ALS 患者由来の iPS 細胞から運動ニューロンを作製し、軸索の形態に異常が生じることと、その軸索形態異常に *Fos-B* 遺伝子がかかわることを報告しました。今回の報告では、ほとんどの ALS 患者の脳・脊髄で蓄積する TDP-43 タンパク質を産生する *TARDBP* という家族性 ALS の原因遺伝子に着目し、家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞を樹立しました。家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞、または健常者由来の iPS 細胞へ *TARDBP* 遺伝子変異をゲノム編集技術で組み込んだ細胞を、運動ニューロンに分化誘導すると、神経突起長が健常者由来運動ニューロンよりも短くなることが確認されました。

軸索病態の解析のために、細胞体と軸索を分離して培養することができるマイクロ流体デバイス<sup>注3</sup>を用いて、運動ニューロンの軸索部分を回収し、RNA シークエンス<sup>注4</sup>を行い、*TARDBP* 変異運動ニューロン軸索で発現が減少している *PHOX2B* を同定しました。*PHOX2B* のメッセンジャーRNA (mRNA)<sup>注5</sup> は *TARDBP* 遺伝子が産生する TDP-43 というタンパク質と結合し、*TARDBP* に変異を持つ運動ニューロン内では早く消失しました。*PHOX2B* の発現を人為的に抑制すると、健常者由来運動ニューロンの神経突起長が短縮し (図 1)、モデル動物であるゼブラフィッシュにおいて *PHOX2B* の発現を抑制すると、脊髄運動ニューロンの軸索が短縮し、運動機能も低下することがわかりました (図 2)。以上から *PHOX2B* の発現低下が *TARDBP* 遺伝子変異による運動ニューロン突起長短縮や個体における運動機能低下という病的表現型につながることを発見しました。*PHOX2B* は ALS 進行期にも比較的保たれる動眼神経や自律神経などの運動ニューロンでない細胞では発現が高いことから、*PHOX2B* の発現減少が ALS において運動ニューロンが選択的に変性してしまうメカニズムの一端を説明しうると考えています。

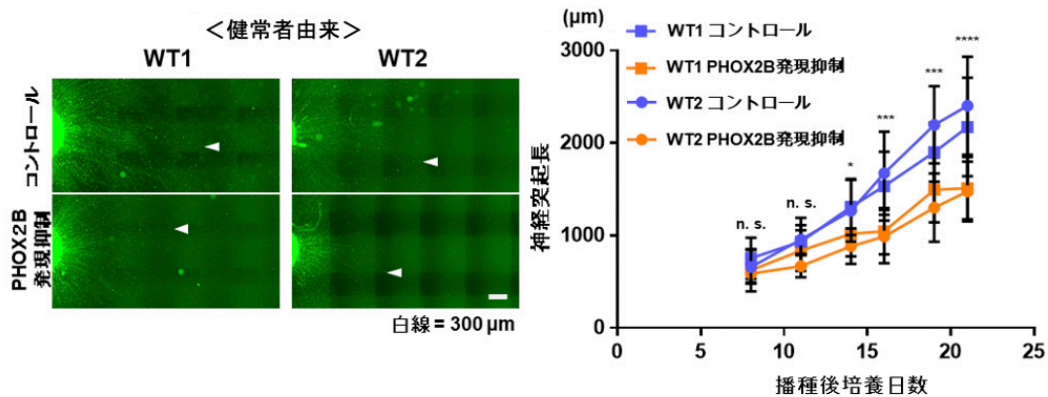


図 1. iPSC 細胞由来運動ニューロンの *PHOX2B* 発現抑制実験  
2 種類の健常者由来運動ニューロン (WT1、WT2) の *PHOX2B* の発現抑制を行うと、コントロールと比較して、神経突起長が短縮する。白い矢印は細胞体の塊であるスフェアから最も遠位の神経突起端。

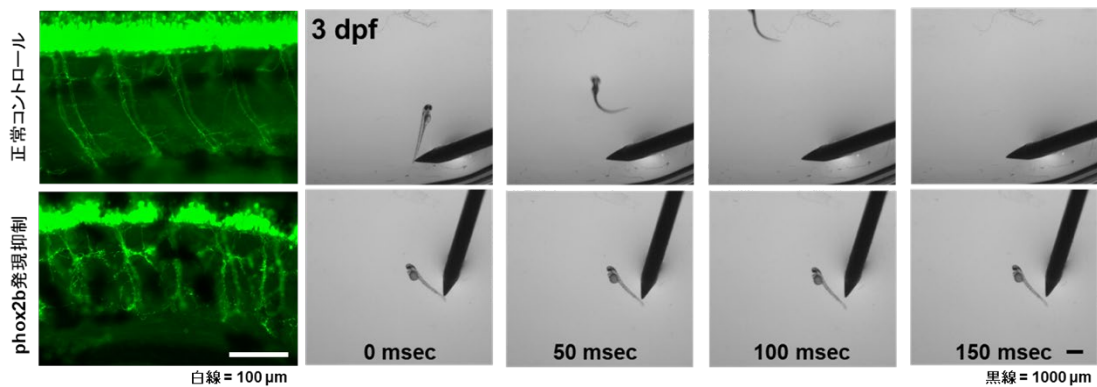


図 2. ゼブラフィッシュの脊髄運動ニューロン軸索長と運動機能の評価  
受精後 3 日目 (day post-fertilization, dpf) のゼブラフィッシュの *phox2b* 発現抑制実験では、脊髄運動ニューロンの軸索長が正常コントロールと比べて短くなり (左下パネル)、ゼブラフィッシュの尾を刺激した際の反応性も低下する (右下パネルに経時的に表示)。

**支援:** 本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム」、科学技術振興機構 (JST)/AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」、厚生労働省 (MHLW)/AMED 難治性疾患実用化研究事業「筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 新規治療法開発をめざした病態解明」、AMED 希少・難治性疾患実用化研究事業、文部科学省・東北大学病院臨床研究推進センター (CRIETO) 若手研究 (A) (15H05667)、基盤研究 (C) (18K07519)、基盤研究 (B) (25293199、16H05318、20H03586)、日本学術振興会 JSPS 科研費 JP20K16593、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業 (難治性疾患政策研究事業)「神経変性疾患領域における基盤的調査研究班」、かなえ医薬振興財団、「生命の彩」ALS 研究助成基金、武田科学振興財団、せりか基金、難病医学研究財団、東海大学教育システム総合研究機構の調査研究事業の支援を受けて実施されました。

#### 【用語説明】

- 注1. iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell): 人工多能性幹細胞ともいわれる。体細胞へ初期化因子を強制発現させることで、いくつもの目的細胞へ分化誘導できる多能性を獲得した細胞のこと。
- 注2. *PHOX2B* (paired mesoderm homeobox protein 2B): 神経系細胞で主に発現する転写因子タンパク質で、発生段階で神経堤の形成に必要とされており、神経前駆細胞の神経細胞への分化に関与している。自律神経細胞などに発現が多いが、運動ニューロンでは、胎生期マウスの頭蓋内および上位頸髄の下位運動ニューロンに蛋白発現があり、今回、成体ラットの腰髄運動ニューロンにも発現していることを確認した。これまで ALS との関連は見出されていない。
- 注3. マイクロ流体デバイス: ここでは、ニューロン培養用デバイスを指す。両脇のチャンバーの間にあるマイクロ流路にはスフェアという塊状の細胞体は入ることができず、軸索束のみが対側へ向かって伸長するためニューロンの細胞体と軸索を分離して培養できる。
- 注4. RNA シークエンス: RNA を網羅的に読み取る手法およびその発現情報の解析方法。遺伝子が働く過程で、DNA の情報が mRNA に転写されて、さらにタンパク質に翻訳される。RNA シークエンスによって、mRNA が検出された遺伝子、つまり働いている遺伝子を網羅的に同定することができる。
- 注5. メッセンジャーRNA (mRNA): DNA 上の遺伝子からタンパク質が産生される過程で、遺伝子情報はいちど RNA という物質にコピー (転写) され、そのコピーを元に、タンパク質が合成 (翻訳) される。この RNA をメッセンジャー (伝令) RNA と呼ぶ

**【論文題目】**

Title: Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with *TARDBP* mutations

Authors: Shio Mitsuzawa, Naoki Suzuki, Tetsuya Akiyama, Mitsuru Ishikawa, Takefumi Sone, Jiro Kawada, Ryo Funayama, Matsuyuki Shiota, Hiroaki Mitsuhashi, Satoru Morimoto, Kensuke Ikeda, Tomomi Shijo, Akiyuki Ohno, Naoko Nakamura, Hiroya Ono, Risako Ono, Shion Osana, Tadashi Nakagawa, Ayumi Nishiyama, Rumiko Izumi, Shohei Kaneda, Yoshiho Ikeuchi, Keiko Nakayama, Teruo Fujii, Hitoshi Warita, Hideyuki Okano, and Masashi Aoki

タイトル: *TARDBP* 変異を持つ運動ニューロンにおける *PHOX2B* の安定性低下により軸索伸長障害が生じる

著者名: 光澤志緒、鈴木直輝、秋山徹也、石川充、曾根岳史、川田治良、舟山亮、城田松之、三橋弘明、森本悟、池田謙輔、四條友望、大野堯之、中村尚子、小野洋也、小野理佐子、長名シオン、中川直、西山亜由美、井泉瑠美子、金田祥平、池内与志穂、中山啓子、藤井輝夫、割田仁、岡野栄之、青木正志

雑誌名: Stem Cell Reports

DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.04.021.

**【お問い合わせ先】**

**(研究に関すること)**

東北大学大学院医学系研究科神経内科

教授 青木正志(あおきまさし)

助教 鈴木直輝(すずきなおき)

TEL: 022-717-7189

FAX: 022-717-7192

E-mail: aokim@med.tohoku.ac.jp

E-mail: naoki@med.tohoku.ac.jp

慶應義塾大学医学部生理学教室

教授 岡野栄之(おかのひでゆき)

TEL: 03-5363-3746

FAX: 03-3357-5445

E-mail: hidokano@a2.keio.jp

**(取材に関すること)**

東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室

東北大学病院広報室

TEL: 022-717-8032

FAX: 022-717-8187

E-mail: press@pr.med.tohoku.ac.jp

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課: 山崎・飯塚

TEL: 03-5363-3611

FAX: 03-5363-3612

E-mail: med-koho@adst.keio.ac.jp