

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 神経・筋相互作用を標的とした運動神経疾患の病態解明と治療開発  
(英語) Pathophysiological analysis and drug discovery for motor neuron diseases using iPSC-derived neuro-muscular co-culture model

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 岡田 洋平  
(英語) Yohei Okada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 愛知医科大学・加齢医科学研究所神経 iPS 細胞研究部門・教授  
(英語) Aichi Medical University・

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等 (和文)

球脊髄性筋萎縮症 (Spinal bulbar muscular atrophy: SBMA) は、成人男性に発症する緩徐進行性の運動ニューロン変性疾患である。これまでのモデルマウスを用いた解析により、ポリグルタミン鎖 (CAG リpeat) の異常伸長した変異アンドロゲン受容体 (AR) が、リガンドであるテストステロン依存的に核内に移行して凝集体を形成し、神経変性をもたらすと考えられてきた。しかし、解析に用いられてきたモデルマウスは患者の病態を完全には再現し得ず、また唯一の治療薬である LH-RH アナログ (リュープロレリン) による抗アンドロゲン療法は、主に発症早期の患者でのみその有効性が認められてきたことから、より患者に即したヒト疾患モデルを用いた新規治療薬の開発が求められてきた。また、近年、SBMA において骨格筋病態や神経・筋相互作用が神経変性に重要な役割を果たすことが示唆されており、病態解明や治療開発における重要な標的として注目されている。そこで、本研究では、SBMA 疾患特異的 iPSC 細胞から誘導した運動ニューロンと骨格筋の共培養により、SBMA における神経・筋相互作用や神経筋接合部 (Neuromuscular junction: NMJ) の病

態を、より正確に再現し得る新たな疾患モデルを作成し、その病態解明と新たな治療標的の探索を行った。

まず、iPS 細胞から、より成熟した運動ニューロンと骨格筋の分化誘導法の開発を行った (Okada et al., 2021, Rashid et al., 2023)。この方法で誘導した運動ニューロンは、成熟マーカーを高発現するのみならず、電気生理学的解析でも成熟ニューロンの性質を示した。また、骨格筋への分化誘導においては、過去に報告されているドキシサイクリン誘導性に *MYOD1* を発現させる分化誘導法を改良し、ドキシサイクリン誘導性 *MYOD1* を iPS 細胞に導入後に Puromycin による薬剤選択を行うことで、クローン選択を行わずにバルク培養で *MYOD1* 発現 iPS 細胞を取得し、迅速、高効率に骨格筋へと分化誘導する方法を確立した。この方法を用いて誘導した骨格筋は、クローン選択により取得した複数の *MYOD1* 発現 iPS 細胞由来骨格筋の平均的分化プロファイルを示したことから、従来問題となってきたクローン間の表現型のばらつきを解決できる可能性が示唆された。さらに、この方法を用いて、サルコメア構造を示し、電気刺激による筋収縮が得られる機能的な三次元骨格筋組織へと分化誘導することに成功した (Rashid et al., 2023)。

次に、このようにして iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンと骨格筋を用いて、高効率に NMJ を形成し得る共培養システムを構築した。この神経・筋共培養システムでは、従来よりも NMJ 形成効率が約 4 倍高く、また電子顕微鏡解析により NMJ に特徴的なプレシナプスのシナプス小胞 (synaptic vesicles: SV) やポストシナプスのシナプス高肥厚 (post-synaptic density: PSD) などの微細構造を捉え、電気生理学的解析により NMJ のシナプス活動を検出することにも成功した。

そこで、この神経・筋共培養システムを用いて、SBMA 疾患特異的 iPS 細胞、および健常者 iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンと骨格筋とを共培養し、病態解析を行なった。まず、骨格筋単独での解析を行なったところ、患者と健常者では分化誘導効率や成熟度に顕著な差は観察されなかったが、患者由来骨格筋では、骨格筋関連分子の発現上昇や、速筋の減少を示唆する遺伝子発現変化が観察され、患者骨格筋病理やモデルマウスで報告されている表現型とよく一致していることを確認した (Rashid et al., 2023)。次に、SBMA 疾患特異的 iPS 細胞、または健常者 iPS 細胞から誘導した運動ニューロンと骨格筋とを共培養し、詳細な解析を行なったところ、神経変性や NMJ の減少のみならず、NMJ の微細構造や NMJ のシナプス活動の変化など、神経・筋相互作用による様々な表現型を捉えることに成功した。また、siRNA を用いて変異 AR をノックダウンしたところ、神経・筋共培養により観察された表現型がレスキューされることを確認し得たことから、観察された表現型がポリグルタミン鎖の異常伸長した変異 AR により引き起こされていることが確認された。以上の結果から、SBMA 疾患特異的 iPS 細胞を用いた運動ニューロンと骨格筋の共培養により、iPS 細胞を用いた新たな疾患モデルを確立できたと考えられた。また、SBMA において神経・筋相互作用が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、得られた表現型を指標にして、IN Cell Analyzer などのイメージングサイトメーターを用いて病態解析や治療薬評価を行うための High content analysis (HCA) のシステムを開発した。

次に、神経・筋相互作用による神経変性を担う病態メカニズムや細胞内シグナルを検討するために、SBMA 疾患特異的 iPS 細胞による神経・筋共培養モデルを用いた詳細な解析を行い、神経変性には NMJ の形成が重要な役割を果たすことを見出し、また神経変性を担う細胞内シグナルを同定することに成功した。また、このような神経・筋相互作用を介した病態を担う骨格筋由来分子を探索するために、SBMA 患者、および健常者 iPS 細胞由来骨格

筋におけるトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、患者由来骨格筋で高発現し、健常者由来運動ニューロンに神経細胞死や神経突起の伸長抑制などの表現型を誘導し得る分子を複数同定した。さらに、同定した分子を抑制することで、SBMA 疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋共培養における表現型や細胞内シグナルをレスキューし得ることを見出した。したがって、同定した分子が、SBMA において、神経・筋相互作用を介した神経変性を担うこと、および SBMA の新たな治療標的となり得ることが示唆された。現在、これらの分子を介した、更に詳細な分子メカニズムの解明、および治療標的としての有用性を検討しており、今後の病態解明や新規治療薬開発への応用が期待される。

#### 研究開発の成果およびその意義等（英文）

Spinal bulbar muscular atrophy (SBMA) is an adult onset, slowly progressive motor neuron disease. By the analysis of mouse model, mutant androgen receptors (ARs) with abnormally expanded polyglutamine tracts (CAG repeats) have been shown to form nuclear aggregates in a ligand testosterone-dependent manner, leading to neurodegeneration. However, mouse models may not fully recapitulate the pathophysiology of patients, and anti-androgen therapy with LH-RH analogs (leuprorelin), the only available treatment, has been shown to be effective only in patients in the early stages of disease, thus there has been a need to develop novel therapeutics using human disease models that more accurately recapitulate patient pathology. In addition, it has recently been suggested that skeletal muscle pathology and neuro-muscular interactions play an important role in neurodegeneration in SBMA, making it an important target for pathophysiological analysis and therapeutic development. In this study, we generated a new disease model that more accurately recapitulates neuromuscular pathology of SBMA by co-culturing motor neurons and skeletal muscle derived from SBMA disease-specific iPSCs, and developed a new disease model of SBMA, and explored new therapeutic targets.

First, we developed a method to induce differentiation of more mature motor neurons and skeletal muscles from iPSCs (Okada et al., 2021, Rashid et al., 2023). Motor neurons differentiated by this method not only expressed maturation markers but showed electrophysiological properties of mature neurons. Skeletal muscles could be efficiently and rapidly differentiated from iPSCs in a bulk culture, by introducing doxycycline-inducible *MYOD1* with puromycin selection. Furthermore, with this method, we could have generated contractible three-dimensional skeletal muscle tissues (Rashid et al., 2023). We next established a co-culture system of motor neurons and skeletal muscles derived from iPSCs, in which NMJ formation efficiency was approximately four times higher than that of conventional systems. By electron microscopy, fine structure of characteristic NMJs, such as presynaptic vesicles (PV) and postsynaptic density (PSD) was confirmed, and by electrophysiological analysis, synaptic activity in NMJs could be detected.

Using this system, we co-cultured SBMA disease-specific iPSC- or control iPSC-derived motor neurons with skeletal muscles, and found that not only neurodegeneration but also various phenotypes caused by neuromuscular interactions could be observed. In addition, siRNA-based knockdown of mutant AR could have rescued the phenotypes observed. These results suggest that a new disease model was established by neuro-muscular co-culture of SBMA disease specific iPSCs, and that neuromuscular interaction plays important roles in SBMA pathophysiology.

We also found that NMJ formation is critical for neurodegeneration in SBMA, and succeeded in

identifying intracellular signals underlying neuronal cell death. In order to identify molecules involved in neuromuscular pathology, we performed transcriptome analysis using SBMA disease specific- or control iPSCs. As a result, we identified several molecules that are highly expressed in patient-derived skeletal muscle and can induce SBMA-like phenotypes in control motor neurons. Furthermore, we found that suppression of identified molecules could rescue phenotypes in neuromuscular co-culture suggesting that the identified molecules are responsible for neurodegeneration via neuro-muscular interactions, and that they may be new therapeutic targets for SBMA. We are currently investigating detailed molecular mechanisms and their usefulness as therapeutic targets. This analysis may lead to elucidate pathophysiology of SBMA and to develop new therapeutics.