

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 非翻訳領域リピート病の iPS 細胞を用いた病態解明研究
(英語) Study for elucidating the pathogenesis of non-coding repeat diseases using iPS cell models

研究開発実施期間: 令和 5 年 7 月 6 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 土井 宏
(英語) Hiroshi Doi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 公立大学法人横浜市立大学・医学部神経内科学・脳卒中医学・准教授
(英語) Department of Neurology and Stroke Medicine, Yokohama City University School of Medicine・Associated professor

II 研究開発の概要

2010 年台以降、これまで原因不明であった神経疾患の多くが、非翻訳領域リピートの病的挿入・伸長に起因することが次々に判明している。これらの疾患では、発症後生涯にわたって神経症状の進行がみられ、患者に重大な QOL 障害をきたすにもかかわらず根本的な治療法が存在せず、病態解明に基づく効果的な疾患修飾療法の開発が強く求められている。本研究は三つの非翻訳領域リピート病 Cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome (CANVAS)、神経核内封入体病 (NIID)、脊髄小脳失調症 27B 型 (SCA27B) を研究対象とし、iPSC 研究者から疾患研究者へ iPSC 培養・解析技術の移転を図り、対象疾患の iPSC (CANVAS_iPSC、NIID_iPSC、SCA27B_iPSC) を用いた病態解析を促進すること、治療法開発へつながる成果を得ることを目的とした。採択時に評価者から①NIID、②CANVAS、③SCA27B の 3 つの疾患を同時に並行して病態解析するのではなく、疾患を絞る或いは優先順位をつけて病態解明をするよう助言があったため、CANVAS、NIID の順で解析を進め、SCA27B に関しては iPSC 樹立にとどめる方針とした。

以上の方針に基づき、本研究では 3 つの研究開発項目を設定した。

研究開発項目 1：非翻訳領域リピート病患者由来 iPSC の樹立

本研究において樹立した iPSC の数を表に記す。

疾患	リピート	目標	検体採取	iPSC 樹立	リピート伸長確認
CANVAS	AAAGG-exp	3	3	3	3
	ACAGG-exp	3	3	3	3
NIID	GGC-exp	3	5	6	5
SCA27B	GAA-exp	2	3	3	3

表に示したように疾患 iPSC 樹立は令和 5 年度末までに目標を達成した。

さらに継代、神経分化でリピート数がほとんど変化しないことを確認した。なお、SCA27B に関しては検体収集過程で蓄積した症例の臨床像をまとめた論文を発表した。

研究開発項目 2：iPSC 培養技術・神経細胞分化誘導技術移転、各種神経細胞分化誘導法の確立

iPS 研究者である研究分担者森本悟の全面的なサポートにより、iPSC 培養技術は横浜市立大学内で確立した。皮質神経細胞については、ドキシサイクリン (DOX) 投与化に NGN2 を発現する PiggyBac ベクター (Michael E. Ward 博士 (NIH) より供与) を使用し、横浜市立大学内で分化技術を再現した。感覚神経細胞については、単一ベクターから DOX 投与化に NGN2 と BRN3A を同時発現するよう PiggyBac ベクターを横浜市立大学で設計・作成し、分化技術を確立した。運動神経細胞については、NGN2-LHX3-ISL1 を発現するセンダイウイルスベクターSeV(PM) LNI/TSdF を用いて運動神経細胞分化系 (慶應大学から提供) を横浜市立大学内で分化技術を再現した。プルキンエ細胞分化系は SFEBq (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate with quick reaggregation)を行った後、day35 にマウス胎児の Rhombic Lip (RL) から Granular cells (GCs)を分離し、共培養する方法で、分化系を確立した。過程が技術的に困難であったため、関西医科大学六車恵子先生から直接ご指導いただき、横浜市立大学内で再現することができ、4 系統の神経分化法を確立した

研究開発項目 3：非翻訳領域リピート病患者 iPSC 由来神経細胞の表現型解析

(a) 免疫細胞化学染色による核内封入体および RNA foci の確認

CANVAS の解析では、CANVAS_iPSC 由来感覚神経細胞 (AAGGG 伸長 3 例、ACAGG 伸長 3 例、コントロール 3 例) を用いて行った。結果、ACAGG 伸長 3 例で RNA foci の形成が認められ、リピート特異的な表現型が存在する可能性が示唆された (下図)。NIID の解析では NIID_iPSC 由来皮質神経細胞を用いた免疫染色、RNA-FISH で明確な核内封入体、RNA foci を認めなかった。

(b) 疾患 iPSC 由来神経細胞における RNA 発現/スプライシング異常の同定

CANVAS_iPSC 由来感覚神経細胞 (AAGGG 伸長 3 例、ACAGG 伸長 3 例、コントロール 3 例) を用いて RNA シーケンス解析を行った。結果、AAGGG 症例、ACAGG 症例ともにスプライシングの異常が起こること、両リピート伸長群で共通するパスウェイのスプライシング異常が見られることが確認された。NIID_iPSC 由来皮質神経細胞 (患者 4 例、コントロール 3 例) 用いて RNA シーケンス解析を行った。結果、患者 iPSC 由来皮質神経細胞で核内封入体形成が見られないにもかかわらず、スプライシングの異常が確認された。

(c) iPSC 由来神経細胞の核内封入体および RNA foci のプロテオーム解析

上記のように、NIID_iPSC 由来皮質神経細胞では核内封入体、RNA foci が確認できないため、NIID 核内封入体のプロテオーム解析については培養細胞系で in situ ビオチン化抗体法を利用して行い、核膜輸送に関連するタンパク質、SUMO (Small ubiquitin like modifier) 修飾関連タンパク質、RNA スプライシングに関連する RNA 結合タンパク質を数多く同定した。培養細胞では、SUMO 修飾関連タンパク質、核膜輸送関連タンパク質、RNA スプライシング関連タンパク質が核内封入体に集積することが観察された。今後 iPSC を用いてこれらのパスウェイ異常を明らかにしていく予定である。

(d) NIID_iPSC 由来神経細胞を用いた 5' -UTR ATG (副 ATG) 翻訳の検証 (RAN 翻訳、RNA 毒性の検証)
ゲノム編集で 5' -UTR を除去した iPSC 由来皮質神経細胞では、NIID 患者 iPSC 由来皮質神経細胞で確認されたスプライシング異常が、キャンセルされていることが確認され、スプライシング異常は NIID の病態のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。以上(a)-(d)の解析で示したように、CANVAS、NIID の iPSC ではスプライシング異常が病態の初期の変化としてかかわっている可能性が高いことを見出だした。RAN 翻訳の検証については引き続き検討を継続する。。

本共同研究では、iPSC モデルを用いた治療薬開発を推進してきた森本が iPSC 研究者として参加し、疾患研究者に iPSC 技術の移転がなされた。本研究において、iPSC 樹立時には多少リピート数の変化が起こるが、樹立後は継代、神経分化を経てもリピート数がほぼ不変であることが判明し、iPSC 技術が非翻訳領域リピート病の優れた解析ツールとなりうることが証明された。

神経変性疾患では疾患特異的に部位選択的な変性が起こることが特徴である。本研究を通じて、皮質神経細胞、感覚神経細胞、運動神経細胞、プルキンエ細胞分化技術、さらにアストロサイトの分化技術を疾患研究者の施設内で再現、確立した。特に感覚神経細胞とプルキンエ細胞分化技術は国内で実施可能な施設は極わずかである。本研究で上記技術を確立したことで今後、疾患特異的な変性を来す部位の神経細胞を使った病態解析が可能となった。本共同研究により疾患研究者である研究代表者らは、神経変性疾患の病態解析において強力なツールを手に入れる結果となった。

これまで CANVAS の iPSC 研究は、CANVAS で変性が見られない皮質神経細胞に分化させ、解析したものに限られていた。本研究では CANVAS で変性が見られる感覚神経細胞から、ACAGG 伸長例でのみ RNA foci を検出し、リピート配列特異的な病態が存在する可能性を示した。また、CANVAS_iPSC 由来感覚神経細胞および NIID で変性が見られる皮質神経細胞の解析から、選択的スプライシングの異常を検出した。選択的スプライシングは細胞・組織特異的な現象であるため、細胞・組織特異的な神経変性のメカニズムに関与している可能性がある。現在得られた結果の精査を通じて、今後疾患バイオマーカーの同定、治療ターゲットの創出へつなげて行く研究が可能と考えられる。

Since the 2010s, it has become clear that many neurological diseases are caused by pathological insertions or expansions of repeat sequences in non-coding regions. In these diseases, although patients suffer significant impairment in their quality of life, there is no fundamental treatment, and there is a strong demand for the development of effective disease-modifying therapies. In this study, we focused on three non-coding repeat diseases, cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome (CANVAS), neuronal intranuclear inclusion disease (NIID), and spinocerebellar ataxia type 27B (SCA27B). Through this study, we aim to transfer iPSC culture and analysis techniques from iPSC researchers to disease researchers, promote pathological analysis using iPSCs of the target diseases (CANVAS_iPSC, NIID_iPSC, SCA27B_iPSC), and obtain results that will lead to the development of treatments. At the start of the research, the evaluators advised us not to simultaneously analyze the pathology of the three diseases, NIID, CANVAS, and SCA27B, but to narrow down or prioritize the diseases. Therefore, we decided to proceed with the analysis

in the order of CANVAS and NIID, and to limit our analysis of SCA27B to iPSC establishment. Based on the above policy, three research projects were set for this research.

Research project 1: Establishment of iPSCs derived from patients with non-coding region repeat diseases

We established iPSCs from 6 CANVAS cases, 6 NIID cases, and 3 SCA27B cases, and achieved our goal by the end of fiscal year 2024. Furthermore, we confirmed that the number of repeats hardly changes with cell passages or neuronal differentiation. In addition, regarding SCA27B, we published a paper summarizing the clinical characteristics of cases accumulated during the sample collection process.

Research project 2: Transfer of iPSC culture and neuronal differentiation technologies, establishment of various neuronal differentiation methods

With the full support of iPSC researcher Satoru Morimoto, iPSC culture techniques were established at Yokohama City University. For cortical neurons, differentiation techniques were reproduced using a PiggyBac vector (provided by Dr. Michael E. Ward (NIH)) expressing NGN2 after administration of doxycycline (DOX). For sensory neurons, a PiggyBac vector was designed and created at Yokohama City University to simultaneously express NGN2 and BRN3A from a single vector after administration of DOX, and differentiation techniques were established. For motor neurons, a motor neuron differentiation system (provided by Keio University) was reproduced at Yokohama City University using the Sendai virus vector SeV (PM) LNI/Tsdf expressing NGN2-LHX3-ISL1. The Purkinje cell differentiation system was established by isolating granular cells (GCs) from the rhombic lip (RL) of mouse fetuses on day 35 after performing SFEBq (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate with quick reaggregation) and co-culturing them. Because the process was technically difficult, we received direct guidance from Prof. Keiko Muguruma of Kansai Medical University and were able to reproduce the process at Yokohama City University. As a result of establishing the above four neural differentiation methods.

Research project 3: Phenotypic analysis of iPSC-derived neurons from patients with non-coding repeat diseases

(a) Confirmation of intranuclear inclusions and/or RNA foci by immunocytochemistry and RNA-FISH
CANVAS analysis was performed using CANVAS_iPSC-derived sensory neurons (3 cases of AAGGG expansion, 3 cases of ACAGG expansion, 3 control cases). As a result, the formation of RNA foci was observed in the 3 cases of ACAGG expansion, suggesting the possibility of the existence of a repeat-specific phenotype. In NIID analysis, immunostaining and RNA-FISH using NIID_iPSC-derived cortical neurons did not reveal clear intranuclear inclusions or RNA foci.

(b) Identification of RNA expression/splicing abnormalities in disease iPSC-derived neurons
RNA sequencing analysis was performed using CANVAS_iPSC-derived sensory neurons (3 cases of AAGGG expansion, 3 cases of ACAGG expansion, 3 control cases). As a result, it was confirmed that splicing abnormalities occurred in both AAGGG and ACAGG cases, and that the pathways with splicing abnormalities common to both repeat expansion groups were observed. RNA sequencing analysis was performed using NIID_iPSC-derived cortical neurons (4 patients and 3 controls). As a result, splicing abnormalities were confirmed in patient iPSC-derived cortical neurons, despite the absence of intranuclear inclusion formation.

(c) Proteome analysis of intranuclear inclusions and RNA foci in iPSC-derived neurons

As mentioned above, intranuclear inclusions and RNA foci could not be confirmed in NIID_iPSC-derived cortical neurons, so proteome analysis of NIID intranuclear inclusions was performed using in situ biotinylated antibody method in cultured cell system, and many proteins related to nuclear membrane transport, SUMO (Small ubiquitin like modifier) modification-related proteins, and RNA binding proteins related to RNA splicing were identified. In cultured cells, SUMO modification-related proteins, nuclear membrane transport-related proteins, and RNA splicing-related proteins were observed to accumulate in intranuclear inclusions.

(d) Verification of 5'-UTR ATG translation using NIID_iPSC-derived neurons (verification of RAN translation and RNA toxicity)

In NIID_iPSC-derived cortical neurons in which the 5'-UTR was removed by genome editing, it was confirmed that the splicing abnormalities confirmed in NIID patient iPSC-derived cortical neurons were canceled, suggesting that splicing abnormalities may be a biomarker for the pathology of NIID. As shown in the above analyses (a)-(d), it was found that splicing abnormalities are likely to be involved as an early change in the pathology in CANVAS and NIID iPSCs. We will continue to examine the verification of repeat-associated non-AUG translation.

In this collaborative research project, Morimoto, who has been promoting the development of therapeutic agents using iPSC models, participated as an iPSC researcher, and iPSC technology was transferred to disease researchers. It was found that the number of repeats changes slightly when iPSCs are established, but after establishment, the number of repeats remains almost constant even after passage and neuronal differentiation, proving that iPSC technology can be a strong analysis tool for non-coding region repeat diseases.

Neurodegenerative diseases are characterized by disease-specific site-selective degeneration. Through this research, the differentiation techniques for cortical neurons, sensory neurons, motor neurons, Purkinje cells, and astrocytes were reproduced and established in the disease researchers' facility. In particular, there are very few facilities in Japan that can perform sensory neurons and Purkinje cell differentiation techniques. By establishing the above techniques, it will be possible to analyze pathology using neurons in areas where disease-specific degeneration occurs in the future. This collaborative research has provided the principal investigators with a powerful tool for analyzing the pathology of neurodegenerative diseases.

Until now, CANVAS iPSC research has been limited to the analysis of diseased iPSC-derived cortical neurons. In this study, RNA foci were detected only in ACAGG expansion cases from sensory neurons that showed predominant degeneration in CANVAS, indicating the possibility of repeat sequence-specific pathology. In addition, analysis of CANVAS_iPSC-derived sensory neurons and NIID_iPSC-derived cortical neurons detected abnormalities in alternative splicing. Since alternative splicing is a cell- and tissue-specific phenomenon, it may be involved in the mechanism of cell- and tissue-specific neurodegeneration. Through detailed examination of the results currently obtained, future research will be possible that will lead to the identification of disease biomarkers and the creation of therapeutic targets.