

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：疾患特異的 iPS 細胞を用いた球脊髄性筋萎縮症の病態解析と新規治療法の開発
2. 研究開発代表者：岡田 洋平（愛知医科大学・医学部）
3. 研究開発の成果

### (1) iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導法の確立

BMP 阻害剤、TGFβ阻害剤、GSK3β阻害剤を併用した、簡便、迅速、高効率なヒト iPS 細胞由来運動ニューロン分化誘導法を確立した。より特異性が高く細胞毒性の低い化合物を用いることで、疾患解析に適したより効率的な培養法へと改良した。また、iPS 細胞由来運動ニューロンを可視化するレンチウイルスレポーター (*HB9<sup>e438</sup>::Venus*) を作製した。イメージングサイトメーターを用いた病態解析や薬剤スクリーニング、フローサイトメトリー (FACS) を用いた運動ニューロンの濃縮、純化等に応用可能である。また、より成熟した運動ニューロンを得るための培養条件を見出し、詳細に検討している。

### (2) SBMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンによる疾患モデルの構築と病態解析

SBMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの分化成熟過程の解析により、分化 4 週目では変異 AR の凝集体は観察されないが、複数の病態関連遺伝子の発現変化が観察され、SBMA の早期病態を検出できていると考えられた。変異 AR 凝集体形成前の早期の病態変化の解析や、早期分子マーカーや早期治療法の開発が期待される。また、SBMA 患者由来運動ニューロンを様々なストレス誘導剤の存在下で培養することで、病態を促進するストレスシグナルを同定した。SBMA の新規病態を明らかにするとともに、新たな治療標的の同定が可能であると考えられ、阻害剤を用いた検討により新規治療への応用を検証していく予定である。

### (3) 運動ニューロンと骨格筋の相互作用の解析

*MyoD1* 遺伝子の強制発現に加えて複数のシグナルを制御することにより、ヒト iPS 細胞から短時間で高効率に骨格筋を誘導する方法を開発した。変異 AR を導入したヒト筋芽細胞 (Hu5/E18) 由来骨格筋による疾患モデルとあわせて、SBMA 患者 iPS 細胞由来骨格筋を用いた病態解析を進める予定である。

また、運動ニューロンと Hu5/E18 由来骨格筋との共培養により、*in vitro* での神経筋接合部 (NMJ) の形成に成功した。NMJ を可視化するレポーターも構築しており、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと変異 AR 導入 Hu5/E18、あるいは SBMA 患者 iPS 細胞由来骨格筋とを共培養することで、神経・筋相互作用や NMJ の病態変化を解析している。また、SBMA モデルマウスを用いた解析により、脊髄および骨格筋における Akt シグナル異常が神経・筋病態に関与することを明らかにした。

### (4) SBMA の新規病態関連因子・病態進行や治療の指標となる分子マーカーの同定と検証

患者および健常者 iPS 細胞由来運動ニューロンを用いてマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行い、患者由来運動ニューロンで発現変動している遺伝子を複数同定した。病態進行や治療指標となり得る分子マーカーの探索を進めていく。一方、SBMA 患者骨格筋における解析から、クレアチン-Cr 代謝が分子病態と臨床的重症度の両方を反映するバイオマーカーになり得ることを示した。次年度は SBMA 患者 5 例の剖検例の CPC による病理所見からの考察を予定している。

### (5) 新規治療薬シーズの探索

*HB9<sup>e438</sup>::Venus* や NMJ レポーター等を応用することで、High content analysis (HCA) による多検体の一括定量解析システムを構築した。患者由来運動ニューロンや骨格筋、共培養系で検出した病態変化を指標として薬剤スクリーニングに着手する予定である。

### (6) プロジェクトの総合的推進

名古屋大学、新潟大学、愛知医科大学加齢医科学研究所、慶應義塾大学拠点（岡野栄之教授）とのミーティングや拠点会議等を通して、情報交換をすすめており、連携して本研究課題を遂行している。

4. その他