

# 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明・治療法探索のための効率的解析システムの開発
2. 研究開発代表者： 祖父江 元（名古屋大学・大学院医学系研究科）
3. 研究開発の成果

## 1. iPS 細胞由来運動ニューロンを用いた病態解析の迅速化、効率化

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、より効率的な分化誘導を確立した。また、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンを 96well のイメージングプレートで培養し、後述の *HB9<sup>e438</sup>::Venus* を用いて標識することで、神経突起伸長などの表現型を一括定量解析するシステムを開発した。これにより、より効率的な病態解析が可能になった。

## 2. 運動ニューロン特異的病態解析法の開発

レンチウイルスレポーター (*HB9<sup>e438</sup>::Venus*) により、iPS 細胞由来運動ニューロンを可視化した。イメージングサイトメーターを用いた客観的、定的解析システムを用いて、病態解析や、薬剤スクリーニングへと応用する予定である。また、*HB9<sup>e438</sup>::Venus* で標識したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの Venus 強陽性画分をフローサイトメトリー (FACS) により分取することで、運動ニューロンの濃縮、純化を行った。さらに効率的な濃縮純化方法の検討を進めており、トランスクリプトームなど、運動ニューロン特異的な病態解析へと応用する予定である。

## 3. 病態をより明確に再現するための成熟分化培養法の検討

iPS 細胞由来運動ニューロンの分化成熟過程を詳細に解析した結果、分化 2-4 週目にかけてより成熟した運動ニューロンが誘導されることが明らかになった。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検討したところ、*ChAT* の発現上昇や神経突起の伸長などが観察される成熟運動ニューロンの誘導法を見出した。今後、運動ニューロンの分化成熟過程を解析することで、変異 AR 凝集体形成前の SBMA の早期の病態変化を捉え、早期分子マーカーや早期治療法の開発が期待される。

## 4. 運動ニューロンと骨格筋との相互作用による病態解析システムの開発

ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンとヒト筋芽細胞株 (Hu5/E18) 由来骨格筋との共培養により、αBTX により染色される神経筋接合部 (NMJ) の形成に成功した。また、Hu5/E18 に変異 AR (AR55Q, AR97Q) を導入し、病態モデルとして共培養系への応用を進めている。また、神経筋接合部 (NMJ) の動的病態変化を捉えるために、NMJ を可視化するレポーターを作成した。今後、NMJ を標的とした病態スクリーニングや薬剤スクリーニングに応用可能である。また、本共培養システムを用いて iPS 細胞由来運動ニューロンと骨格筋 (変異 AR 導入 Hu5/E18 または SBMA 患者 iPS 細胞由来骨格筋) との共培養を行うことで、運動ニューロンと骨格筋の相互作用に基づく SBMA の病態解析を進める予定である。

## 5. 病態進行・治療効果の指標となり得る病態検出システムの確立

SBMA における重要な病態指標である変異 AR 凝集体形成を高感度で再現性良く検出する解析条件を検討した。また、正常ポリグルタミン鎖をもつ蛍光プローブ (tAR24Q-EmGFP) を内在性変異 AR と共凝集させることで、可視化する試みを行っており、今後 SBMA 患者 iPS 細胞由来分化細胞を用いて、評価を進めていく。病態スクリーニングや薬剤スクリーニングへの応用が期待される。また、SBMA 患者由来運動ニューロンの成熟分化過程における病態解析では、変異 AR 凝集体形成前の早期の病態変化と考えられる分子変化が観察され、今後、薬剤スクリーニングの指標となり得るかを検証していく。

## 6. 研究の総括

研究開発代表者の祖父江と研究開発分担者の勝野、岡田、道勇、鳥居は、定期的なミーティングを行い、解析手法や研究成果の共有を行い、研究を推進している。また、慶應義塾大学拠点 (岡野栄之代表) での合同ミーティングや拠点会議への参加により、情報交換を行った。

4. その他