

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) iPS細胞を用いた家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態解明・新規治療法開発  
(英語) Elucidation of the pathology and Development of novel therapeutic strategy for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using iPS cells

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学系研究科 教授 青木正志  
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University Graduate School of Medicine, Professor, Masashi Aoki

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) iPS細胞を用いた家族性2型ALS (ALS2) の病態解明  
開発課題名： (英語) Elucidation of the pathomechanism of ALS 2 using iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 東海大学・医学部・教授 秦野 伸二  
所属 役職 氏名： (英語) Tokai University School of Medicine, Professor, Shinji Hadano

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

運動ニューロンでの特徴的な構造である軸索に着目し、神経細胞の極性を制御し、かつ樹状突起や軸索を取り囲む特異的な微細環境を再現することができる iPS 細胞由来の運動ニューロンの新たな培養法の確立を目的とした。

東北大学神経内科グループでは家族性 ALS 家系を集積し、SOD1 変異に次いで多い 13 家系に Fused in Sarcoma (FUS) 遺伝子変異を同定し臨床型を Muscle Nerve 誌に報告した。2015 年度に FUS-H517D 変異およびアイソジェニックコントロールラインの運動ニューロン分化、酸化ストレス刺激等による表現型の解析をおこなった。RNA シークエンスサンプル調製・網羅的遺伝子発現解析を準備した。2016 年度には RNA シ

ークエンズ解析・治療標的分子の抽出をおこなった。マイクロ流体デバイスを用いた培養系を確立し、軸索特異的に変化した FUS 病態関連遺伝子のリストを抽出した。また、蛍光マーカーにより軸索流を可視化することに成功している。介入実験により表現型を解析している。iPS 細胞のアイソジェニックラインも作成し、分化運動ニューロンの RNA 代謝異常について慶應大学・岡野研究室と共同で *Stem Cell Reports* 誌に報告した。また、hnRNPA1 に関する遺伝子解析結果に関して *Neurology Genetics* 誌に報告し同家系の罹患者から hnRNPA1 変異を持つ iPS 細胞を樹立した。hnRNPA1 変異 iPS 細胞の運動ニューロン分化、酸化的ストレス刺激等による表現型を検討した。2016 年度に hnRNPA1 変異 iPS 細胞の骨格筋分化を行っている。

東海大学グループでは ALS2 変異病態に関しては網羅的遺伝子発現の解析として iPSCs 及びそれから分化誘導した MNPs (Motor neuron precursors) をサンプルとして用いて、mRNA-Seq 解析を行った。実験には、2 名 ALS2 患者、非患者 1 名、健常者 3 名由来の iPSCs を用いた。疾患発症分子機構の解明として得られたデータを解析し、ALS2 患者由来 MNPs 特異的にみられる遺伝子発現量の増減について実験の再現性を検証している。新規培養法の確立として東海大学工学部機械工学科木村啓志准教授との共同研究によって作製したマイクロ流体デバイスを用いて、マウス由来初代神経培養細胞及び iPSC 由来 MNPs を播種し、培養する方法を確立した。さらに疾患表現型評価方法の確立としてマウス由来初代神経培養細胞を用いて、酸性小胞を可視化し、その動態をリアルタイムで観察する条件を設定した。得られた動画から、Kymograph を作成し、その軌跡を用いて小胞動態を定量的に解析する手法を確立した。その手法を用いて、ALS マウスモデル由来初代培養神経細胞の酸性小胞の動態を野生型マウスのそれと比較した。その結果、ALS マウスモデル由来の神経細胞の軸索の先端部において、その酸性小胞の総数は変化しないが、輸送小胞数が増加していることが明らかとなった。よって、マイクロ流体デバイスを用い、軸索輸送の動態を指標とした ALS 疾患表現型を評価することが可能となった。この手法を用いて、ALS2iPSC 由来 MNPs から最終分化した運動ニューロンの軸索輸送の解析に着手した。また、iPSC 由来 MNPs に最適化したデバイスのデザイン、及び試作をおこなった。

## 英文

Focusing on the axon, a characteristic structure of motor neurons, our purpose is to establish the new cell culture method using iPS cell-derived motor neurons. At Tohoku University, among the familial ALS cases we collected, we identified Fused in Sarcoma (FUS) gene mutation in 13 families, and reported clinical phenotypes to Muscle and Nerve. We analyzed cellular phenotypes of FUS p.H517D mutant using isogenic control line mixed with oxidative stress stimulation. We also prepared RNA-seq samples. We established a culture system using a microfluidic device and extracted a list of genes related to FUS-mutant pathomechanism which changed in axon specifically. In addition, we succeeded in visualizing axonal flow with fluorescent markers. We also reported abnormal RNA metabolism of differentiated motor neurons in FUS mutant cells to *Stem Cell Reports* in collaboration with Okano Laboratory at Keio University. We also reported hnRNPA1 mutant case to *Neurology Genetics*. We established iPS cells with hnRNPA1 mutation. We performed skeletal muscle differentiation of hnRNPA1 mutant iPS cells and prepared for omics analysis. At Tokai University, for ALS2 mutant, RNA-Seq analysis was performed using iPSCs and MNPs (Motor neuron precursors). iPSCs from 2 ALS2 patients, 1 healthy in the same family and 3 healthy subjects were used. We analyzed the data obtained as a clarification of the mechanism of disease onset and verified the reproducibility of the experiment. We also tried to establish a method to culture mouse-derived primary neurons and iPSC-derived MNPs using a microfluidic device prepared in collaboration with Keiji Kimura at Tokai University Faculty of Engineering. To evaluate a disease phenotype, we used mouse-derived primary

neurons to visualize acidic vesicles in real time settings. From the obtained motion picture, Kymograph was created and quantified. By using this method, the behavior of acidic vesicles of primary cultured neurons derived from ALS mouse model was compared with that of wild type mouse. The total number of acidic vesicles does not change but the number of transported vesicles increases at the apical part of the axon of neurons derived from the ALS mouse model. Using this method, we started to analyze the axonal transport of motor neurons terminally differentiated from ALS2iPSC-derived MNPs.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 10 件)

1. Nishiyama A, Warita H, Takahashi T, Suzuki N, Nishiyama S, Tano O, Akiyama T, Watanabe Y, Takahashi K, Kuroda H, Kato M, Tateyama M, Niihori T, Aoki Y, Aoki M. Prominent sensory involvement in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the L8V SOD1 mutation. Clin Neurol Neurosurg 2016, 150, 194-6.
2. Hadano S, Mitsui S, Pan L, Otomo A, Kubo M, Sato K, Ono S, Onodera W, Abe K, Chen X, Koike M, Uchiyama Y, Aoki M, Warabi E, Yamamoto M, Ishii T, Yanagawa T, Shang HF, Yoshii F. Functional links between SQSTM1 and ALS2 in the pathogenesis of ALS: cumulative impact on the protection against mutant SOD1-mediated motor dysfunction in mice. Hum Mol Genet 2016, 25, 3321-40.
3. Aizawa H, Hideyama T, Yamashita T, Kimura T, Suzuki N, Aoki M, Kwak S. Deficient RNA-editing enzyme ADAR2 in an amyotrophic lateral sclerosis patient with a FUS(P525L) mutation. J Clin Neurosci 2016, 32, 128-9.
4. Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, Nishiyama A, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Mitsunashi S, Nishino I, Aoki Y, Aoki M. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. Neurol Genet. 2015, 1, e23.
5. Ichiyanagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports 2016, 6, 496-510.
6. Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, Aoki M. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging. 2017, 53, 194.e1-8.
7. Akiyama T, Warita H, Kato M, Nishiyama A, Izumi R, Ikeda C, Kamada M, Suzuki N, Aoki M. Genotype-phenotype relationships in familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS/TLS mutations in Japan. Muscle Nerve 2016, 54, 398-404.
8. Watanabe H, Atsuta N, Hirakawa A, Nakamura R, Nakatochi M, Ishigaki S, Iida A, Ikegawa S, Kubo M, Yokoi D, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Kanai K, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Kawata A, Aoki M, Tsuji S, Nakashima

- K, Kaji R, Sobue G. A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016, 87, 851-8.
9. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohrai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. 2016, 39, 219, e1-8.
10. Chen YP, Wei QQ, Chen XP, Li CY, Cao B, Ou RW, Hadano S, Shang HF. Aberration of miRNAs expression in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci* 2016, 9, 69.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 筋萎縮性側索硬化症に対する治療法の開発, 口頭, 青木正志. 第13回岐阜脳神経研究会, 2016/6/15, 国内.
2. Loss of SQSTM1/p62 but not NFE2L2/Nrf2 exacerbates motor neuron degeneration in a mutant SOD1-expressing mouse ALS model. (oral), Hadano, S ら. 15th Asian and Oceanian Congress of Neurology, 2016/8/20, 国外.
3. Molecular pathogenesis of ALS: Dysregulation of membrane trafficking and proteostasis. (oral presentation; invited) , Hadano, S. Academic conference on Movement Disorders and Motor Neuron Disease, Society of Neurology in Sichuan Province. 2016/6/25, 国外.
4. Development of novel device with high-throughput axonal transport quantification. (poster presentation), Yokoyama, S., ..., Hadano, S., and Kimura, H. The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016 Conference). 2016/10/9, 国外.
5. The novel ALS2-interacting small G protein Rab17 colocalizes with ALS2 in recycling endosomes. (poster presentation) Ono, S., ... Hadano, S. 26th International Symposium on ALS/MND. 2015/12/11, 国外.
6. The novel ALS2-interacting small G protein Rab17 colocalizes with ALS2/Alsin in recycling endosomes. (oral), Ono, S., Otomo, A., Fukuda, M., and Hadano, S. 第39回日本神経科学大会 (Neuroscience2016) , 2016/7/20, 国内.
7. Analysis of axonal transport in cultured neurons from ALS model mouse by using the microfluidic cell culture system. (oral), Otomo, A., Araki, R., Yokoyama, S., Wada, J., Hadano, S., and Kimura, H. 第39回日本神経科学大会 (Neuroscience2016) , 2016/7/20, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

脳の病気へ挑む -神経内科診療の最前線- 青木正志, 河北新報社 健康の医学教室, 2016/9/27, 国内

(4) 特許出願

該当なし