



2024年9月11日

報道関係者各位

慶應義塾大学

**iPS 細胞由来運動ニューロン × ゲノムの統合解析により
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療メカニズムを探索
— 運動ニューロンにおけるコレステロール合成亢進が ALS 病態の鍵 —**

慶應義塾大学再生医療リサーチセンターの岡野 栄之 センター長/教授（研究当時：慶應義塾大学医学部生理学教室・教授）、森本 悟 副センター長/特任准教授（研究当時：慶應義塾大学医学部生理学教室・専任講師）、慶應義塾大学医学部5年生の加藤 玖里純、ならびに大阪大学大学院医学系研究科遺伝統計学の岡田随象教授（理化学研究所生命医科学研究センターシステム遺伝学チーム・チームリーダー、東京大学大学院医学系研究科遺伝情報学・教授）らの共同研究グループは、孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS；注1,2）患者より作成した人工多能性幹細胞（iPSC；注3）由来下位運動ニューロン（LMN；iPSC-LMN；注4）の病態表現型ならびに ALS 治療候補薬であるロピニロール塩酸塩（ロピニロール；注5）への反応性と、遺伝的背景の定量的指標である多遺伝子リスクスコア（polygenic risk score；PRS；注6）を用いた統合解析を行い、血中総コレステロールが孤発性 ALS 患者 iPSC-LMN の神経突起長病態ならびにロピニロール反応性に関与する遺伝的形質であることを見出しました。

血中総コレステロールの PRS が高い、すなわち血中総コレステロールが高くなる遺伝的背景を持っているほど、iPSC-LMN の神経突起が脆弱で、ロピニロール処置による神経突起の改善度が大きいことが分かりました。この結果は、ロピニロール処置によって iPSC-LMN におけるコレステロール合成酵素群の発現が抑制されるとの我々の研究結果と矛盾しない結果でした

（Morimoto, *et al.* Cell Stem Cell. 2023）。また公開データを用いた解析によって、血中総コレステロールの8割が合成される肝臓と、LMN が位置する脊髄において、コレステロール合成に関与する酵素群の遺伝子発現変化を生じる遺伝子変異（expression quantitative trait loci；eQTLs）の効果が高度に一致していることが分かりました。さらに、健常者由来腰髄単一細胞遺伝子発現（scRNA-seq）解析により、LMN では、他の種類のニューロンやアストロサイト（注7）と比べてコレステロール合成に関与する酵素群遺伝子の発現が高く、コレステロール合成が活発であることが示唆されました。

以上より、孤発性 ALS 患者の LMN では、遺伝的素因により生理的に活発なコレステロール合成が亢進しており、それを抑制することがロピニロールの治療メカニズムの一つである可能性を見出しました。この研究成果は、孤発性 ALS の疾患理解だけでなく、治療戦略開発においても重要な知見であると考えます。本研究成果は、2024年9月4日に、BMJ グループの *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 誌に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・孤発性 ALS 患者より作成した iPSC-LMN の表現型とゲノムの統合解析によって、iPSC-LMN における神経突起長病態ならびにロピニロールによる改善度が、血中総コレステロールの遺伝的背景と相関していることを見出しました。
- ・血中総コレステロールが高くなる遺伝的背景を持っている孤発性 ALS 患者から作成した iPSC-LMN では、神経突起長が脆弱であった一方で、ロピニロールによる神経突起の改善度は大きいことが分かりました。

- ・コレステロール合成に関与する酵素群における遺伝子発現変化を生じる遺伝子変異 (eQTLs) について、その効果量は肝臓と頸髄で高度に保存されていることが分かりました。
- ・ヒト腰髄 snRNA-seq 解析により、LMN では、他の種類のニューロンやアストロサイトと比べてコレステロール合成に関与する酵素群の発現が高く、コレステロール合成が活発であることが示唆されました。
- ・孤発性 ALS 患者の LMN では、生理的に活発なコレステロール合成が遺伝的素因により亢進しており、その抑制がロピニロールの治療メカニズムである可能性が示唆されました。

2. 研究背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、運動ニューロン (motor neuron; MN) の変性・脱落を特徴とする神経変性疾患です。孤発性 ALS 患者より作成した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来脊髄運動ニューロン (lower MN; LMN) (iPSC-LMN) は、健常者のものと比して神経突起長の短縮などの ALS 様表現型を反映することが知られています。iPS 細胞は、体細胞から作出する段階で初期化 (リプログラミング) されており、また iPS 細胞から MN を誘導・培養する条件は同じであるにも関わらず、iPSC-LMN において ALS 様表現型が再現されることから、孤発性 ALS 発症は遺伝的背景によって規定されている可能性が示唆されていました。さらに、iPSC-LMN は孤発性 ALS 患者の全ゲノム情報を保持していることから、その表現型 (神経突起長など) は、遺伝的背景を反映していると考えられています。しかしながら、孤発性 ALS 患者における iPSC-LMN の神経突起長短縮に寄与する遺伝的背景、すなわち孤発性 ALS 発症における遺伝的背景はよく分かっていませんでした。

iPSC-LMN を用いた 1,232 種類の既存薬を対象としたドラッグ・スクリーニング (注 8) によって同定され、第 1/2a 相医師主導治験 (注 9) において ALS 病態進行抑制効果が示唆されたロピニロール塩酸塩 (ロピニロール) は、孤発性 ALS 患者 iPSC-LMN におけるコレステロール合成酵素群の発現を抑制し、ALS 様表現型を改善することが知られています。さらに、iPSC-LMN においてロピニロールがより効いた患者群では、あまり効かなかった患者群と比べて、臨床的なロピニロール反応性が良く、iPSC-LMN はロピニロールの薬剤反応性も反映することが分かっていました。しかしながら、ロピニロールの反応性を規定する要因は不明でした。

ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) は、特定の疾患や形質 (身長など) と関連する遺伝的変異を特定する研究手法です。GWAS によって特定された遺伝的変異と、変異ごとの疾患ないし形質への影響の大きさ (重み) を積算して算出する多遺伝子リスクスコア (polygenic risk score; PRS) は、個人におけるさまざまな形質の遺伝的背景の定量的指標として用いられています。例えば、身長の PRS が大きい集団ほど、実際の身長の測定値が大きいことが明らかとなっています。PRS を用いることで、さまざまな形質における各個人の遺伝的背景を定量化することができるため、各個人において多様な形質の PRS を算出することで、iPSC-LMN 表現型に寄与する遺伝的な形質を探索することができると考えられました。

そこで共同研究グループは、孤発性 ALS 患者 iPSC-LMN の表現型ならびにロピニロール反応性と、PRS を用いた統合解析を行いました (図 1)。

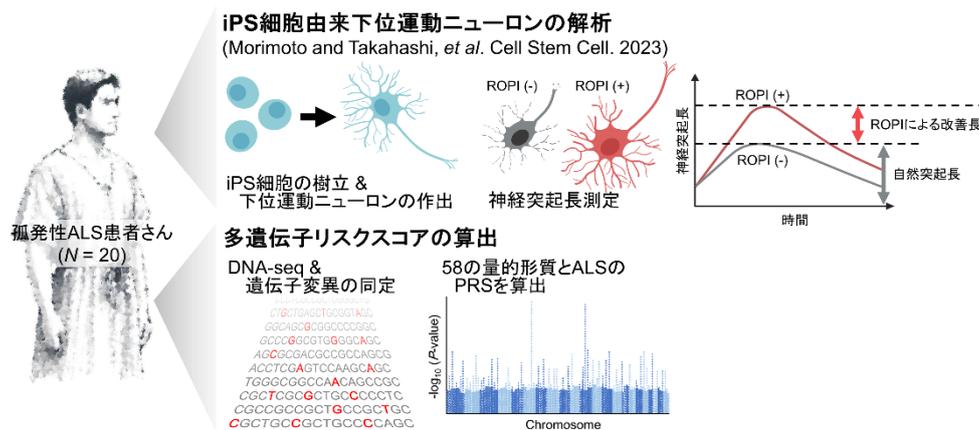


図 1. 本研究の概要図

3. 研究内容・成果

(1) 孤発性 ALS 患者 iPSC-LMN の神経突起長短縮ならびにロピニロール反応性に関与する遺伝的形質として、血中総コレステロールを同定しました。

まず、孤発性 ALS 患者 20 名について全ゲノム配列決定を行い、58 の定量的形質ならびに ALS における PRS を算出しました。

次に、当該孤発性 ALS 患者 20 名の iPSC 細胞由来運動ニューロンについて、ロピニロール非投与下における神経突起長（自然突起長）ならびにロピニロール投与による神経突起長改善度を測定したデータセットを用いて、PRS との相関解析を行いました。孤発性 ALS の病態とロピニロールの効果は相反するとの仮定のもと、自然突起長に対する相関係数と、ロピニロール投与による神経突起長改善度に対する相関係数の差が最も大きい形質を探索したところ、血中総コレステロールが同定されました（図 2）。

血中総コレステロールの PRS が高い、すなわち血中総コレステロールが高くなる遺伝的背景を持っているほど、iPSC-LMN の自然神経突起長が短く、ロピニロールによる改善度が大きいことが分かりました。ロピニロールは、iPSC-LMN におけるコレステロール合成酵素群の発現を抑制する効果があることが知られており、また孤発性 ALS 患者 iPSC-LMN におけるコレステロール合成酵素群の発現は健常者のものと比して高く、さらにその発現が高いほどロピニロールによる改善度が高いことが分かっています (Morimoto, *et al.* Cell Stem Cell. 2023)。よって、血中総コレステロール高値の遺伝的背景は、iPSC-LMN におけるコレステロール合成亢進を介して、神経突起長短縮やロピニロール反応性に寄与している可能性が示唆されました。

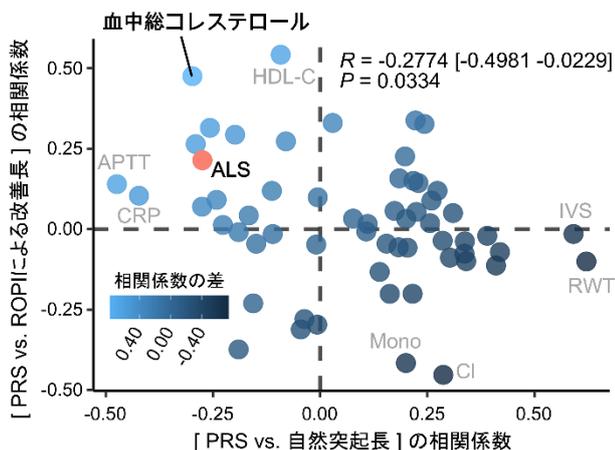


図 2. 58 の量的形質および ALS の PRS と iPSC-LMN の表現型におけるピアソン相関解析結果
各プロットは各形質を表す (ALS: サーマンピンク、58 の量的形質: 青)。プロットの色は、PRS (ALS および 58 の量的形質) に対する自然突起長の相関係数と、ロピニロール投与による神経突起長改善度の相関係数の差を表す (プロットの色が明るいほど、その形質の PRS が高いことで自然突起長が短くなる一方、ロピニロール投与により改善する)。

(2) コレステロール合成に関与する酵素群の eQTLs 効果量は、肝臓と頸髄で高度に保存されていました。

血中総コレステロールの遺伝的背景が、iPSC-LMN における表現型ならびにロピニロール反応性に寄与している可能性が示唆されましたが、血中総コレステロールの 8 割は肝臓で合成されることが知られているため、血中総コレステロール高値を規定する遺伝的背景が、LMN が位置する脊髄におけるコレステロール合成亢進と関連しているかは不明でした。さらに、脊髄を含む中枢神経系におけるコレステロール代謝は、中枢神経系外における全身循環とは独立していると考えられており、コレステロールの全身循環に寄与する肝臓での合成と、脊髄におけるコレステロール合成は、異なるものと推察されています。そこで、公開データを用いて、遺伝子発現変化をもたらす遺伝子変異 (expression quantitative trait loci; eQTLs) について、コレステロール合成に関与する酵素群の eQTLs 効果量を肝臓と頸髄で比較したところ、高度に保存されていました (図 3)。

よって、血中総コレステロール高値の遺伝的背景を持っていると、肝臓におけるコレステロール合成亢進だけではなく、頸髄におけるコレステロール合成も亢進していることが示唆されました。

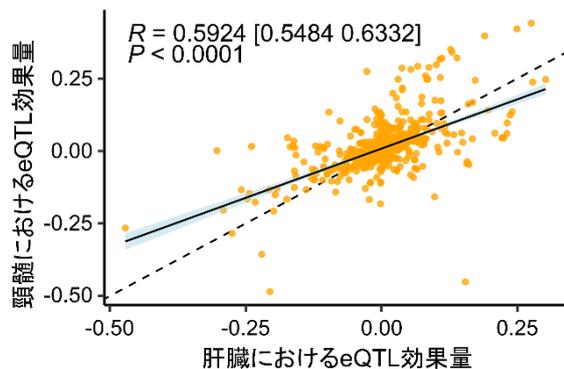


図 3. コレステロール合成に関与する酵素群の eQTLs 効果量の肝臓-頸髄比較結果
eQTLs について肝臓と頸髄の組織特異の効果量を比較した (ピアソンの相関検定)。各プロットは各 eQTL を表す。

(3) 運動ニューロンは、他細胞種と比して生理的にコレステロール合成が活発であることが分かりました。

肝臓と頸髄における eQTLs 効果量が高度に一致していることは分かりましたが、中枢神経系におけるコレステロール合成の細胞種異質性は不明でした。そこで、公開データである健常者における腰髄単一細胞発現解析データを用いて、中枢神経系の構成細胞ごとのコレステロール合成酵素群の発現パターンを解析しました。その結果、LMN では、他の種類のニューロンやアストロサイトと比べて、生理的にコレステロール合成酵素群の発現が高いことが分かりました (図 4)。

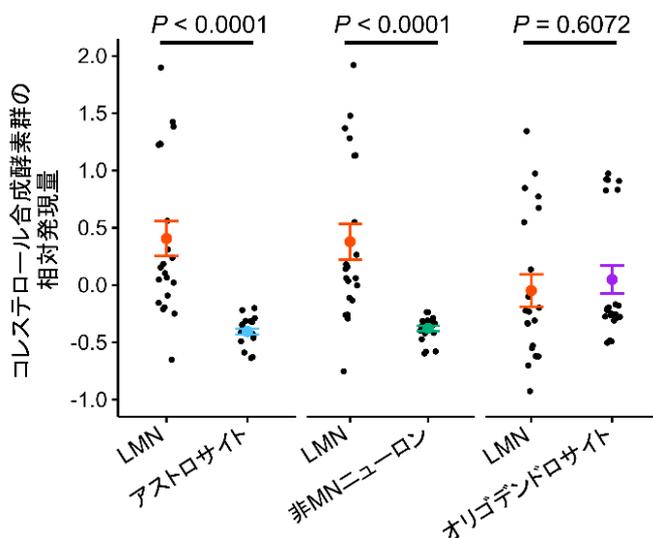


図 4. 細胞タイプ (LMN、アストロサイト、非 MN ニューロン、オリゴデンドロサイト) におけるコレステロール合成経路酵素群の相対発現比較結果
各プロットは疑似細胞集団ごとのコレステロール合成酵素群の相対発現量を表す。

(4) 運動ニューロンにおけるコレステロール合成亢進は、孤発性 ALS 病態において重要であり、その抑制はロピニロールの作用機序である可能性がある。

これまでの孤発性 ALS 患者を対象とした GWAS 結果では、血中総コレステロール高値を規定する遺伝的背景が、ALS 発症の原因として同定されています (van Rheenen W, *et al.* Nat Genet. 2022)。さらに、マウスの脊髄においてコレステロール合成を亢進させると、ALS 様の運動症状が出現することが示されています (Dodge JC, *et al.* J Neurosci. 2020)。また、中枢神経系において合成されたコレステロールは、24(S)-ヒドロキシコレステロール (24-OHC) などの代謝物に変換されることが知られていますが、24-OHC を代表とするコレステロール代謝物は、神経毒性を持つことが分かっています (Yamanaka K, *et al.* Cell Death Dis. 2014)。

以上の知見を総括し、血中総コレステロールが高いことが孤発性 ALS の原因ではなく、血中総コレステロール高値を規定する遺伝的背景に起因した LMN レベルでのコレステロール合成亢進が、LMN 細胞死ならびに孤発性 ALS 発症を惹起すること、そしてその抑制がロピニロールにおける抗 ALS 効果の作用機序であるという仮説を提唱します。

4. 今後の展開

本研究により、LMN におけるコレステロール合成亢進が孤発性 ALS 病態において重要であること、またその抑制が治療戦略として有用である可能性が示唆されました。また、iPSC-LMN におけるロピニロール反応性は、臨床におけるロピニロール反応性を反映することが分かっているため、ゲノム情報によって患者の層別化を行える可能性があります。iPS 細胞を用いた疾患モデルと、ゲノムを組み合わせた解析は、疾患理解や治療メカニズム解明において非常に強力であると考えられ、今後さらなる大規模な研究や、他疾患への応用が期待されます。

5. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 神経疾患特異的 iPSC 細胞を活用した病態解明と新規治療法の創出を目指した研究、再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 筋萎縮性側索硬化症における病態回避機構の解明と治療に資する層別化技術開発、再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 革新的 RNA 編集技術を用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療開発、脳とこころの研究推進プログラム 孤発性筋萎縮性側索硬化症の双方向トランスレーショナル研究による病態介入標的の同定と核酸医薬の開発研究、ゲノム創薬基盤推進研究事業 RNA 標的医薬創出に資する、疾患 RNA 分子完全長一次構造に関するデータ基盤の構築、難治性疾患実用化研究事業 患者レジストリを活用した沖縄型神経原性筋萎縮症のエビデンス創出研究、JSPS 科学研究費助成事業 (科研費) JP20H00485, JP21H05278, JP22K07500, JP22K15736、宮田幸比古記念 ALS 研究助成基金、日本 ALS 協会小出良夫基金、公益財団法人第一三共生命科学研究振興財団、UBE 学術振興財団の研究助成を受けて実施されました。

<参考文献>

Fujimori K, *et al.* Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. Nat Med. 2018 Oct;24(10):1579-1589. PMID: 30127392.

Morimoto S, *et al.* Phase 1/2a clinical trial in ALS with ropinirole, a drug candidate identified by iPSC drug discovery. Cell Stem Cell. 2023 Jun 1;30(6):766-780.e9. PMID: 37267913.

van Rheenen W, *et al.* Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. Nat Genet. 2021 Dec;53(12):1636-1648. PMID: 34873335.

Dodge JC, *et al.* Neutral Lipid Cacostasis Contributes to Disease Pathogenesis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurosci.* 2020 Nov 18;40(47):9137-9147. PMID: 33051352.

Yamanaka K, *et al.* Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1. *Cell Death Dis.* 2014 Jan 9;5(1):e990. PMID: 24407243.

<原論文情報>

英文タイトル : Spinal Cord Motor Neuron Phenotypes and Polygenic Risk Scores in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis: Deciphering the Disease Pathology and Therapeutic Potential of Ropinirole Hydrochloride

タイトル和訳 : 孤発性筋萎縮性側索硬化症における脊髄運動ニューロン表現型と多遺伝子リスクスコア : 病態とロピニロール塩酸塩の治療可能性を読み解く

著者名 : Chris Kato (加藤 玖里純)^{1,2,3} Satoru Morimoto (森本 悟)^{1,2,3,†} Shinichi Takahashi (高橋 慎一)^{1,2,4} Shinichi Namba (難波 真一)⁵ Qingbo S. Wang (王 青波)^{5,6,7} Yukinori Okada (岡田 随象)^{5,6,7,8,9,10} Hideyuki Okano (岡野 栄之)^{1,2,3,†}

† Co-corresponding author

1 Keio University Regenerative Medicine Research Center, Kanagawa, Japan. (慶應義塾大学再生医療リサーチセンター)

2 Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. (慶應義塾大学医学部生理学教室)

3 Division of Neurodegenerative Disease Research, Tokyo Metropolitan Institute for Geriatrics and Gerontology, Tokyo, Japan. (東京都健康長寿医療センター研究所神経変性疾患研究)

4 Department of Neurology and Cerebrovascular Medicine, Saitama Medical University International Medical Center, Saitama, Japan. (埼玉医科大学国際医療センター脳神経内科・脳卒中内科)

5 Department of Statistical Genetics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan. (大阪大学大学院医学系研究科遺伝統計学)

6 Laboratory of Statistical Immunology, Immunology Frontier Research Center (WPI-IFReC), Osaka University, Suita, Japan. (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

7 Department of Genome Informatics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. (東京大学大学院医学系研究科遺伝情報学)

8 Integrated Frontier Research for Medical Science Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Japan. (大阪大学先導的学際研究機構生命医科学融合フロンティア研究部門)

9 Center for Infectious Disease Education and Research (CiDER), Osaka University, Suita, Japan. (大阪大学感染症総合教育研究拠点)

10 Laboratory for Systems Genetics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan. (理化学研究所生命医科学研究センターシステム遺伝学チーム)

掲載雑誌 : *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*

DOI : 10.1136/jnnp-2024-333690

<用語説明>

注1 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) : 運動ニューロンの変性・脱落を特徴とする神経変性疾患で、全身の筋力低下を主症状とする。呼吸筋を含めた筋力低下を引き起こすため、未治療では2-5年で呼吸障害により死亡する。

注2 孤発性 ALS : ALS 患者の90%は孤発性、すなわち家族歴を持たずに発症し、孤発性 ALS と呼ばれている。

注3 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞 ; iPSC) : 体を構成する細胞 (体細胞) に、特定の遺伝子を導入することによって作出される人工的な細胞。ほぼ全ての細胞種への分化能 (多能性) と、無限増殖能 (幹細胞性) を保持している。

注4 脊髄運動ニューロン (lower MN ; LMN) : ヒトが運動する際、脳からの司令が上位運動ニューロン、次いで脊髄 (下位) 運動ニューロンに伝達され、筋肉まで伝わる。脊髄 (下位) 運動ニューロンは、脊髄に位置している。

注5 ロピニロール塩酸塩 : ドパミン D2 受容体作動薬の1つ。ドパミンが不足する Parkinson 病において治療薬として用いられている。家族性/孤発性 ALS 患者 iPSC-LMN を疾患モデルとしたドラッグ・スクリーニング (※8 参照) によって、既存薬 1,232 種のなかで最も薬効の高い薬剤として選択された。

注6 多遺伝子リスクスコア (polygenic risk score; PRS) : 特定の疾患や形質 (身長など) と関連する遺伝的変異を特定する研究手法であるゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) によって特定された遺伝的変異と、変異ごとの疾患ないし形質への影響の大きさ (重み) を積算して算出される値。個人におけるさまざまな形質の遺伝的背景の定量的指標として用いられている。

注7 アストロサイト : 中枢神経系を構成する細胞の1種。ニューロンに栄養を与える、物理的に支持し構造を保たせるなどの役割があると考えられている。

注8 ドラッグ・スクリーニング : ある特定の疾患に対する治療薬を探索する手法とそのプロセスのこと。膨大な化合物ライブラリーより、期待される薬効 (神経突起長の改善など) を示す化合物を絞り込み、有効薬剤として選出する。

注9 第1/2a 相臨床試験 : ロピニロール塩酸塩を用いて、安全性・忍容性、ならびに ALS 治療効果を検証するために、孤発性 ALS 患者 20 名を対象として行われた医師主導治験。安全性ならびに忍容性が確認され、効果についても、1年間のロピニロール塩酸塩投与によって病態進行が約7ヶ月遅らせることが分かり、その有効性が示唆された。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 再生医療リサーチセンター センター長 岡野 栄之 (おかの ひでゆき)

TEL : 044-276-2388 FAX : 044-276-2388 E-mail : hidokano@a2.keio.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室 (向坂)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>