

論文内容の要旨

論文提出者氏名 吉田 路子

論文題目

Modeling the Early Phenotype at the Neuromuscular Junction of Spinal Muscular Atrophy Using Patient-Derived iPSCs

論文内容の要旨

脊髄性筋萎縮症 (SMA : spinal muscular atrophy) I 型は、乳児期早期に筋萎縮・筋力低下に伴う呼吸不全をきたす重篤な神経筋疾患であり、1995 年に *SMN1 (survival of motor neuron 1)* 遺伝子変異により SMN 蛋白量が減少することにより発症することが明らかにされたが、疾患の発症と進行に至るメカニズムは未だ不明で、有効な治療法はない。臨床検査所見と病理組織像から、SMA は脊髄運動神経 (MN : motor neuron) 細胞死が原因の下位運動神経疾患に分類されてきたが、近年、SMA モデルマウスを用いた研究により、神経筋接合部 (NMJ : neuromuscular junction) 形成の異常が MN の減少に先立って観察されることが報告された。そのため、NMJ 病変は最も早期に出現する重要な表現型であると考えられ、この表現型をヒトの細胞を用いて *in vitro* で再現し、さらにそれらを回復させるような薬剤スクリーニング系を構築することを目的とした。

まず異なる 2 名の最重症型である I 型の SMA 患者皮膚線維芽細胞から iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells) を樹立し、その多能性と、*SMN1* 変異を維持していること、初期化の過程で新たな変異が入っていないことの確認を行った。また、上記患者由来 iPSCs とコントロールとして用いる健常者由来 iPSCs が未分化性では同等であることを示した。

次に、上記 2 クローンの iPSCs (以下 P1,P2) と健常者皮膚線維芽細胞由来 iPSCs (以下 C1,C2) を SFEBq 法を用いて MN へ分化誘導し、MN 特異的な転写因子 HB9 の発現を確認した。過去の SMA-iPSCs 由来 MN の表現型を解析した報告では、MN 細胞数の減少が表現型として注目されていたが、今回我々が分化誘導した MN では、SMA-iPSCs 由来 MN と健常者-iPSCs 由来 MN 間で有意な細胞数の差は認めなかった。

NMJ 構造を形成するため、上記健常者 iPSCs から分化誘導した MN とマウス C2C12 細胞から分化誘導した筋管細胞を共培養したところ、NMJ 構造形成初期に観察されるアセチルコリン受容体 (AChR) のクラスタリングが、共培養開始 4 日目で MN 末端に相対する筋管細胞表面に観察された。P1,P2 で同様の NMJ 構造形成を試みたところ、AChR クラスタリングが健常者 iPSCs 由来 MN と共培養したものに比し著明に減少していた。我々の MN 分化誘導系では MN 細胞死は観察されなかったが、共培養下の MN 細胞死が NMJ 形成障害に影響している可能性があるため、共培養下の MN の TUNEL 染色を行ったところ、TUNEL 陽性 MN の共培養に伴う増加は認められず、生存している MN で、シナプス形成障害が起こっていることが示唆された。また、SMA モデルマウスで認められた MN 末端におけるニューロフィラメントの凝集が、SMA-iPSCs 由来 MN を筋管細胞と共培養することにより出現し、NMJ 形成時の MN の機能障害を示す重要な表現型である可能性が考えられた。

NMJ 形成障害が MN の SMN 蛋白減少によるものであるかを確認し、治療薬の評価系を構築するために、SMA-iPSCs 由来 MN を用いた上記共培養系に、SMN 蛋白量を増加させることが報告されているバルプロ酸と SMN1 特異的なアンチセンスオリゴをそれぞれ投与した。するといずれの投与によっても、MN における安定で機能的な完全長 SMN mRNA の発現量増加に伴い、筋管細胞表面の AChR のクラスタリングが回復していることが示された。中でもアンチセンスオリゴによる回復は著しく、バルプロ酸投与によって改善しなかった MN 末端のニューロフィラメントの凝集の一部改善をも認めた。

以上から、SMA-iPSCs 由来 MN を用いて、SMA の発症早期に、MN 細胞死に先行して出現する NMJ 形成障害を再現した。現在、SMA に対する治療薬の効果を評価する適切な表現型は限られているため、発症早期に出現する表現型を再現し、それらが VPA や PMO 投与により改善可能であった点で、我々が構築した共培養系は、治療の候補となる薬剤を評価する有用なツールとなり得ることが示された。SMA の NMJ における表現型の少なくとも一因は MN にあり、さらに MN 細胞死ではなく pathfinding や NMJ 構造形成・維持等の機能障害が原因と考えられた。