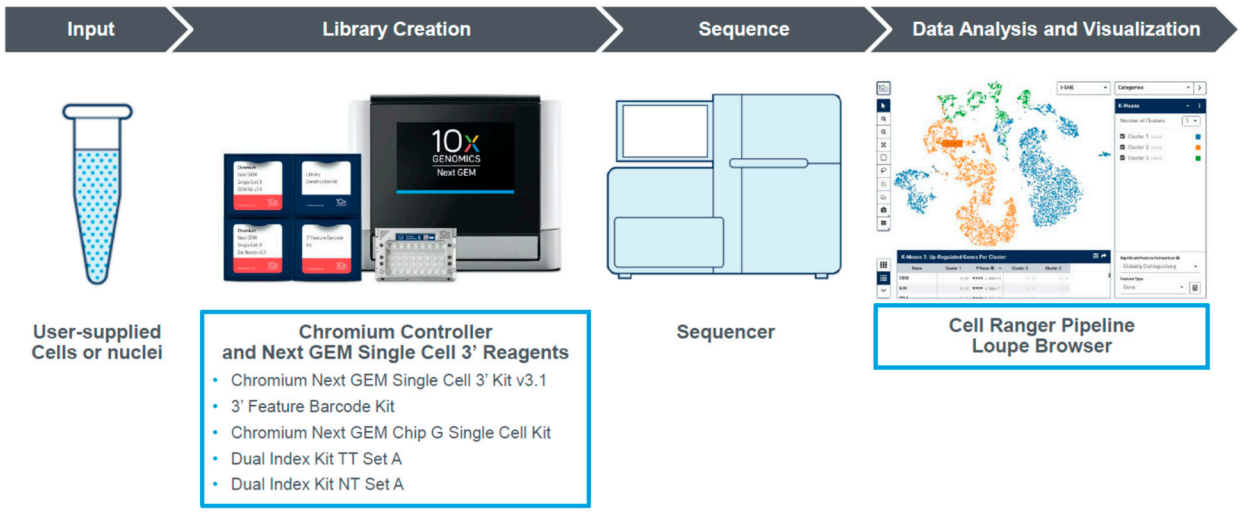
146　単一核トランスクリプトームによる神経・筋病態の解明	伊藤　卓治

【目的】運動ニューロン疾患では、運動ニューロンにおける病態のみならず、骨格筋との相互作用が病態に大きく寄与すると考えられている。そのため、神経筋接合部（Neuromuscular junction：NMJ）を介した運動ニューロンと骨格筋の相互作用を詳細に解析できるモデルの開発が求められてきた。しかし、運動ニューロンと骨格筋の相互作用を一つの機能単位（神経筋ユニット）として分子レベルでの解析を行った疾患モデルの報告は乏しいため、分子病態は不明な点が多い。本研究では、ヒト iPS 細胞から誘導した運動ニューロンと骨格筋を共培養することで、神経・筋疾患の分子メカニズムの解明と新たな治療標的の探索につながる機能的神経・筋モデルを構築し、新規病態関連因子探索のための単一核 RNA-seq（snRNA-seq）のシステムを構築する。

【方法】ヒト iPS 細胞由来神経・筋モデルを用いて、(1) 機能的 NMJ の構築 (2) 病態関連因子の同定を目指した snRNA-seq のシステム構築 (3) 開発したシステムを用いた、運動ニューロン疾患由来 iPS 細胞における、NMJ を標的とした病態解析や治療開発への応用の検証を行った。

【結果】ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと骨格筋から、核を抽出し、snRNA-seq を行った。Uniform Manifold Approximation and Projection（Umap）diagram を作成し、運動ニューロンと骨格筋のクラスターを同定することができた。また、それぞれの核ポピュレーションにエンリッチされたマーカー遺伝子を Violin plots で示すことができた。現在、構築した snRNA-seq のシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態関連因子の探索を行っている。

snRNA-seq 解析のワークフロー



146. 単一核トランスクリプトームによる神経・筋病態の解明

伊藤　卓治

愛知医科大学 加齢医科学研究所 神経 iPS 細胞研究部門

Key words：iPS 細胞，運動ニューロン，骨格筋，単一核 RNA-seq

緒　言

運動ニューロンと骨格筋は、神経筋接合部（Neuromuscular junction：NMJ）を介して相互作用を行うが、それを詳細に解析できるモデルは少ない。さらに、運動ニューロンと骨格筋の相互作用に着目して分子レベルでの解析を行った疾患モデルの報告は乏しく、分子病態は不明な点が多い。本研究では、ヒト iPS 細胞から誘導した運動ニューロンと骨格筋を用いることで、神経・筋疾患の分子メカニズムの解明と新たな治療標的の探索につながる機能的神経・筋モデルを構築し、新規病態関連因子探索のための snRNA-seq のシステムを構築した。そのために、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと骨格筋を用いて、(1) 機能的 NMJ の構築 (2) 病態関連因子の同定を目指した snRNA-seq のシステム構築 (3) 開発したシステムを用いた、運動ニューロン疾患由来 iPS 細胞における、神経・筋相互作用に着目した病態解析や治療開発を行った。本研究は神経・筋疾患発症機序の解明、薬剤スクリーニングにつながる重要なツールになり得ると考えられる。

方　法

1. snRNA-seq のシステム構築

ヒト iPS 細胞由来神経・筋から、核を抽出した。核の濃度を 0.7～1.2×10^6 核/mL に調整後、10xGenomics Chromium Single Cell 3’ Kit を用いてシングルセルとビーズの結合を行った。10x microfluidic chip のウェルにサンプルをロードすることでエマルジョンの中にシングルセルゲルビーズ（GEMs）が形成された。Chromium を用いてそのエマルジョンの中で逆転写反応を行った。cDNA を PCR で増幅後、品質および量をバイオアナライザー Agilent 2100 で測定した。ライブラリーを構築した後、かずさ DNA 研究所へ委託し、Illumina chemistry を用いてシーケンスを行った。そのアウトプットとして生成された binary base call（BCL）ファイルを、10x Genomics の cell ranger パイプラインを使用し、分離、FASTQ ファイルへの変換を行った。

2. データ解析

NMJ 形成核集団が空間的にドットとして cluster されるかどうか検討するため、Uniform Manifold Approximation and Projection（Umap）diagram を作成した。クラスターにエンリッチされた、NMJ の集団で発現する特異的遺伝子のクラスタリングが可能かどうか検討するため、Heatmap を作成した。さらに、upregulated と downregulated が認められた上位約 30 遺伝子のクラスタリングを行い、NMJ 関連遺伝子がクラスタリング可能かどうか検討した。また、それぞれの核ポピュレーションにエンリッチされたマーカー遺伝子を Violin plots で示した。

3. 病態関連因子の探索

我々は、これまでの解析により球脊髄性筋萎縮症（SBMA）由来 iPS 細胞から作製した神経・筋共培養モデルにおいて、表現型の一部を捉えることに成功している。そこで、構築した snRNA-seq のシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態関連因子の探索を行った。

結果および考察

1. 機能的神経・筋共培養モデルの構築

我々のグループは、これまでに、ヒト iPS 細胞から収縮可能な骨格筋を構築することに成功している［1］。さらに、ヒト iPS 細胞由来神経・筋共培養システムを構築済である（図 1）。また、NMJ レポーターを作製し、NMJ 形成を可視化・定量化することに成功している。そこで、このモデルが機能的な NMJ が形成されているかどうか検討するため、Microelectrode array（MEA: MED64）プローブ上で運動ニューロンと骨格筋の共培養を行い、運動ニューロン刺激により誘発される骨格筋の活動電位を記録し NMJ のシナプス機能異常を解析した。これまでに、光感受性チャネルロドプシン（ChR2-EGFP）発現 iPS 由来運動ニューロンを、MEA 上で骨格筋細胞と共培養したところ 460 nm の青色光による神経刺激で誘導される活動電位が AChR 遮断薬ベクロニウムにより抑制されたため、機能的な NMJ が形成されていることを確認した（図 1）。

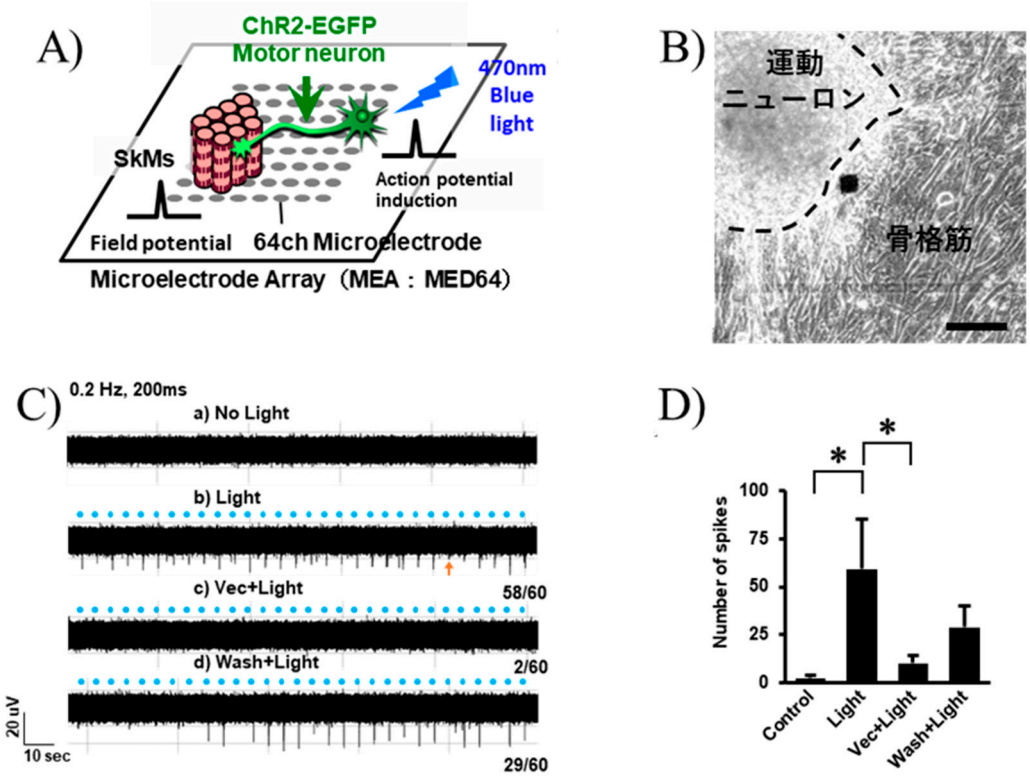


図 1. MEA を用いた神経・筋シナプス機能解析システム

A) 神経・筋共培養のスキーム。

B) 神経・筋共培養の位相差画像。スケールバー：200 μ m。

C) スパイクの生波形。青色光刺激のタイミングに一致して、スパイクが検出された。

D) スパイクの定量解析。青色光によってスパイク数は有意に増加した。また、このスパイクは、AChR 遮断により有意に抑制された。

*p＜0.05 (one-way ANOVA with Tukey's post hoc multiple comparison test)。

2. scRNA-seq/snRNA-seq のシステム構築

神経・筋は互いに NMJ を介して相互作用し、遺伝子発現に影響を与えている。そこで、運動ニューロン疾患の真の病態関連因子を探索するため、ヒト iPS 細胞由来神経・筋共培養モデルにおいて scRNA-seq/snRNA-seq のシステム構築を行った。HB9^{e438}::mRFP を導入したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンとヒト iPS 細胞由来骨格筋から細胞を単離した。細胞濃度を 0.7～1.2×10^6 cells/mL に調製後、10xGenomics Chromium Single Cell 3' Kit を用いてシン

グルセルとビーズの結合を行った。10x microfluidic chip のウェルにサンプルをロードすることでエマルジョンの中にシングルセルゲルビーズ（GEMs）が形成される。Chromium を用いてそのエマルジョンの中で逆転写反応を行った。cDNA を PCR で増幅後、品質および量をバイオアナライザー Agilent 2100 で測定した。ライブラリーを構築した後、かずさ DNA 研究所へ委託し、Illumina chemistry を用いてシーケンスを行った。そのアウトプットとして生成された binary base call（BCL）ファイルを、10x Genomics の cell ranger パイプラインを使用し、分離、FASTQ ファイルへの変換を行った。

骨格筋は多核の細胞であり、核により遺伝子発現のプロファイルが異なる。例えば NMJ を形成すると NMJ 直下の核（subsynaptic nuclei）からアセチルコリン受容体などの遺伝子発現が上昇する。そこで、NMJ 特異的な遺伝子の探索や神経・筋相互作用に着目した神経・筋疾患の病態解析への応用を目指して、snRNA-seq のシステム開発を行った。HB9e^{438}::mRFP を導入したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンとヒト iPS 細胞由来骨格筋から、核を抽出し、scRNA-seq と同様の方法でライブラリー作成、シーケンスを行った。

3. データ解析

NMJ 形成細胞集団が空間的にドットとして cluster されるかどうか検討するため、Uniform Manifold Approximation and Projection（Umap）diagram を作成した。また、運動ニューロンと骨格筋以外にも種々の細胞が混在していると考えられるため、種々の細胞集団の plot と、骨格筋の核（Myonuclei）だけの plot（遅筋 slow、速筋 fast、NMJ、unidentified myonuclei など）を作成し、Umap 上でドットの集まりとして cluster 分類が可能かどうか検討した。

クラスターにエンリッチされた、Myh7（遅筋）、Myh2（中間型）、Myh1（速筋）、NMJ のそれぞれの集団で発現する特異的遺伝子のクラスタリングが可能かどうか検討するため、Heatmap を作成した。また、Myonuclei だけの Umap Plots において、筋タイプ（Myh7、Myh2、Myh1）、NMJ の集団ごとに、どこにそのマーカー遺伝子が位置するか、Umap 上に示せるかどうか検討した。body nuclei（遅筋 slow＋速筋 fast）と specialized nuclei（NMJ など）の遺伝子発現を比較できるか検討するため、Heatmap で body myonuclei（遅筋 slow＋速筋 fast） versus unidentified myonuclei、body myonuclei（遅筋 slow＋速筋 fast） versus NMJ nuclei（Ache、Etv5 など）において、upregulated と downregulated が認められた上位約 30 遺伝子のクラスタリングを行い、NMJ 関連遺伝子がクラスタリング可能かどうか検討した。また、それぞれの核ポピュレーションにエンリッチされたマーカー遺伝子を Violin plots で示した。最終的には、免疫細胞化学法を用いて、遺伝子発現パターンをバリデーションする予定である。

4. 疾患 iPS 細胞を用いた NMJ 病態の解明

構築したシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態の解析を行った。さらに、健常者と患者 iPS 由来の運動ニューロンと骨格筋による非細胞自律的な効果も検討した。今後、変異遺伝子を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で正常化し、遺伝的バックグランドが同一の（isogenic）コントロール iPS 細胞を作製し（Footprint-free system）、病態をレスキューできるか検討する予定である。

5. 病態関連因子の探索

scRNA-seq/snRNA-seq のシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態関連因子の探索を行っている（図 2）。

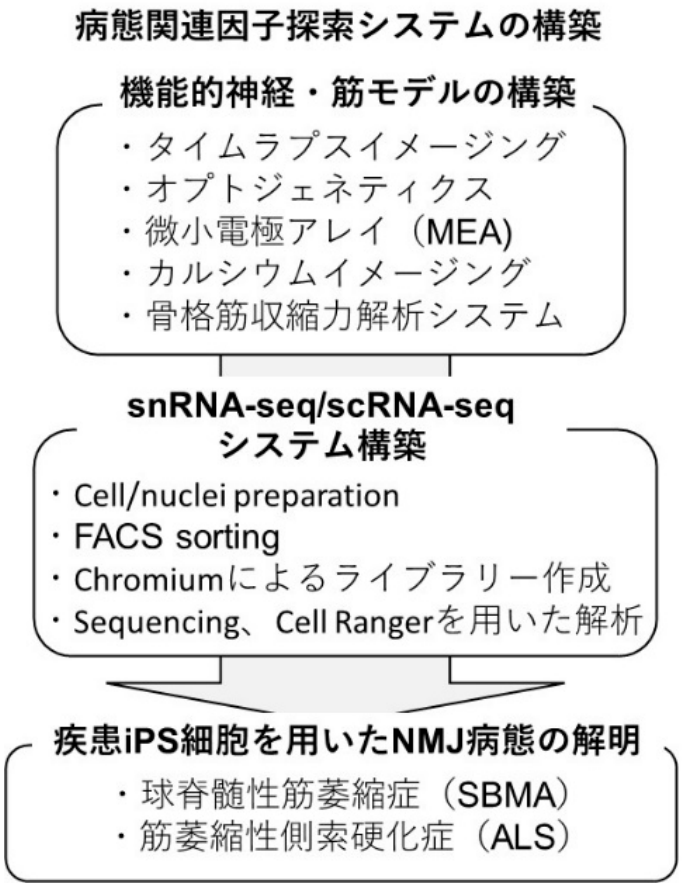


図 2. scRNA-seq/snRNA-seq 解析システムの構築

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1） Rashid MI, Ito T, Miya F, Shimojo D, Arimoto K, Onodera K, Okada R, Nagashima T, Yamamoto K, Khatun Z, Shimul RI, Niwa JI, Katsuno M, Sobue G, Okano H, Sakurai H, Shimizu K, Doyu M, Okada Y. Simple and efficient differentiation of human iPSCs into contractible skeletal muscles for muscular disease modeling. Sci Rep. 2023 May 25;13(1):8146. doi: 10.1038/s41598-023-34445-9.