

井上 治久

京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

iPS 細胞を駆使した神経変性疾患病因機構の解明と個別化予防医療開発

§1. 研究実施の概要

本研究課題では、アルツハイマー病 (AD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 等の神経変性疾患について、疾患特異的 iPS 細胞を神経系譜に分化誘導することにより、in vitro で神経変性を生じる微小環境 (ニッチ) を再現し、ニッチのミスフォールドタンパク質モニタリングによる疾患予防法確立、遺伝学的解析によるニッチ制御分子同定と該分子機能のモデル動物での評価を目指している。(Inoue et al. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, [*In press*])

今研究期間において、AD および ALS 患者由来の疾患特異的 iPS 細胞クローンを樹立した。

ヒト iPS 細胞より ALS で変性する脊髄運動ニューロンを迅速分化・純化する方法を開発した。さらに ALS およびコントロール iPS 細胞由来運動ニューロンを用いたマイクロアレイによる遺伝学的解析を行った。また神経変性疾患の病因に深く関与していると考えられてきた異常タンパク質の蓄積を、iPS 細胞より分化誘導したヒトニューロンで観察することに成功した。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたアルツハイマー病病因関連分子アミロイド β ペプチド (A β) について、その産生関連分子の分化過程における経時的発現モニタリングを行った。

一方、iPS 細胞利用による神経変性疾患治療の基礎検討として、正常マウス由来の iPS 細胞から神経前駆細胞に富む胚様体 (neurosphere) を作製し、野生型マウスなどの脳内に移植した。移植後 3 週の時点で脳を摘出し、移植細胞の生着を確認した。また、移植細胞のレポーター遺伝子となる変異型神経受容体のクローニングを行い、同遺伝子を神経細胞に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。さらに同マウスのポジロン断層撮影 (PET) を実施し、脳内遺伝子発現レポーターの実用的な PET イメージングを初めて成功させた。

今後、これらの結果を有機的に統合し、さらに研究の目的達成をはかる。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「井上」グループ

- ① 研究分担グループ長: 井上 治久 (京都大学、准教授)
- ② 研究項目

- ・神経変性疾患iPS細胞樹立(iPS細胞評価、iPS細胞遺伝子導入)
- ・神経変性微小環境(ニッチ)の再現

(2)「岩田」グループ

- ① 研究分担グループ長:岩田 修永(長崎大学、教授)
- ② 研究項目
 - ・アルツハイマー病 iPS 細胞由来神経系細胞を用いた診断法の確立と予防・治療法の開発(ミスフォールドタンパク質モニタリング)

(3)「戸田」グループ

- ① 研究分担グループ長:戸田 達史(神戸大学、教授)
- ② 研究項目
 - ・神経変性疾患iPS細胞由来神経系細胞を用いた遺伝学的解析

(4)「須原」グループ

- ① 研究分担グループ長:須原 哲也((独)放射線医学総合研究所、グループリーダー)
- ② 研究項目
 - ・iPS細胞利用による神経変性疾患モデル動物の分子イメージング(モデル動物イメージング、細胞ベクター作製)

§3. 研究実施内容

【井上 G】

本年度は以下の研究を推進した。

遺伝性および孤発性アルツハイマー病および ALS の疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

疾患特異的 iPS 細胞から疾患標的細胞への分化誘導効率が、同一人物由来であっても、iPS 細胞株により異なることを観察した。そこで、ALS に関して、ヒト iPS 細胞より ALS で変性する脊髄運動ニューロンを迅速分化・純化する方法を開発した。この方法を用いて ALS およびコントロール iPS 細胞由来運動ニューロンを収集し、マイクロアレイによる遺伝学的解析を行った。ソートされた脊髄運動ニューロンは、コリレーションプロットでは、発現パターンが比較的類似していたが、ALS とコントロールで、発現量の異なる数十個の遺伝子を同定した。また神経変性疾患の病因に深く関与していると考えられてきた異常タンパク質の蓄積を同定した。

【岩田 G】

本年度は、コントロールおよびアルツハイマー病患者 iPS 細胞由来神経系細胞に発現するアミロイド前駆体蛋白質(APP)や A β 産生系コンポーネントの発現量ならびに A β 分泌量の解析を

進め、コントロールおよびアルツハイマー病患者間での各コンポーネントの発現量や A β 分泌量の変化を明らかにすることを目指した。iPS 細胞から分化誘導された神経細胞は、A β 代謝系に関わる全ての因子を発現していることは確認した。コントロールおよびアルツハイマー病患者の両方の場合で、分化誘導期間に比例して iPS 細胞由来神経系細胞内 β -セクレターゼ(BACE1) (A β 産生の初発段階に関与する)、APP およびその N 末端フラグメント量や総 A β 分泌量が増加した(論文準備中)。

【戸田 G】

戸田グループは、神経変性疾患 iPS 細胞由来疾患材料を用いた遺伝学的解析のモデル研究として、神経機能の統合である認知機能の差が顕著な一卵性双生児のマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現・DNA メチル化解析を行い、神経機能に関する遺伝子の同定を試みた。一卵性双生児 6 組 12 検体のリンパ芽球由来 RNA を用いて遺伝子発現プロファイリング解析を行ったところ、それぞれの双子の IQ が低い方の検体で、炎症性サイトカイン遺伝子の発現が有意に高い傾向にあった。また、血液由来ゲノム DNA を用いてメチル化解析を行ったところ、兄弟間に有意差が見られるゲノム領域は同定されなかった。さらに CNV の解析も行ったが、双子の兄弟間で異なる CNV は確認されなかった。以上から、神経機能の統合である認知機能に炎症性サイトカインが関係している可能性がある。(Yu et al. 論文準備中)。今後、神経変性疾患 iPS 細胞由来神経細胞において同定した炎症性サイトカインの関連等を解析する。

【須原 G】

本グループの研究は、アルツハイマー病などの神経変性疾患モデル動物に iPS 細胞由来の神経系細胞を移植し、病理変化や脳機能障害への治療効果を生体イメージングにより明らかにすると共に、移植細胞自体を可視化し経時的変化を追跡することを目的としている。

平成 22 年度は、細胞移植の基礎検討として、野生型マウスなどへの細胞移植を試みた。具体的には、C57BL/6 バックグラウンドで蛍光タンパク(DsRed)を発現するマウス由来の iPS 細胞から、神経前駆細胞に富む胚様体(neurosphere)を作製し、C57BL/6 系統の野生型マウスもしくは神経免疫関連分子の遺伝子改変マウスの脳内に移植した。移植後 1-2 週の時点でポジトロン断層撮影(PET)により移植細胞の活性を評価したところ、一部の個体で高い活性が認められた。移植後 3 週の時点で脳を摘出し、DsRed をマーカーとして移植細胞の生着が確認された。移植細胞の生着率、神経細胞およびグリア細胞への分化度、癌化率などについて現在解析中で、これらと神経免疫関連分子との相関についても分析を行なっている。

上記移植実験に並行して、移植細胞を非侵襲的な生体イメージングにより可視化するレポーター遺伝子の開発に取り組んだ。将来的にヒトに応用可能とするために、PET でイメージングできるレポーターの遺伝子として、もともと脳内に微量しか存在しない神経受容体の遺伝子に機能喪失型変異を組み込んだものや、特殊なリガンド以外結合しなくなる変異を組み込んだ神経受容体遺伝子を候補とした。4 種類の変異型受容体遺伝子をクローニングし、これらを神経細胞に特異的

に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。F1 マウスを用いて、変異型受容体に特異的に結合する PET リガンドを投与しイメージングを行ったところ、野生型マウスでは脳内のシグナルがほとんど認められないのに対して、トランスジェニックマウスでは変異型受容体へのリガンド結合による明瞭なシグナル増加が認められた。この結果より、低いバックグラウンドと高い感度で PET により画像化可能な脳内遺伝子発現レポーターシステムが、世界に先駆けて実現できたと考えられる。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Inoue H., Yamanaka S. “The Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*”, [*In press*]

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)