

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 21 年度採択研究代表者

井上 治久

京都大学 物質・細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター ・特定拠点准教授

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。

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。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたアミロイド β ペプチド ($A\beta$) 代謝モニタリングおよび、ヒト iPS 細胞由来グリア細胞を用いたマイクロアレイによる遺伝学的解析を行った。さらにモデル動物に対する治療用 iPS 細胞由来ベクターを *in vivo* で可視化するためのレポーターの開発を実施した。

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、特定拠点准教授)

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)

(2) 「岩田」グループ

① 研究分担グループ長: 岩田 修永 ((独) 理化学研究所、副チームリーダー)

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

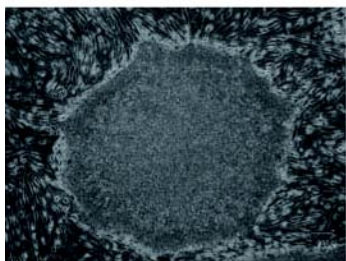
- ・ iPS 細胞利用による神経変性疾患モデル動物の分子イメージング(モデル動物イメージング、細胞ベクター作製)

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

アルツハイマー病(AD)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者皮膚線維芽細胞にレトロウイルスで3因子(Klf4、Oct3/4、Sox2)もしくは4因子(cMyc および3因子)を導入し、疾患特異的 iPS 細胞クローン(図1:各コロニーはES細胞様)を樹立した。各因子のサイレンシング、3胚葉への分化能、核型等を検討中である。

図1



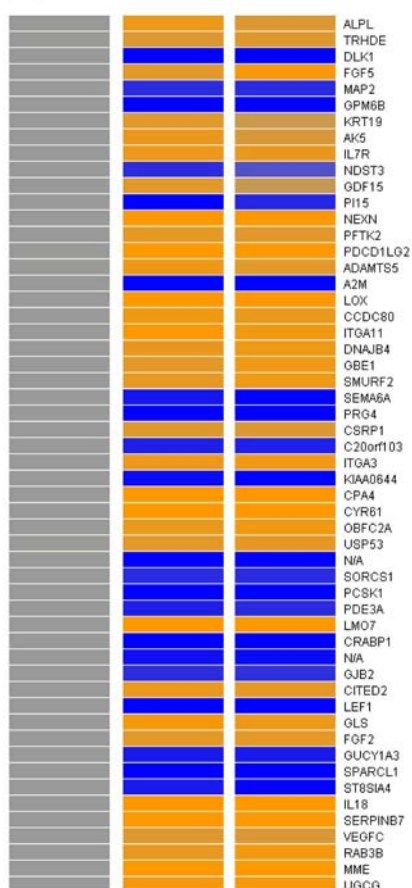
今研究期間に、疾患特異的 iPS 細胞を用いる研究の前に、コントロールヒト iPS 細胞を用いて、下記の研究を推進した。

コントロールヒト iPS 細胞を neurosphere を経て、Tuj1 陽性神経細胞に分化誘導した。誘導後数日および数週間後に、細胞および遠心して沈殿を除去した後の培養上清を用いて、アルツハイマー病において、ミスフォールド化する A β 量の測定を行った。各 A β 濃度は、A β (1-40)および A β (1-42)の合成品を用いて作成した検量線を基に算出した。分化誘導期間に比例して、総 A β 分泌量が増加することが明らかになった。

今後遺伝性および孤発性アルツハイマー病患者 iPS 細胞を用いて同様のモニタリングを行う。ALS ではグリア細胞が非自律性運動神経変性に寄与することが知られている¹⁾。今研究期間に、

コントロール iPS 細胞をグリア細胞 (GFAP 陽性アストロサイト) に分化誘導し、Affymetrix 社マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った (図 2: マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った結果、コントロール iPS 細胞由来アストロサイトはアストロサイトのマーカーである GFAP や GLAST を発現していた。また、GFAP や GLAST の発現は免疫染色でも確認された)。アストロサイトの各種マーカー遺伝子の発現を認めた。今後遺伝性および孤発性 ALS 患者 iPS 細胞を用いて同様の解析を行い、病態へ関与しうる遺伝子の同定を目指す。

図2



iPS 細胞から分化させた神経系細胞が、神経変性疾患モデル動物において機能修復を可能にするかどうかをイメージングにより評価するため、ポジトロン断層撮影 (PET) で移植細胞の生着や遊走のトラッキングを可能にするレポーター遺伝子をあらかじめ細胞に組み込み、レポーター蛋白に対する選択的 PET プローブを動物に投与する必要がある。今研究期間に、ある内在性神経受容体に変異を導入したレポーター遺伝子の作製と、その変異型特異的検出用リガンド薬剤を開発し、ポジトロン核種標識を実施した。今後、このレポーター遺伝子を iPS 細胞へ導入し、神経変性モデル動物に移植する際に移植細胞の *in vivo* トラッキングを行う予定である。

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。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Inoue H, Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research.
the JSPS Issue of Experimental Cell Research (*in press*)