

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. 研究実施体制

(1) 「井上」グループ

① 研究代表者: 井上 治久 (京都大学、准教授)

② 研究項目

- ・神経変性疾患特異的 iPS 細胞樹立・疾患再現、およびその分子メカニズムの解明
- ・iPS 細胞由来ニューロンを純化する技術の開発
- ・神経変性疾患標的細胞遺伝子発現データベースの構築

(2) 「岩田」グループ

① 主たる共同研究者: 岩田 修永 (長崎大学、教授)

② 研究項目

- ・iPS 細胞由来ニューロンを純化する技術の開発
- ・ γ セクレターゼ調節因子の解析
- ・アルツハイマー病 iPS 細胞由来ニューロンを用いた病態解析

(3) 「戸田」グループ

① 主たる共同研究者: 戸田 達史 (神戸大学、教授)

② 研究項目

- ・神経変性疾患 iPS 細胞由来神経細胞・グリア細胞のマイクロアレイ解析

(4) 「須原」グループ

① 主たる共同研究者: 須原 哲也 ((独)放射線医学総合研究所、プログラムリーダー)

② 研究項目

- ・神経変性疾患モデルマウスにおける iPS 細胞技術を利用した治療効果の生体イメージング、及びプローブ開発

・脳内イメージングに適したレポーター遺伝子の開発、及びその有用性評価

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

「井上」グループ

本研究課題では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、アルツハイマー病 (AD) 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。

本年度、iPS 細胞を神経細胞へ分化誘導し、その後、神経細胞を純化する技術を開発した。RNA 結合タンパク質である TDP-43 の変異を有する遺伝性 ALS 運動ニューロンの解析によって、既報告 ALS モデルで同定された疾患表現型を再現した。

さらに、ALS-iPS 細胞から運動ニューロンを純化し、遺伝子発現解析を行い、ALS 運動ニューロン遺伝子発現データベース (Gene expression data base for ALS motor neuron) を作成した。

アルツハイマー病の解析については、アミロイド β 測定を含むアッセイ基盤を確立し¹⁾、遺伝性 AD-iPS 細胞を樹立し、岩田グループ、戸田グループとともに、一部の疾患表現型を再現した。

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。

「岩田」グループ

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 (結果の一部は、PLoS ONE¹⁾ に公表)。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。しかし興味深いことに、 γ -セクレターゼ構成成分 (PS1, Aph1, Pen2, ニカストリン) の発現量にはまったく変化が認められなかった。また、いずれの iPS 細胞クローンの場合も、神経細胞への分化誘導期間が長くなるにつれ、A β 42/A β 40 比が有意に低下し、最長 35 日間の分化誘導では *in vivo* で観察されるレベルとほぼ同程度になった。この結果は、分化誘導に伴い、 γ -セクレターゼ活性を修飾し A β 42/A β 40 比を低下する何らかの因子が存在することを示唆する。戸田グループでは DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により、分化誘導期間で変動する幾つかの候補分子を明らかにしている。当研究グループでは、これらの候補遺伝子の中から γ -セクレターゼ活性に変化を与える可能性が高い遺伝子を選別して、クローニングを行い、手始めとして既に確立している株化細胞の系を用いて解析を進めている。詳細な解

析を進めた結果上記の調節因子が同定されれば、直接的にアルツハイマー病の創薬につながる
と考えられる。一方、同一人物から調製した iPS 細胞由来神経細胞の比較においては今回測定し
た全ての項目において著しい差異が観察され、同一人物由来のクローンでも大きな clonal
variation が存在した。しかし、このような clonal variation は分化誘導された神経細胞を純化するこ
とで解決できると考え、目下それに向けた研究を進めている。

「戸田」グループ

ヒト iPS 細胞由来神経細胞は、分化誘導期間が長くなるにつれ、 $A\beta 42/A\beta 40$ 比が有意に低下
することが昨年次に示され、戸田グループは、 γ -セクレターゼ活性を修飾し $A\beta 42/A\beta 40$ 比を
低下させる分子の候補をマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により同定した。本年度は、
その候補遺伝子の特に Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)解析により同定したものの中から、
培養細胞系を用いて $A\beta 42/A\beta 40$ 比を低下させる分子の特定を試みた。ある1分子が
 $A\beta 42/A\beta 40$ 比を変化させている可能性があり、今後詳細な解析をする。

一方で、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 17 組 34 検体において、マイクロアレイ
を用いた網羅的遺伝子発現・DNA メチル化解析を行った。低分子 G タンパク質やリボソーム、
DNA 複製に関連する遺伝子群が認知能力に関係する可能性が示唆された。

「須原」グループ

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 23 年度は、野生型マウス脳内に iPS 細胞由来の神経系細胞を移植し、移植細胞が生着し
て神経細胞やグリア細胞に分化することを確認した。その際に、移植細胞の生着率や癌化率が、
iPS 細胞のクローンや培養ならびに投与時の条件、移植時の細胞の調整法や密度などに依存す
るかどうかを検討した。少なくとも細胞の調整法と密度が大きく影響しうることを確認し、現在最適
化を実施している。

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を発現するトランス
ジェニックマウスを作製し、ポジトロン断層撮影 (PET) イメージングによりレポーターが生体で非侵
襲的かつ特異的に画像化できることを確認した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K., Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama

K, Saido T.C, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H, “Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease”, PLoS ONE, vol. 6, Issue 9, e25788, 2011
(DOI: 10.1371/journal.pone.0025788)

2. Wada T, Goparaju SK, Tooi N, Inoue H, Takahashi R, Nakatsuji N, Aiba K, “Amyotrophic lateral sclerosis model derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant SOD1”, Stem Cells Translational Medicine. (in press).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)