

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

- ・各疾患 iPS 細胞樹立、iPS 細胞評価。
- ・疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患病的微小環境 (ニッチ) の再現・解析。

(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

- ・家族性および孤発性アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 患者 iPS 細胞由来神経系細胞を用いた病態解析と治療薬スクリーニングのためのプラットフォームの開発。
- ・新規病態制御分子の同定と機能解析および AD モデル動物に対する疾患の予防・治療実験。

(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

- ・疾患特異的 iPS 細胞由来細胞を用いた分子生物学的解析。
- ・認知機能に関する網羅的遺伝子発現解析。

(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、グループリーダー)

② 研究項目

- ・モデルマウスにおける細胞移植による神経機能障害などの病態改善についての検討。
- ・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

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 等の神経変性疾患について、疾患特異的 iPS 細胞を神経系譜等に分化誘導する技術を開発する¹²⁾とともに、それらの技術を用いて、*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、RNA 結合タンパク質である Tar DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) の変異を有する家族性 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、さらにいくつかの新たな表現型(phenotype)を同定した³⁾。具体的には、ALS 運動神経細胞では、神経突起が短縮し (cellular phenotype)、運動神経細胞純化後の解析で、RNA 代謝に関連する遺伝子の発現が上昇し、神経細胞骨格の遺伝子発現が低下していた (molecular phenotype)。また TDP-43 タンパク質は、TDP-43 pre-mRNA に結合し、発現量を自己制御していることが知られているが、ALS 運動神経細胞では TDP-43 の遺伝子発現が上昇していた。さらに、生化学的解析によって ALS においては、TDP-43 タンパク質の凝集性の亢進を認め (biochemical phenotype)、TDP-43 のタンパク質としての性質の変化によって、TDP-43 の自己発現制御が破綻していることが ALS の病因の一つになりうる可能性を見いだした。既存の疾患モデル系と異なり、疾患特異的 iPS 細胞由来の本モデルは、TDP-43 のコピー数は正常、プロモーター領域は内在性の TDP-43 独自のものであり、繊細な病態をより忠実に再現できる可能性がある。さらに、RNA 代謝を制御する薬剤のスクリーニングを行い、アナカルジン酸により、ALS 運動神経細胞の表現型が改善することを見いだした³⁾。

AD の解析については、amyloid β ($A\beta$) 測定を含むアッセイ基盤を確立している。現在 AD の病態に関して、いくつかの仮説があり、1. アミロイドカスケード仮説(細胞外 $A\beta$ が fibril という多重合体を形成し毒性を有する)および 2. アミロイドオリゴマー仮説(細胞内外の $A\beta$ が fibril を作る前に形成する数個～数十個の分子が会合した小さな集合体である $A\beta$ オリゴマーが毒性を有する)である。

本年度、それぞれの仮説の根拠となっている家族性 AD iPS 細胞を樹立し(1.については APP-Ehime 変異家族性 AD、2.については APP-Osaka 変異家族性 AD)、岩田グループ、戸田グループとともに、疾患表現型を再現した⁵⁾。その家族性 AD の解析プラットフォームに基づき、孤発性 AD の解析を行った。結果として、AD は $A\beta$ 代謝の観点からは複数の病態が存在し、細胞内に $A\beta$ オリゴマーが蓄積するタイプに対しては、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 投与により小胞体ストレス・酸化ストレス、神経細胞脆弱性が改善することを示した⁵⁾。このように、これまで一括りにされていた孤発性 AD の中にも異なるフェノタイプ(細胞外に $A\beta$ を蓄積するタイプと細胞内に $A\beta$ を蓄積するタイプ)があり、孤発性 AD をサブグループ化することによって将来的に各々の患者

の病態に合った治療法(例えば、DHA)を提案できる可能性を示唆した

また、ヒト iPS 細胞からアストロサイトの分化誘導法を確立し、解析を行った。結果として、今回の研究では APP-Osaka 変異家族性 AD iPS 細胞由来アストロサイトでも神経細胞と同様に細胞内 A β オリゴマーの蓄積が観察された。この結果は、APP-Osaka 変異家族性 AD では神経細胞と同様にアストロサイトが A β オリゴマーによって傷害を受ける可能性を示唆し、従来と異なった視点での AD 研究の展開が期待できる。

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。

「岩田」グループ

本研究では、患者の遺伝情報を反映する iPS 細胞由来神経細胞を用いた病的ニッチにおいて、疾患原因となるミスフォールドタンパク質 A β の代謝(産生・分解)、凝集過程および病態修飾因子の発現レベルをモニタリングすることにより、個別の患者で発症のメカニズムやその予測、予防薬剤・化合物の同定、さらに治療効果の検証を行った。

研究拠点の井上グループでは正常対象者、孤発性 AD 患者および A β の前駆体タンパク質 APP に変異を有する家族性 AD 患者 (APP-Osaka 変異、APP-Ehime 変異) から iPS 細胞を樹立した。当グループでは、井上グループから提供された各 iPS 細胞由来神経系細胞培養液および細胞抽出液を用いて、A β の代謝について詳細に解析した(結果は、「井上」グループの記載を参照)⁵⁾。

「戸田」グループ

戸田グループは、昨年次より継続し、 γ -セクレターゼ活性を修飾し A β 42/A β 40 比を低下させる分子の候補を同定してきた。強制発現および RNAi を用いた培養細胞系における詳細な解析により、昨年次に GSEA 解析により同定した候補分子には A β 42/A β 40 比を変化させるものはないことがわかった。また、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析にノイズを減らす工夫 (GSEA や比較グループの多様化) を行い、より確からしい候補分子を同定し、培養細胞系を用いて A β 42/A β 40 比を低下させる分子の特定を継続して行った。また、これまで、双生児の研究から、認知機能に関連する遺伝子研究をすすめてきており、今後、AD の遺伝子解析における結果と比較・検討を行う⁶⁾⁷⁾。

「須原」グループ

本研究では、神経変性疾患の病態関連分子を標的とするイメージングプローブを、遺伝子改変マウスから霊長類に至るモデル動物を用いて開発し、神経疾患発症前の診断技術を創出することを目標としている。これと共に、iPS 細胞由来細胞ベクターや低分子薬剤の生体内での挙動および機能を明らかにし、神経疾患に対する予防・治療効果をモニタリングする分子イメージング技術を、モデル動物を用いて実現することをねらいとしている。

iPS 細胞由来の神経前駆細胞を脳内に移植した際の生着や神経細胞への分化をモニタリング

する技術として、神経特異的なプロモーターの制御下にレポーター遺伝子を発現させ、放射性プローブによりポジロン断層撮影 (PET) で検出する方法の開発に取り組んだ。PET による脳内遺伝子発現レポーターイメージングを実現させるためには、(1)レポーターに結合する PET リガンドが血液脳関門を通過すること、(2)PET リガンドが内在性の分子に結合せずにレポーターにのみ選択的に結合すること、(3)内在性分子はレポーターには作用しないこと、の 3 つが条件となる。我々は前年度までにこれらの条件を満たすレポーター遺伝子を 2 種類見出して、そのうちの 1 種類を神経特異的 Thy-1 プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックマウスを作製し、PET によりレポーター発現を可視化した。今年度は京都大学井上グループと連携して同トランスジェニックマウスの胎児線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、これを神経前駆細胞に分化させ野生型マウス脳に移植し、PET によりレポーターイメージングを試みた。

神経変性疾患の病態関連分子を PET で可視化するプローブ開発として、AD をはじめとする多くの神経変性型認知症で中核病理となるタウタンパクの PET プローブを作製し、モデル動物であるタウトランスジェニックマウスで評価を行った。多数の候補化合物から患者およびモデルマウス脳切片上のタウ病変に強く結合する化合物を選び出し、代謝的に比較的安定な化合物を絞り込み、放射性標識を行なってタウトランスジェニックマウスに投与した。投与後に実施した PET スキャンでは、タウ病変の脳内分布に一致したプローブの集積が得られた。一方、野生型マウスではプローブは速やかに脳から排出され、明らかな集積は見られなかった。これにより、モデルマウスでタウ病態の経時変化をモニタリングする技術が実現し、細胞プローブや治療薬のタウ蓄積に対する効果を調べることも可能となった。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. 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 superoxide dismutase 1. *Stem Cells Translational Medicine*, **5**, 396-402, 2012 (doi:10.5966/sctm.2011-0061).
2. Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**:12538-43, 2012 (doi:10.1073/pnas.1209979109).
3. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo, T Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa

- M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* **4**:145ra104, 2012 (doi:10.1126/scitranslmed.3004052).
4. Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R. (2012) Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* **287**: 42984-42994, 2012 (doi: 10.1074/jbc.M112.417600).
5. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N,* Yamanaka S, and Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, **12**:487-496, 2013 (doi: 10.1016/j.stem.2013.01.009).
6. Yu CC, Furukawa M, Kobayashi K, Shikishima C, Cha PC, Sese J, Sugawara H, Iwamoto K, Kato T, Ando J, Toda T. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses of monozygotic twins discordant for intelligence levels. *PLoS ONE* **7**: e47081, 2012 (doi:10.1371/journal.pone.0047081).
7. Ando J, Fujisawa KK, Shikishima C, Hiraishi K, Nozaki M, Yamagata S, Takahashi Y, Ozaki K, Suzuki K, Deno M, Sasaki S, Toda T, Kobayashi K, Sugimoto Y, Okada M, Kijima N, Ono Y, Yoshimura K, Kakihana S, Maekawa H, Kamakura T, Nonaka K, Kato N, Ooki S. Two cohort and three independent anonymous twin projects at the Keio Twin Research Center (KoTReC). *Twin Res Hum Genet* **16**:202-216, 2013 (doi: 10.1017/thg.2012.131).

(3-2) 知財出願

- ① CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)