

200936053A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発

平成21年度 総括研究報告書

(H20 - 難治 - 一般 - 045)

研究代表者 祖父江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成22 (2010) 年3月

目 次

I. 総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発

研究代表者 祖父江 元…… 1

II. 研究報告(研究分担者)

1. TDP-43 による神経細胞障害：loss of function の検討
祖父江 元…… 7
2. 再生誘導因子の逐次投与による ALS ラットモデル内在性再生機転促進の試み
糸山 泰人…… 10
3. 人工多能性幹細胞を用いた神経変性疾患の病態解明
岡野 栄之…… 13
4. GluR2 RNA 編集異常と TDP-43 蛋白のプロセッシング異常
郭 伸…… 19
5. 低分子化合物と幹細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の治療法の研究
高橋 良輔…… 22
6. オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発
田中 啓二…… 25
7. 血管内投与型 AAV ベクターの開発
中野 今治…… 30
8. 初代培養ミクログリアに対するリコンビナントmutant SOD1^{G93A}の
作用と遺伝子発現プロファイリング
船越 洋…… 32
9. 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた新規免疫療法開発研究 (第 2 報)
漆谷 真…… 37
10. 細胞内 TDP-43 凝集体形成モデルの構築とその応用
長谷川成人…… 41
11. ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態の解明
山中 宏二…… 45

III. 研究報告(研究協力者)

12. TAT-FNK 蛋白髄腔内投与による ALS モデルマウスへの蛋白治療
阿部 康二…… 47
13. ALS モデルマウス肝臓における一過性組織障害からの回復過程には、
HGF のエンドクリン性供給が寄与している
加藤 信介…… 49
14. 孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの CNV(copy number variation)解析 (第 3 報) :
疾患感受性蛋白質の免疫組織化学染色および Western blot 法による検討 (第 3 報)
加藤 丈夫…… 53

15. 神経突起制御因子 PRGs の結合タンパク TRIMEN の同定と機能解析	佐々木秀直……	55
16. 遺伝性 ALS のモデル動物におけるリンパ球の役割	佐古田三郎……	58
17. 家族性 ALS の凝集体形成機構の解明と治療法への応用	谷口 直之……	63
18. TDP-43 過剰発現による ALS サルモデル動物作製	水澤 英洋……	65
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		69
V. ワークショップ・班会議プログラム		79
VI. 研究者一覧		93
VII. 研究成果の刊行物・別刷(別冊)		

I. 總括研究報告

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発

研究代表者 祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻 脳神経病態制御学講座神経内科学 教授

研究要旨

本研究班では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を克服するため、基礎系、臨床系研究者を結集し集約的な研究の推進体制を構築している。本研究の目標は、病態に関連する新規標的分子の探索同定による病態解明、新規治療法・治療手段の開発、孤発性ALS新規疾患モデルの開発であり、三者の研究を有機的に結合させることによって成果の生産性を向上させた。これらの多岐に渡る研究成果には、分担研究者、研究協力者間の共同研究、情報交換が重要な役割を果たした。今年度は、ALSの疾患感受性遺伝子探索の分野では、昨年度までに同定した疾患感受性遺伝子の発現、局在を明らかにした。ALS病態におけるグリアの役割解明の分野では、リンパ球とミクログリアの相互作用の証明、自然免疫経路が疾患進行の制御因子であることの証明を行い、さらにミクログリアでの変異SOD1による遺伝子発現変化を明らかにした。ALS病態におけるTDP-43の役割解明と疾患モデル開発の分野では、TDP-43ノックダウンによる神経細胞障害におけるRho family GTPaseの関与を明らかにし、FTLD患者脳に蓄積するTDP-43断片の同定、ADAR2 活性低下とTDP-43陽性封入体形成の分子連関の検討を行った。さらに、カニクイザルへのTDP-43の過剰発現により孤発性ALSモデルを開発することに成功した。ALSの治療法開発へ向けた新規病態解明の分野では、SOD1がtransglutaminaseの基質となり多量体を形成すること、ALSモデルマウスの肝臓における一過性組織学的障害からの回復にHGF供給が関与すること、ミトコンドリアの品質管理においてPINK1がParkinの上流で機能することを明らかにした。また、神経細胞の突起伸長に係わるPRGsに結合する蛋白としてTRIMENを同定した。ALS治療に向けたデリバリーシステム開発の分野では、血管内投与可能な神経細胞特異的プロモーターを搭載したAAVベクターの開発に成功し、変異SOD1マウスにおけるTAT-FNK髄腔内投与の優れた治療効果を明らかにした。ALSに対する低分子化合物による治療・再生療法・免疫療法開発の分野では、SOD1の発現量を減少させる10種類の化合物と既存薬の同定、EGF/FGF-2に続くHGFの逐次投与による内在性再生機転の促進、患者皮膚からのiPS細胞樹立と運動ニューロンへの誘導に成功した。さらに、変異SOD1マウスに対する変異型、野生型アポクチン効果の作用機序解明、他動免疫療法の効果確認を行った。これらの多岐に渡る研究成果には、分担研究者、研究協力者間の共同研究、情報交換が重要な役割を果たした。

研究分担者

- 糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科学分野教授
岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学講座教授
郭 伸 東京大学大学院医学系研究科臨床神経精神医学講座神経内科学分野准教授
高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学分野教授
田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所所長代行
中野 今治 自治医科大学内科学講座神経内科部門教授
船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野准教授
漆谷 真 滋賀医科大学分子神経科学研究センター神経難病治療学分野准教授
長谷川成人 東京都精神医学研究所分子神経生物学研究チーム副参事研究員

研究協力者

阿部 康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経病態内科学講座神経内科学分野教授
加藤 信介 鳥取大学医学部脳病態医科学分野准教授
加藤 丈夫 山形大学医学部器官病態統御学講座生命情報内科学分野教授
佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野教授
佐古田三郎 大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学講座神経内科学分野教授
谷口 直之 大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学（生化学工業）教授
野本 明男 東京大学疾病生命工学センター特任教授
水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学講座神経内科学分野教授

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンの選択的細胞変性死によって発症後3～5年で死に至る神経難病である。ALSに対する有効な治療法は未だ確立しておらず、患者本人のみならず家族や社会にも重大な苦痛と損失を伴う疾患であり、一刻も早い克服が望まれている。本疾患の進行を阻止し有効な治療法の開発に結びつけるためには、基礎・臨床を問わずALS研究者を結集し、集約的な研究を推進していく体制を構築する必要がある。

本研究班の目的は、ALSの病態に基づく画期的治療法の開発に向けて、ALSの病態を担う病態関連分子を探索・同定・解析し、これを基に有効な分子標的治療を開発することである。

今年度は、ALS疾患感受性遺伝子探索の分野では、孤発性ALS患者において、コピー数が増加していることを明らかにした遺伝子Xがコードする蛋白質の発現・局在について検討した。

また、ALS病態におけるグリアの役割解明の分野では、ALSにおけるリンパ球-ミクログリア相互作用の役割解明、変異SOD1マウス脊髄におけるmRNA発現プロファイルの網羅的解析と自然免疫経路の検討、初代培養ミクログリアに変異SOD1を添加した際の遺伝子変動評価などを目的とした。

一方で、ALS病態におけるTDP-43の役割解明と疾患モデルの開発を推進した。すなわち、loss of functionの立場からのTDP-43の機能解明、FTLD患者脳に蓄積するTDP-43断片の解析、孤発性ALS運動ニューロンにおけるADAR2 活性低下とTDP-43陽性封入体形成の分子連関解明を目指した。そして、カニクイザルの

頸髄前角細胞に野生型TDP-43を過剰発現させ、ALS疾患モデルを開発することを目的とした。

次に、ALSの治療法開発へ向けた新規病態解明を推進した。まず、SOD1の凝集体形成機構解明を治療法開発へと発展させるために、SOD1がTransglutaminaseの基質となり、重合体を形成するかを検討した。また、ALSモデルマウスにおいて、肝臓の組織学的障害が中枢神経系と異なり一過性である機序の解明を目指した。さらに、

多くの神経変性疾患の発症への関与が推定されるミトコンドリアの品質管理におけるPINK1やParkinの役割について、選択的オートファジー (Mitophagy) の作用機序を中心に検討した。一方、神経細胞の突起伸長にかかわる膜タンパク質PRG1の機能のALS治療への応用を目指し、LPA・PRGを制御するタンパク質の機能を検討した。

ALS治療に向けたデリバリーシステムの開発では、血管内投与可能なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの開発、細胞膜透過性を有するTAT蛋白を搭載したTAT-FNKのALSモデルマウスへの持続髄腔内投与における治療効果検討を目的とした。

治療の分野では、SOD1の転写をモニタリングできるアッセイ系の樹立により、変異SOD1の発現量を抑制する低分子化合物のスクリーニングを目指した。また、神経再生誘導療法開発を目指し、変性脊髄における内在性再生機転の促進を試みた。さらに、ALS患者からiPS細胞を誘導し、運動ニューロンを作成することを目的とした。免疫療法においては、野生型、変異型アポSOD1タンパクによるワクチン療法の作用機序を解析し、一方、他動免疫療法についても効果を検討した。

B. 研究方法

研究内容をサブセクション毎に主任および分担・協力研究者の各テーマに沿った独自の研究を進展させつつ情報交換を密に行い、研究組織としての有機的協力態勢を強化した。

【ALS の疾患感受性遺伝子の探索】

孤発性 ALS 患者でコピー数が有意に増加している遺伝子 X 蛋白質の発現・局在を SH-SY5Y 細胞、ヒト剖検脳、脊髄組織を用いて免疫組織化学染色、Western blot にて解析した。

【ALS 病態におけるグリアの役割解明】

成熟リンパ球が存在しない RAG2 遺伝子欠損マウスと変異 SOD1 マウスを交配し、その表現型の解析及び脊髄の標識レクチン染色、定量的 RT-PCR により、リンパ球-ミクログリア相互作用について考察した。

また、疾患進行期の ALS モデルマウスの脊髄病巣の DNA マイクロアレイ解析から自然免疫関連分子の発現異常を検討した。さらに SOD1 変異マウスと Toll-like 受容体を介したシグナル伝達に必須の MyD88, Trif ノックアウトマウスとの 3 重交配を行い、疾患の進行速度や生存期間延長効果を検討した。

一方、大腸菌由来リコンビナント変異、野生型 SOD1 およびその分画で Pure なラット初代培養ミクログリアを処理した後、DNA Array 法にて変動遺伝子を解析した。

【ALS 病態における TDP-43 の役割解明と疾患モデル開発】

ALS 病態における TDP-43 の役割を loss of function の立場から検討するため、neuro-2a 細胞を用い siRNA 法にて TDP-43 のノックダウンを行い、Rho family GTPase に注目し、細胞機能障害機序を検討した。

FTLD 患者脳に蓄積するリン酸化 TDP-43 の主要な C 末断片をゲル内トリプシン消化し、質量分析を用いて N 末端部位の解析を行った。同定された C 末断片を細胞に発現し、凝集体形成について観察した。また、TDP-43 の変異体を発現する細胞モデルを用いて低分子化合物の評価を行った。

培養細胞 2 系統を用い、野生型 TDP-43、TDP-43 siRNA、様々な TDP-43 変異体を導入し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率、ADAR2 mRNA の発現量、GluR2 pre-mRNA の発現量、酵素対基質量比の変化を検討した。

カニクイザルの頸髄前角細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させ、神経症状および神経病理学的所見を観察し、ALS モデルとなりうるかを検討した。

【ALS の治療法開発へ向けた新規病態解明】

リコンビナント human SOD1 を精製し、TG2 と Ca²⁺存在下でインキュベートし、SOD1 が TG2 の基質になり、数~多量体が検出されるかどうかを還元型 SDS-PAGE/Western blotting にて検討した。さらに、TG の阻害剤である Cystamine 投与の影響を調べた。

ヒト G93A-SOD1 を高発現(25 コピー数導入)する ALS(G1H-G93A)モデルマウスの肝臓に焦点をあてて、肝細胞回復の過程における HGF-c-Met system の活性化について免疫染色などにより解析を行った。

PINK1 において、仮想的ミトコンドリア移行シグナルを持つ N 末ドメインを削除した変異体や、キナーゼ不活性型変異体を PINK1 欠損 MEFs に導入・発現させ、Parkin の損傷ミトコンドリアへのリクルートを検討した。さらに、PINK1 がミトコンドリアの膜電位に依存した Mitophagy に必須であるか否かを検討した。

Yeast two-hybrid スクリーニングにより、PRGs (PRG1 及び PRG2) と結合するタンパク質の同定を試み、同定タンパク質による PRGs の分解への影響を検討した。また、それらのタンパク質の局在や細胞形態への影響を観察するとともに、さまざまな変異体を作製し PRGs との結合に必要な領域を決定した。

【ALS 治療に向けたデリバリーシステムの開発】

血管内投与後に脳内へ移行しやすい AAV ベクターの開発を目指し、神経細胞への親和性を持つ Rabies virus の糖タンパク質由来の RVG ペプチド(29 アミノ酸)の誘導体を化学合成しカプシド蛋白を修飾した。そして、このベクターをマウスの血管内に投与し組織を解析した。

細胞膜透過性を有する TAT 蛋白と抗アポトーシス作用をもつ FNK 蛋白を結合した TAT-FNK を SOD1 (G93A) Tg マウスに持続髄腔内投与し、治療効果につき、腰髄の運動ニューロン数、cleaved caspase 9、3 および TUNEL 陽性細胞数などを検討した。

【ALS に対する低分子化合物による治療・再生療法・免疫療法の開発】

SOD1 の promoter 制御下に分泌型ルシフェラーゼ

を発現するベクターをヒトグリア細胞株に導入したハイスクリーンシステムにより、変異 SOD1 転写活性を抑える低分子化合物、既存薬の同定を試みた。

変異 SOD1 ラット脊髄腔内に、EGF と FGF-2 を最初の 1 週間、ついで HGF を逐次的に 2 週間脊髄腔内へ持続投与した (逐次投与群) 群と、EGF/FGF-2/HGF 三者を同時持続投与した群とにおいて、ニューロンやグリア新生の効果を検討した。

患者繊維芽細胞にエクトロピックレセプターを発現するレンチウイルスベクター遺伝子(Slc7a1)を導入し、次に初期化因子である Oct4/Sox2/Klf4/cMyc をレトロウイルスを用いて iPS 細胞樹立を試みた。さらに、ES 細胞からニューロスフェアを形成させる培養法を用い運動ニューロンの誘導を行った。

変異 SOD1 マウスに対する変異型、野生型アポワクチン効果の作用機序を明らかにするため、血清と脾臓サイトカイン発現解析、脊髄組織の免疫組織化学的検討を行った。さらに、変異 SOD1 特異認識モノクローナル抗体を髄腔内投与し、他動免疫療法の効果を確認した。

(倫理面への配慮)

採取した DNA サンプル、剖検組織等については、遺伝子解析を含む医学研究への利用についてのインフォームド・コンセントを患者および患者家族より得た。剖検組織等のヒト由来試料を用いる研究については、各分担研究者が所属する研究施設の倫理委員会から承認を得た。組み替え DNA 実験を行う際には、「遺伝子組み換え生物等の使用などの規制による生物の多様性の確保に関する法律」などにに基づき、各研究者が所属する研究施設での組み替え DNA 実験規定に従った。また実験動物の取り扱いについては、カルタヘナ条約および、各研究施設の動物実験指針に基づき、動物愛護面に十分配慮しつつ利用動物数を極力減らすように努めた。

また、ヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 19 年 10 月 31 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。患者からの iPS 細胞の樹立は「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に

関する研究」として慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けており (2008 年 6 月)、十分な説明の上で患者の同意の下で行われた。

C&D. 研究結果と考察

【ALSの疾患感受性遺伝子の探索】

蛋白質Xは、ヒト脳および脊髄の免疫組織化学染色では、SH-SY5Y細胞と同様に、神経細胞、グリア細胞の核に局在しており、運動ニューロンの核での蛋白質Xの量的異常が、運動ニューロンの生存にとって重要な役割を演じている可能性が考えられた。

【ALS病態におけるグリアの役割解明】

mSOD1/RAG2^{-/-}の発症はmSOD1と比べて遅延しており、疾患初期においてレクチン陽性ミクログリア及び神経保護作用を持つYm1のmRNAの発現が脊髄で増加していた。すなわち、リンゴ球消失により疾患初期にミクログリアが活性化してYm1の分泌が増加し、発症が遅延した可能性が示唆された。

変異SOD1マウスの脊髄mRNAの網羅的解析で同定した225個の遺伝子の約70%がミクログリア由来と考えられ、自然免疫に関与するToll-like 受容体などの発現上昇がみられた。そこで、SOD1G93A/MyD88^{-/-}/Trif^{-/-}およびSOD1G93A/Trif^{-/-}を解析したところ、疾患進行の加速が見られたが、MyD88よりむしろTrif依存性経路が疾患進行の制御因子である可能性が示唆された。

変異SOD1G93Aと野生型SOD1の初代培養ミクログリア細胞の遺伝子発現修飾を網羅的に評価した結果、ミクログリアの活性化マーカーや各種サイトカイン、HGF-c-Met系の発現が修飾されていた。ALSにおけるミクログリアの遺伝子発現変化を有利に修飾することにより、発症後のALS病態改善に寄与するものと期待される。

【ALS病態におけるTDP-43の役割解明と疾患モデル開発】

TDP-43ノックダウン細胞では、神経突起の伸長が障害され細胞死が誘発された。また、Rho family membersであるRhoA, Rac1, Cdc42の不活化、細胞膜への局在減少が観察され、これは、Rho familyのゲラニルゲラニル化の抑制に基づくことが明らかとなった。TDP-43は、神経細胞の形態維持と生存にとって重要な役割を担うと考えられる。

FTLD患者脳に蓄積するTDP-43断片として、219および247から始まるC末切断を同定し、いずれもリン酸化、ユビキチン化された凝集体の形成を観察した。また、TDP-43蓄積細胞モデルを用いて、メチレンブルーとディメボンの二つの薬剤がTDP-43の凝集抑制効果を有することを明らかにした。

ADAR2 活性低下とTDP-43陽性封入体形成の分子連関の検討で、TDP-43の発現減少や各種変異は、直接RNA編集低下を引き起こしている可能性はないことが示唆された。今後は、RNA編集異常の下流にTDP-43プロセッシング異常がある可能性について検討を行う。

カニクイザルの頸髄にAAVベクターで野生型human TDP-43を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43の細胞質への異常局在、凝集体形成および核の染色性低下という孤発性ALS類似の病理変化の再現に成功した。

【ALSの治療法開発へ向けた新規病態解明】

FALS変異型SOD1やAポ型SOD1はTG2の基質となり、Ca²⁺依存的に共有結合によるSOD1の数一多量体の形成が認められた。また、Cystamine処理によりこれらの数一多量体形成を阻害することができ、治療法への応用が期待できる。

GIH-G93Aマウス肝臓における一過性組織学的障害からの回復には、HGFのエンドクリン性供給が寄与していた。脊髄前角細胞では血液脳関門の存在により早期からの血中HGF供給が受けられないために回復できず、細胞死に至ると考えられた。

PINK1がParkinの上流で機能し、Parkinを損傷ミトコンドリアへ輸送させるリクルート因子であることを見出した。この結果からPINK1-Parkin経路が損傷したミトコンドリアをオートファジーでクリアランスし、ニューロンの健康維持に働いていることが明らかとなり、このシステムを制御する化合物は神経変性疾患の有力な治療薬になることが示唆された。

リング型ユビキチンリガーゼとして機能するTRIMEN1/2は、PRGsが結合する一方、PRGsの分解には関与していないことを明らかにした。また、TRIMEN2を過剰発現することで神経突起様伸長が抑制されることを見いだした。また、変異体の作製によりTRIMEN2のPRGsへの結合部位を明らかにした。

【ALS治療に向けたデリバリーシステムの開発】

神経細胞特異的プロモーターを搭載した改良型AAVベクターは、脳の広範な領域と脊髄の神経細胞で発現が認められた。今回、開発した改良型ベクターは、血管内投与により運動神経細胞へ遺伝子導入可能であり、臨床応用への期待が持てる。

変異SOD1マウスでは、TAT-FNK投与群でL4腰髄運動ニューロン数が優位に増加していた。また、cleaved caspase 9, 3, TUNEL陽性細胞数はTAT-FNK投与群で優位に減少し、抗アポトーシス効果が十分に発揮されたことが判明し、有効な治療法として期待される。

【ALSに対する低分子化合物による治療・再生療法・免疫療法の開発】

9,600種類の低分子化合物のスクリーニングにより、濃度依存性にSOD1の発現量を減少させる10種類の化合物とその構造式類似の既存薬を同定し、その効果をELISA及びウェスタン・ブロッティングで確認した。今後、この化合物がSOD1転写を抑制するメカニズムを検討するとともに、マウス、幹細胞由来モデルを用いた治療実験を推進する。

ALSラットモデル脊髄腔内に再生誘導因子EGF/FGF-2に続いてHGFを逐次的に投与することにより、過度のグリア新生や再生阻害因子の沈着が抑制され、幼若ニューロンマーカー陽性細胞の増加が認められた。再生誘導因子の種類に応じた至適投与タイミングを考慮することが、内在性再生機転の促進戦略として重要と考えられた。

ALSを含む神経変性疾患、特に遺伝子の既知の構造異常のある症例を中心に、18症例の患者皮膚からiPS細胞を樹立し、Neurosphere法やSDIA法を用いてニューロンを誘導した。ALSのiPS細胞からは病変部位である運動ニューロンを誘導することに成功した。今後は疾患特異的iPS細胞により、ALSの病態解明・創薬を目指す。

ワクチンの効果発現は獲得免疫系に大きく修飾され、特に発症後期のTh1系免疫反応は進行に積極的に関与する可能性が示された。またIL-4とTGFβの重要性が示されたことから、鼻粘膜ワクチンを中心とする粘膜ワクチンが有効である可能性が示唆された。一方、変異SOD1特異認識抗体は発症時期の髄腔内持続投与によって、進行を21日間遅延させ、この効果はFab断片化抗体よりもFcを含む全長抗体の方が明らかであった。

E. 結論

本研究が目的とする ALS の病態に基づく治療法の確立は今世紀の最も重要な課題の1つであり、本疾患に対する有効な治療法の開発は、我々神経疾患の研究に携わる者にとっての使命である。

本研究によって、近年の ALS 研究のトピックである TDP-43 やグリアの病態への役割が明らかになりつつある。また、新規治療法開発へ向けての ALS の病態解明がさらに進み、新たな分子標的が次々と明らかになった。さらに、低分子化合物による治療、遺伝子治療、再生治療、免疫治療についても、より優れたデリバリーシステムを構築することができ、特に iPS 細胞から運動ニューロンを導入できたことは大きな成果であった。サルにおいて新たな ALS モデルの作成にも成功し、研究は順調に進捗した。

本研究班が目指す ALS という難治性疾患に対する分子標的治療の開発は患者や家族にとっても大きな希望をもたらすものである。さらに、運動ニューロンの過酷な変性死の機序解明へ向けてのチャレンジは他の神経変性疾患研究に対しても重要なインパクトを与えると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Efficient generation of transgenic nonhuman primates using common marmoset embryos. *Nature* 459: 523-527, 2009.

他の研究発表は別掲

H. 知的財産の出願・登録状況

発明の名称 神経幹細胞の増殖誘導方法

出願番号 特願 2003-578547

出願人 株式会社 G B S 研究所

特許番号 特許第 03984959 (2009.7.13)

発明者 戸田 正博、岡野 栄之、河上 裕、戸山 芳昭、三上 裕嗣、坂口 正徳

他の出願・登録状況は研究報告（分担研究）に別掲

II. 研究報告(研究分担者)

TDP-43 による神経細胞障害：loss of function の検討

研究分担者:祖父江 元¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授
研究協力者:井口洋平¹⁾、勝野雅央^{1,2)}、丹羽淳一³⁾、曾根 淳¹⁾
足立弘明¹⁾、田中章景¹⁾、貝淵弘三⁴⁾

- 1) 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学
- 2) 名古屋大学大学院高等研究院
- 3) 愛知医科大学脳卒中センター
- 4) 名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学

研究要旨

43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43)は、ALS や frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions(FTLD-U)において観察されるユビキチン化封入体の主要構成成分として知られている。TDP-43 は核蛋白であるが、これら疾患の変性神経細胞やグリア細胞では核から細胞質へ局在が変化している。このため、本来の機能が失われ神経変性を来している可能性がある。そこで、分化させた Neuro-2a 細胞において TDP-43 をノックダウンしたところ、神経突起の伸長が障害され細胞死が誘発された。ノックダウン細胞では Rho family members の RhoA, Rac1, Cdc42 が不活化されており、これら分子の細胞膜への局在が減少していた。さらに、ノックダウン細胞では、Rho family の活性と細胞内局在の調節因子であるゲラニルゲラニル化が抑制されていた。これらのことより、TDP-43 は Rho family GTPases のゲラニルゲラニル化を通じて、神経細胞の形態維持と生存にとって重要な役割を担うと考えられた。

A.研究目的

TDP-43 は ALS や FTLD-U の神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として報告されているが、それが神経変性にどのように関わっているのかは明らかでない。ALS や FTLD-U において、封入体が存在する神経細胞では核に存在するはずの TDP-43 が染色されないことから TDP-43 の loss of function の検討が gain of function と同様に重要と考えられる。今回我々は、TDP-43 の loss of function について検討した。

B.研究方法

Neuro-2a 細胞において、2 種類の siRNA オリゴヌクレオチドにより TDP-43 をノックダウンし、分化させた後、細胞形態や細胞死を

観察した。また、Annexin V や TUNEL 染色、caspase3/7 アッセイによりアポトーシスの有無について検討した。さらに、TDP-43 ノックダウンにおける Rho family GTPases の役割を明らかにするため、プルダウンアッセイにより活性化の検討を行った。また、Rho family GTPases の細胞内局在をウェスタンブロッティング、蛍光免疫染色を用いて検討し、ゲラニルゲラニル化を ¹⁴C 標識メバロン酸の取り込みにより評価した。

(倫理面への配慮)

組み替え DNA 実験に際しては、名古屋大学における組み替え DNA 実験規定に従った。

C.研究結果

TDP-43 をノックダウンすることにより神経突起の伸長阻害と細胞死が誘導された。この細胞死は、Annexin V や TUNEL 染色、caspase3/7 アッセイの結果からはアポトーシスの証拠は得られなかった。

神経突起の伸長阻害と細胞死をきたす原因として Rho family GTPase である RhoA, Rac1, Cdc42 に注目し検討したところ、RhoA, Rac1, Cdc42 の活性が一様に低下していることが判明した。これらの活性低下は、Rho family によってリン酸化される myosin phosphatase targeting subunit 1 のリン酸化が障害されていることから確認された。

Rho family が生物学的活性を発揮するためには、細胞膜に局在化する必要がある、このためには Rho family 蛋白のゲラニルゲラニル化が起こっていなければならない。

まず、TDP-43 ノックダウン細胞において RhoA, Rac1, Cdc42 の局在を細胞分画後のウェスタンブロットティングおよび蛍光免疫染色で確認したところ、細胞膜での局在が低下していた。さらに、¹⁴C 標識メバロン酸の RhoA や Rac1 への取り込みが、ゲラニルゲラニル化の特異的阻害剤である GGTI-298 を投与した時と同様に、ノックダウン細胞では減少しており、ゲラニルゲラニル化の障害が生じていることが明らかとなった。

一方、ゲラニルゲラニル化の最終的な基質である GGPP を加えることにより、膜結合型 RhoA, Rac1, Cdc42 の増加、細胞生存率の上昇、神経突起伸長の回復が見られた。

D. 考察

Rho family (RhoA, Rac1, Cdc42) は、細胞骨格系の維持、神経突起伸長や細胞生存に重要な役割を果たしている。本研究により、TDP-43 の loss of function により Rho family の活性化障害と神経変性が生じることが明らかとなった。

ゲラニルゲラニル化の特異的阻害剤である GGTI-298 を Neuro-2a 細胞に加えることにより、Rho family の不活化、非アポトーシス性神経細胞が生じた点、¹⁴C 標識メバロン酸の RhoA や Rac1 への取り込みが障害されていた点、また、GGTI-298 で処理した細胞に TDP-43

を過剰発現することで膜局在や細胞生存、神経突起延長が改善した点より、TDP-43 ノックダウンがゲラニルゲラニル化の障害を通じて Rho family を不活化していると考えられた。

E. 結論

TDP-43 の Loss of function により神経変性を起こす可能性が示唆された。その病態機序としてゲラニルゲラニル化が障害されることによる Rho family GTPase の活性低下が一因と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 288-294 (2009)
2. Palazzolo I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Taylor JP, Sumner CJ, Fischbeck KH, Pennuto M. Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron*. 63, 316-328 (2009)
3. Sone J, Niwa JI, Kawai K, Ishigaki S, Yamada SI, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 88, 123-135 (2009)
4. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J Biol Chem*. 284: 22059-22066 (2009)
5. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Getting a handle on Huntington's disease: the case for

- cholesterol. *Nature Med.* 15, 253-254 (2009)
6. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.* 65, 140-150 (2009)
 7. Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler.* 10, 288-294 (2009)
 8. Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet.* 18, 898-910 (2009)
 9. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G. Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 276, 163-169 (2009)

2. 学会発表

1. 井口洋平、勝野雅央、丹羽淳一、曾根淳、和座雅浩、足立 弘明、田中章景、貝淵弘三、祖父江 元. TDP43 による神経細胞障害：loss of function の検討. 第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009 年 5 月 21 日
2. 和座雅浩、田中章景、蔣 月梅、黄 哲、勝野雅央、足立弘明、山本正彦、祖父江 元. Dynactin-1 ノックダウン線虫モデル. 第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009 年 5 月 21 日
3. 田中章景、和座雅浩、山本正彦、祖父江 元.

- 孤発性 ALS 疾患モデルによる病態解明と治療法開発. 第 50 回日本神経学会総会シンポジウム 仙台 2009 年 5 月 21 日
4. 井口洋平、勝野雅央、丹羽淳一、曾根淳、和座雅浩、足立弘明、田中章景、貝淵弘三、祖父江 元. TDP-43 による神経変性機序. 第 32 回日本神経科学大会 名古屋 2009 年 9 月 16 日
 5. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. Neuroscience 2009 シカゴ 2009 年 10 月 18 日

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

なし

再生誘導因子の逐次投与による ALS ラットモデル内在性再生機転促進の試み

分担研究者：糸山泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科学・教授
研究協力者：青木正志, 割田 仁, 水野秀紀, 鈴木直輝（東北大学神経内科）
船越 洋（大阪大学分子再生医学）
中村敏一（大阪大学先端科学イノベーションセンター）

研究要旨 画期的治療法として期待される神経再生誘導療法開発をめざし、変性脊髄における内在性再生機転の促進を試みた。ALS ラットモデル脊髄腔内に再生誘導因子 EGF/FGF-2 に続いて HGF を逐次的に投与すると、これらを同時に投与した群に比較して過度のグリア新生や再生阻害因子の沈着をより抑制することができ、幼若ニューロンマーカー陽性細胞の増加が認められた。本研究のように再生誘導因子の種類に応じた至適投与タイミングを考慮することが、内在性再生機転の促進戦略として重要であり、これらの知見は細胞移植を含めた将来的な神経再生療法開発に寄与すると期待される。

A. 研究目的

〔背景〕 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の画期的な新規治療法として再生医療開発が期待されている。ALS は脳・脳幹・脊髄にいたる広範な系統的運動ニューロン変性をもたらすため、局所的な細胞移植によって神経再生を実現することは困難である。したがって、脳室－中枢神経軸 (ventricular neuraxis) に沿った脳・脊髄の広い領域に存在する神経前駆細胞 (Weiss, *et al.* J Neurosci 1996) を賦活する方略が実現可能であるならば魅力的である。また、生理的には神経新生が起きていない部位で損傷により誘導される神経新生 (insult-induced neurogenesis) も注目されており (Okano, *et al.* J Neurochem 2007)、成体中枢神経組織が本来もつ内在性再生機転を促進する再生戦略の可能性がある。

〔目的〕 本研究班において我々は新しく開発したラットの ALS モデル (Nagai, *et al.* J Neurosci 2001) を用い、内在性神経前駆細胞の活性化による神経再生に取り組んできた。その中で、代表的な再生誘導因子である上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) の脊髄腔内持続投与では、神経前駆細胞の増殖促進が得ら

れるものの、ニューロン新生は検出されずグリア新生優位の促進効果にとどまることを明らかとなっている。そこで今回、EGF/FGF-2 に加えて、ニューロン新生促進・グリア増生抑制・神経保護作用を併せもつ肝細胞増殖因子 (HGF) を組合せ投与し、EGF/FGF-2 投与を上回る効果の有無を検討した。

B. 研究方法

発症直後 (24-25 週齢) の His46Arg 変異 *SOD1* 遺伝子導入ラットに皮下浸透圧ポンプを用い、EGF と FGF-2 を最初の 1 週間、ついで肝細胞増殖因子 (HGF) を逐次的に 2 週間、計 3 週間脊髄腔内へ持続投与した (逐次投与群)。bromodeoxyuridine を最初の 7 日間持続投与して新生細胞を標識し、再生誘導因子投与終了時の腰髄灌流固定凍結切片で各種選択的マーカーによる多重蛍光免疫組織化学の定量的解析を共焦点レーザー顕微鏡下に行った。対照群 (PBS 投与群)、EGF/FGF-2/HGF 三者同時持続投与群 (同時投与群) と合わせ 3 群間で比較し統計学的解析を加えた (各群 n=8)。

〔倫理面への配慮〕 すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に

十分配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

C. 研究結果

〔神経変性抑制効果〕 3週間の持続投与終了時、腰髄前角細胞脱落が同時投与群 ($P<0.01$)・逐次投与群 ($P<0.001$) で有意に抑制され、とくに逐次投与群では病的なリン酸化ニューロフィラメントの前角への蓄積が減少していたことから ($p<0.05$)、神経保護効果が明らかとなった。

〔グリア新生への効果〕 腰髄前角の新生細胞密度は同時投与群でのみ有意に増大していたが ($p<0.01$)、逐次投与群は PBS 投与群と有意差を認めなかった。しかし、同時投与群で腰髄腹側の白質で有意にグリア前駆細胞の増殖を認めた ($p<0.001$) のに対し、逐次投与群ではむしろ腰髄前角でグリア前駆細胞の増殖が有意に抑制されていた ($p<0.05$)。また、新生アストロサイトは逐次投与群で腰髄前角、白質ともに他群より有意に減少しており ($p<0.001$)、過度のグリア新生が逐次投与によって抑制されることが明らかとなった。さらに逐次投与群でのみ、有意に腰髄前角の再生阻害因子 (コンドロイチン硫酸) 沈着が抑制されていた ($P<0.001$)。

〔神経新生への効果〕 同時投与群 ($p<0.01$)、さらに逐次投与群 ($p<0.001$) では一層、腰髄前角および中心灰白質で PSA-NCAM 発現が有意に亢進し、幼若ニューロンの選択的マーカーである PSA-NCAM/HuC/D 二重陽性細胞も有意に増加していた ($p<0.001$) ことから、HGF を EGF/FGF-2 と組合せ投与することで、neuroblastic な細胞が病変部位を中心とする脊髄灰白質で増加することが明らかとなった。さらにニューロン新生への効果について現在検討中である。

D. 考察

齧歯類の成体脊髄では生理的条件下においても一定の新生細胞が存在し、おもにグリア新生にあずかっているとされる (Horner, *et al.* J Neurosci

2000)。我々はこれまでに、ALS ラットモデル脊髄では発症期以前から新生細胞が進行性に増加してグリア新生 (グリオーシス) に与るとともに、運動ニューロン脱落が顕著となった末期に至っては未分化神経前駆細胞も増殖していることを報告してきた。このように不十分ながら ALS 病態下でも存在が示唆される内在性再生機転を促進する戦略として、本研究のような外来性再生誘導因子の脊髄腔内持続投与は有力な戦略のひとつと考えられる。

EGF/FGF-2 は後期ニューロン新生を抑制し得ることが報告されている (Chen, *et al* Neurobiol Aging 2007)。すなわち、EGF/FGF-2 投与によって未分化神経前駆細胞の増殖促進効果が得られたとしても、長期にわたって EGF/FGF-2 が継続投与されることでグリア新生優位の促進効果が生じてしまいニューロン新生を実現し難いことが想定される。そこで本研究では、ニューロン新生促進作用とグリア増生抑制作用を併せもつ HGF を EGF/FGF-2 に組合せ投与することで、神経新生促進を試みた。上述の結果より実際に HGF を組合せ投与、とりわけ EGF/FGF-2 の投与終了に続いて「逐次的に」HGF を投与することで、病変部位における (1) 過度のグリア新生抑制, (2) それに伴う再生阻害因子沈着の抑制, (3) neuroblastic な細胞増加促進 が同時投与群より効果的に得られることが明らかとなった。

今後、より詳細な検討を加えるとともに、さらにニューロン新生を促進あるいはニューロン新生抑制因子の阻害を試み、有効な内在性再生機転の促進戦略を開発していくことが重要と考えられる。

E. 結論

複数の再生誘導因子を適切な投与タイミングで組み合わせて脊髄腔内に持続投与することで、ALS ラットモデル変性脊髄における内在性再生機転が促進され得る可能性が示唆された。神経前駆細胞を単に増殖させるだけでなく、過度のグリア新生を抑制し、細胞外微小環境を神経再生許容的なものに誘導する戦略が重要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y. Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant *Cu/Zn superoxide dismutase* gene. **J Neuropathol Exp Neurol** 2009; 68(4): 365-373.

2. 学会発表

- 1) Warita H, Aoki M, Mizuno H, and Itoyama Y. Endothelial proliferation in the spinal cord microvasculature of ALS transgenic rats. December 8-10, 2009. 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, Germany
- 2) Suzuki N, Aoki M, Warita H, Takeda S, and Itoyama Y. Dislocation of neuronal nitric oxide synthase contributes to muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. September 9-12, 2009. 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland.
- 3) 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人. 神経栄養因子による ALS の治療戦略. 2009 年 5 月 21 日 第 50 回日本神経学会総会シンポジウム (仙台)
- 4) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 船越 洋, 糸山泰人. 逐次的な再生誘導因子投与による ALS モデルラット脊髄の内在性再生機転促進. 2009 年 5 月 20-22 日 第 50 回日本神

経学会総会(仙台)

- 5) 水野秀紀, 割田 仁, 青木正志, 糸山泰人. ALS モデルラット脊髄活性化アストロサイトにおける再生阻害因子発現. 同上
- 6) 鈴木直輝, 青木正志, 割田 仁, 水野秀紀, 武田伸一, 糸山泰人. 筋萎縮性側索硬化症マウスに対する一酸化窒素合成酵素阻害剤による治療の検討. 同上
- 7) 割田 仁, 青木正志, 船越 洋, 中村敏一, 糸山泰人. 運動ニューロン変性を示すラットモデル脊髄における微小血管新生. 2009 年 9 月 16-18 日 Neuroscience 2009 [第 32 回日本神経科学大会] (名古屋)
- 8) 鈴木直輝, 青木正志, 割田 仁, 加藤昌昭, 水野秀紀, 島倉奈緒子, 秋山徹也, 古谷博和, 銚之原敏博, 岩城明子, 服巻保幸, 富樫慎二, 今野秀彦, 糸山泰人. 若年発症・急速進行・好塩基性封入体を特徴とし FUS/TLS に変異を持つ日本人家族性筋萎縮性側索硬化症の 3 家系. 2009 年 9 月 24-26 日 日本人類遺伝学会第 54 回大会 (東京)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル(出願済)

2. 実用新案登録

なし

人工多能性幹細胞を用いた神経変性疾患の病態解明

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨

神経変性疾患の病態解明・新規治療法開発の新たな方法として疾患特異的 iPS 細胞が有用であると期待されている。我々は今回、ALS 患者から採取した皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞を樹立することに成功した。樹立された iPS 細胞では ES 細胞マーカーの発現が確認され、SDIA 法を用いた神経細胞への誘導で Islet-1 および Tuj-1 陽性の運動ニューロンと思われる細胞への分化を認めた。この iPS 細胞由来の運動ニューロンを正常対照群と比較することにより ALS の病態解明・新規治療法の開発が大きく進歩することが期待される。

A.研究目的

2007 年にヒト繊維芽細胞への遺伝子導入で人工的に多能性幹細胞を誘導する技術が報告され、この方法で誘導された細胞は人工多能性幹細胞(iPS 細胞)と名付けられた。ヒト iPS 細胞は患者の皮膚から樹立された少量の繊維芽細胞から誘導することが可能であり、その性質は極めてヒト ES 細胞に類似していることが報告された。

これまで ALS 患者検体における病変部位の解析は死後検体を中心とせざるを得なかったため、その結果が患者の生体内での変化を正確に示しているかという点には大きな疑問が残っていた。この問題を解決するため、我々は ALS を含む神経疾患の患者から iPS 細胞を誘導し、誘導された疾患特異的 iPS 細胞に対して、我々がこれまで確立してきたヒト多能性幹細胞から神経前駆細胞/幹細胞を誘導する方法をニューロスフェアとして用いて誘導する方法を用いて、ALS 患者の運動ニューロンを培養皿上で誘導し、その表現系を正常対照群と比較することにより ALS の病態解明および新規治療法の開発を目指す。

B.研究方法

ALS を含む神経変性疾患、特に遺伝子の既知の構造異常のある症例を中心に、患者皮膚から繊維芽細胞を樹立する。iPS 細胞の樹立は山中らの報告したレトロウイルスベクターを用いた方法により行う。この方法は第 1 世代のヒト iPS 細胞樹立法であるが、現在我が国で樹立されている疾患特異的 iPS 細胞の樹立法の標準となっており、同じ方法で樹立された正常対照群 iPS 細胞の種類も多く解析も最も進んでおり、現状では最適な方法であると考えられる。患者繊維芽細胞にエクトロピックレセプターを発現するレンチウイルスベクター遺伝子(Slc7a1)を導入し、次に初期化因子である Oct4/Sox2/Klf4/cMyc をレトロウイルスを用いて導入を行う。遺伝子導入後 7 日目に Feeder 細胞上に細胞を播種し、培養条件をヒト ES 細胞と同様の条件に変更する。約 3-4 週間後に iPS 細胞のコロニーが出現する。十分にリプログラミングを受けた繊維芽細胞は、iPS 細胞に変化した時点ではレトロウイルスによって導入された遺伝子はサイレンシングされている。各実験ごとに 4 遺伝子に加え GFP もしくは dsRed の蛍光レポーターを発現するレトロウイルスを加えた群を設定し、典型的な iPS 細胞コロニーの形態をした細胞が、蛍光レポーターの遺伝

子が抑制され、十分にサイレンシングを受けていることを確認する。実際にはレポーターウイルスを感染させていない dish から細胞形態を指標として、1疾患あたり 50 個程度の独立したクローンを単離する。24well→6well→10cm とスケールを徐々に大きくし、評価用の RNA/DNA サンプルと凍結ストックを作成する。ここまでに 3-4 ヶ月程度の時間が必要であると考えられる。

我々のこれまでの知見で、樹立されたヒト iPS 細胞においては、レトロウイルスで導入された遺伝子が十分にサイレンシングされていることが、体細胞へと再分化する際に異常な分化抵抗性を有して腫瘍化するリスクも少なく、分化誘導シグナルに対しても適正に反応して分化するのに必要な条件である事が明らかになっている。まず定量的 PCR を用いて導入遺伝子の量を定量し、発現がよく消失しているクローンを 4-5 個選択する。我々は昨年度報告したヒト ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法が、ヒト iPS 細胞にも適用できることをすでに確認している。この方法で神経幹細胞への分化が良好であるクローンを選択し、ヒト iPS 細胞マーカーの発現の確認、テラトマ作成実験などで樹立したクローンの万能性を確認する。実際の解析ではこの方法とこれまで報告されている方法 (SDIA 法、神経ロゼット法) などその他の方法を組み合わせ細胞の分化誘導を行い、病変部位の細胞を誘導し、正常対照群の細胞と比較してその表現系を解析する。

(倫理面への配慮)

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒト ES 細胞の使用につ

いては、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 19 年 10 月 31 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。患者からの iPS 細胞の樹立は「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」として慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けており (2008 年 6 月)、十分な説明の上で患者の同意の下で行われる。

C.研究結果

これまでに計 18 症例から皮膚生検もしくは患者の手術検体から iPS 細胞の樹立を行った。その中で筋萎縮性側索硬化症および関連の神経変性疾患の症例は、慶應大神経内科 3 例 (孤発性パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症各 1 例)、順天堂大神経内科との共同研究で 1 例 (家族性パーキンソン病 2 例) である。皮膚生検に際しては患者に特に大きな副作用や合併症もなく終了した。iPS 細胞の樹立に関しては、全例で通常の方法で十分な数の良質なクローン数を樹立できた。樹立した iPS 細胞に関してはそれぞれの疾患感受性細胞へ試験管内で誘導を行っている。

慶應義塾大学医学部神経内科との共同研究である筋萎縮性側索硬化症症例は孤発性の症例で 70 代女性。2006 年 6 月頃から呼吸困難感と構音障害が出現、2007 年 5 月頃から両下肢筋力低下と歩行障害が出現し、構音障害も進行したため 8 月に慶應義塾大学医学部神経内科を受診した。舌の萎縮と筋線維束性収縮、四肢腱反射亢進等の所見を認め、筋電図検査において四肢、体幹、舌において神経原性変化を認め筋萎縮性側索硬化症と診断された。2009 年 2 月に呼吸不全増悪したため、気管切開術を施行した際に繊維芽細胞を樹立した。既往歴: X 年右内頸動脈瘤クリッピング術施行 家族歴: 特記

事項なし。

樹立された iPS 細胞では Tra1-60/81 の発現、SSEA3/4 の発現が確認された。SDIA 法を用いて神経細胞への誘導を行ったところ、Islet-1 および Tuj-1 陽性の運動ニューロンと思われる細胞に分化することを確認した。

D. 考察

樹立された iPS 細胞クローンの Transgene の消失と形態により解析に使用するクローンを絞り込むという方法を採用したが、山中研でのオリジナルなヒト iPS 細胞でも Transgene のサイレンシングが十分な 201B7 が最も外胚葉への分化が良好なことを根拠としている。この方法で選択した現在解析中の疾患 iPS 細胞クローンもほぼすべてのクローンで良好な神経分化を示し、異常な分化誘導、分化抵抗性を示す細胞は認められなかった。この選択法を継続し、解析に用いる品質の iPS 細胞クローンを効率的に選択することが可能であると思われる。

E. 結論

筋萎縮性側索硬化症を含む神経変性疾患、特に遺伝子の既知の構造異常のある症例を中心に、18 症例の患者皮膚から iPS 細胞を樹立し、良質なクローンの選択の後、Neurosphere 法や SDIA 法を用いてニューロンを誘導した。筋萎縮性側索硬化症症例の iPS 細胞からは病変部位である運動ニューロンを誘導することに成功した。今後は疾患特異的 iPS 細胞は ALS の病態解明・創薬を目標とする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1)

Kanki H, Shimabukuro MK, Miyawaki A and Okano H. "Color Timer" mice: visualization

of neuronal differentiation with fluorescent proteins. Mol. Brain (in press) 2010.

2)

Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H and Sawamoto K. : Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. Stem Cells. 2010. Jan 13. [Epub ahead of print]

3)

Tada H, Okano HJ, Takagi H, Shibata S, Matsumoto M, Yao I, Saiga T, Nakayama KI, Kashima H, Takahashi T, Setou M and Okano H. : Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. J. Biol. Chem. 2009 Dec 7. [Epub ahead of print]

4)

Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Kitamura K, Nagoshi N, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okada S, Shibata S, Toh S, Toyama Y, Nakamura M and Okano H. : Roles of ES Cell-Derived Gliogenic Neural Stem/ Progenitor Cells in Functional Recovery after Spinal Cord Injury PLOS ONE 4(11):e7706, 2009.

5)

Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshi T, Ohmura M,

Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J and Hirao A. : Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106(40):17163-17168, 2009.

6)

Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H and Yamanaka S. : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines Nature Biotechnol. 27(8):743-745, 2009. (*H. Okano is the corresponding author in this paper)

7)

Hamanoue M, Matsuzaki Y, Sato Ki, Okano