

20093607/A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

パーキンソン病および類縁疾患患者 iPS 細胞を用いた病態解明

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋 良輔

分担研究者 井上 治久

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

パーキンソン病および類縁疾患患者 iPS 細胞を用いた病態解明

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋 良輔

分担研究者 井上 治久

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目次

### I 総括・分担研究報告

1. パーキンソン病および類縁疾患患者iPS細胞を用いた病態解明  
高橋 良輔 3
  
2. 分担課題：遺伝性パーキンソン病患者からのiPS細胞樹立に関する研究  
井上 治久 5
  
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 7
  
- III. 研究成果の刊行物・別刷り 13

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
(総括・分担)研究報告書

パーキンソン病および類縁疾患患者iPS細胞を用いた病態解明に関する研究

研究代表者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授

研究要旨:17名のパーキンソン病患者より皮膚線維芽細胞を樹立した(遺伝性6名、孤発性11名)。類縁疾患として、3名の多系統萎縮症患者より、皮膚線維芽細胞を樹立した。

#### A. 研究目的

パーキンソン病(PD)の臨床診断は、臨床症状と画像診断などを含む多角的状況証拠を積み上げることによりなされているが、非典型的な場合も多く、正確な診断はレビー小体と呼ばれる細胞質内凝集体の出現を伴う黒質ドーパミン神経細胞変性を中心的特徴とする死後脳の病理組織学的所見に基づく。本研究は、パーキンソン病および類縁疾患の診断用分子生物学的バイオマーカーの同定およびその診断技術の確立を目的としている。

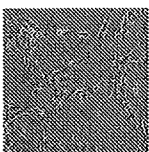
#### B. 研究方法

申請者は、これまでの研究から、構造異常を起こしたミスフォールドタンパク質の蓄積により神経変性が生じると考えている。本申請研究では、難病であるパーキンソン病およびその類縁疾患について、患者さんへの適切な説明及びそれに基づく同意取得の下、皮膚細胞を収集し、患者皮膚細胞バンクを構築する。

#### (倫理面への配慮)

京都大学医学部附属病院では、本研究は京都大学医学部倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的iPS細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究』(承認番号第824番)および『ヒト疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第G259)として承認されている。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守するものである。

#### C. 研究結果



17名のパーキンソン病患者より皮膚線維芽細胞を樹立した(左図はその1例)。内訳は、遺伝性6名、孤発性11名である。また、類縁疾患として、3名の多系統萎縮症患者より皮膚線維芽細胞を樹立した。

#### D. 考察

目標としていた数のパーキンソン病とその類縁疾患の皮膚線維芽細胞を樹立した。ただし、iPS細胞樹立とその解析は、今後の課題である。

#### E. 結論

本研究資金により、パーキンソン病およびその類縁疾患の皮膚線維芽細胞を集積した。本研究は、患者由来組織を使用するため、通常の基礎研究よりも、時間を要し、また、

発展途上の技術を用いており、研究費の面での長期的な支援を要する。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

村上 学、井上治久、高橋良輔 (2009) : 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略、*ファルマシア*、45 : 1009-1112

高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、*日本医事新報*、4445 : 79-80

Takahashi R. (2009) Edaravone in ALS. (commentary) *Exp Neurol.* 217:235-6

Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S (2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res.* 87:576-85.

Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A. (2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. *J. Neurochem* 108(2): 350-60.

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R (2009) Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. *Auton Neurosci.* 146:33-5.

Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac

metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 16:174-82.

Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R (2009) Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? *Epilepsia* 50:2072-84.

Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H (2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Neuroreport* 20:990-6.

Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T (2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 125: 2029-35.

Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalara RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R (2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice. *Brain Res.* 1294:202-10.

Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R (2009) Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Intern Med.* 48:1307-9.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R (2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res.* 65:263-71.

Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R (2009) Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. *Epilepsia.* 2009 Sep 22. [Epub ahead of print]

Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, Takahashi R, Fukuyama H. (2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol.* 120: 1923-6.

Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T. (2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68:1084-91.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H. (2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R (2010) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. *Neurosci Res.* 66:151-61.

Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, Takahashi R (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:1240-5.

Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Ihara M, Kawamata J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R (2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* in press.

## 2. 学会発表

高橋良輔：孤発性パーキンソン病の病因：環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経学会総会、仙台（2009. 5. 22）

高橋良輔：パーキンソン病の最新の治療と展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講演会、仙台（2009. 9. 6）

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズムー神経保護治療に向けてーシンポジウム神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第32回日本神経科学学会、名古屋（2009. 9. 18）

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
(分担)研究報告書

遺伝性パーキンソン病患者からのiPS細胞樹立に関する研究

研究代表者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授

研究要旨:1名の遺伝性パーキンソン病患者(じょうせ PARK8, )皮膚線維芽細胞より iPS 細胞候補クローンを樹立した。

研究分担者:井上治久  
京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)の臨床診断は、臨床症状と画像診断などを含む多角的状況証拠を積み上げることによりなされているが、非典型的な場合も多く、正確な診断はレビー小体と呼ばれる細胞質内凝集体の出現を伴う黒質ドーパミン神経細胞変性を中心的特徴とする死後脳の病理組織学的所見に基づく。本研究は、パーキンソン病および類縁疾患の診断用分子生物学的バイオマーカーの同定およびその診断技術の確立を目的としている。

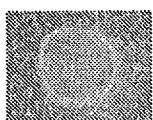
B. 研究方法

申請者は、これまでの研究から、パーキンソン病死後病理組織においては、 $\alpha$ -synucleinが中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて封入体として蓄積しており、パーキンソン病患者iPS細胞由来ドーパミン作動性ニューロンにおいて、 $\alpha$ -synucleinが生化学的に不溶化しやすいという仮説を有している。本申請研究では、難病であるパーキンソン病およびその類縁疾患皮膚細胞よりiPS細胞を作成し、分化誘導によるモデル細胞構築を行う。

(倫理面への配慮)

京都大学医学部附属病院では、本研究は京都大学医学部倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的iPS細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究』(承認番号第824番)および『ヒト疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第G259)として承認されている。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守するものである。また国立精神神経センター神経病院においても、倫理委員会申請準備中である。

C. 研究結果



1名の遺伝性パーキンソン病()患者皮膚線維芽細胞よりiPS細胞を樹立した(左図)。

D. 考察

樹立した皮膚線維芽細胞より、iPS細胞を作製、さらにドーパミン作動性神経に分化誘導し、表現型を解析する必要がある。

E. 結論

本研究資金により、パーキンソン病およびその類縁疾患の皮膚線維芽細胞を集積した。本研究は、患者由来組織を使用するため、通常の基礎研究よりも、時間を要し、また、発展途上の技術を用いており、研究費の面での長期的な支援を要する。

G. 研究発表

1. 論文発表

村上 学、井上治久、高橋良輔 (2009) :  
筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略、ファルマシア、45、1009-1112

2. 学会発表

井上治久・運動ニューロン疾患におけるiPS細胞の可能性・SMA家族の会・京都、2009年5月16日  
井上治久・疾患特異的iPS細胞を用いたALS研究・放射線分子疫学セミナー・広島、2009年7月2日

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research・International Symposium: New Approach for Molecular Neuropathology, Tokyo, Japan. 2009 Aug 13.

井上治久・疾患iPS細胞の樹立から臨床応用へ・第2回iPS細胞樹立・維持培養の講習会・京都、2009年8月26日

井上治久・Translational Neuroscience based on iPS cell Technology iPS細胞作製技術を用いた神経科学研究・第30回再生医療・臓器再建医学コースミーティング・京都、2009年9月11日

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research・The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan. 2009 Sep 16.

井上治久・疾患特異的iPS細胞を用いた神経変性疾患研究・倉敷神経内科疾患フォーラム・倉敷、2009年10月2日

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced

Pluripotent Stem cells research・The Workshop,  
San Francisco, USA.2009 Jun 8.

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced  
Pluripotent Stem cells research・Sweden-Japan Joint  
Colloquim: Advances in Cellular Reprogramming and  
Stem Cell Biology, Stockholm, Sweden. 2009 Sep 5.

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced  
Pluripotent Stem cells research・5th Symposium sur la  
SLA, Quebec, CANADA. 2009 Sep 25.

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced  
Pluripotent Stem cells research・Gladstone Institute of  
Cardiovascular Disease: Seminar, San Francisco,  
USA.2009 Oct 26.

Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced  
Pluripotent Stem cells research・Joint iPS  
Meeting, Toronto, CANADA. 2009 Oct 28.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上 学、井上治 久、高橋良輔	萎縮性側索硬化症(ALS) の治療戦略	ファルマシア	45	1009-1112	2009
高橋良輔	パーキンソン病の神経細 胞移植治療	日本医事新報	4445	79-80	2009
Takahashi R	Edaravone in ALS. (commentary)	Exp Neurol.	217	235-6	2009
Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S	Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models.	J Neurosci Res.	87	576-85	2009
Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A	N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio.	J. Neurochem.	108	350-60	350-60

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, <u>Takahashi R.</u>	Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach.	Auton Neurosci.	146	33-35	2009
Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, <u>Takahashi R.</u> Kawamura T	Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease.	Eur J Neurol.	16	174-82	2009
Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, <u>Takahashi R.</u>	Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia?	Epilepsia	50	2072-84	2009
Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, <u>Takahashi R.</u> Tomimoto H	Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia.	Neuroreport	20	990-6	990-6
Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, <u>Takahashi R.</u> Chiba T	Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers.	Int J Cancer	125	2029-35	125
Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, <u>Takahashi R.</u>	Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice.	Brain Res.	1294	202-10	2009

Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, <u>Takahashi R</u>	Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA).	Intern Med.	48	1307-9	2009
Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, <u>Takahashi R</u>	A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish.	Neurosci Res.	65	263-71	2009
Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, <u>Takahashi R.</u>	Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families.	Epilepsia	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2009
Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, <u>Takahashi R,</u> Fukuyama H	Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy.	Clin Neurophysiol.	120	1923-6	2009
Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, <u>Takahashi R,</u> Mizutani T.	Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study.	J Neuropathol Exp Neurol.	68	1084-91	2009
Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, <u>Takahashi R,</u> Shimohama S, Sawada H	Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	Biochem Biophys Res Commun.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2009
Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, <u>Takahashi R</u>	Loss of PINK1 in medaka fish ( <i>Oryzias latipes</i> ) causes late-onset decrease in spontaneous movement.	Neurosci Res.	66	151-61	2010

Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, <u>Takahashi R.</u>	PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity.	Biochem Biophys Res Commun.	391	1240-5	2010
Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Ihara M, Kawamata, J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, <u>Takahashi R.</u>	HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis.	Neuropath Appl Neurobiol.	in press.	in press.	2010

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上 学、井上治 久、高橋良輔	萎縮性側索硬化症(ALS) の治療戦略	ファルマシア	45	1009-1112	2009

## 研究成果の刊行物・別刷り

# ファルマシア

別刷

# 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略

村上 学

Gaku MURAKAMI

京都大学大学院医学研究科  
臨床神経学大学院生

井上治久

Haruhisa INOUE

京都大学物質・細胞統合システム拠点  
IPS 細胞研究センター准教授

高橋良輔

Ryosuke TAKAHASHI

京都大学大学院医学研究科  
臨床神経学教授

## 1 はじめに

神経変性疾患は、特定の神経系が選択的に変性・細胞死を生じる疾患の総称である。神経変性疾患の神経病理学的な特徴は、神経細胞及び非神経細胞の内外に認められる脳内のタンパク質凝集物(封入体)である。そのうち筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性していく疾患である。40~70歳代で発症し、平均発症年齢は約65歳である。通常発症後四肢及び球麻痺が進行性の経過をたどり、3~5年で呼吸不全などで死亡することが多い。ALSの約90%は孤発性、約10%は家族性である。<sup>1)</sup> 高次脳機能など、その他の神経系には目立った症状を認めず、運動神経が選択的に侵され、患者の苦痛が大きいこと、症状の重篤さにも関わらず有効な治療がないことより、治療方法の開発が精力的に行われてきた。

1993年に、家族性ALSの一部はCu/Zn superoxide dismutase(SOD 1)の変異による<sup>2)</sup>ことが発見された。その後の研究で、家族性ALSの約20%がSOD 1変異によるとされたが、最近の学会報告では日本では家族性ALSの50%前後がSOD 1変異による。また、孤発性ALSの数%がSOD 1変異によることも明らかになった。<sup>3)</sup> 変異SOD 1は活性を残留しているものもあり、その活性低下と臨床経過とは相関せず、変異SOD 1タンパク質の毒性による運動神経変性と考えられる。

さらに最近になって、ALS患者剖検脳脊髄運動神経細胞のタンパク質凝集物の主要構成成分がtransactivation responsive element(TAR) DNA-binding protein of 43 kDa(TDP-43)であることが判明した。<sup>3,4)</sup> 驚くべきことに、その後の遺伝学的解析によって、家族性及びごく一部の一見孤発性にみえるALSが、TDP-43遺伝子の変異によって発症す

ることも次々と報告された。<sup>5)</sup>

本稿では、SOD 1及びTDP-43の関与するALSの治療戦略について概説する。

## 2 ALSの病態仮説

### SOD 1関連ALS

ALSの病態モデルとして、変異SOD 1トランスジェニックマウスによる研究が精力的に行われ、様々な病態仮説が提唱されている。酸化ストレス、グルタミン酸による興奮毒性、炎症性機序、ミトコンドリア異常、軸索輸送障害、小胞体ストレス、ユビキチン・プロテアソームシステムやオートファジーなどのタンパク質品質管理機構の破綻、凝集タンパク質による細胞毒性などである。

また変異SOD 1トランスジェニックマウスモデルの解析により、変異SOD 1が神経細胞に対して毒性を発揮するだけでなく(自律性神経細胞毒性)、アストロサイトやミクログリアといった非ニューロン細胞内の変異SOD 1タンパク質発現が、ニューロンの変性を促進するという、非自律性神経細胞毒性機序も報告されている。<sup>6,7)</sup>

しかし変異SOD 1患者及びモデルマウスでは、一部報告<sup>8)</sup>を除いて細胞内TDP-43タンパク質凝集がみられず、核移行性の変化も原則的にはみられない<sup>9)</sup>ため、孤発性ALSのモデルとしては問題点が指摘されている。

### TDP-43関連ALS

近年発表されたTDP-43の病態仮説については、さらに他の機序が提唱されている。ALS患者剖検組織においてはTDP-43のリン酸化、<sup>3,10)</sup> カスパーゼによる切断<sup>11)</sup>がみられ、TDP-43に対する免疫組織染色では核の染色性が失われ細胞質に移行する。<sup>3,4)</sup> TDP-43はRNA結合ドメインを持ち、種々のRNA及びタンパク質に結合して、核内において



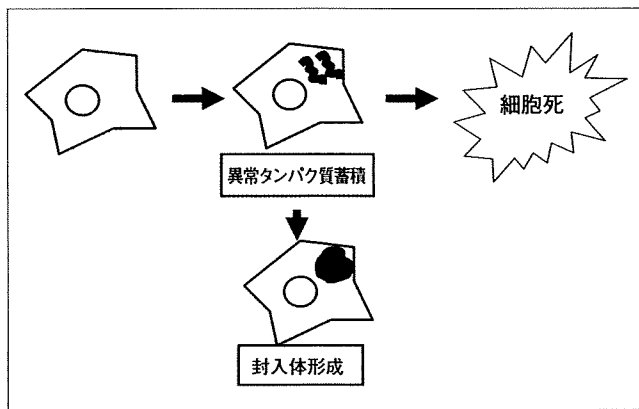


図1 異常タンパク質による細胞毒性

異常タンパク質が蓄積すると、それを分解するだけでなく、封入体に凝集して無毒化する。しかし、細胞の処理能力を超えるタンパク質が蓄積すると、細胞死を引き起こす。

mRNA のスプライシングなどを行っている。<sup>12)</sup> そのため、細胞内の修飾された TDP-43 の核移行が低下することにより核内の TDP-43 の機能低下を来たし、毒性を発揮するという機能喪失モデルも提唱されている。

他の神経変性疾患同様、変異タンパク質が毒性を獲得して神経細胞障害、細胞死を起こす可能性も考えられる (gain of toxic function モデル) (図 1)。細胞内では、異常タンパク質を分解したり、無毒な封入体に凝集させることで対応していくと考えられるが、その防御機構を超えて異常タンパク質が蓄積すると細胞毒性を発揮して細胞死を引き起こすものと考えられる。

### 3 ALS 治療開発の現状

先述のように、ALS では変異 SOD1 トランスジェニックマウスが家族性 ALS の病態モデルとして確立しており、その動物モデルによる治療法開発が行われている。例えば、酸化ストレスに対し抗酸化剤であるビタミン E や、ミトコンドリア機能改善目的にコエンザイム Q<sub>10</sub> で運動神経症状の進行を遅延し生存期間を延長し、有効性が認められた。<sup>13)</sup> また、シクロオキシゲナーゼを抑制し抗炎症作用を有するミノサイクリンなども有効性が認められた。<sup>13)</sup>

また、アストロサイトのグルタミン酸トランス

ポーター 1 の発現を上昇させる既存薬剤のハイスクリーン・スクリーニングを行い、第 3 世代セフェム系抗生物質であるセフトリアキソンが発見され、<sup>14)</sup> ヒトへの臨床試験も行われている。

他に、神経栄養因子による神経保護を目指した治療も検討されている。インスリン様増殖因子 (IGF-1) などが有効性を認めた。<sup>13)</sup>

そのほか様々な治療アプローチがなされてきたが、いずれの薬剤も臨床試験で明らかな有効性を証明できず、現在 ALS に対し有効性が証明された薬剤はグルタミン酸遊離阻害や興奮性アミノ酸受容体との非競合的阻害、電位依存性 Na<sup>+</sup> チャンネル阻害等の作用を有するリルゾールのみである。しかしリルゾールによる延命効果は約 3 か月に留まり、筋力・運動機能の改善は望めず、その効果は限定的である。<sup>15)</sup>

### 4 SOD1 タンパク質量制御による家族性 ALS の治療法

変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは、トランスジーンのコピー数が多いほど表現型が重篤である。<sup>16)</sup> また、変異 SOD1 トランスジェニックラットでは、トランスジーンのコピー数の多いラットのみが ALS を発症し、コピー数の少ないラットでは発症しない。<sup>17)</sup> したがって、変異 SOD1 に関連した ALS では、変異 SOD1 の量を減らすことが治療につながる可能性がある。

実際の実験治療として、RNA 干渉や antisense oligonucleotide を用いてタンパク質発現量を低下させることで病態を改善した、という報告がある。RNA 干渉を用いた実験<sup>18)</sup> では、変異 SOD1 mRNA に相補的な siRNA を変異 SOD1 マウスにかけ合わせたダブルトランスジェニックマウスで、その生存期間が著明に延長したという報告がある。また、antisense oligonucleotide を脳室内に投与し、変異 SOD1 タンパク質の細胞内産生抑制を行ったマウスでも表現型の改善が見られる。<sup>19)</sup>

さらに、lox 配列で変異 SOD1 遺伝子を挟み SOD1 本来のプロモーターで変異 SOD1 を発現して、通常の変異 SOD1 マウスと同様に ALS を発症するトランスジェニックマウスを組織特異的 Cre

発現マウスとかけ合わせることによって、運動ニューロンでのみ変異 SOD1 発現を低下させると ALS の発症が遅延し、ミクログリアでのみ変異 SOD1 発現を低下させると疾患の進行を遅らせたという報告がある。<sup>6)</sup> 同様の手法で、アストロサイト内変異 SOD1 発現低下により疾患の進行を遅らせたという報告もある。<sup>7)</sup>

他の神経変性疾患モデルでも、原因タンパク質発現量を減少させることで治療につながる可能性が示唆されている。ハンチントン病はハンチンチン (Htt) というタンパク質のポリグルタミン (polyQ) が異常に増えることで、そのタンパク質の凝集、神経細胞変性が認められる疾患であり、polyQ Htt を過剰発現するトランスジェニックマウスはハンチントン病のモデルとして知られている。そのマウスの polyQ 発現量を、Tet-Off システムを用いて後天的に減少させると、発症を抑えられたという報告がある。<sup>20)</sup> また、アルツハイマー病モデルである変異タウトランスジェニックマウスでも、同様のシステムで発現量を抑えることで、記憶機能の改善及び神経細胞変性の抑制が観察されている。<sup>21)</sup>

以上から、我々は SOD1 の転写を抑制して SOD1 タンパク質量を減少する低分子を、低分子化合物・既存薬ライブラリのハイスループット・スクリーニング・システム (図 2) を構築して、家族性 ALS 治療薬スクリーニングを行っている。我々は SOD1 の本来のプロモーターの支配下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現するコンストラクトを構築した。

化合物がプロモーターに作用し転写を抑制すれば、ルシフェラーゼの発現量が低下しルシフェラーゼの基質から産生される蛍光物質の量が低下する。アストロサイトが非自律性神経細胞死、疾患の進行に関連することから、ヒトアストロサイト由来の細胞株を使用している。また、ルシフェラーゼ反応基質を 96-ウェル・プレート上で自動分注後吸光度を測定する装置を用いて測定している。このような方法でこれまでに 9,600 種類の化合物をスクリーニングし、蛍光物質の産生を減少させる、すなわち SOD1 の転写を抑制する化合物を 177 種類見いだしており、これからさらに ALS モデル細胞や ALS

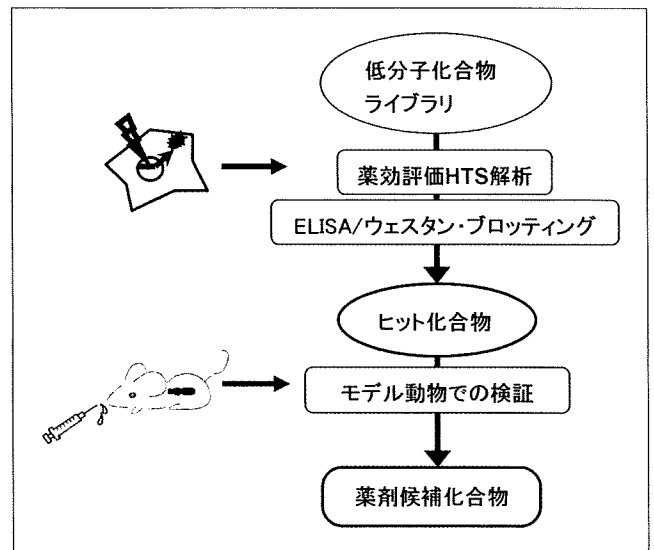


図 2 我々の ALS 治療開発戦略の概要

SOD1 プロモータ下にルシフェラーゼを発現するコンストラクトを導入した、ヒトアストロサイト由来細胞株を用いて、SOD1 転写を抑制する化合物をスクリーニングする。ELISA やウェスタン・プロットングで SOD1 タンパク質量を特異的に減少する化合物を抽出する。変異 SOD1 トランスジェニックマウスでその効果を確認する。

モデル動物での効果を確認して、臨床的に有用な化合物を絞り込んでいく予定である。低分子化合物は、大量生産が可能であり、安価で安定した供給を行うことが可能となる。また、既存薬を用いればヒトへの使用における安全性も既に確認されており、速やかな臨床への応用も可能となる。我々の開発した方法は、ALS 治療開発における新たなアプローチの 1 つとなるものと考えられる。

## 5 SOD1 タンパク質を減少させることによる問題点

SOD1 は細胞内に発生した superoxide radicals を過酸化水素に分解する酵素であり、抗酸化ストレス酵素の 1 つに挙げられる。したがって、SOD1 を減少させることは、酸化ストレス反応に対する脆弱性を来す可能性がある。

SOD1 ノックアウトマウスの解析によると、脊髄運動神経軸索を切断した後の神経細胞死が SOD1 非ノックアウトマウスに比して多く見られる。<sup>22)</sup> ほかに、神経筋接合部の形成不全や軸索変性が、高齢の SOD1 ノックアウトマウスで見られるという報告もある。<sup>23)</sup> したがって、SOD1 を大きく低下させることは脊髄運動神経変性を来す可能性

がある。

ただし、SOD1 ノックアウトマウスの寿命は非ノックアウトマウスに比べ著変が見られない。<sup>24)</sup> さらに、SOD1 ヘテロノックアウトマウスはノックアウトマウスに比して軸索切断による神経細胞死の程度が軽度である。<sup>24)</sup> また、他のアンチオキシダントによる代償も期待できるため、SOD1 を特異的部分的に減少させることが、重篤な副作用を来たさずに、治療効果を得るために重要である。

さらに、コピー数が多い野生型 *SOD1* 遺伝子のトランスジェニックマウスでも軸索変性やミトコンドリアの変性、脊髄運動ニューロンの減少が、高齢になれば出現することが報告されている。<sup>24)</sup> 変異型 SOD1 と野生型 SOD1 のダブルトランスジェニックマウスは、野生型 SOD1 量に応じて進行が速くなるとの報告<sup>24)</sup> もあり、野生型 SOD1 細胞内産生も制御する試みは相乗的に有効である可能性がある。

先述のように、他のアプローチで明らかな有効性を認めた治療がほとんどないこともあり、原因となる異常タンパク質を直接減少させるアプローチが有望と考えられることから、SOD1 タンパク質量を減少させる有用性は、部分的特異的に行うことができれば、そのリスクよりも大きく、根本的な治療につながると思われる。

## 6 孤発性 ALS に対する治療的アプローチ

先述のように、孤発性 ALS では TDP-43 タンパクの細胞質内封入体を認め、核における染色性が失われている。核移行シグナルを欠損させた *TDP-43* 遺伝子ないし、易凝集性の高い C 末端 *TDP-43* 遺伝子に GFP を付して導入した TDP-43 凝集細胞モデルを用いて、タンパク質凝集を抑制させる薬剤が

報告されている。<sup>25)</sup>

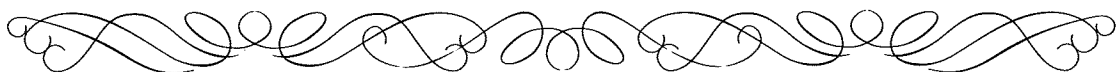
ただし、TDP-43 に関連した ALS の病態生理はまだ未解明の部分が多く、今後 TDP-43 の生理的機能及び変異 TDP-43 の神経細胞に対する影響の詳細な解析がまたれる。

## 7 おわりに

ALS、特に変異 SOD1 関連 ALS の病態に沿った治療戦略について概説した。精力的な研究がなされてはいるが、未だ病勢を決定的に改善する薬剤は開発されていない。この難病に対する治療法が早く発見され、多くの患者が治療される日が来ることを望む。

### 文 献

- 1) Rosen D. R. *et al.*, *Nature*, 362, 59-62 (1993).
- 2) Andersen P. M. *et al.*, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 6, 37-46 (2006).
- 3) Arai T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 602-611 (2006).
- 4) Neumann M. *et al.*, *Science*, 314, 130-133 (2006).
- 5) Lagier-Tourenne C. *et al.*, *Cell*, 136, 1001-1004 (2009).
- 6) Boilee S. *et al.*, *Science*, 312, 1389-1392 (2006).
- 7) Yamanaka K. *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 11, 251-253 (2008).
- 8) Shan X. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 458, 70-74 (2009).
- 9) Mackenzie I. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 61, 427-434 (2007).
- 10) Hasegawa M. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 64, 60-70 (2008).
- 11) Zhang Y. J. *et al.*, *J. Neurosci.*, 27, 10530-10534 (2007).
- 12) Buratti E. *et al.*, *Front. Biosci.*, 13, 867-878 (2008).
- 13) Brujin L. *et al.*, *Expert. Rev. Neurother.*, 6, 417-428 (2006).
- 14) Rothstein J. D. *et al.*, *Nature*, 433, 73-77 (2005).
- 15) Miller R. G. *et al.*, *Cochrane Database Syst Rev.*, (1), CD 001447 (2007).
- 16) Dal Canto M. *et al.*, *Brain Res.*, 676, 25-40 (1995).
- 17) Nagai M. *et al.*, *J. Neurosci.*, 21, 9246-9254 (2001).
- 18) Saito Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 42826-42830 (2005).
- 19) Smith R. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 116, 2290-2296 (2006).
- 20) Yamamoto A. *et al.*, *Cell*, 101, 57-66 (2000).
- 21) SantaCruz K. *et al.*, *Science*, 309, 476-481 (2006).
- 22) Reasume A. *et al.*, *Nat. Genet.*, 13, 43-47 (1996).
- 23) Flood D. G. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 155, 663-672 (1999).
- 24) Jaarsma D. *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, 7, 623-643 (2000).
- 25) Yamashita M. *et al.*, *FEBS Lett.*, 583, 2419-2424 (2009).



を計算する。浸透圧ギャップは血漿浸透圧実測値と計算値(上記の間で提示された式より計算)との差で、通常 $10\text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$ 以下である。これが $10\text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$ 以上を示す場合には、マンニトール、エタノール、メタノール、エチレングリコール、トルエンなど、外因性浸透圧物質の増加が考えられる。

たん漿膠質浸透圧

再び較的巨大な粒子であるコロイド。字が懸濁液を形成しているよロモ状態でも、浸透圧を形成する。

浸透圧を膠質浸透圧 (colloid osmotic pressure または oncotic pressure) と呼ぶ。膠質浸透圧は、一定容積中に含まれるコロイド粒子の数が多しほど大きくなる。血漿浸透圧と異なり、氷点降下法では測定できない。臨床的には、血漿蛋白質の約6割を占めるアルブミン $1\text{ g/dl}$ につき $5.5\text{ mmHg}$ 、 $4.5\text{ g/dl}$ で約 $25\text{ mmHg}$ の膠質浸透圧を示す。これは血漿全膠質浸透圧の8〜9割に相当し、間質から血管に向かう力である。ネフロローゼ症候群や肝硬変のよ

うに血漿アルブミン濃度が減少する病態では、血漿膠質浸透圧が低下し血管内から間質に水の移動が生じ、浮腫が出現することになる。

文 献

1) 武藤重明: 日臨誌 135: 5198, 2006.

◆◆ 回 答 ◆◆

自治医科大学透析部/腎臓内科 教授 武藤重明

パーキンソン病の神経

細胞移植治療



神経細胞を移植したパーキンソン病患者の場合、健康なはずの移植された細胞にパーキンソン病の病理所見が出現することが報告された(Nature Medicine, 2008)。以下について。

(1) 移植手術はパーキンソン病の根本治療法となりうるのか。

(2) 近年、神経新生(neurogenesis)の研究が盛んであるが、この研究はパーキンソン病の新しい治療ターゲットとして有望なのか。

京都大学臨床神経学(神経内科)・高橋良輔教授に。

(熊本県 N)



Nature Medicine の 5 月号に掲載されたスウェーデンとアメリカ

とカナダの3グループからの論文に基づいたご質問である<sup>1) 3)</sup>。パーキンソン病の病理を特徴づけるのは、 $\alpha$ -シヌクレインの凝集であるレビー小体である。上記3論文の結果をまとめると、胎児の黒質ドーパミン神経細胞を移植されて4〜16年を経た計8例のパーキンソン病患者剖検例を調べたところ、驚くべきことに移植後10年以上を経た3例で移植片中の本来は健康なドーパミン神経にレビー小体が形成されていることが見出された。これはレビー小体病理がパーキンソン病患者組織から移植片に「伝播」するという、これまで神経変性疾患ではプリオン病でしか知られていなかったメカニズムが、パーキンソン病でも働くことを示したことになる。

「伝播」が生じるメカニズムに

関してはまだ分からないが、移植後10年以内の5例の移植片ではレビー小体形成は見られなかったことから、少なくとも「伝播」には10年は必要なことが推察される。また、1例では移植後14年を経ても移植片にレビー小体形成が見られていない。この例とレビー小体ができた例との違いの一つは、前者ではミクログリアの活性化が乏しかったことで、レビー小体「伝播」への炎症の関与をうかがわせる。

その他、酸化的ストレス、興奮毒性、神経栄養因子の欠乏などがメカニズムとして提唱されており、今後その解明はパーキンソン病の病態解明の上できわめて重要な課題となるであろう<sup>4)</sup>。

ただ、気をつけなければならぬのは、レビー小体の形成が細胞の機能や生存に与える影響がまったく不明なことである。レビー小体は、それ自体が異常構造として細胞毒性を持つという考えから、レビー小体は毒性を持つ異常蛋白質を封じ込めるために作られるものであり、細胞保護的に働いてい