

200936120 A

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

大脳皮質基底核変性症由来 iPS 細胞の樹立とタウ
オパチーの新規治療戦略の確立

課題番号：H21-難病-一般-065

平成 21 年度 総括・研究報告書

平成 22(2010)年 3 月

研究者代表者 鈴木 則宏

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)

大脳皮質基底核変性症由来 iPS 細胞の樹立と
タウオパチーの新規治療戦略の確立

課題番号：H21-難病-一般-065

研究事業予定期間：平成 21 年 6 月 15 日～平成 22 年 3 月 31 日

主任研究者：鈴木 則宏
慶應義塾大学医学部神経内科
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
Tel: 03-5363-3787 Fax: 03-3359-2843

目次

I.	総括研究報告書	3
	平成 21 年度 総括報告書 主任研究者：鈴木 則宏	4
	研究組織	6
	事務局及び経理事務担当者	7
II.	分担研究報告	8
	タウオパチー由来 iPS 細胞の樹立 分担研究者：伊東大介	9
	研究の目的	9
	研究計画	11
	研究方法	14
	倫理面への配慮	16
	平成 21 年度研究結果及び考察	17
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	21

I. 総括研究報告書

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

大脳皮質基底核変性症由来 iPS 細胞の樹立とタウオパチーの新規治療
戦略の確立

平成 21 年度 総括報告書

主任研究者：鈴木 則宏 慶應義塾大学医学部神経内科 教授

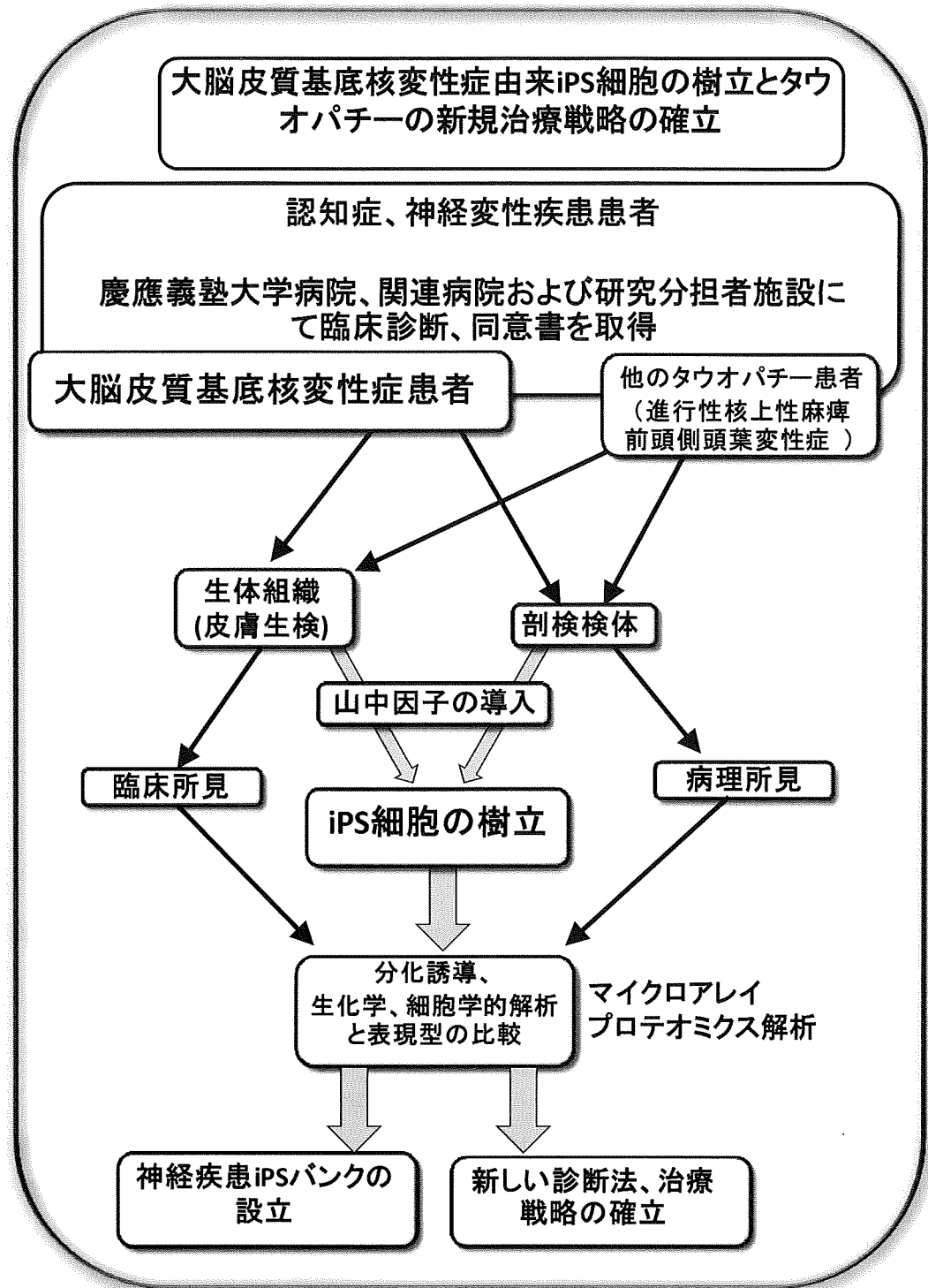
超高齢化社会に直面している我が国にとって、認知症はじめとする神経変性疾患の医療と対策は 21 世紀の避けられない重大な課題である。分子医科学の発展により、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)などの病態の解明は進み、多岐にわたる治療法が実用化、開発段階である。しかし、AD の 4 分の 3 の頻度があるタウオパチーに関しては、その病態の解明は立ち遅れ、依然として難治性疾患である。本研究では、タウオパチーの代表である大脳皮質基底核変性症(Corticobasal degeneration: CBD)の神経疾患の患者から皮膚等の体組織試料を採取し、iPS (人工多能性幹)細胞を樹立、神経細胞に分化誘導し生化学的、細胞生物学的な特性を解析する(流れ図参照)。この手法により、これまで検体採取困難だった神経疾患の原因・治療研究において、従来にない新しい観点からの疾患研究の発展が予測される。特に、創薬スクリーニングには強力な手法となりうる。また、iPS 細胞由来神経細胞の疾患特異的な現象(例えば、タウ蛋白の蓄積、リン酸化)を指標に、脳生検に変わる画期的な診断法の確立が期待できる。

本プロジェクトの初年度、2 年度は、CBD 患者の臨床、病理所見の収集と、生体試料もしくは剖検検体より、iPS 細胞を作成する。3 年次以降は、マイクロアレイ、プロテオミクス解析により mRNA、蛋白質の発現を網羅的に解析し、分子病態の解明を試み、さらに、iPS 細胞をもちいた新規診断法の確立、タウ蛋白をターゲットにした治療、創薬スクリーニングの手法の確立を目指すことを目標としている。

初年度である平成 21 年度は、多くの分担研究者の方々のご協力により、目的としていた主要タウオパチー(CBD、AD、進行性核上性麻痺(PSP)、ピック病)すべての皮膚検体、線維芽細胞を得ることができた。また、全症例で、詳細な臨床所見も収集できることができ、極めて質の高い神経疾患 iPS 細胞の樹立が望める。現在、各疾患 iPS 細胞へのリプログラミングを開始しており、半年以内にすべての疾患の iPS 細胞を樹立できるもの確信している。年内には、この細胞を利用して治療、創薬スクリーニングに取りかけられるものと思われる。採択決定からまだ半年も経過していない段階でのこの達成度は、本研究組織の重要性

を強く示すものと考えている。

流れ図



研究組織

研究者名	分担する 研究項目	最終卒業校・ 卒業年次・学位 及び専攻科目	所属研究機関 及び現在の専門 (研究実施場所)	所属研究 機関ける職名
鈴木 則宏	研究統括	慶應義塾大学医学部・昭和56年・医学博士	慶應義塾大学医学部・神経内科	教授
山田 正仁	CBDの臨床診断	東京医科歯科大学・昭和59年・医学博士・神経内科学	金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学(神経内科学)	教授
伊東 大介	CBDの臨床診断・生化学的解析	慶應義塾大学医学部・平成4年・医学博士	慶應義塾大学医学部・神経内科	専任講師
小堺 有史	個人情報管理	慶應義塾大学医学部・平成9年・医学博士	慶應義塾大学医学部・神経内科	助教
吉崎 崇仁	iPSの作成・生化学的解析	慶應義塾大学医学部・平成10年・医学博士	慶應義塾大学医学部・神経内科	助教
美原 盤	CBDの臨床診断	慶應義塾大学医学部・昭和55年・医学博士	美原記念病院・神経内科	院長
高尾 昌樹	CBDの神経病理	慶應義塾大学医学部・平成2年・医学博士	美原記念病院・神経内科/神経病理	内科部長
服部 英典	CBDの臨床診断	慶應義塾大学医学部・平成11年・医学博士	慶應義塾大学医学部・神経内科	助教
村山 繁雄	CBDの神経病理	東京大学医学部・昭和54年・医学博士	東京都健康長寿医療センター研究所・神経病理	研究部長

事務局及び経理事務担当者

事務局	岩永理絵	慶應義塾大学・医学部 神経内科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 Tel: 03-5363-3787 Fax: 03-3359-2843 E-Mail: iwanaga@sc.itc.keio.ac.jp
経理事務担当者	大友正敏	慶應義塾大学・医学部 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 Tel: 03-5363-3879 Fax: 03-5363-3507 E-Mail: masatoshi.ohmoto@adst.keio.ac.jp

II. 分 担 研 究 報 告

タウオパチー由来 iPS 細胞の樹立

分担研究者：伊東大介 慶應義塾大学医学部神経内科 専任講師

研究の目的

わが国の急速な高齢化で2030年には、65歳以上の人口が総人口のおよそ3分の1を占めるようになると予想されている。これにともない画期的な治療法・予防法が出現しない限り認知症患者の数は急速に増加し、2030年には約350万人に達すると予測されている。また、認知症患者1人に対し平均3人の介護人が必要とされ、将来1000万人以上の介護者が必要と指摘されている。大脳皮質基底核変性症をはじめとする孤発性タウオパチーの頻度は、アルツハイマー病 (AD) の4分の3に匹敵すると考えられ、その有病率は加齢とともに増加する。現在、AD、パーキンソン病 (PD) に対する治療薬は複数存在し、急速に新薬の開発が進んでいる。しかし、孤発性タウオパチー、特に大脳皮質基底核変性症 (CBD) の発症機序は不明であり、依然として難治性疾患であり、根本治療は皆無である。神経疾患の研究における障壁のひとつは、侵襲性の高い脳生検は施行するのが難しく、死後変性に脆弱な神経系は剖検から生化学に適した組織を得ること困難な点である。本研究では、CBDをはじめとするタウオパチー患者から体組織試料を採取し、iPS細胞を樹立、神経細胞に分化誘導し生化学的、細胞生物学的な特性を解析することを第一の目標とする。

これまでに、PD、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの難治性の神経疾患の患者から体組織試料を利用してiPS細胞を樹立する研究が報告され、大きな注目を浴びている(1)。我々も、Takahashiらの方法(2)を用いて、PD、遺伝性脊髄小脳変性症、ALSなどの神経変性疾患のiPS細胞の作製し、神経細胞への分化誘導を報告している(図1)。現在、 α シヌクレイン、ポリグルタミン、TDP-43の蛋白品質管理機構の生化学、細胞生物学的解析をすすめている。一方、同意を得ることが難しい認知機能の低下した患者は、剖検組織より線維芽細胞を採取し、侵襲を伴わずiPS細胞を樹立する方法を確立した。これら疾患特異的iPS細胞により、これまで生検困難だった神経疾患において、従来にない観点からの研究の発展

が予測される。本プロジェクト3年間で、CBDをはじめとするタウオパチー由来iPS細胞を組織的に作成する。次にCBD由来iPS細胞を利用して、タウオパチーの分子機構の解明と新規治療ターゲットの同定、さらにはiPS細胞由来神経細胞の疾患特異的な現象（タウ蛋白の蓄積、リン酸化など）を指標に、脳生検に変わる画期的な診断法の確立を目指す。また、多くの神経変性疾患のiPS細胞を作製、管理し神経疾患iPS細胞バンクを設立するとともに、国内外の研究機関への提供と研究の発展に貢献することを最終目標とする。

文献： I. H. Park et al., Cell 134, 877 (2008).

2. K. Takahashi et al., Cell 131, 861 (2007).

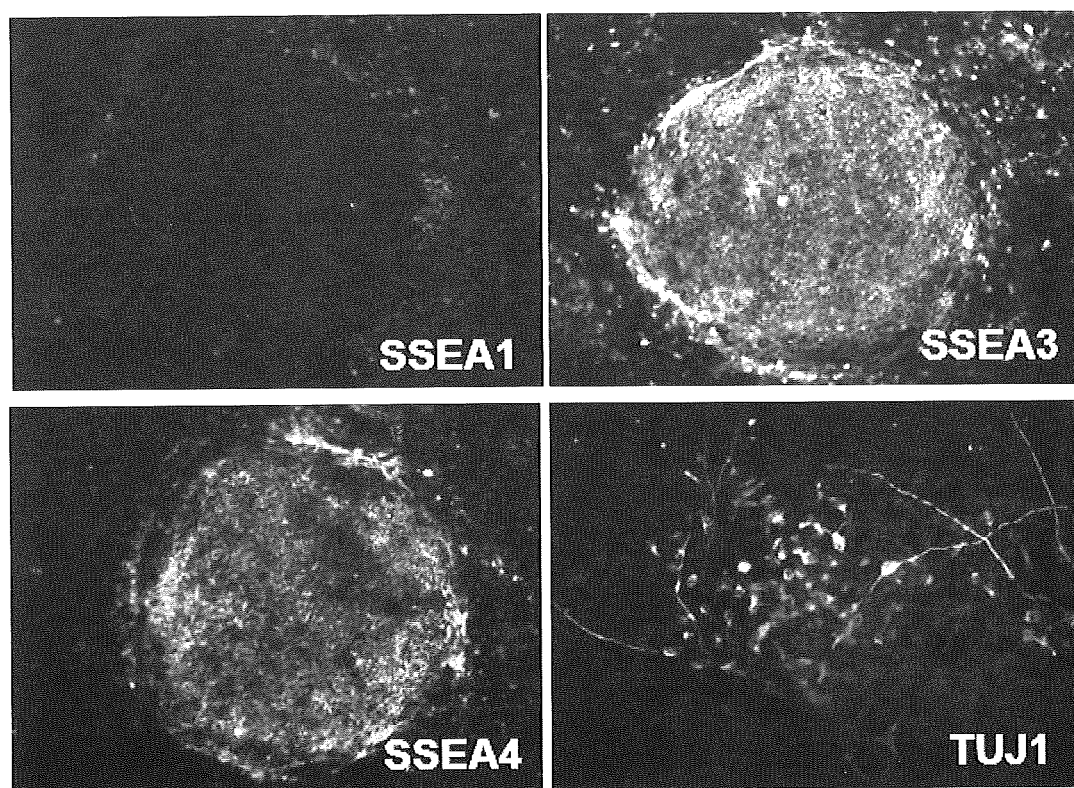


図1. パーキンソン病患者由来iPS細胞。
樹立したiPS細胞は、ヒト幹細胞のマーカであるSSEA3、4陽性であることを確認した。また、PA6細胞による共培養による分化誘導後、神経細胞のマーカであるTUJ1陽性細胞の出現が見られた。

研究計画

初年度から2年度

CBD由来iPS細胞樹立

当院もしくは共同研究施設の患者もしくは代諾者の同意のもと、CBD患者から生体組織試料(皮膚生検)または、剖検検体より組織試料を採取し、線維芽細胞を培養・増殖する。対象患者の選択、臨床診断、同意の取得は、慶應義塾大学医学部神経内科、鈴木、伊東、服部、金沢大学医学部神経内科、山田、美原記念病院 美原が中心となり担当する。剖検検体からの組織の採取は東京都健康長寿医療センター、村山、美原記念病院、高尾が行う。採取された組織は、メスにて、2-3mmの小片に切断し線維芽細胞培養・増殖を行う。Takahashiらの方法に基づき、疾患由来線維芽細胞にレトロウイルスを用いて4遺伝子、Oct3/4, Sox2, Klf4とc-MycもしくはOct3/4, Sox2, Klf4, Lin28およびNanogを導入してiPS細胞を作成する(図2a,b)。iPS細胞の培養は、慶應義塾大学神経内科、吉崎が担当する。平行して、患者の受診している機関の個人情報管理者(慶應義塾大学医学部 小堺)が、採取された体組織試料と患者の臨床所見・検査所見・病理所見に関する情報を連結可能匿名化する。個人情報管理者は各患者に対して連結可能な匿名コードを付番し、患者名と匿名コードの対照表を施錠可能なスペースに保管する。プロジェクトの初めの2年間は、症例生体試料の確保とiPS細胞の樹立が中心となり、症例数は、CBD 5例、タウオパチーの近縁疾患としてPSP 5例、Pick病 5例を目標とする。

3年度

CBD由来iPS細胞の生化学、細胞生物学的解析

プロジェクト3年度以降は、CBD由来iPS細胞を利用してCBDの分子病態の解明、治療ターゲットの同定を目標とする。樹立したiPS細胞は、PA6細胞との共培養、胚様体(embryonic body, embryoid body, EB)を介して、神経細胞へ分化誘導を行う。疾患由来神経細胞は、タウ蛋白アイソフォーム(4リピート、3リピート)の発現量、プロセッシング、リン酸化をウエスタンブロット、蛍光免疫染色により正常対象者、タウオパチー以外の神経疾患を比較する。また、他のタウオパチーであるPSP、Pick病などの生化学的差異と臨床症状、病理所見との関連を検討する。さらに、マイクロアレイ、プロテオミクス解析によりmRNA、蛋白質の発現を網羅的に解析する。生化学、細胞生物学的解析は慶應義塾大学神経内科、伊東が中心となり行う。

CBD由来iPS細胞の臨床応用と神経変性疾患iPS 細胞バンクの設立

上述の生化学、細胞生物学的解析結果をもとに、タウ蛋白をターゲットにした創薬スクリーニングの手法の確立、疾患特異的な生化学的特徴（例えば、タウ蛋白の蓄積やリン酸化）を指標に、脳生検に変わる新規診断法の確立を目指す。さらに、簡便なiPS細胞の樹立と神経細胞の分化誘導法を確立し、多種のタウオパチー由来iPS 細胞を作製、管理し神経疾患iPS 細胞バンクを設立するとともに、国内外の研究機関への提供と研究の発展に貢献することを最終目標とする。神経変性疾患iPS 細胞バンクは、慶應義塾大学総合医科学研究棟認知症リサーチセンター内で、慶應義塾大学神経内科、伊東大介が管理運営する。

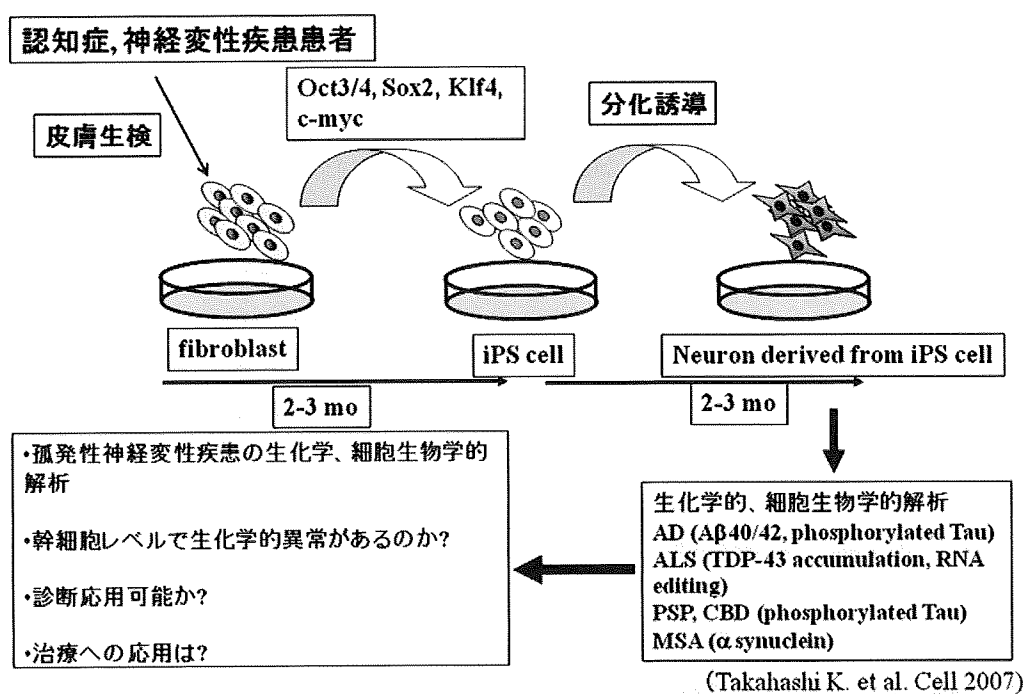


図2a. リプログラミング方法(1)

1. ヒト皮膚線維芽細胞へのレトロウイルス感染(OCT3/4, SOX2, KLF4, LIN2, NANOG)
2. 感染させた線維芽細胞をmitomycin C処理したSTO細胞上へ撒きなおし
3. ヒトES細胞様コロニーの出現 - iPSコロニーの単離
4. iPS細胞の培養、継代

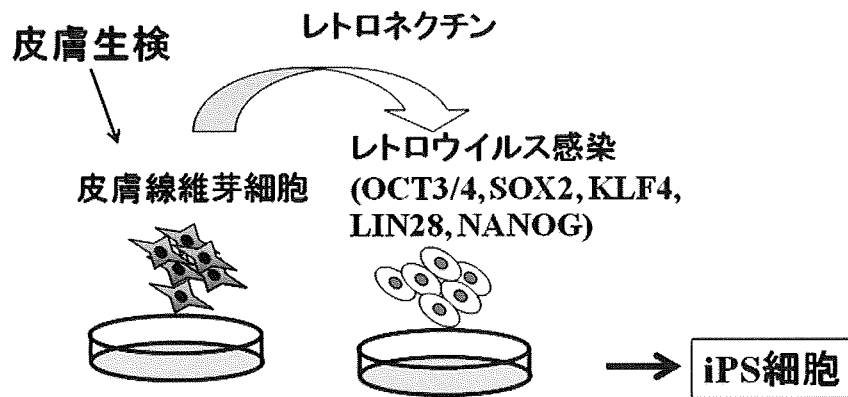
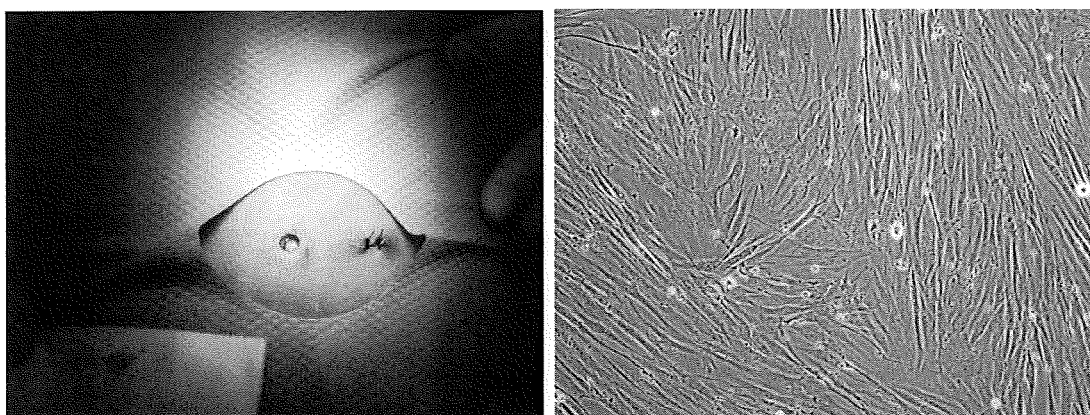


図2b. リプログラミング方法(2)

研究方法

皮膚生検方法

- (1) 皮膚の採取
ポビドンヨードを用いて採取部（腹部）の入念な消毒を行う。
デルマパンチ（5mm）（マルホ）を使用しパンチ生検を2か所行う（図3）。
- (2) 皮膚組織を10%FBS DMEMの入った15mlチューブに入れ、冷蔵保存。
- (3) 慶應義塾大学医学部神経内科、伊東に連絡後、保冷剤（冷蔵）とともにバイク便で、慶應義塾大学医学部リサーチパーク4N4へ搬送



患者腹部より皮膚生検を施行

皮膚検体より皮膚線維芽細胞の培養

図3. 神経疾患病患者由来の皮膚線維芽細胞の培養

当研究に関して、倫理委員会に承認された申請書に基づき文書にて患者自身より同意を得た。患者の腹部より皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞の培養を行った

リプログラミング方法

①iPS細胞誘導用レトロウイルスベクターの調製

G3T-hi細胞にiPS細胞誘導用ベクターをTransIT-293によりトランスフェクションし、2日培養後の培養上清を0.45 μ mのフィルターでろ過してiPS細胞誘導用レトロウイルスベクター（4遺伝子、Oct3/4, Sox2, Klf4とc-MycもしくはLin28およびNanog）を調製する。

②遺伝子導入

レトロネクチン固定化プレートに①で調製したレトロウイルスベクター溶液を添加し32°C、2,000×gで2時間遠心後、上清を除去し、約 1×10^5 個の皮膚線維芽細胞を添加する。翌日同様の操作を行い、計2回遺伝子導入を行う。

③フィーダー細胞上への播種

ゼラチン固定化プレートにマイトマイシン処理したST0細胞を播種し終夜培養することによりフィーダー細胞を調製する。②の遺伝子導入後、4-7日目に細胞を回収し、フィーダー細胞上に播種する。

④iPS細胞誘導

フィーダー細胞上に播種してから終夜培養後、霊長類ES細胞用培地に交換し、以降1~2日おきに培地を交換し、20日程度培養を継続することで、iPS細胞を誘導する。なお、この時点でiPS細胞コロニーが見られない場合は実験を中止する。

⑤iPS細胞コロニーのピックアップ及び凍結

iPS細胞コロニーは実体顕微鏡下でピックアップし、新たに調製したフィーダー細胞上に播種する。なお、iPS細胞コロニーが充分得られている場合は、10-15個程度ピックアップし、最終的に5個まで選抜する。コロニー数が10個未満の場合は全数ピックアップする。以後、培地は毎日交換し、またiPS細胞は随時継代し十分な細胞数となるまで培養を継続後、凍結保存する。

倫理面への配慮

本研究に関連した研究計画として、すでに下記の3つが慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認されている。

- 1) 「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」
- 2) 「神経疾患剖検組織からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」
- 3) 「高齢者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた神経変性疾患と老化のメカニズムに関する研究」

その概略を以下に記す。

患者からの体組織試料、剖検試料の採取およびその組織の本研究への利用は、患者もしくは代諾者の自由意志による同意が得られた場合のみ行う。患者・高齢者/代諾者への説明に際しては説明書に基づき担当医師が説明を行う。特に、iPS 細胞研究は、現段階では治療目的に利用することはできないことを十分な時間をもって説明し、研究目的での利用に限定していること御了解していただく。同意書は4枚複写で作成し、患者・高齢者/代諾者・研究者・個人情報管理者・医学部各保管用として一通ずつ保存する。患者・高齢者/代諾者は一旦同意されても、不利益を受けることなく患者・高齢者側から文書により同意を撤回することができる。その場合、検体、樹立した iPS 細胞、それに付随する医療情報は破棄され、以降は研究に用いられることはない。

さらに、当大学遺伝子組み換え実験安全委員会より下記の研究が承認されている。

- 1) 「ヒト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」

また、当大学動物実験委員会委員会より下記の研究が承認されている。

- 2) 「ヒト神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と臨床応用」

以上より、当大学倫理委員会における必要手続きはすべて承認されている。

平成 21 年度研究結果及び考察

平成 21 年夏に採択が決定し、11 月に分担金受領したばかりであるが、研究計画は順調に進展している。10 月に第一回研究組織会議を開催、関東、東海、北陸地方の神経疾患の剖検症例が多い他施設との提携により iPS 細胞目的の検体が集積する体制を構築した。したがって、病理診断で確定診断のついた極めて質の高い疾患由来 iPS 細胞を戦略的に作り出すことが可能となった。また、美原記念病院、美原、高尾より 11 月には 3 例のタウオパチー患者（アルツハイマー病、進行性核上性麻痺、ピック病）、平成 22 年 1 月には CBD 症例より皮膚検体の提供を受けることができた。以下に、症例の臨床情報を記載する。

採択決定からまだ半年も経過していない段階で、主要タウオパチー 4 種すべての検体が確保できたことは、本研究組織の重要性を示すものといえ、極めて高い評価に値する。

現在線維芽細胞の培養、リプログラミングを開始している。神経疾患 iPS 細胞の樹立法は当研究組織ではほぼ確立したといえる。本年 11 月には、第 28 回日本認知症学会において TDP-43 プロテインオパチー由来 iPS 細胞の作成と生化学的解析を報告した。

さらに、神経疾患 iPS 細胞を分化誘導し、Tau の発現を免疫組織学的に確認した(図 4)。今後、Tau のアイソホームの発現変動を含め生化学的解析を進めていきたい。

大脳皮質基底核変性症症例

80 代女性

現病歴: X 年 非流暢性失語が出現

X+4 年 非流暢性失語の進行、発語失行、失書を認める。

MRI: 左に有意の前頭側頭葉の萎縮、小脳萎縮

SPECT: 左側頭葉の血流低下

X+5 錐体外路症状出現し、CBD と診断

MRI にて大脳皮質の萎縮進行

発語はほとんどなし

X+6 家族より同意を得て、皮膚生検を施行。

既往歴: 60 代 大腸癌

家族歴: 特記事項なし。

ピック病症例

60代男性

- 現病歴: X年 異常な頑固さなど人格変化が出現、通常の会話が困難となる
- X+3年 勝手に自転車で遠方までいってしまい、警察に保護される。
MRIにて前頭側頭葉の著明な萎縮 (knife edge atrophy) を認め、Pick病と診断
- X+4 誤嚥性肺炎を繰り返すため、胃ろう造設
家族より同意を得て、皮膚生検を施行。

家族歴: 特記事項なし。

進行性核上性麻痺症例

50代男性

- 現病歴: X年 錐体外路症状出現、抗パーキンソン病薬開始するも効果は乏しかった。
- X+3年 歩行障害、構音障害、嚥下障害出現し、以降誤嚥性肺炎を繰り返す。
眼球運動障害、MRIにて、中脳の萎縮を認め (humming bird sign)、PSPと診断
家族より同意を得て、皮膚生検を施行。

家族歴: 特記事項なし。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、タウオパチーのiPS細胞樹立の報告はない。臨床診断が難しく質の高い検体を入手することが困難な点が障壁となっていた。本プロジェクトでは、病理診断で確定診断のついた剖検検体からのiPS細胞樹立システムを確立することにより、この問題点を克服したと考えられる。認知症の中で大きな頻度を占めるタウオパチーの研究は、超高齢化社会を迎えるわが国において重要である。また、iPS細胞を用いたタウオパチーへ研究手法、疾患iPS細胞バンクの設立は、難治性疾患病態解明の新規アプローチ手段として他の医学分野にも大きな進展をもたらすと期待される。

今後の展望について

本研究組織をもとに多種にわたるタウオパチーの検体収集とiPS細胞の樹立を組織的に行い、生化学的差異と臨床症状、病理所見との関連を検討する。さらに、マイクロアレイ、プロテオミクス解析によりmRNA、蛋白質の発現を網羅的に

解析し、タウオパチーの分子機構の解明と新規治療ターゲットの同定、さらには iPS 細胞由来神経細胞の疾患特異的な現象（タウ蛋白の蓄積、リン酸化など）を指標に、脳生検に変わる画期的な診断法の確立を目指す。また、平成 22 年 2 月 20 日に第二回班会議を予定している。

研究内容の効率性について

平成 21 年 10 月に第一回研究組織会議を開催し、2 か月の間に、2 例のタウオパチー患者より、検体採取が実現でき今後も検体試料は順調に増えていくものと思える。当プロジェクトの最終目標である神経疾患 iPS 細胞バンクの現実性を高いものと考えている。

結論

採択決定からまだ半年も経過していない段階ではあるが、多施設との提携により iPS 細胞目的の検体が集積する体制を構築でき、しかも主要タウオパチー患者すべての検体採取が実現できた。今後は、タウオパチー由来 iPS 細胞の樹立とマイクロアレイ、プロテオミクス解析により mRNA、蛋白質の発現を網羅的に解析し、タウオパチーの分子機構の解明を目指す。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし