

201024045A

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22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23 (2011) 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. 酸化ストレスによる TDP-43 修飾の検討

祖父江 元 …… 7

2. 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 …… 11

3. ALS 運動ニューロンにおける RNA 編集異常と TDP-43 病理

郭 伸 …… 16

4. 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 …… 20

5. 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 …… 23

6. 血管内投与型 AAV ベクターによる乏突起膠細胞への遺伝子導入

中野 今治 …… 29

7. 血管新生因子による ALS モデルラット神経保護の試み

青木 正志 …… 31

8. ALS 治療に向けた HGF 供給法の検討—遺伝子治療法の可能性について

船越 洋 …… 35

9. ALS の免疫療法における野生型 SOD1 の応用性について

漆谷 真 …… 40

10. TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導

長谷川成人 …… 44

11. ALS における自然免疫経路の関与

山中 宏二 …… 48

III. 研究報告(研究協力者)

12. ALS モデルマウスにおける骨髄移植と顆粒球コロニー刺激因子投与併用効果	阿部 康二 …… 51
13. キサンチン酸化還元酵素(XOR)阻害作用を有しかつプリンサルページ回路の 基質とならない化合物としての ALS 治療薬	加藤 信介 …… 53
14. 孤発性 ALS における isopentenyl diphosphate isomerase 遺伝子領域の コピー数変化	加藤 丈夫 …… 57
15. 神経突起様伸長及び増殖を制御する TRIM-EN1/2 の機能解析	佐々木秀直 …… 59
16. B 細胞刺激因子 (BAFF) は ALS モデル動物の神経変性を抑制する	佐古田三郎 …… 62
17. 酸化修飾の標的である Cys111 を 2ME で還元し安定化させた SOD1 の構造解析	谷口 直之 …… 65
18. 運動神経細胞で HGF を発現するポリオウイルスベクターの開発	野本 明男 …… 68
19. TDP-43 過剰発現による ALS ラットモデル動物の作製	水澤 英洋 …… 71
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
V. ワークショップ・班会議プログラム	85
VI. 研究者一覧	99
VII. 研究成果の刊行物・別刷(別冊)	101

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 isopentenyl diphosphate isomerase を同定した。ALS におけるグリア・免疫病態の役割解明の分野では、BAFF シグナル、自然免疫経路の重要性を明らかにした。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 の翻訳後修飾が酸化ストレスでも生じること、TDP-43 凝集体が細胞の増殖阻害や転写制御の異常を起こすことを明らかにし、さらに野生型 TDP-43 過剰発現による孤発性 ALS モデルラット作製を行った。ALS の治療法開発へ向けた新規病態解明の分野では、SOD1 の結晶 X 線構造解析、ミトコンドリアの品質管理における PINK1-Parkin 経路の解明、神経細胞の突起伸長に係わる TRIMEN の機能解析などを行った。孤発性 ALS 疾患モデルの開発の分野では、TDP-43 の変化が RNA 編集異常の下流の変化であることを明らかにした。ALS 治療に向けたデリバリーシステム開発の分野では、AAV ベクターの血管内投与により治療用遺伝子を乏突起膠細胞へ導入する方法を開発し、骨格筋に接種したポリオウイルスベクターを中枢神経系で発現させることに成功した。低分子化合物による治療・再生療法・免疫療法の開発の分野では、変異 SOD1 の転写を抑制する低分子化合物および既存薬 X を同定し in vivo での効果確認を行った。また、新規経口治療薬として、キサンチン酸化還元 (XOR) 酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物のマウスにおける効果を確認した。さらに血管新生・保護因子、骨髄移植と顆粒球コロニー刺激因子 GCSF 投与の併用療法も有効であることが明らかとなった。また、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、変異 SOD1 マウスに対する野生型アポワクチン効果の作用機序解明などを推進した。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

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
青木 正志 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

船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学/分子再生医学(現 旭川医科大学脳機能医工学研究センター) 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遺伝子解析部門准教授
長谷川成人 東京都精神医学総合研究所分子神経生物学研究チーム副参事研究員
山中 宏二 理化学研究所脳科学総合研究センターチームリーダー

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 鳥取大学医学部脳神経医科学講座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 国立病院機構刀根山病院院長
谷口 直之 大阪大学産業科学研究所疾患糖鎖学教授
野本 明男 (財)微生物化学研究会微生物研究センター理事長
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のリスクとなるコピー数多型の同定をめざした。

また、ALSにおけるグリア・免疫病態の役割解明の分野では、Bリンパ球の役割解明、自然免疫経路の検討を目的とした。

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。TDP-43の局在変化や翻訳後修飾への酸化ストレスの関与、TDP-43の凝集体を形成する細胞モデルによるTDP-43凝集体形成と神経変性の関係解明などを目的とした。さらに、孤発性ALSの病態における野生型TDP-43の役割を明らかにすること

を目的とし、野生型TDP-43過剰発現による孤発性ALSモデルラット作製を試みた。

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、安定な2ME-SOD1とCys111を酸化させた酸化型SOD1の結晶X線構造解析を行った。さらに、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、解析すると共にこのオルガネラの選択的オートファジー(Mitophagy)の作用機序についても併せて検討した。一方、神経細胞の突起伸長にかかわるリゾフォスファチジン酸(LPA)、plasticity related gene1(PRG1)の機能のALS治療への応用を目指し、これらを制御するTRIM-EN1/2の機能を検討した。

孤発性ALS疾患モデルの開発の分野においては、コンディショナルADAR2ノックアウトマウスを用い、TDP-43の変化がRNA編集異常の下流の変化である可能性を探ることを目的とした。

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)ベクターを乏突起膠細胞へ導入する方法の開発、ポリオウイルスベクターのALSモデルマウス骨格筋接種によるHGF治療効果の確認を目的とした。

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すとともに、キサンチン酸化還元

(XOR)酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物による治療効果の確認を目的とした。また、外来性の血管新生・保護因子の投与、野生型マウス由来骨髄の移植と顆粒球コロニー刺激因子 (GCSF) 投与の併用の効果を確認した。また、ALS患者からiPS細胞を樹立し、これまでに開発した神経分化誘導法を用いて分化誘導することで再生療法の基盤作りを目的とした。また、野生型SOD1の免疫療法における応用性を検討するため、変異SOD1マウスに対するワクチンとしての効果とその作用機序を検討した。

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 患者および健常者の末梢血よりDNAを抽出し、deCODE/Illumina CNV370K chipなどを用いた解析を行った。

【ALS におけるグリア・免疫病態の役割解明】

ALSにおけるBリンパ球の役割を明らかにするために、成熟B細胞が存在しないBAFFR遺伝子欠損マウス及びIgM遺伝子欠損マウスとG93Aヒト変異SOD1トランスジェニックマウスを交配、解析した。

また、孤発性ALSの凍結頸髄試料のDNAマイクロアレイ解析からグリア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。

【ALS 病態における TDP-43 の役割解明と疾患モデル開発】

GSH阻害剤であるエタクリン酸(EA)をNSC34細胞に負荷後P-43のリン酸化や不溶化、断片化、局在変化を検討した。

SH-SY5Yに、全長TDP-43、あるいはC末断片を発現し、細胞増殖能の評価、subG1解析による細胞周期の検討、凝集体と共局在する因子の検索を行った。

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いてラットの頸髄前角細胞にヒト野生型TDP-43を過剰発現させ、その神経症状及び神経病理学的所見を観察した。

【ALSの治療法開発へ向けた新規病態解明】

2ME-SOD1と酸化型SOD1の結晶化を行い、ビームラインPF BL-5AにてX線構造解析を行い、さらに円偏光二色性解析(CD解析)により熱安定性を検討した。

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・免疫沈降法・パルスチエイスマッセイ・安定発現株細胞・ノックダウン細胞での生化学的検討とマウス組織での検討より、PRG1とTRIMEN1/2の機能を解析した。

【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

コンディショナルADAR2ノックアウトマウス(AR2)、ヘテロ接合体AR2マウス、野生型マウスにおいて抗TDP-43抗体、抗ADAR2抗体を用いて、免疫組織化学を行った。

【ALS 治療に向けたデリバリーシステムの開発】

3型AAVのゲノム両端のITR配列の間にミエリン塩基性蛋白質(MBP)プロモーター、蛍光蛋白質GFPのcDNA, SV40 poly(A)配列からなる発現カセットを搭載し、マウスの血管内に投与し解析を行った。

ポリオウイルス(PV)感受性のヒトPV受容体発現トランスジェニックマウス(hPVR-Tg)にDI(HGF)d株を筋肉内接種し、経時的に脊髄を採取し、PV抗原およびHGF抗原を免疫組織染色法により観察した。

【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】

ヒトSOD1のゲノムを用いて、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構築し変異SOD1転写活性を抑える低分子化合物もしくは既存薬の同定を試みた。

G1H-G93Aトランスジェニックマウスに、生後80日よりキサントニン酸化還元(XOR)酵素阻

害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物5mg/kgを連日経口投与し、解析を行った。

3種の血管新生・保護因子、すなわち血管内皮細胞を標的としたFGF-2、HGF、および周皮細胞を標的としたPDGF-Bを投与し、BrdUによる新生細胞標識の下、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行った。

G93A変異SOD1マウスを、vehicle投与群、GFPマウスの骨髄移植単独治療群、GCSF単独投与群、GFPマウスの骨髄移植+GCSF投与群の4群に分けて治療を行った。

iPS細胞の樹立のため、患者由来繊維芽細胞にエコ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/c-Mycをレトロウイルスを用いて導入した。

低発現型G93A SOD1トランスジェニックマウスに対し、大腸菌で精製した非金属配位状態の野生型SOD1とG93A型SOD1をワクチン投与し、解析を行った。

(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か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】

孤発性ALS患者において、相同性のある2つの遺伝子isopentenyl diphosphate isomerase 1 (IDI1)とIDI2でコピー数の増加を認めた。IDIは孤発性ALSの病態への関与が示唆されるメバロン酸経路に存在する重要な酵素である。

【ALSにおけるグリア・免疫病態の役割解明】

mSOD1/IgM^{-/-}マウスは、コントロール群と比較して差を認めなかったが、mSOD1/BAFFR^{-/-}マウスでは、症状の悪化と寿命の短縮を認めた。以上より、B細胞の存在は神経変性に影響せず、BAFFシグナルが遮断されると神経保護作用が消失することが示唆された。

TRIF依存性のシグナル経路抑制により疾患進行の加速がみられ、マウスの生存期間が著しく短縮した。疾患進行の加速はケモカインの発現抑制とよく相関していた。ALSモデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられた。

【ALS病態におけるTDP-43の役割解明と疾患モデル開発】

EA負荷によってTDP-43のリン酸化、不溶化、断片化、TDP-43の核から細胞質への移行が確認された。これにより、ALSやFTLD-TDPにおけるTDP-43の翻訳後修飾が酸化ストレスによって2次的にも生じることが示された。

TDP-43凝集体形成細胞においてBrdUの取り込みがほぼ完全に阻害され、RNAポリメラーゼII等の転写因子の凝集体への局在が観察された。TDP-43凝集体は細胞の増殖阻害や転写制御の異常を引き起こすと考えられる。

頸髄前角細胞での野生型TDP-43過剰発現ラットでは、進行性の前肢筋力低下、頸髄前根の大径線維の脱落を示した。しかし、神経病理学的に脊髄前角細胞においてTDP-43の発現は核に局限しており、同様に作製したカニクイザルの結果とは異なり、TDP-43の病態には霊長類と

げっ歯類で種差が存在することが明らかになった。

【ALSの治療法開発へ向けた新規病態解明】

2ME-SOD1の結晶構造はこれまで報告されているSOD1の構造とほぼ同様であったが、SOD1のダイマー形成部位に2MEを介した水素結合やファンデルワールス相互作用の存在を見出すことができた。これらの分子間力がSOD1ダイマーの安定性を増大させている可能性があると考えられる。

ミトコンドリアの膜電位を低下させると、PINK1が損傷ミトコンドリアの外膜に蓄積すること、この蓄積したPINK1が細胞質のParkinを損傷ミトコンドリアに移行させること、p62が損傷ミトコンドリアの凝集・細胞内移動因子であることが明らかとなった。

PRG1とTRIMEN1/2が結合し、TRIM-EN2安定発現株では細胞増殖能の低下と神経突起様伸長が見られRasの活性が抑制されていた。TRIM-EN1/2はPRG1とMAPK系に関与することでニューロン新生・シナプス形成など発生の段階でも重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

AR2マウスでADAR2免疫染色性のない脊髄運動ニューロンにおいてTDP-43の局在異常が観察された。ADAR2陰性の運動ニューロンは細胞死に陥ることから、孤発性ALS運動ニューロンでおきているADAR2活性低下は、細胞死を引き起こすとともにTDP-43の局在異常を引き起こすことが示唆される。

【ALS治療に向けたデリバリーシステムの開発】

特定の変異型AAVベクターを投与したマウスでは、大脳皮質・線条体を含む広範な領域において、抗MBP抗体あるいは抗Olig2抗体に反応する乏突起膠細胞にGFPの発現が認められ、明らかな炎症反応や組織障害はみられず臨床応用への期待が持てる。

骨格筋に接種したPV DIベクターは、中枢神経系でHGFを発現させることに成功した。しかしながら、発現量の関係からかALSのモデルマウスでは、病態を改善させることは出来なかった。

【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】

変異SOD1転写活性を抑える低分子化合物のスクリーニングにおいて、最も効果の高いヒット化合物を見いだした。さらなる解析によりヒット化合物はSOD1の主要な転写活性化因子の1つであるNF-E2 DNA binding protein (Nrf2)のリン酸化を抑制することが明らかになった。さらに他のヒット化合物の構造解析から既存薬Xを同定し、ALSモデルマウスでの効果を確認した。

キサントニン酸化還元(XOR)酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物は、有意な発症遅延効果、生存期間延長効果、病悩期間延長効果を認めた。運動負荷試験においても有意な効果を示した時期が必ず存在していた。病理組織学的解析結果では、有意な残存神経細胞の存在を認めた。

FGF-2、HGF、PDGF-Bのいずれの因子も血管新生促進・保護効果を示すとともに脊髄前角細胞の脱落を有意に抑制した。微小血管内皮細胞あるいは周皮細胞がALS病態の新たな治療標的となる可能性が示唆される。

骨髄移植+GCSF併用療法では運動機能低下を有意に遅延し、生存期間を有意に延長した。また、併用療法群では脊髄前角の運動ニューロン減少が有意に抑制されていた。これにより、骨髄移植+GCSF併用療法はALS治療として有用である可能性が示された。

孤発性筋萎縮性側索硬化症症例(70代女性)からヒトiPS細胞を樹立。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。ヒトiPS細胞の技術を用いて、実際の患者由来神経系細胞を用いることで、患者で実際に起こっている、神経変性疾患の新たな病態の解析が期待される。

SOD1ワクチン接種群では運動ニューロン周囲にIgGと結合体を形成するC1qの沈着が増強しており、残存運動ニューロン数が生食対照群に比較し有意に高かった。末梢血の解析では、野生型SOD1ワクチンでは変異型に比しよりTh2環境が誘導されやすいことが分かった。以

上より、野生型アポワクチンは変異型によらない有望な治療法となる可能性がある。

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・免疫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、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. Hideyama T, et al: Induced Loss of ADAR2 Engenders Slow Death of Motor Neurons from Q/R site-unedited GluR2. J Neurosci 30(36):11917-25, 2010

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 人口多能性幹細胞の選択方法

出願番号(出願日) PCT/JP2010/00362

(2010/05/28)

基礎出願 アメリカ61/217,362(2009/5/29)

出願人名 学校法人慶應義塾 国立大学法人
京都大学

発明者 岡野栄之、岡田洋平（慶應義塾）、山

中伸弥、三浦恭子（京都大学）

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)

酸化ストレスによる TDP-43 修飾の検討

研究分担者：祖父江 元 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⁾、高木伸之介¹⁾、田中章景¹⁾

1) 名古屋大学大学院 医学系研究科 神経内科学

研究要旨

[目的]ALSやFTLD-TDPの変性ニューロンにおける翻訳後修飾が酸化ストレスで生じるかどうかを検討する。[方法]エタクリン酸(EA)をNSC34細胞に負荷後、細胞を回収しWestern blottingでTDP-43のリン酸化や不溶化、断片化を検討した。局在変化の検討のために、免疫染色とGFP融合TDP-43を発現させた細胞を用いたTime-lapse imagingを行った。[結果と考察]今回の検討によりTDP-43のリン酸化や不溶化、断片化、細胞質への局在変化は酸化ストレスによって2次的にも生じることが示された。ALSを始めとするTDP-43の病理学的異常を生じる疾患の病態を理解する上で重要な結果と考えられる。

A.研究目的

TDP-43はALSやFTLD-TDPの変性ニューロンにおいて、本来存在する核から消失し細胞質内に凝集体として存在している。さらに、異常構造物としてのTDP-43は過剰にリン酸化され、ユビキチン化、断片化している。家族性や孤発性ALS患者から複数のTDP-43変異が確認されておりTDP-43はALSの“pathological hallmark”となっている。しかし、この局在変化や翻訳後修飾がどのように病態に関係しているのかよく解っていない。また、ALSの発症や進行において酸化ストレスの関与を示唆するデータが蓄積されつつある。そこで我々は酸化ストレスがTDP-43修飾に与える影響を検討した。

B.研究方法

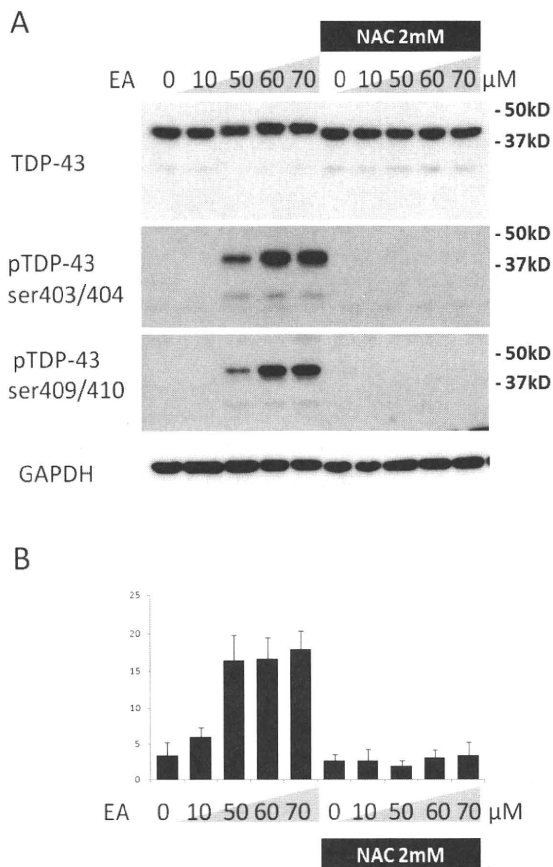
GSH阻害剤であるエタクリン酸(EA)をNSC34細胞に負荷後、細胞を回収しSDS page後Western blotting(WB)でTDP-43のリン酸化や不溶化、断片化を検討した。不溶化の検討にはTris-Hcl (Tris), Triton X100 (TX), Sarkosyl (Sar), SDS bufferの順に回収した。局在変化の検討のために、免疫染色

を行うとともに、GFP融合TDP-43を発現させた細胞をTime-lapse imagingで観察した。さらに、TDP-43C末端の403/404、409/410のセリンをアラニンに置換したリン酸化抵抗性TDP-43発現ベクターを構築し、酸化ストレス下における細胞内局在、不溶化を野生型と比較しリン酸化の影響を検討した。

C.研究結果

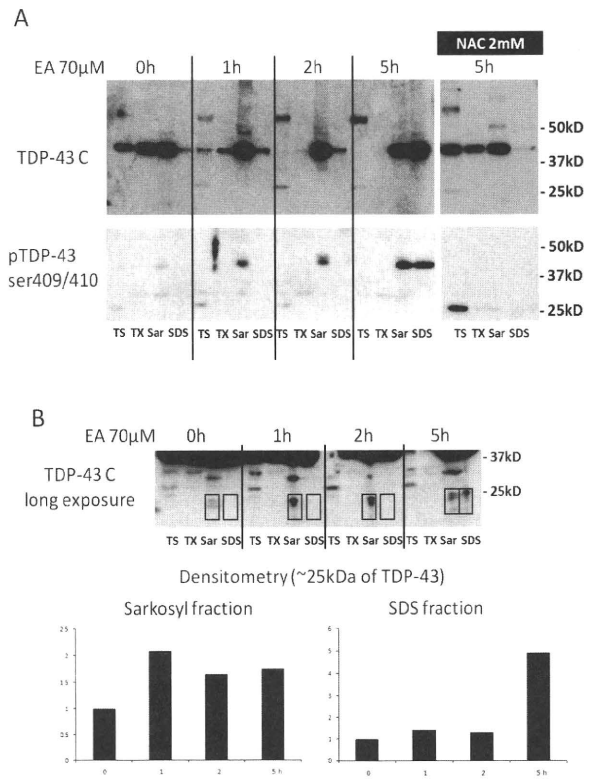
NSC34細胞に対してEA負荷によってTDP-43のリン酸化が確認された(Fig.1)。不溶化の検討ではEA負荷によってTris, TX可溶性TDP-43が減りSar不溶分画が増加しTDP-43の不溶化が生じていた(Fig.2)。また、EA負荷によりSar不溶分画の~25kDaのC末断片が確認され断片化も確認された。免疫染色やTime lapseではEA負荷によりTDP-43の核から細胞質への移行が確認された(Fig.3)。これらの現象は抗酸化剤であるNACにより相殺されることから酸化ストレス負荷による影響と考えられた。リン酸化抵抗性TDP-43を発現させた細胞に酸化ストレスを加えたところ野生型と同様に不溶化し細胞質への局在変化が確認された(Fig.4)。

Figure1



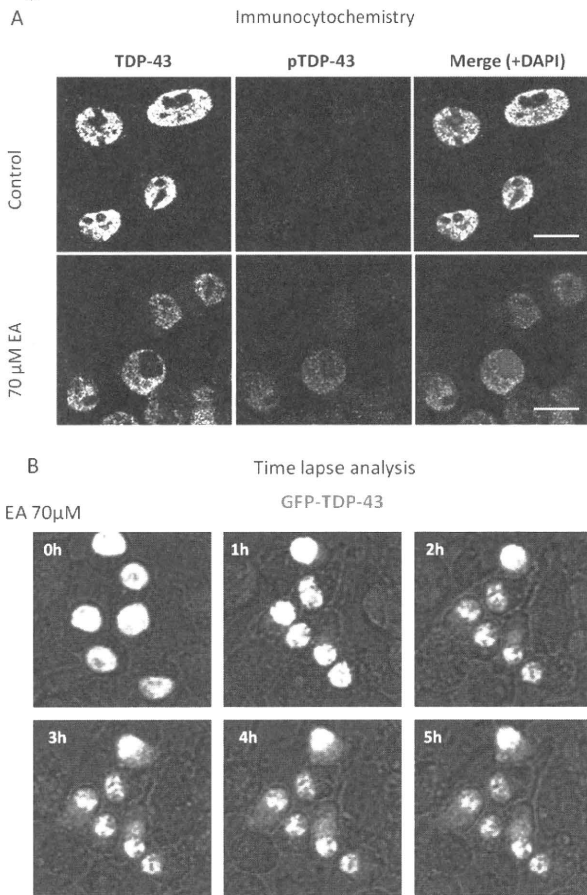
A. Immunoblots of NSC34 cells. EA induced TDP-43 C-terminal phosphorylations at S403/404 and S409/410 in dose-dependent manners. These phosphorylations were prevented by 2mM NAC. *B.* Quantification of ROS using CM-H2DCFDA oxidative assay. ROS productions were increased by EA induction and suppressed by 2mM NAC.

Figure2



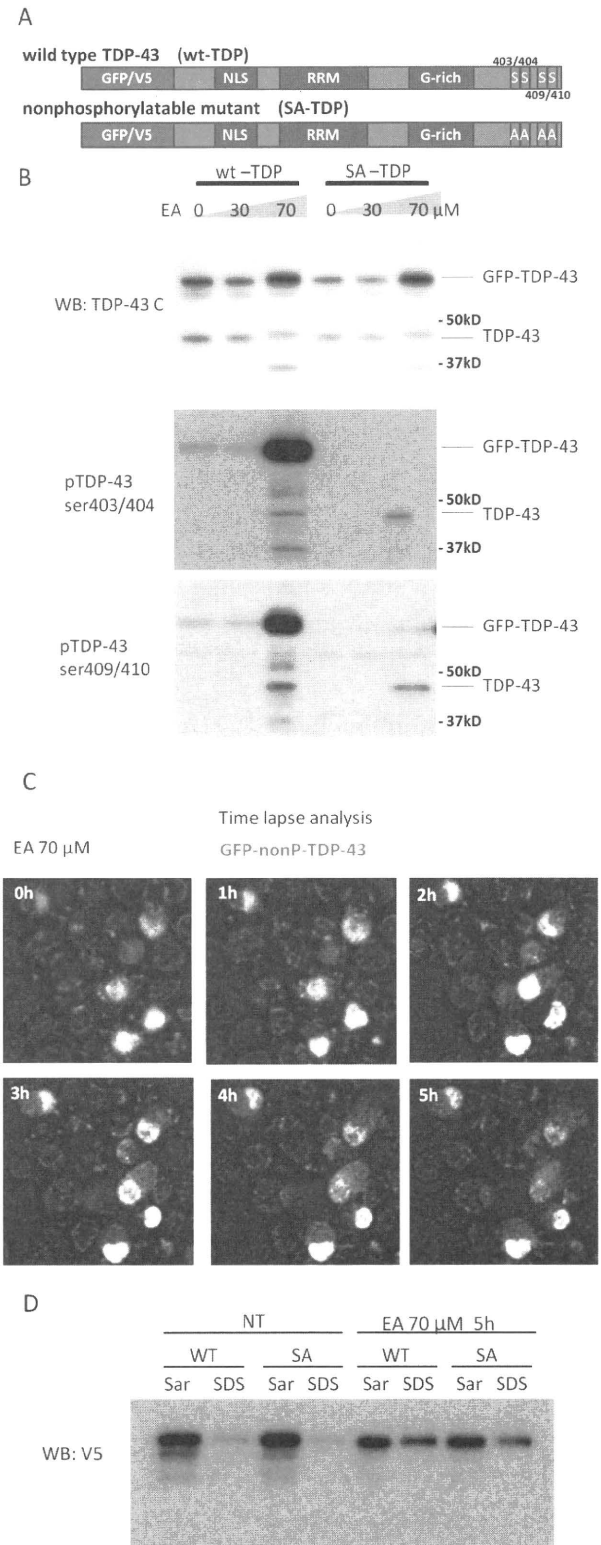
A. Sequential extraction analysis using Tris (TS), Triton X100 (TX), Sarkosyl (Sar), and SDS buffers. TDP-43 in TS and TX fractions was decreased by 70μM EA in time-dependent manners, but that in Sar and SDS fractions was increased by the treatment. These phenomena were prevented by 2mM NAC. Phosphorylated TDP-43 (S409/410) was increased in Sar and SDS fractions in time-dependent manners. *B.* Densitometric quantitations of TDP-43 C-terminal fragment (CTF). In the long exposure of immunoblot with anti-TDP-43 antibody (405-414) (TDP-43 C) showed that CTF of TDP-43 were increased in Sar fraction from 1h, and in SDS fraction at 5h after the EA induction.

Figure3



A. Immunocytochemistry of NSC34 cells. Cells were stained with TDP-43 antibody (green), phospho-specific TDP-43 (pTDP-43) antibody (S409/410) (red) and DAPI (blue). EA treatment (70 μM, 5h) induced translocation of TDP-43 from the nucleus to the cytoplasm in NSC34 cells. Cytoplasmic TDP-43 was immunopositive for pTDP-43 antibody. In the control cells, TDP-43 was localized in the nucleus without phosphorylation. Scale bars indicate 10 μm. **B.** The time laps analysis of NSC43 cells expressing GFP-WT-TDP-43. Images of GFP and phase contrast TDP-43 was distributed to the cytoplasm of by 70 μM EA induction.

Figure4



A. Structures of WT- and SA-TDP-43 vectors. SA-TDP-43 is contained serine to alanine substitutions at 403/404 and 409/410. **B.** Immunoblots of NSC34 cells expressing GFP-WT- or GFP-SA-TDP-43. Endogenous and GFP-WT-TDP-43 were phosphorylated at both 403/404 and 409/410 by 70 μM EA, but

GFP-SA-TDP-43 was not phosphorylated by the treatment. C. The time laps analysis of NSC34 cells expressing GFP-SA-TDP-43. GFP-SA-TDP-43 was distributed to the cytoplasm by 70 μ M EA as GFP-WT-TDP-43. D. Sequential extraction of NSC34 cells expressing V5-WT- or SA-TDP-43. Sar-insoluble fraction of SA-TDP-43 was not different from that of WT-TDP-43 in the SA-insoluble fraction of the EA-treated cells.

D. 考察

NSC34 細胞において EA 負荷により TDP-43 のリン酸化、不溶化、断片化と細胞質への局在変化が確認され、ALS や FTLD-TDP における TDP-43 の翻訳後修飾が酸化ストレスによって 2 次的にも生じることが示された。これは ALS や FTLD-TDP の病態を考える上でも重要な所見であり、またアルツハイマー病などの疾患でも TDP-43 の病理学的異常が生じることの説明にもなりうる結果と考えられた。酸化ストレス下でのリン酸化抵抗性 TDP-43 を用いた実験の結果からは、TDP-43 のリン酸化は不溶化や細胞質への局在変化に影響していないと考えられ、リン酸化と不溶化、細胞局在はそれぞれ独立した現象であると考えられた。

E. 結論

ALS や FTLD-TDP においてみられるリン酸化、不溶化、断片化や細胞質への局在変化などの翻訳後修飾が酸化ストレスによって生じることが示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Curr Mol Med*. 2011 Feb;11(1):48-56.

Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Doi H, Kondo N, Mizoguchi H, Nitta A, Yamada K, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Disrupted transforming growth factor-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci*. 2010 Apr 21;30(16): 5702-12.

2. 学会発表

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Sobue G. Oxidative stress induces TDP-43 modification, recapitulating its pathological feature. *Neuroscience* 2010. Chicago. 2010

Ishigaki S, Fujioka Y, Zhu YL, URANO F, Sobue G. Analysis of differential gene profiles in FUS/TLS knock-down motor neurons. *Neuroscience* 2010. Chicago. 2010

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

人工多能性幹細胞を用いた神経変性疾患の病態解明

研究分担者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨

神経疾患患者から採取した繊維芽細胞を用いて作製したヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、神経系の細胞へと分化誘導することで、これまで治療もなかった、数多くの神経変性疾患の病態解明における重要な細胞モデルとなる。そこで、ALSを含む種々の神経疾患患者の疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立し、これまでに開発した神経分化誘導法を用いて分化誘導することで、神経疾患の病態解明を行っている。

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/幹細胞をニューロスフェアとして誘導する方法を用いて、ALSを含む神経変性疾患患者のニューロンを培養皿上で誘導し、その表現型を正常対照群と比較することにより神経変性疾患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。具体的には、患者由来繊維芽細胞にエコ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/c-Mycをレトロウイルスを用いて導入する。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。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し、評価用のRNA/DNAサンプルと凍結ストックを作成する。

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、(1)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、(2)これまでに確立した、胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、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を用いた神経分化誘導により、高効率に神経系へと分化誘導されること、を指標に、良好と考えられるヒト iPS 細胞クローンを選択する。また、ヒト iPS 細胞表面マーカー (Tra1-60/81、SSEA3/4) の発現の確認、テラトーマ作成による多分化能の確認、カリオタイプ解析などにより、実際に実験に用いるヒト iPS 細胞クローンを選択する。実際の解析では先に述べたニューロスフェア法とこれまで報告されている神経分化誘導方法 (SDIA 法、神経ロゼット法) などその他の方法を組み合わせた細胞の分化誘導により、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型を解析する。

昨年度までに、計 18 症例から皮膚生検もしくは患者の手術検体を用いてヒト iPS 細胞の樹立を行い、報告した。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。本年度は樹立した 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い、疾患の関連病態につき、解析を行う。

(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

慶應義塾大学医学部神経内科と共同研究で

孤発性筋萎縮性側索硬化症症例(70 代女性)からヒト iPS 細胞を樹立。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。

一方、順天堂大学医学部神経内科との共同研究で、家族性パーキンソン病(PARK2)の 2 症例 (67 歳女性[exon2-4 deletion]、および 50 歳男性 [exon6-7 deletion]) の患者検体からヒト iPS 細胞を樹立した。レトロウイルス由来外来遺伝子の発現や神経分化効率をもとに数クローンのヒト iPS 細胞クローンを選別した。選択したヒト iPS 細胞は、未分化マーカーを発現し、NOD/SCID マウス精巣への移植により、テラトーマを形成した。また、aCGH 解析では、それぞれの患者の genotype にあった Parkin 遺伝子の exon2-4 及び exon6-7 の deletion が確認できた。次に、これまでに確立した胚様体を介した神経幹細胞の誘導法を用いて神経幹細胞を誘導し、さらに接着培養で分化させることでドーパミン作動性ニューロンを含むニューロンへと分化させた。これらの分化ニューロンを用いて神経変性のもととなり得る各種解析を行い、表現型を確認している。

D. 考察

これまでに確立したヒト iPS 細胞のクローンの選択方法をもとに、疾患特異的ヒト iPS 細胞において、解析に用いるヒト iPS 細胞を選択した。選択したヒト iPS 細胞から神経系細胞への分化誘導を行い、正常ヒト iPS 細胞、および、ヒト ES 細胞由来神経系細胞をコントロールとして、疾患特異的ヒト iPS 細胞由来ニューロンで見られる表現型を解析している。従来神経変性疾患の病態解析は、各種細胞株への遺伝子導入や、各種遺伝子改変動物を用いて行われてきたため、実際に患者の神経系細胞で起こっている病態を反映しているかどうかは、はっきりしなかった。しかし、ヒト iPS 細胞の技術を用いて、実際の患者由来神経系細胞を用いることで、患者で実際に起こっている、神経変性疾患の新たな病態の解析が期待される。また、低分

子化合物ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングにより、新規治療薬の開発が期待される。

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 細胞や、家族性パーキンソン病の患者由来ヒト iPS 細胞はニューロンへと分化誘導して、病態解析を進めている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Mukaino M, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Ikeda E, Nagai T, Kohda K, Takahashi K, Okita K, Katoh H, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S and Okano H.: Therapeutic effect of the appropriately evaluated 'safe' iPS cells for spinal cord injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 107(28):12704-12709, 2010.
- 2) Kuwako K., Kakumoto K, Imai T, Igarashi M, Hamakubo T, Sakakibara S, Tessier-Lavigne M, Okano HJ, Okano H.: Neural RNA-binding protein Musashi1 controls midline crossing of precerebellar neurons through post-transcriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression. *Neuron* 67(3):407-421, 2010.
- 3) Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JL and Sawamoto K: New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67(2): 213-223, 2010.
- 4) 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*. 28(3):545-554, 2010.

5) Hirota Y, Meunier A, Huang S, Shimozawa T, Yamada O, Kida YS, Inoue M, Ito T, Kato H, Sakaguchi M, Sunabori T, Nakaya M, Nonaka S, Ogura T, Higuchi H, Okano H, Spassky N, Sawamoto K.: Planar polarity of the multiciliated ependymal cells includes asymmetric location of basal bodies. *Development* 137(18):3037-3046, 2010.

6) Kanki H, Shimabukuro MK, Miyawaki A, and Okano H: "Color Timer" mice: visualization of neuronal differentiation with fluorescent proteins. *Mol. Brain* 3: 5, 2010.

7) Sawamoto K, Yuki Hirota Y, Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, and Okano H: Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J. Comp. Neurol*, 519(4):690-713, 2011.

8) Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson J, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, and Sawa A. : Phosphorylation of serine-710 in DISC1 activates a molecular switch from progenitor proliferation to neuronal migration in the developing cortex. *Nature* In Press, 2011.

2. 学会発表

- 1) Hideyuki Okano: "Regeneration of CNS using iPS cells", 2010 SEOUL SYMPOSIUM ON STEM CELL RESEARCH, 2010.8.25*session 8/25 (Centennial Hall, Yonsei University, Seoul, Korea)
- 2) Hideyuki Okano: "Strategies toward regeneration of damaged CNS using Induced pluripotent stem (iPS) cells", the 10th Biennial Meeting of The Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN), 2010.10.19 *session 10/17-20 (PHUKET GRACELAND RESORT & SPA, Phuket, Thailand)
- 3) 岡野栄之 : iPS 細胞と霊長類遺伝子改変技術

を用いた神経再生・疾患・創薬研究, BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)特別講演・プレナリーレクチャー、2010年12月7日 *会期12/7-10 (神戸国際会議場、神戸)

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

【平成22年度】国内2件 海外6件

【国内】

(1)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 特願 2006-519063

特許番号 特許第 4555924 号 (2010/07/30)

出願日 2004/2/24

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

(2)

発明の名称 Notch シグナル伝達系活性化検知方法

出願番号 特願 2004-298241

特許番号 特許第 4599610 号 (2010/10/08)

出願日 2004/10/12

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、徳永 暁憲、中尾 啓子、神山 淳

【海外】

(1)

発明の名称 脊髄損傷サルモデルの作成法及びその利用

出願番号 アメリカ 10/496,993

特許番号 アメリカ 7753054 (2010/07/13)

出願日 2002/11/26

出願人 独立行政法人科学技術振興機構

学校法人慶應義塾

発明者 岡野 栄之、戸山 芳昭、中村 雅也、野村 達次、谷岡 功邦、安東 潔、金村 米博

(2)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 メキシコ PA/A/2005/008713

特許番号 メキシコ 275691 (2010/05/06)

出願日 2004/2/24

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

(3)

発明の名称 ヒトグリオーマ治療に有用なリコンビナント HSV

出願番号 アメリカ 12/091,633

特許番号 アメリカ 7790451 (2010/09/07)

出願日 2006/9/14

移行日(日本) 2008/04/14

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 矢崎貴仁、岡野栄之、河瀬斌、金井隆一

(4)

発明の名称 神経幹細胞の生存及び/又は増殖及び神経突起伸張を促進する方法並びに促進剤、神経幹細胞を含む医薬組成物、検定方法、スクリーニング方法

出願番号 アメリカ 10/571,277

特許番号 アメリカ 7785596 (2010/08/31)

出願日 2004/9/8

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、坂口昌徳、岡野ジェイムズ 洋尚

水澤 英洋(東京医科歯科大学)、石橋 哲(東京医科歯科大学)

(5)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 フィリピン 1-2005-501537

特許番号 フィリピン 登録査定

出願日 2004/2/24

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

(6)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 イスラエル 170399

特許番号 イスラエル 登録査定

出願日 2004/2/24

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

2.実用新案登録

なし

3.その他

出願特許

【平成 22 年度】

【国内】

(1)

発明の名称 神経幹細胞の自己複製促進剤およびその使用方法

出願番号(出願日)特願 2010-101415 (2010/04/25)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 並木 淳、岡野栄之

(2)

発明の名称 脊髄損傷治療用製剤

出願番号(出願日)特願 2010-177255 (2010/08/06)

出願人名 大日本住友製薬株式会社 学校法人慶應義塾

発明者 前田美穂、岸野晶祥、佐野明彦(大日本住友製薬)、岡野栄之、中村雅也、張 亮(慶應義塾)

【国外】

(1)

発明の名称 人口多能性幹細胞の選択方法

出願番号(出願日) PCT/JP2010/00362

(2010/05/28)

基礎出願 アメリカ 61/217,362(2009/5/29)

出願人名 学校法人慶應義塾 国立大学法人京都大学

発明者 岡野栄之、岡田洋平(慶應義塾)、山中伸弥、三浦恭子(京都大学)

(2)

発明の名称 シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法

出 願 番 号 (出 願 日) PCT/JP2010/062915

(2009/07/30)

基礎出願 日本 特願 2009-178340 (2009.7.30)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、中村雅也、戸山芳昭、石井賢、高木岳彦