

201024045B

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20年度～22年度 総合研究報告書

(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. 総合研究報告

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. dynactin-1, TDP-43 を標的とした孤発性 ALS モデルの作成

祖父江 元 …………… 11

2. 多能性幹細胞を用いた再生医学と神経変性疾患の病態解析

岡野 栄之 …………… 16

3. 孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下、GluR2 RNA 編集異常

および TDP-43 病理の分子連関と病因的意義

郭 伸 …………… 26

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 …………… 30

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 …………… 34

6. 血管内投与型 AAV ベクターの開発

中野 今治 …………… 42

7. 細胞外微小環境と内在性神経幹/前駆細胞を標的とした

ALS 再生誘導療法開発の試み

糸山 泰人 …………… 45

8. ALSの病態修飾の分子機序解析と再生因子HGFの治療適用の可能性

船越 洋 …………… 50

9. ALS に対する免疫療法の開発研究

漆谷 真 …………… 57

10. TDP-43 の分子病態解明と凝集体形成細胞モデルの構築

長谷川成人 …………… 62

11. ALS のグリア細胞における分子病態の解明

山中 宏二 …………… 67

III. 研究報告(研究協力者)

12. ALS モデルマウスにおける TAT-FNK 蛋白髄腔内投与による蛋白治療、
および骨髄移植と顆粒球コロニー刺激因子投与併用治療 阿部 康二 71
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
ALS 治療薬と一過性肝細胞組織障害からの回復過程における肝細胞増殖因子(HGF)の寄与
加藤 信介 76
14. 孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムのコピー数多型(copy number variation)解析
加藤 丈夫 84
15. 変異型 SOD1 による小胞体ストレスへの関与、及び神経突起制御因子 PRGs 結合タンパク
TRIM-EM1/2 の同定と機能解析 佐々木秀直 87
16. 筋萎縮性側索硬化症の免疫学的病態の解析
佐古田三郎 90
17. 家族性 ALS の凝集体形成機構の解明
谷口 直之 97
18. ALS 病態進行遅延を目指した肝細胞増殖因子発現
野本 明男 102
19. TDP-43 過剰発現による ALS サルおよびラットモデル動物の作製
水澤 英洋 107
- IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 111
- V. 研究成果の刊行物・別刷(別冊) 129

I. 総合報告書

総合研究報告書

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。ALS の疾患感受性遺伝子探索の分野では isopentenyl diphosphate isomerase を同定し、その局在を明らかにした。ALS におけるグリア・免疫病態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、BAFF シグナル、自然免疫経路の重要性を示し、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 の関与を示し、TDP-43 の翻訳後修飾が酸化ストレスでも生じうること、FTLD 患者脳に蓄積する TDP-43 断片、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た。さらに野生型 TDP-43 過剰発現によるカニクイザル・ラット孤発性 ALS モデル作製を行った。ALS の治療法開発へ向けた新規病態解明の分野では、オートファジー経路、変異型 SOD1 による小胞体ストレス、SOD1 の凝集体形成機構の観点から新たな ALS 病態が明らかとなった。さらに、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を明らかにした。また、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、孤発性 ALS 線虫モデルの開発、解析を推進し、さらに 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、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 ベクターの開発や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。さらに、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。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、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を明らかにし、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を示した。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

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
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
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。

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、リンパ球-ミクログリア相互

作用の役割解明、Bリンパ球の役割解明、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、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カニクイザルおよびラットモデル作製を試みた。

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、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

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。また、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、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すとともに、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による治療効果の確認を目的とした。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、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 (G-CSF) 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。さらに同定した遺伝子の発現・局在を解析した。

【ALSにおけるグリア・免疫病態の役割解明】

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。

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 BAFRR 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。

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。

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。

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。

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。

カニクイザルおよびラット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】

恒常的オートファジーは、細胞の恒常性維持に不可欠であり、その破綻がALSをはじめとする様々なヒト疾病の発症原因となりうる。そこで、オートファゴソーム形成の起源解明を目的に、Atg8/LC3 タンパク質結合システムに特異的なE2酵素であるAtg3欠損マウスを作製し、解析を行った。

小胞体関連分解 (ERAD) において小胞体から細胞質へ逆行輸送されるT細胞抗原受容体 (TCR α) の、小胞体内への蓄積および細胞質での凝集形成への変異型 SOD1 による影響を検討し、ALS 病態における小胞体ストレスの関与を検討した。

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。

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・パルスチェイスアッセイ・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】

孤発性ALS患者脊髄で観察される分子動態を反映する疾患モデルとして、ALS運動ニューロンにおいて神経変性初期から発現低下を示す dynactin-1 の運動ニューロン特異的ノックダウン (KD) 線虫の作成を行ってきた。このモデルを用い、dynactin-1 発現低下による神経変性メカニズムについて、細胞周期関連分子である cyclin C についての検討を行った。

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】

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。また、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。

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 制御下に分泌型リン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ループットスクリーニングシステムにより、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。

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。

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。

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、G-CSF 単独投与群、GFP マウスの骨髄移植 + G-CSF 投与群の 4 群に分けて治療を行った。

患者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/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。また、その発現は、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 におけるグリア・免疫病態の役割解明】

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マイ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、リンパ球消失により疾患初期にマイクログリアが活性

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。

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。

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。疾患進行の加速はケモカインの発現抑制とよく関連していた。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。

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。

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。

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。

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。

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。一方、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の発現は核に限局しており、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】

Atg3欠損マウスでは、一見正常なオートファゴソーム様構造体が形成できるが、リソソームと癒合したオートリソソームの形成に欠陥が見られた。すなわち、オートファゴソーム形成における複数の段階に障害が生じ、Atg3KO線維芽細胞(MEFs)において、長寿命タンパク質の分解は有意に抑制されていた。このAtg3KOマウス・細胞は、オートファゴソームの起源を探る強力なツールとなると考えられた。

プロテアソーム阻害剤であるMG132の存在下では、TCR α の凝集体が出現し、さらに、変異型SOD1を発現させると凝集体を形成する細胞数が減少した。ERADで分解を受けるTCR α が、変異型SOD1により小胞体からの逆行輸送が阻害されたために細胞質での凝集体形成が抑制されるものと考えられ、神経毒性の機序に小胞体ストレスが関与することが示唆された。

FALS変異型SOD1やアポ型SOD1はTG2の基質となり、Ca²⁺依存的に共有結合によるSOD1の数へ多量体の形成が認められた。また、Cystamine

処理によりそれらの数-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。

G1H-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。

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。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。

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。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。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】

dynactin-1の運動ニューロン特異的KD線虫は、進行性の運動機能障害と運動ニューロン変性を示す。患者運動ニューロンで見られるcyclin Cの発現増加と核内移行は、このKD線虫においてもシミュレートされていた。さらに、核移行シグナルを付加したcyclin Cを単独で線虫に高発現させると、dynactin-1 KDに類似した表現型が得られ、dynactin-1発現レベルの低下による神経変性機序の一つとして、細胞周

期の deregulation が関与していることが示唆された。

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】

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。

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。

変異SOD1マウスでは、TAT-FNK投与群でL4脊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】

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。

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。

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。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。

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。またIL-4とTGF β 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。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。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・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. 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 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)

dynactin-1, TDP-43 を標的とした孤発性 ALS モデルの作成

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⁾、池中建介¹⁾、蔣 月梅¹⁾、河合香里、黄 哲¹⁾、
高木伸之介¹⁾ 勝野雅央^{1,2)}、丹羽淳一³⁾ 貝淵弘三⁴⁾ 田中章景¹⁾

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

孤発性ALS脊髄運動ニューロンで観察されるdynactin1の発現低下を再現する線虫モデルを作成し解析を行った。このモデルにおいては神経変性とともに、患者運動ニューロンで見られるcyclin Cの顕著な発現増加と核内移行が再現されていた。また、cyclin Cの高発現と核内移行を再現する線虫モデルを作成したところ運動ニューロン障害を示唆する表現型を得たことより、細胞周期のderegulationと神経変性の間の密接な関係が示唆された。

TDP-43はALS運動ニューロンでは核から細胞質へ局在が変化しているため、本来の機能が失われ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。また、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。

さらに、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エタクリン酸(EA)をNSC34細胞に負荷後、TDP-43のリン酸化や不溶化、断片化、局在変化について検討した。この結果、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

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の約10%を占める遺伝性ALSの一部のものは原因遺伝子が同定され、そのトランスジェニックマウスモデルの作成により病態解明に一定の成果が得られている。しかし、ALSのほとんどを占める孤発性については、現在もその病因は不明のままであり、病態を反映した優れた疾患モデルの作成が切望されている。我々は、孤発性ALS患者運動ニューロンにおいて、神経変性過程の初期より発現が低下しているdynactin1と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TDP-43をターゲットにloss of functionの立場から研究を推進した。また、TDP-43については、局在変化や翻訳後修飾の病態への関与を明らかにするために、酸化ストレスがこれらに与える影響を検討した。

B.研究方法

コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターであるacr-2支配下に、dnc-1(ヒト

dynactin1の相合体)shRNAをマイクロインジェクションすることによってdynactin1 KD線虫モデルを作成した。孤発性ALS脊髄運動ニューロンで観察される細胞周期関連因子cyclin Cの発現増加と局在変化(核内移行)がこの線虫でも観察されるかどうかを調べるため、TagRFPを融合した cic-1 (TagRFP-cic-1) をacr-2プロモーター下にdnc-1 shRNAと共に発現した。さらに、核移行シグナル付き GFP を融合した cic-1(NLS-GFP-cic-1)を単独で高発現させることによりcyclin Cの高発現と核局在をシミュレートする線虫モデルの作成を行った。

また、Neuro-2a細胞において、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、TUNEL染色等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い、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。

また、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。局在変化は免疫染色、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。

(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

コントロール群の線虫運動ニューロンにおいては、cic-1のmRNAの発現は抑制されているが、dnc-1 KDモデルでは、cic-1のmRNAは顕著に増加していた。TagRFP-cic-1は、コントロー

ル群では核外に局在したが、dnc-1 KDモデルでは、一部の運動ニューロンにおいて核移行が認められた。さらに、cyclin Cの高発現と核局在を線虫で再現するために、NLS-GFP-cic-1を単独で高発現させると、dnc-1 KDに類似したcoiler UNCの表現型と、進行性の首振り回数の低下が認められた。

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非アポトーシス性の細胞死が誘導された。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に着目したところ、RhoA, Rac1, Cdc42の活性が低下していることが判明した。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いなければならない。RhoA, Rac1, Cdc42の局在を細胞分画後のウェスタンブロッ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。

NSC34細胞に対してEA負荷によってTDP-43のリン酸化、不溶化が生じていた。さらに、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。局在変化については、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。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。

D.考察

dnc-1 KD線虫モデルにおいて、孤発性ALS運動ニューロンで認められたcyclin Cの発現変化が忠実に再現されていた。また、cic-1(cyclin C)の高発現により、dnc-1 KDモデルに類似した表現型を示したことから、孤発性ALS運動ニューロンで認められたcyclin Cの発現量増加や核移行は、運動ニューロン変性の原因の一つである可能性も示唆され、細胞周期のderegulationと神

経変性との関係を今後検討していく必要があると考えられた。

TDP-43のloss of functionにより細胞骨格系の維持、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。そして、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。

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たことより、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、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

dynactin1遺伝子ノックダウン線虫モデルは、孤発性ALSの少なくとも一部の病態（細胞周期異常など）を反映していると予想され、病態解明のための有用な動物モデルとなりうる可能性がある。また、TDP-43ノックダウン細胞モデルでは、Rho family GTPaseの活性低下を通じ神経変性を起こす可能性が示唆された。さらに、ALSにおいてみられるTDP-43のリン酸化、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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Senda J, Kato S, Kaga T, Ito M, Atsuta N, Nakamura T, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Sobue G: Progressive and widespread brain damage in ALS: MRI voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging

study. *Amyotroph Lateral Scler*, 12: 59-69, 2011

2. Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D, Ikegawa S. Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians. *Neurobiol Aging*, in press, 2011
3. Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G: Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Curr Mol Med*, 11: 48-56, 2011
4. Kato T, Emi M, Sato H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Katagiri T, Tsuburaya K, Toyoshima I, Tanaka F, Sobue G, Matsubara K: Segmental copy-number gain within the region of isopentenyl diphosphate isomerase genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 402: 438-442, 2010
5. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Morita M, Nakano I, Kanai K, Ito S, Ishikawa K, Mizusawa H, Yamamoto T, Tsuji S, Hasegawa K, Shimohata T, Nishizawa M, Miyajima H, Kanda F, Watanabe Y, Nakashima K, Tsujino A, Yamashita T, Uchino M, Fujimoto Y, Tanaka F, Sobue G; Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group: Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 9: 875-884, 2010
6. 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- β signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci*, 30: 5702-5712, 2010
7. Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, 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, 2010
8. 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
 9. 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
 10. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nature Med*. 15, 253-254, 2009
 11. 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
 12. 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
 13. Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H. Spatio-Temporal Recapitulation of Central Nervous System Development By Murine ES Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*. 26: 3068-3098, 2008
 14. Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, Sobue G. A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel pharmacotherapeutic strategies. *Expert Opin Pharmacother*. 9: 1845-1857, 2008
 15. Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain*. 131: 229-239, 2008
2. 学会発表
 1. 祖父江 元: 神経変性疾患の分子標的治療への展開, 第47回日本臨床分子医学会学術集会 特別講演I 2010.4.10 東京
 2. 祖父江 元: 第51回日本神経学会総会シンポジウム「Academia-based development of disease-modifying therapy (アカデミア発の創薬・治療研究) 2010.5.21
 3. Shinsuke Ishigaki, Yusuke Fujioka, Lihua J. Zhu, Fumihiko Urano, and Gen Sobue. Analysis of FUS/TLS-deficient differentiated motor neurons. First BRI International Symposium 2010, Niigata Japan, November 22-23, 2010
 4. 池中建介、蔣月梅、田中章景、勝又竜、河合香里、黄哲、勝野雅央、山本正彦、祖父江元. 神経変性疾患におけるdynactin-1と細胞周期関連分子の発現解析. 第51回日本神経学会総会. 東京. May 20-22, 2010.
 5. Katsuno M. TGF-beta signal disruption and cell cycle dysregulation in motor neuron diseases. Kick off symposium of Scientific Research on Innovative Area “Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology”. Tokyo, Japan, Oct 27, 2010.
 6. 田中章景、黄哲、勝又竜、池中建介、河合香里、蔣月梅、和座雅浩、勝野雅央、祖父江元. Dynactin-1ノックダウン線虫における神経変性. 第51回日本神経学会総会, 東京 (2010. 5. 20-22)
 7. Shinsuke Ishigaki, Yusuke Fujioka, Julie Zhu, Fumihiko Urano, and Gen Sobue. Analysis of differential gene profiles in differentiated FUS knock-down motor neurons. 第33回神経科学大会、neuro2010、神戸 September 2-4, 2010.

8. Shinsuke Ishigaki, Yusuke Fujioka, Julie Zhu, Fumihiko Urano, and Gen Sobue Analysis of differential gene profiles in FUS knock-down motor neurons. The 40th Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA, Nov 13-17, 2010.
9. Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Shinnosuke Takagi, Gen Sobue. Oxidative stress induces TDP-43 modification, recapitulating its pathological feature. The 40th Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA, Nov 13-17, 2010.
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 田中章景、和座雅浩、丹羽淳一、祖父江 元. 孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第 49 回日本神経学会総会シンポジウム 横浜 2008 年 5 月 17 日
16. 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の作成. 第 49 回日本神経学会総会 横浜 2008 年 5 月 16 日

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

なし

多能性幹細胞を用いた再生医学と神経変性疾患の病態解析

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 胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、個体を構成する様々な細胞へと分化することができ、神経再生や *in vitro* の神経系の実験モデルとして期待されてきた。そこで、マウス、ヒト多能性幹細胞から神経幹細胞を誘導し、神経再生治療における安全性評価を行い、その有効性を確認した。さらに、ALS、パーキンソン病などの種々の神経疾患患者の疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、神経系細胞へと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

胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、個体を構成する様々な細胞へ分化できることから、神経再生や *in vitro* の神経系の実験モデルとして期待されてきた。特に、iPS 細胞は、自身の皮膚から採取した線維芽細胞など、体細胞から樹立できるため、ES 細胞の持つ倫理的問題や免疫学的拒絶反応などの問題を回避することが可能である。同時に、安全性の問題など、未解決の問題もある。

我々は、これまでの研究で、マウス ES 細胞から誘導した神経幹細胞が、脊髄損傷モデルマウスへの移植により運動機能の回復に寄与することを見出している。そこで、マウス iPS 細胞から同様に誘導した神経幹細胞を動物モデルに移植してその安全性を検討し、また、脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復が得られるかどうかを検討する。さらに、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞からも神経幹細胞を誘導する培養システムを構築し、その安全性を検討すると同時に、脊髄損傷などのモデル動物への移植により機能回復が得られるかどうかを検討する。

一方、ALS を含む神経変性疾患のこれまでの病態解析では、神経系の細胞株やモデル動物が用いられてきたが、これらのモデルは必

ずしも患者の病態を反映しているとは限らない。また、死後の患者検体も用いられてきたが、その解析には限界があると言わざるを得なかった。このような問題点を解決する上で、患者由来ヒト iPS 細胞は、極めて有用な病態モデルを提供し得る。そこで、我々は ALS を含む神経疾患の患者から iPS 細胞を樹立し、我々がこれまで確立してきた方法を用いて、神経前駆幹細胞、種々のニューロンなどの神経系細胞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

我々は、これまでにマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、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を開発してきた。この方法を用いてマウス ES 細胞から誘導した神経幹細胞の移植は、脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復に寄与することを見出している。そこで、マウス iPS 細胞から神経幹細胞を誘導し、NOD/SCID マウスの脳に移植して造腫瘍性などの安全性評価を行う。安全と思われるマウス iPS 細胞株を用いて、同様に誘導した神経幹細胞を脊