

髓損傷モデルマウス(C57/BL6)、損傷後 9 日目に移植し、免疫組織化学解析によりその分化能を、また、BMS スコアを用いて運動機能の改善を評価する。

さらに、将来的な再生医療への応用を念頭に置き、ヒト ES 細胞からニューロスフェアとして神経幹細胞を誘導する培養法を開発する、また、同様の手法を用いてヒト iPS 細胞からも神経幹細胞の誘導を行う。ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から誘導した神経幹細胞は、NOD/SCID マウスの脳および精巣に移植してその安全性を評価し、安全と思われるヒト iPS 細胞株から誘導した神経幹細胞を脊髄損傷モデルマウスに移植し、運動機能の改善効果を検討する。

一方、ALS を含む神経変性疾患、特に変異遺伝子既知の症例を中心に、患者皮膚から繊維芽細胞を樹立し、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、疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立する。コロニーの形態、外来遺伝子の発現、神経分化能などを指標に優良株を選別し、選別したヒト iPS 細胞株を用いて、ニューロスフェア法、あるいは種々の神経分化誘導方法 (SDIA 法、神経ロゼット法) を用いて病変部位の疾患感受性細胞を誘導し、正常対照群の細胞と比較してその表現型を解析する。

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を用いてヒト 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。樹立した iPS 細胞はそれぞれの疾患感受性細胞へ分化誘導し、疾患の関連病態について解析を行う。

#### (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

##### (1)ES 細胞、iPS 細胞からの神経分化誘導と、誘導した神経幹細胞を用いた神経再生

まず、多数の株のマウス iPS 細胞からマウス ES 細胞と同様の方法で、ニューロスフェアとして神経幹細胞を誘導した。その結果、一部の株を除いて、ニューロンとグリア細胞を生み出すニューロスフェアを誘導することができた。次に、誘導したニューロスフェアにおいて Nanog-EGFP により標識される未分化細胞の残存を解析し、また、NOD/SCID マウスの脳に移植してその造腫瘍性を解析したところ、分化抵抗性の Nanog-EGFP 陽性細胞の残存が多く見られた一部の株においては、移植後にテラトーマを形成した。多数株において同様の解析を行ったところ、胎児由来線維芽細胞、胃細胞から樹立したマウス iPS 細胞を用いた時は、分化誘導後の Nanog-EGFP 陽性細胞が少なく、テラトーマの形成頻度が低い事、成体皮膚由来線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を用いた時は、分化誘導後の Nanog-EGFP 陽性分化抵抗性細胞が多く残存し、高頻度にテラトーマを形成することを見出した。これらの結果から、由来体細胞の種類によって、分化抵抗性細胞の割合や造腫瘍性に差があることが明らかになった。

次に、上記の解析で造腫瘍性が見られなかった、38C2 マウス iPS 細胞からニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷後 9 日目のモデルマウスに移植し、組織学的評価および運動機能評価(BMS スコア)を行った。その結果、PBS 注入群に対し、マウス iPS 細胞由来ニューロスフェア移植群では、脊髄の萎縮や脱髄が軽

減し、5-HT陽性ファイバーが多く見られた。また、ニューロスフェア移植群においてBMSスコアの優位な改善がみられ、マウスiPS細胞由来神経幹細胞の有効性が示された。

将来的な臨床応用を視野に、マウスES細胞、iPS細胞からニューロスフェアを誘導する培養法を応用し、京都大学より分与されたヒトES細胞から、ニューロスフェアとして神経幹細胞を誘導する培養法を確立した。同様の方法で、やはり京都大学より分与を受けたヒトiPS細胞からもニューロスフェアを誘導することができた。このヒトiPS細胞由来ニューロスフェアは長期継代培養可能で、接着細胞で分化させると活動電位が記録される機能的なニューロンを生み出した。また、ニューロスフェアにおける未分化細胞の残存を未分化細胞のマーカーであるTra-1-60およびTra-1-81の発現をFlowcytometryを用いて解析したところ、ニューロスフェアへの分化誘導後には、未分化細胞の残存は、殆ど見られないことが明らかになった。

そこで、このヒトES細胞、iPS細胞由来ニューロスフェアをNOD/SCIDマウス脳、精巣に移植し、その分化能と造腫瘍性を検討したところ、*in vivo*において、ニューロンおよびグリア細胞に分化し、シナプスの形成や髄鞘化も見られることが明らかになった。しかしながら、一部の株は腫瘍化し、その組織像は、テラトーマではなくグリオーマであることが明らかになった。一方、一部の株においては、そのような造腫瘍性は示さず、適切に分化した。そこで、この腫瘍化しないヒトiPS細胞から誘導したニューロスフェアをNOD/SCIDマウスの脊髄損傷モデルに移植したところ、マウスES、iPS細胞の時と同様に、脊髄の萎縮や脱髄が抑制され、BMSスコアによる運動機能の改善が見られた。今後は、安全性の問題を解決すべく、腫瘍化の要因を明らかにすると同時に、レトロウイルスを用いないで樹立した、integration-freeのヒトiPS細胞を用いて同様の解析を行っていく予定である。

(2)患者由来ヒトiPS細胞を用いた神経疾患の病態解析

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葉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

マウスES細胞、iPS細胞で行った実験をもとに、ヒトES細胞、iPS細胞から神経幹細胞を効率的に誘導し、その造腫瘍性などの安全性、および脊髄損傷モデルマウスへの移植による、運動機能の改善効果を確認することができた。また、霊長類モデルであるコモンマーモセット脊髄損傷モデルへのヒトiPS細胞由来神経幹細胞の移植を行っており、良好な結果を得ている。今後のヒトiPS細胞由来神経幹細胞を用いた神経再生治療の臨床応用に向けて、これらの細胞の安全性(あるいは造腫瘍性)を決定づける要因についての解析、また、ゲノムへ組み込まれないタイプのベクターを用いた臨床グレードのヒトiPS細胞を

用いた解析を現在進めている。

また、疾患特異的ヒト iPS 細胞は、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。従来の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は不明であった。しかし、ヒト iPS 細胞の技術を用いることで、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

ES 細胞、iPS 細胞などの多能性幹細胞から神経幹細胞を誘導する培養法を構築し、その安全性評価を行い、神経再生治療における有効性を確認した。

また、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 細胞を樹立した。筋萎縮性側索硬化症や、家族性パーキンソン病の患者由来ヒト iPS 細胞は、良質なクローンの選択の後、神経系細胞を誘導し、その表現型解析を行っている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H.: Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Whisker Pad of Adult Rodents. *Cell Stem Cell*. 2: 392-403, 2008.

2) Naka H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in central nervous system development. *Nature Neurosci* 11 (9): 1014-1023, 2008

3) 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 ES cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 26; 3086-3098, 2008.

4) Kohyama J, Takatsuka E, Yamashita T, Namiki J, Hsieh J, Gage FH, Namihira M, Okano H, Sawamoto K, Nakashima K. Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 105 (46): 18012-18017, 2008.

5) Akamatsu W, DeVeale B, Okano H, Cooney AJ, van der Kooy D: Suppression of Oct4 by germ cell nuclear factor restricts pluripotency and promotes neural stem cell development in the early neural lineage. *J. Neurosci*, 29(7): 2113-2124, 2009.

6) 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. : Generation of transgenic non-human primates with germ line transmission. *Nature*, 459(7246):523-527, 2009. (\*H. Okano is the corresponding author in this paper)

7) 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, 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)

8) 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, 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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
- 【2008】
- 1) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Amane Koizumi, Ryosuke Enoki, Seiji Ishii, Yasuto Itoyama, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. 第31回日本神経科学大会、東京、2008年7月
- 2) 岡田洋平、富里周太、幸田和久、島崎琢也、祖父江元、柚崎通介、岡野栄之、胚性幹細胞 (ES細胞) からの神経幹細胞の誘導とその特性の解析、第31回日本分子生物学学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008年12月
- 3) Okada, Y., Tomisato, S., Kohda, K., Sobue, G., Yuzaki, M., Okano, H., Derivation and characterization of human ES cell-derived neural stem/progenitor cells, The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, San Francisco, December, 2008
- 【2009】
- 1) Hideyuki Okano : "Strategies toward regenerating th injured spinal cord", the 22nd Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the Asian Pacific Society for Neurochemistry (APSN),

2009.8.27 \*session 8/23-28 (BEXCO, Busan, Korea)

2) Hideyuki Okano : "Evaluation of tumorigenicity of induced pluripotent stem cells-derived neural stem/progenitor cells and its application to the cell therapy for injured spinal cord.", "Mini Symposium, Neuroscience 2009, SfN's 39th annual meeting", 2009.10.20\*session 10/17-21 (McCormick Place, Chicago, U.S.A.)

3) Hideyuki Okano : "Strategies toward CNS-Regeneration using iPS cell technology", Plenary Session, The 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2009.12.19 \*session12/16-20 (The Westin Maui Resort & Spa, Ka'anapali Maui, HI, U.S.A.)

4) Hideyuki Okano : "Regeneration of the Damaged CNS with iPS Cells", KEYSTONE SYMPOSIA -Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation (B4)-,2010.2.18\*session 2/15-20 (Conference Center, Keystone Resort, Colorado, U.S.A.)

#### 【2010】

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)

#### 【2008 年】

##### 【海外】

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 香港 06108578.7

特許番号 香港 HK1088230 (2008.6.20)

出願日 最優先日 2003/02/24 PTC 出願 2004/02/24 香港移行日 2006/8/2

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

#### 【2009 年】

##### 【国内】

##### (1)

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

特許番号 特許第 03984959 (2009.7.13)

出願日 2003.3.27

出願人 株式会社 G B S 研究所

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

##### (2)

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 特願 2003-546653

特許番号 特許第 4332650 (2009.7.3)

出願日 2003.11.26

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

##### (3)

発明の名称 記憶障害治療剤

出願番号 特願 2003-559527

特許番号 特許第 4374469 (2009.9.18)

出願日 2002.10.15

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、島崎琢也、長尾省吾、松本義人

## H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

【海外】

(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 ロシア 2005130011

特許番号 ロシア 2358761 (2009.6.20)

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 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 オーストラリア 2004212843

特許番号 オーストラリア 2004212843(2009.10.08)

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 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 ニュージーランド 541928

特許番号 ニュージーランド 541928(2009.10.08)

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

(4)

発明の名称 IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する内耳障害治療剤

出願番号 アメリカ 10/593,776

特許番号 アメリカ 7498031 (2009.3.3)

出願日 2005/3/24

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 藤岡正人、岡野ジェイムス洋尚、小川郁、岡野栄之、神崎晶

【2010】

【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

【2008年】

【海外】

(1)

発明の名称 分化細胞由来誘導多能性幹細胞

由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その選択方法によって選択されたクローン、及びそのクローンの使用方法

出願番号(出願日) 米国 61/086,369 (2008.8.5)

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、中村雅也、辻収彦、山中伸弥、三浦恭子

(2)

発明の名称 神経分化促進剤

出願番号(出願日) 米国 61/088,521 (2008.8.13)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、島崎琢也、仲勇人

(3)

発明の名称 神経幹細胞製造方法

出願番号(出願日) 米国 61/198,365 (2008.11.5)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、赤松和土

(4)

発明の名称 神経損傷治療剤及び神経損傷治療方法

出願番号(出願日) 米国 61/206,711 (2009.2.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田洋平、中村雅也、海苔聡、高橋勇一朗

(5)

発明の名称 神経損傷治療方法

出願番号(出願日) 米国 12/164,827 (2008.6.30)

基礎出願 米国 61/065,973 (2008.2.18) 米国 61/034,661 (2008.3.7)

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、中村雅也、辻収彦、山中伸弥、三浦恭子

(6)

発明の名称 神経損傷治療方法

出願番号(出願日) PCT/JP2008/061845 (2008.6.30)

基礎出願 特願 2008-058447 (2008.3.7)

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、中村雅也、辻収彦、山中伸弥、三浦恭子

(7)

発明の名称 ヒト間葉系幹細胞濃縮方法  
出願番号(出願日) PCT/JP2008/066169(2008.9.8)  
基礎出願 特願 2007-231298 (2007.9.6)  
出願人名 学校法人慶應義塾  
発明者 岡野栄之、松崎有未、馬渕洋、森川暁

(8)

発明の名称 霊長類動物の初期胚への外来遺伝子導入法及び該導入法を含むトランスジェニック霊長類動物を作出する方法(特願の時と名称変更)

出願番号(出願日) PCT/JP2008/072732  
(2008.12.9)

基礎出願 特願 2008-017955 (2008.1.29)

出願人名 学校法人慶應義塾 財団法人動物実験中央研究所

発明者 岡野栄之、佐々木えりか

#### 【2009年】

##### 【国内】

(1)

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) 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

(2)

発明の名称 分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法

出願番号(出願日) 特願 2009-181009 (2009.8.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、松崎有未、新部邦透、森川暁、馬渕洋、永井康夫

##### 【海外】

(1)

発明の名称 人工多能性幹細胞の選択方法

出願番号(出願日) 米国 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、山中伸弥、三浦恭子

(2)

発明の名称 分化細胞由来誘導多能性幹細胞

由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その選択方法によって選択されたクローン、及びそのクローンの使用方法

出願番号(出願日) PCT/JP2009/003755 (2009.8.5)

基礎出願 米国 61/086,369 (2008.8.5)

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、中村雅也、辻収彦、山中伸弥、三浦恭子

(3)

発明の名称 神経分化促進剤

出願番号(出願日) PCT/JP2009/003195 (2009.7.8)

基礎出願 米国 61/088,521 (2008.8.13)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、島崎琢也、仲勇人

(4)

発明の名称 神経幹細胞製造方法

出願番号(出願日) PCT/JP2009/005856  
(2009.11.4)

基礎出願 米国 61/198,365 (2008.11.5)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、赤松和土

(5)

発明の名称 ヒト分化細胞由来多能性幹細胞由来の胚様態及び神経幹細胞培養方法(名称変更)

出願番号(出願日) PCT/JP2010/000640 (2010.2.3)

基礎出願 米国 61/206,711 (2009.2.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田洋平、中村雅也

(6)

発明の名称 分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法

出願番号(出願日) PCT/JP2010/051435 (2010.2.2)

基礎出願 特願 2009-181009 (2009.8.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、松崎有未、新部邦透、森川暁、馬渕洋、永井康夫

#### 【2010】

##### 【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 (2010/04/26)

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

## 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

研究分担者：郭 伸、東京大学大学院 医学系研究科 神経内科学 准教授

研究協力者：山下雄也<sup>1)</sup>、日出山拓人<sup>1)</sup>、寺本さやか<sup>1)</sup>、八賀康祐<sup>1)</sup>、木村 大輔<sup>1)、2)</sup>、鈴木 岳之<sup>2)</sup>、  
辻 省次<sup>1)</sup>、Miyoko Higuchi<sup>3)</sup>、Peter H. Seeburg<sup>3)</sup>、高橋 良輔<sup>4)</sup>、三澤 日出巳<sup>5)</sup>  
<sup>1)</sup> 東大神経内科、<sup>2)</sup> 慶大基礎生物、<sup>3)</sup> Max-Planck Institut、<sup>4)</sup> 京大神経内科、<sup>5)</sup> 慶大薬理

**研究要旨：**孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位における RNA 編集が低下している。この分子病態と孤発性 ALS の病因との関連を検討するために、この部位の RNA 編集を触媒する adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) のコンディショナルノックアウトマウス (AR2) を作成し、分子病態を解析し、孤発性 ALS の病因との関連を解析した。AR2 マウスが緩徐な運動ニューロン死を引き起こすこと、それが GluR2 Q/R 部位の RNA 編集不全に依ることを明らかにしたほか、外眼筋ニューロンが変性を免れるなど ALS に見られる特徴を備えたモデルマウスであることを明らかにした。さらに、孤発性 ALS 運動ニューロンに見られるもう一つの疾患特異的分子変化である TDP-43 局在異常との関連を培養細胞および AR2 マウスを用いて検討した。TDP-43 の局在異常が ADAR2 活性低下の下流である可能性を示す結果を得た。

### A. 研究目的

グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体のサブユニット GluR2 Q/R 部位における RNA 編集は、動物の生存にとり必須であるが<sup>1)</sup>、孤発性 ALS 運動ニューロンではこの部位の RNA 編集が不十分で、未編集型 GluR2 が発現している<sup>2,3)</sup>。この分子異常が孤発性 ALS の発症に関連する分子メカニズムを、モデルマウスを用いて解析する。

他方、孤発性 ALS の運動ニューロンには TDP-43 陽性の細胞質封入体が形成され、同時に核内 TDP-43 免疫活性が消失することも疾患特異性が高い<sup>4,5)</sup>。GluR2 の RNA 編集異常、TDP-43 の局在異常は、疾患特異性が高く、神経細胞死に深く関連する分子変化であること、

両者が孤発性 ALS 患者の同一の運動ニューロンに生ずること<sup>6)</sup>、から孤発性 ALS の病因と深く関連すると考えられ、両者には分子的な関連があると予想される。GluR2 の RNA 編集異常が TDP-43 の局在異常を引き起こしている可能性、および逆の可能性を検討することにより、ALS の病因解明を進めることを第二の目的とする。

### B. 研究方法

1) モデルマウス：コリン作動性ニューロンに Cre 依存性に ADAR2 を knock out するコンディショナルノックアウトマウス (AR2) 12 ヶ月齢と同月齢対照マウスとで脳神経核・脊髄の運動ニューロン数、脊髄前根の軸索数を算定した。また、脳神経諸核を切り出し、GluR2 Q/R 部位

の RNA 編集率を測定した。

2) AR2/GluR-B<sup>R/R</sup> マウス: ADAR2 活性なしに編集型 GluR2 を発現するように GluR2 遺伝子を改変した (GluR2 遺伝子の CAG を CGG に改変した遺伝子を発現する) GluR-B<sup>R/R</sup> マウス<sup>7</sup> と AR2 マウスとを掛け合わせた、AR2/ GluR-B<sup>R/R</sup> (AR2res) マウスを作成し、行動変化、運動ニューロン死変化を検討した。

3) 野生型 TDP-43、TDP-43 siRNA、家族性 ALS 関連変異 TDP-43、TDP-43 断片を培養細胞に遺伝子導入し、培養 72 時間後に、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を測定した。RNA 編集率に変化のあったものは、その機序を調べる目的で ADAR2 mRNA と GluR2 pre-mRNA の発現比を定量 PCR により算定した。

4) 様々な週齢の AR2 マウス、ヘテロ接合体 AR2 マウス、野生型マウス脊髄につき、TDP-43、ADAR2 の局在変化を免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

研究の方法について、研究倫理委員会、動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

1) AR2 マウスの脳神経核では、III、IV、VI の神経細胞数に減少はなく、VII、XII の大径運動ニューロンに脊髄運動ニューロン同様に減少が認められた。一方、GluR2 Q/R 部位の編集率は何れの神経核でも低下を認めた。

2) AR2res マウスの表現型は解析した 6 カ月齢まで対照群と有意差が無く、脊髄運動ニューロン総数にも有意差を認めなかった。一方、AR2 マウスではごく少数の ADAR2 陰性運動ニューロンを認めたのに対し、AR2res マウスでは 30% 前後が ADAR2 陰性だった。すなわち、編集型

GluR2 が発現すれば、ADAR2 活性が全く零であっても運動ニューロン死が起こらないことを意味する。

3) TDP-43 siRNA、野生型、変異型 TDP-43、TDP-43 の様々な断片を遺伝子導入しても、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率には優位な変化は見られなかった。

4) 野生型マウスでは全ての大径前角細胞の核が TDP-43 陽性であったが、ホモ接合体 AR2 マウス、ヘテロ接合体 AR2 マウスでは脊髄前角領域において、核の TDP-43 免疫陰性の運動ニューロンが観察された。ADAR2 との二重染色では全ての TDP-43 陽性細胞は核が ADAR2 陽性であったが、AR2 マウスの TDP-43 陰性細胞の核は ADAR2 にも陰性であった。その一部に、細胞質に TDP-43 免疫活性を有するものが観察された。

## D. 考察

AR2 マウスの解析により、ADAR2 活性の低下は運動ニューロン死の直接原因であることが明らかになり<sup>6</sup>、孤発性 ALS 運動ニューロンに見られる未編集型 GluR2 の発現は運動ニューロン死に関連する分子変化であることが明らかになった。また、AR2res マウスの解析から、ADAR2 の活性低下による神経細胞死は数ある ADAR2 基質の中でも GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が行われないことに依っていることが明らかになった<sup>6</sup>。

運動ニューロンの間でも、ADAR2 活性低下への脆弱性に違いがあることが明らかになり、脊髄運動ニューロン、顔面神経核運動ニューロン、舌下神経核運動ニューロンに比し、外眼筋神経諸核運動ニューロンは ADAR2 活性低下に抵抗性であることが明らかになった。この病変の選択性は ALS に見られるものに相同であり、孤発性 ALS には AMPA 受容体を介する神経細

胞死が病因として働いている更なる証拠を示していると考えられる。

ADAR2 活性低下と TDP-43 蛋白のプロセッシング異常とは、孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に生じている現象であり、疾患特異性が高い分子変化である。両者は同一の運動ニューロンに共在し、何れかを正常に発現する運動ニューロンにはもう一方の分子異常は生じていないことが患者脊髄の解析から明らかになり、両者には強い分子連関がある<sup>8</sup>。本報告の結果から、ADAR2 活性低下は TDP-43 局在異常を引き起こすことがわかった。

マウスにおける TDP-43 の局在異常は、ヒト野生型 TDP-43 ないし変異型 TDP-43 のトランスジェニック動物により報告されているが、遺伝子発現変化、遺伝子変異を伴わない場合でもストレス（脳虚血、軸索損傷、外傷など）下で生じることが報告されている。ただし、その場合には、一過性の変化であり可逆的で、必ずしも神経細胞死を伴わない<sup>9-12</sup>。AR2 マウスの結果は、細胞死に陥る ADAR2 陰性ニューロンのみに TDP-43 の局在異常が観察されることを示しており、TDP-43 の局在異常が運動ニューロン死と関連する病理変化である可能性を示している。しかし、一方では TDP-43 の局在異常が存在しても、運動ニューロンは長期間（1 年前後）生存できることも示しており、TDP-43 の局在異常のみでは細胞死に陥らない可能性をも示唆している。ただ、AR2 マウスで観察された TDP-43 の局在異常は、核からの喪失と一過性の細胞質局在であり、ALS 患者脊髄に観察される封入体は形成されていないことが、マウスにおける特殊性を意味しているかもしれない。

## E. 結論

孤発性 ALS 運動ニューロンにおける未編集

型 GluR2 の発現は ADAR2 活性低下によりもたらされ、運動ニューロン死の直接原因となることが明らかになった。また、孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に観察されるもう一つの分子異常である TDP-43 局在異常が ADAR2 活性低下により引き起こされることが明らかになった。

F.健康危険情報：なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishimoto Y, Yamashita T (contributed equally with YN), et al: Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions, *Neurosci Res* 61:201-206, 2008.
2. Kwak S, et al: Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research. *RNA Biology* 5:193-197, 2008.
3. Sawada J, Yamashita T (contributed equally with JS), et al: Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line. *Neurosci Res* 64:251-258, 2009.
4. Aizawa H, et al. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol.*120(1): 75-84, 2010.
5. 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.
6. Kwak S, et al: AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30(2): 182-8, 2010.

他 16 編

### 2. 学会発表

1. 郭 伸：「TDP43 異常と運動ニューロン死を結ぶ分子異常」シンポジウム S3 前頭側頭葉変性症 (FTLD) と ALS における TDP-43

をめぐる最近の話題。第 27 回日本認知症学会、前橋、October 10-11, 2008.

2. Yamashita T, et al: Regulatory mechanism of GluR2 Q/R site-editing in cultured cell lines, **38th Annual Meeting Society for Neuroscience**, Washington, 15-19 November 2008.
3. Hideyama T, et al: Slow neuronal death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by RNA editing enzyme ADAR2 knockout. **38th Annual Meeting Society for Neuroscience**, Washington, 15-19 November 2008.
4. 郭 伸:「興奮性神経細胞死から見た ALS」ALS シンポジウム。第 50 回日本神経病理学会、高松、June 4-6, 2009.
5. 郭 伸ら: 発症機構から導き出された神経疾患の薬物治療への新たな可能性。シンポジウム「生体機能と創薬シンポジウム」。日本薬学会、東京、August 26-27, 2009.
6. 郭 伸: Excitotoxicity, old but new vistas to ALS therapy」シンポジウム Molecular targeted therapy for neurodegenerative disease – new progress」.第 32 回日本神経科学大会、名古屋, September 13-18, 2009.
7. Hideyama T, et al: Role of RNA editing of GluR2 mRNA in mouse model of sporadic ALS. **The 20<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS**, Berlin, 8-10 Dec, 2009.
8. 郭 伸: Inefficient A-to-I RNA editing and ALS/ALS における RNA editing 異常の病因的意義。シンポジウム「Neurodegenerative diseases and RNA/神経疾患と RNA」第 51 回日本神経学会総会 東京 May 22, 2010.
9. Hideyama T, et al: Absence of GluR2 RNA editing induces slow death of motor neurons in conditional ADAR2 knockout mice. **40th Annual Meeting Society for Neuroscience**, San Diego, 13-17

November 2010.

10. Aizawa H, et al: Close association of TDP-43 pathology with loss of RNA editing enzyme ADAR2 in motor neurons in sporadic ALS. **The 21<sup>st</sup> International Symposium on MND/ALS**, Orland, 11-13 Dec, 2010.

他 30 編

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む): なし

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

I.引用文献

1. Higuchi, M., et al. *Nature* **406**, 78-81 (2000).
2. Kawahara, Y., et al. *Nature* **427**, 801 (2004).
3. Kwak, S. & Kawahara, Y. *J Mol Med* **83**, 110-120 (2005).
4. Arai, T., et al. *Biochem Biophys Res Com* **351**, 602-611 (2006).
5. Neumann, M., et al. *Science* **314**, 130-133 (2006).
6. Hideyama, T., et al. *J Neurosci* **30**, 11917-11925 (2010).
7. Kask, K., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13777-13782 (1998).
8. Aizawa, H., et al. *Acta Neuropathol.* **120**, 75-84 (2010).
9. Moisse, K., et al. *Brain Res.* **1249**, 202-211 (2009).
10. Sato, T., et al. *Neuroscience* **164**, 1595-1578 (2009).
11. Kanazawa, M., et al. *J. Neurochem.*, in press (2010)
12. Lee, E.B., et al. *Acta Neuropathol.* **115**, 305-311 (2008).

## 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

### 研究分担者

高橋 良輔 京都大学医学部神経内科・教授

### 研究協力者

村上 学 京都大学医学部神経内科・大学院生

井上 治久 iPS 細胞研究センター・准教授

月田 香代子 iPS 細胞研究センター・教務補佐員

中辻 憲夫 京都大学物質一細胞統合システム拠点・センター長

下川 浩輝 京都大学物質一細胞統合システム拠点・助教

上杉 志成 京都大学物質一細胞統合システム拠点・教授

饗庭 一博 幹細胞創薬研究所・主任研究員

天貝 裕地 幹細胞創薬研究所・所長

浅井 康行 リプロセル 取締役

**研究要旨** 家族性 ALS の原因遺伝子の 1 つである変異 SOD1 の転写活性を抑制する低分子化合物（もしくは既存薬）を同定するためのハイスループットスクリーニングシステムを開発した。SOD1 の発現量を濃度依存的及び特異的に減少させる化合物を同定し Nrf2 のリン酸化を抑制することを見出した。また構造解析より SOD1 の発現を低下させる既存薬を細胞実験及び ALS モデルマウスで同定した。

### A. 研究目的

これまでの研究から、以下のことが明らかである。1. 変異 SOD1 G93A high copy マウスは low copy マウスよりも ALS 症状が重篤である (Dal Canto et al. *Brain Res.*676: 25-40, 1995)、2. 変異 SOD1 ラットでは高発現ラインのみ発症する (Nagai et al. *J.Neurosci.* 21: 9256-9254, 2001)、3. RNA 干渉による治療により変異 SOD1 マウスで症状改善を認める (Saito et al. *J. Biol. Chem.* 280: 42826-42830, 2005)、4. 脊髄運動ニューロンあるいはミクログリアの変異 SOD1 発現量が、変異 SOD1 マウスの発症時期と症状進行を規定している (Boillée et al. *Science* 312: 1389-1392, 2006)。以上から、変異 SOD1 の発現量を抑制することが、変異

SOD1 による ALS に対して治療効果を有する可能性が示唆される。そこで、SOD1 の転写をモニタリングできるアッセイ系を樹立することを試みた。最終的に、変異 SOD1 の転写を抑制する低分子化合物（もしくは既存薬）による治療薬開発を目的とする。

### B. 研究方法

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する。ヒトグリア細胞細胞株にそのベクターを導入し、恒常的に分泌型ルシフェラーゼを発現するクローンを樹立する。上清のルシフェラーゼを測定し、変異 SOD1 転写活性を抑える低分子化合物もしくは既存

薬を同定する。すでに細胞死を誘発することにより SOD1 の転写を抑制することが知られているマイトマイシン C を陽性対照として用いる。また、低分子化合物（もしくは既存薬）の濃度依存性に SOD1 の転写が抑制されるかを検討する。

### C. 研究結果

変異 SOD1 ゲノムを用い内在性 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た。ヒトアストロサイト由来細胞株に導入し恒常的に発現するクローンを樹立した。ベクター導入をサザンブロットニングで確認し、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイの反応性によりクローンを選別した。低分子化合物ライブラリで、選別したクローンをを用いたハイスループットスクリーニング (HTS) を行った。パイロットスタディでは、Z'-factor は、0.5~1.0 であった。

9,600 種類の低分子化合物のうち、濃度依存性に SOD1 の発現量を減少させる 177 種類の化合物といくつかの既存薬を一次スクリーニングで同定した。同定した既存薬の中には、変異 SOD1 マウスを用いた治療実験で治療効果を示されているものも含まれていた。WST-1 アッセイでその効果が細胞毒性によるものであることを除外し、内因性 SOD1 蛋白の実際の発現低下を ELISA で確認した。その中で最も効果の高いヒット化合物を見出し、ウェスタン・ブロットニングで SOD1 蛋白が実際に減少していることを確認した。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を見出した。さらに他のヒット化合物の構造解析から既存薬 X を同定した。既存薬 X でもレポーターシステム、ELISA、ウェスタンブロットニングで SOD1 蛋白発現を抑制することを確認した。既存薬 X

を ALS モデルマウスである変異 SOD1G93A トランスジェニックマウスに 4 週間経口投与し、その脊髄内 SOD1 mRNA レベルの低下を確認し、*in vivo* でも効果を有することを見出した。

### D. 考察 および E. 結論

FALS 標的分子である SOD1 の発現モニタリングシステムとそれを用いたアッセイ系を確立し、SOD1 転写を抑制する低分子化合物及び既存薬 X を同定した。さらに既存薬 X は ALS モデルマウス投与実験から *in vivo* でも効果を有することを見出した。ヒット化合物が SOD1 の転写を抑制するメカニズムをさらに検討するとともに、今後このシステムが、FALS 治療薬開発に寄与するかどうか、変異 SOD1 マウス等を用いた治療実験と共に、幹細胞由来モデルでの実験をあわせて検証していく。

### F. 健康危険情報：なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. (2008 Feb 3) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 11, 251-253

Moriwaki Y, Kim YJ, Ido Y, Misawa H, Kawashima K, Endo S, Takahashi R. (2008) L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner. *Neurosci. Res.* 61, 43-8

Ogawa M, Mizuguchi K, Ishiguro A, Koyabu Y, Imai Y, Takahashi R, Mikoshina K, Aruga J. (2008) Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *Gene Cells*, 13, 397-409

Imai Y, Gehrke S, Wang HQ, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, Lu B. (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons

in *Drosophila*. *EMBO J.* 27, 2432-43.

Wang HQ, Imai Y, Inoue H, Kataoka A, Iita S, Nukina N, Takahashi R. (2008) Pael-R transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss. *J. Neurochem.* 107, 171-85.

Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R., Chiba T. (2008) Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 27, 6002-11.

Kawamoto Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Inoue H, Tomimoto H, Akiguchi I, Budka H, Martins LM, Downward J, Takahashi R. (2008) Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies. *J. Neuropathol Exp Neurol.*, 67, 984-93.

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.

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.

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.

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

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

Inoue, H., Kondo, T., Lin, L., Mi S., Isacson O., Takahashi, R. (2009) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Diseases, **In Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases**, ed. Ovadi, J.

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

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R., Shimohama S, Sawada H. (2010) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 391, 129-34

Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R., Misawa H, Kwak S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci.* 30:11917-25.

Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. (2011) Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat ALS. *J Biomol Screen* in press

## 2. 学会発表

高橋良輔 : はじめに一神経変性疾患研究の課題、第 49 回日本神経学会総会シンポジウム「神経変性疾患研究の焦点-新たな病的因子の登場と臨床への展望」、2008. 5. 16、横浜

Takahashi R : The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism, BMB2008、シンポジウム「神経変性疾患関連



遺伝子探索と機能解析」、2008.12.11、神戸

Murakami G, Inoue H, Takahashi R,  
Development of a high-throughput screening  
assay for drug discovery in SOD1- mediated  
ALS・The 32nd Annual Meeting of the Japan  
Neuroscience Society, Nagoya, Japan (2009. 9.  
17.)

村上 学、井上治久、高橋良輔、転写を標的と  
した家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法  
の開発、The 51st Annual Meeting of the Japan  
Society of Neurology, Tokyo, Japan (2010 5.  
22.)

村上 学、井上治久、高橋良輔・転写を標的と  
した家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法  
の開発・The 28th Annual Meeting of the  
Japanese Society of Neurological  
Therapeutics, Yokohama, Japan (2010. 07.  
16.)

田代善崇、井上治久、山崎真弥、阿部学、伊東  
秀文、三澤日出巳、崎村建司、高橋良輔、神経  
変性疾患モデル作製のための26Sプロテアソ  
ームコンディショナルノックアウトマウスの  
確立と解析、第33回日本神経科学大会、神戸  
(2010.9.3)

Murakami G, Inoue H, Takahashi R, A  
high-throughput screening assay for drug  
discovery in SOD1- mediated ALS targeting  
the transcription of SOD1, The 33rd Annual  
Meeting of the Japan Neuroscience Society,  
Kobe, Japan (2010. 9. 3.)

Murakami G, Inoue H, Takahashi R, A  
high-throughput screening assay for drug  
discovery in SOD1- mediated ALS targeting  
the transcription of SOD1, The 40th Annual  
Meeting of Society for Neuroscience, San  
Diego, U.S.A., (2010. 11. 17.)

Tashiro Y, Inoue H, Yamazaki M, Abe M, Ito  
H, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R, The  
establishment and analysis of 26S  
proteasome conditional knockout mice for the  
mechanisms of neurodegenerative diseases.  
BMB2010, Kobe, Japan (2010.12.8)

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

## 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

研究分担者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・所長代行

**研究要旨** オートファジー（自食作用：self-eating）は、ダイナミックな膜形成によって細胞質成分を隔離した小胞（オートファゴソーム）がリソソーム（多数の消化酵素を含むオルガネラ）と融合することによって取り込んだ内容物を分解する真核生物に保存された主要なタンパク質分解システムである。われわれは条件的にオートファジーが不能となる遺伝子改変マウス（cKO: *Atg7<sup>Flox/Flox</sup>*）を作出することに世界で初めて成功した。そしてこの変異マウスと *Nestin-Cre* トランスジェニック（Tg）マウスを交配し、中枢神経系特異的にオートファジーを欠損させた *Atg7<sup>Flox/Flox</sup>:Nes* マウスを作製した結果、このニューロン特異的オートファジー不能マウスは反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患様症状を示した。この成果が出発点となってオートファジーと神経変性の関連性について解析に取り組んできた。その後、神経細胞の健康維持に必須な役割を果たしているミトコンドリアの品質管理を制御する研究に焦点を当てた研究に邁進している。そして近年、若年性にドーパミンニューロンを（そしておそらく他のニューロンにおいても）変性させる常染色体劣性の原因遺伝子として同定されていた *PINK1* と *Parkin* が不良（膜電位が低下して ATP 合成能が低下した）ミトコンドリアを選択的にユビキチン化する機構を解明し、その結果、損傷ミトコンドリアがオートファジーで浄化（分解）されるというスキームを確立した。健全なミトコンドリアは、非分裂細胞であるニューロンの健康維持に必須であり、その破綻は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を含む様々な神経変性疾患の発症と密接に関係していることが報告されているので、*PINK1*・*Parkin* 系によるミトコンドリアの品質管理機構の研究は、新規な神経変性疾患の予防・治療薬の開発に繋がることが期待される。

### A. 研究目的

われわれは、過去四半世紀以上に亘って、細胞内の主要なタンパク質分解システムであるユビキチン・プロテアソームシステムの構造と機能について包括的な研究を進め、当該分野の世界の研究を先導してきた。またその生理および病態に関する研究では、タンパク質の品質管理に関与するユビキチンリガーゼ（連結酵素）として *Parkin*（常染色体劣性若年性パーキンソン症候群の責任遺伝子産物）、*CHIP*（分子シャペロン依存性リガーゼ）、*Dorfin*（ALS 患者に見られる変異 *SOD* を標的とするリガーゼ）、*SCF<sup>Fbs</sup>*（糖鎖を識別し *ERAD* に関与するリガ

ーゼ）等の研究を進めてきた。

さらにわれわれは細胞内の不良品を選択的に破壊処理するもう一つの大規模なタンパク質分解システムとしてオートファジー（自食作用）・リソソーム系システム（主な機能は栄養飢餓に応答して栄養素確保のために自己成分を消化することであり、究極の生存戦略と見なされている）にも注目してきた。その大きな理由は、神経変性疾患の患者の脳においてオートファゴソーム（膜小胞）の異常形態を示す病理組織学的知見が多数報告されているからであった。

2006 年、我々は発生工学的手法を用いて条件

的にオートファジーが不能にすることができる cKO ( conditional knockout ) マウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>) を作出し、この Atg7<sup>Flox/Flox</sup> マウスを Nestin-Cre (ニューロン幹細胞で発現している Nestin のプロモーターに Cre-recombinase を連結・導入した) トランスジェニックマウス (Tg) と交配し、中枢神経系の細胞でオートファジーが不能となるマウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>:Nes) を世界で最初に作出した。この変異マウスを用いて中枢神経系におけるオートファジーの役割についてタンパク質の品質管理に注目して解析した結果、飢餓に応答する誘導的なオートファジーとは異なった日々低いレベルで恒常的に起こっているオートファジーの破綻が神経変性疾患を引き起こすことを見出した。

これまでは神経細胞死 (神経変性疾患) を誘発するためには、アミロイド様の異常凝集する変異タンパク質 (アルツハイマー病におけるタウタンパク質、パーキンソン病における  $\alpha$  シヌクレイン、ALS における変異 SOD, TDP-43 など) が存在して、それらが毒性効果を発揮すると考えられていたので、異常な原因物質が無くともオートファジー依存的なタンパク質分解系活性の減弱喪失によって神経変性が誘発されることは、予想外の発見であり世界を驚かせた。しかもさらに驚いたことにオートファジー不能ニューロンにはユビキチン陽性タンパク質凝集体 (封入体) が観察された。これまでユビキチンで分解シグナルを付与されたタンパク質はプロテアソームで選択的に分解されると考えられていたので、この概念に大きな変更を迫る発見であった。

さて Parkin は我が国で発見された神経変性性患の責任遺伝子であり、2000 年、われわれは世界に先駆けてその分子機能がユビキチンリガーゼ (標的タンパク質に文秋シグナルであるユビキチンを連結する酵素) であることを報告した。しかし Parkin の研究は、その後 10 年

間に多くの論文が発表されたが、神経変性の病態を説明することは、困難を極めた。ところが 2008 年、NIH の Yoole のグループは、細胞質に局在する Parkin が膜電位の低下した障害ミトコンドリアに移行、これが引き金になってオートファジーが選択的に除去されることを発見し、世界を震撼させた。われわれは、直ちにこの観察を追試・確認すると共にその上流で作用する PINK1 の機能解析に成功した。その結果、PINK1 は通常、健康なミトコンドリアでは急速にターンオーバー (激しく分解) しており、検出できないが、膜電位が低下したミトコンドリアでは、分解抑制が誘導され大量に蓄積する。すると、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“リクルート因子”として作用することを見出した。これらの結果から、PINK1-Parkin 経路がミトコンドリアの障害状態を感知して、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 (浄化) していることが判明した。おそらくこれが PINK1 と Parkin の真の機能であり、この PINK1・Parkin 系によるミトコンドリアの品質管理は非分裂細胞であるニューロンの健康維持に必須であるという仮説が、現在、世界を席卷している。

本報告書は、神経変性の病態発症に関するオートファジーの役割について解析した 2008 ~2010 年の 3 年間における研究成果を総括する。

## B. 研究方法

「条件付きオートファジー不能マウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>) の作製」

ターゲティングベクターの作製と ES 細胞のスクリーニングは、既知の方法に準じて行った。ノックアウト ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に移植、得られたヘテロウマスがジャームラインに入

っていることを PCR およびサザンブローディングにより確認した。最終的にヘテロウマスを交配して条件的 Atg7 (モディファイヤー分子である Atg8 及び Atg12 の共通の活性化酵素 E1) 欠損ホモマウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>) を作製した。

「中枢神経系特異的オートファジー不能マウス (Atg7<sup>Flox/Flox;Nes</sup>) の作製」

Atg7<sup>Flox/Flox</sup> マウスと Nestin-Cre トランスジェニックマウス (ニューロンで特異的に発現している Nestin のプロモーターに Cre リコンビナーゼを連結して作製した Tg マウス) を交配し、中枢神経(CNS:central nervous system)でオートファジーが不能となるマウス (Atg7<sup>Flox/Flox;Nes</sup>) を作製した。

「p62 のノックアウトマウスの作製」

p62/Sqstm1 ノックアウトマウス (p62-/-マウス) は、筑波大学大学院人間総合科学研究科の石井哲郎博士から供与された。

「Atg7・p62 のダブルノックアウトマウス」

上記の中枢神経系オートファジー不能マウス (Atg7<sup>Flox/Flox;Nes</sup> マウス) と p62-/-マウスを交配して作製した。

「組織化学的及び免疫組織化学染色解析」

Atg7<sup>Flox/Flox;Nes</sup> と 野性型マウスの脳を 4% paraformaldehyde-4% sucrose を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに標準光学顕微鏡による組織化学的解析には、2% paraformaldehyde-2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液、免疫組織化学染色解析には 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で固定した。

光学顕微鏡解析は、脳の 10-mm cryosections (凍結切片) を Meyer's hematoxylin and

eosin(H&E) で染色した。

「電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡」

マウス脳を 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに 1% OsO<sub>4</sub> で固定し、Epon812 で包埋した後、超薄層切片を作製した。anti-ubiquitin (1B3) と colloidal gold conjugated secondary antibody による免疫金染色は、定法に従って行った。

「抗体」

Antibodies used in this study are as follows: anti-Actin (AC-40, Sigma), anti-Cytochrome-c (6H2.B4, BD), anti-Flag (M2, Sigma), anti-GFP (3E6, Wako chemical; A6455, Invitrogen), anti-HA (12CA5, Roche), anti-Hsp70 (SR-B810, MBL), anti-Lactate Dehydrogenase (LDH) (ab2101, Abcam), anti-Parkin (#2132, Cell Signaling for immunocytochemistry; PRK8, Sigma for immunoblotting), anti-PINK1 (BC100-494, Novus), anti-Tom20 (FL-145 and F-10, Santa Cruz Biotech), anti-Ubiquitin (P4D1, Santa Cruz; FK2, MBL) and anti-V5 (Invitrogen), anti-p62 (raised in rabbits).

「培養細胞への遺伝子導入」

For transformation of MEFs, pMXs-puro plasmids harboring genes of interest were packaged into individual retroviruses using PLAT-E cells and transfected as described previously.

「遺伝子欠損MEFs」

MEFs (mouse embryonic fibroblasts): Parkin- 欠損 MEFs, PINK1- 欠損 MEFs, p62-欠損MEFs.