

201122016A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

筋萎縮性側索硬化症患者由来疾患モデル細胞を用いた

病態解明と治療法開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 良輔

研究分担者 井上 治久

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

筋萎縮性側索硬化症患者由来疾患モデル細胞を用いた

病態解明と治療法開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 良輔

研究分担者 井上 治久

平成 24 (2012) 年 3 月

目次

I 総括・分担研究報告

1. 筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞を用いた病態解明と治療法開発に関する研究
高橋 良輔 1

 2. 分担課題：筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞のアストロサイトへの分化誘導とその治療的応用
井上 治久 7
-
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 12
-
- III. 研究成果の刊行物・別刷り 16

筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞を用いた病態解明と治療法開発に関する研究

研究代表者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授

研究要旨:筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)のうち約10%を占める家族性ALSの主要な原因遺伝子であるsuperoxide dismutase 1 (SOD1)は、変異SOD1蛋白が毒性を獲得することにより運動ニューロン変性を来す。我々は、SOD1 転写活性を抑制する低分子化合物を同定するためのハイスループット・アッセイ系を確立した。このスクリーニング・システムを用いたさらなる解析により、既存薬 X を同定した。さらに、既存薬 X を変異 SOD1G93A トランスジェニックマウスに経口投与したところ、マウスの脊髄内 SOD1 発現量を減少させ、その運動ニューロン疾患症状の進行を遅延し、生存日数を延長した。本研究から、我々のスクリーニング・システムが SOD1 関連遺伝性 ALS の治療薬開発に強力な手段となりうる考えられる。また、病原蛋白の発現を、直接抑制するという治療戦略は変異蛋白の蓄積によって生ずる他の神経変性疾患にも適用可能であると考えられる。

本研究では、神経変性疾患の有力な病因仮説の一つ、タンパク質分解障害仮説に立脚して孤発性ALSモデルマウスの作出に成功している。今後、既存薬 X の効果を孤発性ALSモデルマウスでの解析を行う。

研究分担者:井上治久
京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性する致死的な神経変性疾患である。ALSでは、進行性の筋力低下、麻痺を生じ、発症より5年以内に呼吸不全に至る。全ALSの約10%を占める家族性ALSの内、約25%はsuperoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子変異によるものである。

変異SOD1蛋白は、獲得した神経毒性が増強することにより、ALSを発症すると考えられる。変異SOD1蛋白の発現レベルが、運動ニューロン疾患の進行や重篤度を規定することが種々の先行研究で示唆されている。従って、SOD1蛋白の発現を抑制することはSOD1関連家族性ALSに治療効果を有すると考えられる。そこで我々は最近、SOD1の転写活性を抑制する化合物を同定するためのハイスループット・スクリーニング(HTS)系を確立したことを報告した。また、成人の体細胞をリプログラミングしinduced pluripotent stem cells (iPS細胞)に誘導できることが報告された。iPS細胞作製の技術を用いることにより、ある疾患に罹患する患者から細胞モデルを構築することも可能であるのみならず、ヒトに対する薬剤の安全性、副作用のチェックも可能となる。そこで我々は、SOD1変異を有するALS患者からiPS細胞を樹立し、アストロサイトに分化させた。我々のスクリーニング・アッセイから得られたヒット薬剤が、iPS細胞由来アストロサイトでもSOD1転写抑制作用を示し、かつ明らかな細胞毒性の有無についても検討した(研究分担者井上)。

本研究で我々は、FDA承認薬剤である既存薬XがSOD1の転写を抑制することを見出し、主要なALSモデルの一つである、変異SOD1トランスジェニックマウスに投与することで、治療効果を有することを見出した。既存の分子標的薬を用いたことによって、治験までの過程を大幅に短縮できる可能性がある。

さらに我々は本研究で、神経変性疾患の有力な病因仮説の一つ、タンパク質分解の障害仮説に立脚し、治療薬の検証を行い得る孤発性ALSのマウスモデルの確立を目指し、運動ニューロン特異的プロテアソームノックアウトマウスの作製をおこなった。

B. 研究方法

(a) 濃度依存性試験及び細胞毒性試験

昨年度までに作製した gPrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を用いて、ヒット化合物が SOD1 の発現を濃度依存的に抑制していることを確認した。一次スクリーニングと同様、細胞は overnight で前培養し、化合物添加培地に交換し 0-80 μ M に濃度を振った。さらに 16 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。HTS アッセイで適用した濃度である 40 μ M で-3SD 以上の SOD1 発現抑制作用を有するもののみさらなる解析に回した。

毒性アッセイにより、細胞毒性によってルシフェラーゼ活性を非特異的に減弱させる化合物を同定した。非トランスフェクト H4 細胞を使用し、tetrazolium 塩、WST-1 (Roche)を用いてアッセイを行った。このアッセイにおいて、ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼにより WST-1 が切断され formazan に変化すると、赤から黄色に色調変化が起きる。一次スクリーニング・アッセイと同様、非トランスフェクト H4 細胞を overnight で 96 ウェルプレートに前

培養し、化合物添加培地に交換し、0-40 μ M に濃度を振る。さらに 16 時間培養し、WST-1 を 10 μ L well-1 加え、1 時間 37°C で培養した。450nm の吸光度を測定し、化合物非添加群と比較した。40 μ M で処理した際、蛍光が非治療細胞に比べ 2SD 以上減弱した場合、その化合物は有意な細胞毒性があると判断した。

(b) ELISA アッセイ

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) とウェスタン・ブロッティングによって、レポーター細胞株でみられた効果が内因性 SOD1 蛋白レベルにおいても再現されるか否かを判定した。一次アッセイ同様、非トランスフェクト H4 細胞を overnight で前培養し、ヒット化合物を添加した培地に交換し、最終濃度を 0-40 μ M に振った。さらに 48 時間培養し、各ウェルを 200 μ L の PBS で一度洗浄し、プロテアーゼ阻害剤(Roche)を加えた 1% Triton-X 液 100 μ L で細胞溶解した。

SOD1 蛋白レベルの変化を定量化し、EC50 値を計算するため、抗体を用いたサンドイッチ法によるヒト SOD1 の ELISA を行った。ポリスチレン製の

enzyme-linked immunosorbent 96 ウェル・アッセイ・プレート(Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)を、0.02 μ g 0.1 mL⁻¹ well⁻¹ の rabbit anti-SOD1 antibody (1:5,000, cat. #SOD100, Stressgen, Ann Arbor, MI) で 50 mM sodium carbonate buffer at pH 9.4 に希釈しコーティングした。プレートは 4°C、overnight でインキュベートした。PBS でウェルを洗浄し、3%ウシ血清アルブミン(BSA) in wash buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) でブロッキングした。ブロッキング液を捨て、3% BSA で 1:100 に希釈した細胞溶解液 50 μ L を各ウェルに加え、検量線作成のためリコンビナント SOD1 蛋白もアプライした。14 プレートは overnight、4°C でインキュベートした。ウェルを PBS で洗浄し、mouse anti-SOD1 antibody (1:1,000, cat. #S2147, Sigma) 100 μ L を加え、1 時間室温でインキュベートした。ウェルを PBS で洗浄し、結合した mouse antibody を、各ウェル

HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:5000, cat. #NA9310V, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 100 μ L で検出した。1 時間室温でインキュベートし、30 分間 OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences, San Jose, CA) で反応させた。100 μ L の 1M sodium phosphate を加え反応を停止させた。450nm の吸光度の変化比を ThermoFischer Scientific Multiskan JX (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) で測定した。細胞溶解液中の SOD1 濃度は、検量線の内 1.0-125 ng mL⁻¹ の間の直線変化領域で算出した。細胞溶解液は SDS-PAGE を行い、polyvinylidene difluoride membranes にトランスファーした。メンブレンは 3% BSA in TBS でブロッキングし、anti-SOD1 antibody (1:1,000, Stressgen) でプローブし、次に内因性対照として anti- β -actin antibody (1:5,000, cat. #A1978, Sigma) で再プローブした。

(c) 定量的リアル・タイム RT-PCR

リアル・タイム RT-PCR は、LightCycler SYBR green I を用いて、LightCycler 480 (Roche) sequence detection system で行った。総 RNA の抽出は TriPure Isolation Reagent (Roche) を用いて製造者の指示通り試行した。総 RNA 量は Nanodrop を用いて定量した。標的 mRNA の相対量は β -actin の mRNA で補正した。遺伝子特異的プライマーのコンストラクトは以下である：

SOD1, forward primer:
5' -CGTGGCCTAGCGAGTTATGG-3', reverse
primer: 5' -GAAATTGATGATGCCCTGCA-3' ;
 β -actin, forward primer:

5' -GATCACCAACTGGGACGA-3', reverse primer:
5' -GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'。

(d) ウェスタン・ブロッティング

ウェスタン・ブロッティングによる解析の概要は以下の通りである。各ウェル 2mL の PBS で洗浄、プロテアーゼ阻害剤(Roche)及びフォスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えた 1% Triton-X 液 100 μ L で H4 細胞を溶解した。細胞溶解液は SDS-PAGE を行い、polyvinylidene difluoride membranes にトランスファーした。メンブレンは 3% BSA in TBS でブロッキングし、anti-SOD1 antibody (1:1,000, Stressgen) でプローブし、次に内因性対照として anti- β -actin antibody (1:5,000, cat. #A1978, Sigma) で再プローブした。使用抗体は、以下である。SOD1 (1:1000, Stressgen, #SOD-100)、 β -actin (1:5,000, Sigma)。

(e) NF- κ B 活性測定のためのルシフェラーゼ・アッセイ

H4 細胞を 12 ウェルプレートに 5.0 \times 10⁴ cells/well の濃度で overnight で前培養し 48 時間後、FuGene 6 Reagent (Roche) を用いて NF- κ B reporter plasmid ((Ig κ)3 conaluc plasmid) をトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は Drug X, withaferin A ないし TNF- α で処理して 4 時間後、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用いて測定した。

(f) 行動解析及び SOD1G93A マウスの発症と生存日数の観察

雄のヒト SOD1G93A 遺伝子トランスジェニックマウスを野生型の雌 (Japan Oriental Survice, Kyoto, Japan) と交雑した。ジェノタイプングを行い、解析に回すべきマウスを選別した。マウスに既存薬 X を経口ゾンデで投与した。投与期間は 26 週齢から 32 週齢の 6 週間投与した。マウスの生存を毎日評価し、週に 2 回体重測定及び ALS grading scale の評価を、薬剤投与グループとは異なる施行者が盲目的に行った。投与開始時の体重から 10% の減少を認めた時点を発症と定義した。End-stage はマウスを側臥位にして 30 秒以内に体勢を直すことができなくなることを観察した時期と定義した。全ての動物実験は京都大学医学部医学研究科動物実験施設の承認を得て行った。

(g) SOD1G93A マウス脊髄内 SOD1 発現の解析

マウスは腹腔内麻酔で麻酔し、脱血還流した。組織は 10mM Tris, pH 7.6、120mM NaCl、1% Triton-X 100 を含む溶解液でホモジェナイズした。12.5% ゲルの各ウェルに 5 μ g の脊髄から採取した蛋白を入れ、SDS-PAGE を行った。次いで polyvinylidene difluoride membranes にトランスファーした。メンブレンは 3% BSA in TBS でブロッキングした。使用抗体は、以下である。SOD1 (1:1000, Stressgen, #SOD-100)、 β -actin (1:5,000, Sigma)。

(h) 組織解析

マウスは PBS で還流した後、4% buffered paraformaldehyde で固定した。脊髄は同じ溶液で後固定した。腰髄膨大部を取り出し、パラフィン包埋、14 μ m の厚さで連続切片を作成した。撮影は Olympus LSM confocal microscope で行った。

(i) 孤発性 ALS モデルマウスの作製と解析

運動ニューロンにおけるユビキチンプロテアソーム系 (UPS) の破綻をタンパク質分解障害仮説に基づく孤発性 ALS のモデルとみなし、我々は部位特異的に UPS の破綻を行うことを目標とし、Cre-loxP system を用い、運動ニューロン特異的に UPS 機能が障害されるマウス (Rpt3-CKO マウス) を作製した。

C57BL/6N ES 細胞系である RENKA 株に対して、Rpt3 のエクソン 7-10 を loxP 配列で囲んだコンストラクトをエレクトロポレーション法によって導入した。この導入判定はコンストラクトにネオマイシン耐性遺伝子を導入しており、ES 細胞培地にネオマイシンを投与することで選定を行った。ネオマイシン耐性 ES 細胞系の取得後、目標とする相同組換えが行われているかどうかの判定をサザンブロット法によって解析した。得られた ES 細胞は系統として増やしこれを用いて、ICR 雌より取得した受精卵 8 細胞期にインジェクションを行った。ES 細胞を導入した卵は ICR 代理母に戻し、出産後、得られたキメラ個体が成体となった後、交配によってキメラ個体の生殖細胞が ES 細胞由来であるかを判定した。この判定によって得られたマウス系統を用いて C57/BL6N と交配し、系統の樹立とした。このマウスではネオマイシン耐性遺伝子が残っており、この遺伝子によって、Rpt3 の発現が阻害されホモにした場合、致死性を示すことからネオマイシン耐性遺伝子を FLP-FRT システムを用いて除去した。これより得られた系統を floxed Rpt3 マウスとした。Floxed Rpt3 マウスは 8 世代経たものを実験個体として使用した。今回 Cre-loxP システムとして用いる VACHT-Cre マウスは特徴として、脊髄運動ニューロンにのみ Cre を発現すること、この発現は生後 5 週間で最大発現となること、この発現は脊髄運動ニューロンの約 50% であることがある。発現の影響を確実にするため、運動ニューロンにおけるユビキチンプロテアソーム系 (UPS) の破綻をタンパク質分解障害仮説に基づく孤発性 ALS のモデルとみなし、我々は部位特異的に UPS の破綻を行うことを目標とし、Cre-loxP system を用い、運動ニューロン特異的に UPS 機能が障害されるマウス (Rpt3-CKO マウス) を樹立した。

Rpt3 の一つの遺伝子座を全身で Cre を発現する CAG-Cre を用いて欠損させ、対立遺伝子の flox の有無によって対照比較した。CAG-Cre マウスとの交配によって得られた Rpt3 +/delta マウスと Rpt3 flox/flox マウス、VACHT-Cre マウスをそれぞれに交配させることによって、コントロール群 (Rpt3 +/delta; Cre+)、ミュータント群 (Rpt3 flox/delta; Cre+) を取得した。

得られたコントロールとミュータント群に対して、行動解析を行った (ロタロッド装置を用いた追従運動機能測定、握力装置を用いた、前肢、後肢の握力測定、体重測定。測定は 8 週齢より隔週または毎週。すべてメスマウスを使用)。

病的解析は、6、12、40 週齢のメスマウス三匹から脊髄を取得し、これをパラフィン置換させ、パラフィン切片とし、この切片をヘマトキシリン&絵オジン (HE) 染色、Kluver-Barrera (KB) 染色した。さらにこの切片を用いて、免疫染色を行った (ChAT、Rpt3、ユビキチン、TDP43、FUS、OPTN、Ubiquilin2、GFAP、Mac2 を反応抗体として選定)。

(j) 統計

in vitro 及び *in vivo* の薬剤効果の定量的差異分析、マウスの組織学的解析の定量解析は、analysis of variance (ANOVA) もしくは Students t-test で行った。生存分析は Long-rank test で行った。ソフトウェアは Prism 5 を使用した。

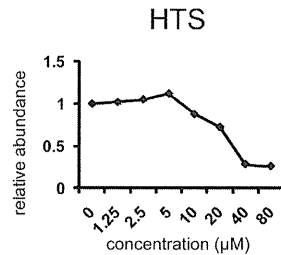
(倫理面への配慮)

京都大学医学部倫理委員会に承認を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守する。動物の取扱については、医学部動物実験ガイドラインを遵守し動物委員会の承認を得て行う。

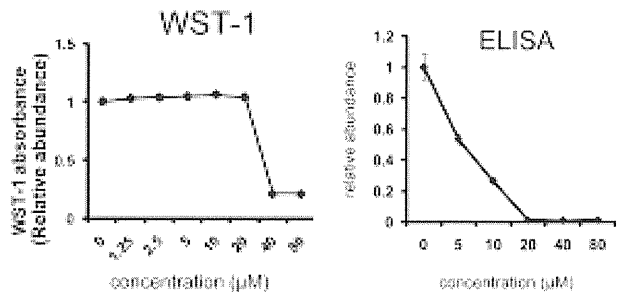
C. 研究結果

(a) 既存薬 X は H4 細胞において SOD1 の転写を抑制する

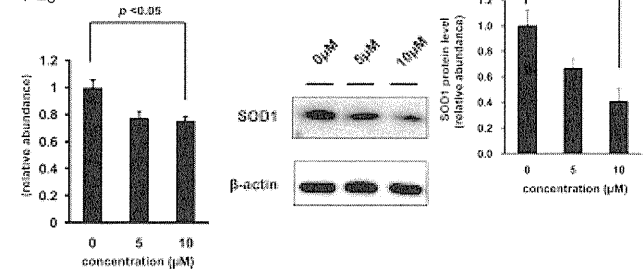
我々は、以前報告したスクリーニング・アッセイを用いて、明らかな毒性を示すことなく、SOD1 プロモータ活性を濃度依存的に抑制する低分子化合物を数種同定した。さらなる解析で我々はその内の 2 つのヒット化合物が、共通的特徴的な化学構造を有していることを突き止めた。同様の構造を持った薬剤が FDA に承認された薬剤に存在したので (既存薬 X)、我々は既存薬 X もまた SOD1 プロモータ活性を抑制するか検討した。予期していたように、既存薬 X は我々のスクリーニング・アッセイでルシフェラーゼ活性を低下させた (左図)。



ELISA の結果から、既存薬 X は WST-1 アッセイで検出可能な細胞毒性を認める濃度より低濃度で内因性 SOD1 蛋白発現レベルを H4 細胞において低下させた (下左右図)。



次に定量的リアル・タイム RT-PCR 及びウェスタン・ブロットティングによる解析でも、既存薬 X が SOD1 の蛋白レベル (下中図、下右図) 及び mRNA レベル (下左図) でも発現を低下させていることを認めた。



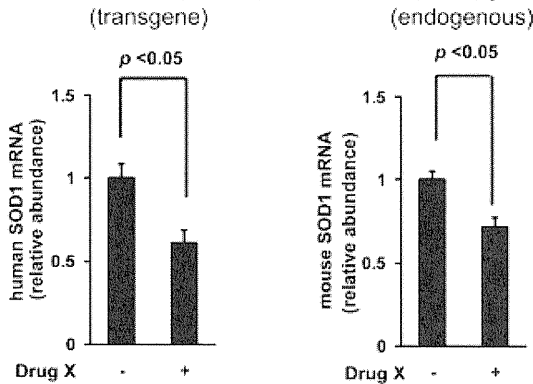
(c) 既存薬 X は、SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS 患者由来 iPS 細胞より分化させたアストロサイトにおいても SOD1 発現を低下させる

我々は SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS 患者の皮膚細胞から iPS 細胞を樹立した。その iPS 細胞を分化させ、アストロサイトを作成した。既存薬 X が、ヒトアストロサイト内の SOD1 発現を抑制することを認めた。

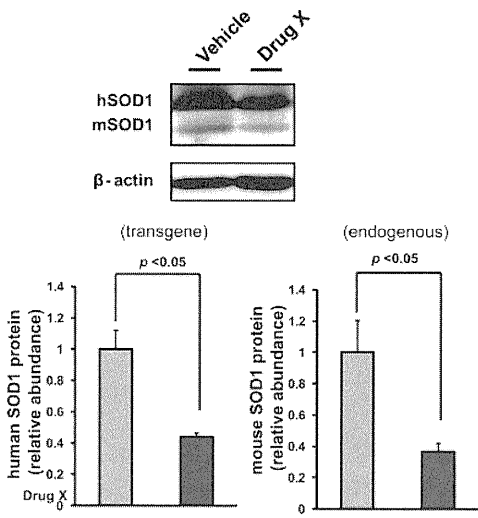
(d) 既存薬 X は SOD1G93A トランスジェニックマウスに投与すると脊髄内 SOD1 発現を低下させる

既存薬 X が *in vivo* で SOD1 転写抑制作用を有するか検討するため、我々はまず SOD1G93A マウスに 4 週間既存薬 X を経口投与した。定量的リアル・タイム PCR

で測定したところ、既存薬 X はマウス脊髄内 SOD1 の mRNA レベルは有意に低下していた(下図)。



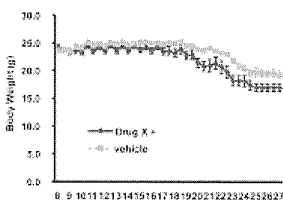
この結果より我々はマウスに既存薬 X をより長期間投与(6週間)した。その結果より我々は、既存薬 X がマウス脊髄内 SOD1 蛋白レベルも減少させるかを検証した。予期したように、既存薬 X を 6 週間経口投与したところ、マウス脊髄の SOD1 蛋白レベルも有意に減少させることがわかった(右上図)。



(d) 既存薬 X は SOD1G93A トランスジェニックマウスに投与すると ALS 症状を改善する

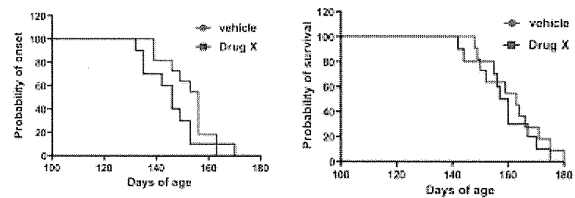
既存薬 X が ALS モデルマウスの運動ニューロン変性を遅延させるかを検証するため、我々は既存薬 X を SOD1G93A マウスに投与し経過を観察した。

我々はまず、SOD1G93A 高コピー導入マウスに、8 週齢(経口投与可能となる週齢)より既存薬 X (60mg kg⁻¹) を毎日、ゾンデによる経口投与を行った。我々は、既存薬治療群のマウス(n=10)及び vehicle 投与群のマウス(n=10)をモニターし、毎日生存の有無を確認し、1 週間に 2 回体重を観察した。その結果、SOD1 高コピーマウスでは既存薬 X により体重減少を遅延する効果は認めなかった(下図)。



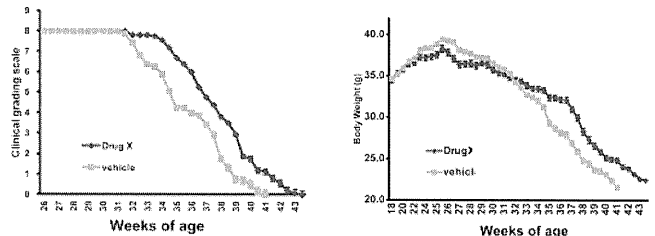
また、SOD1 高コピーマウスの発症の延長も認めず(既存薬 X 治療群, 146 ± 4 days, vehicle 治療群 152 ± 3

days; log rank, $\chi^2=1.7, P>0.05$)、SOD1 高コピーマウスの生存日数の延長も観察されなかった(既存薬 X 治療群, 159 ± 3 days, vehicle 治療群, 163 ± 4 days; log rank, $\chi^2=0.47, P>0.05$) (下図)。

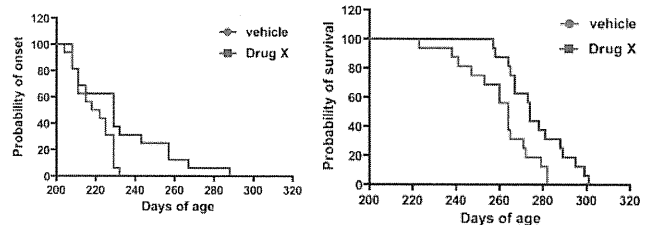


そこで我々は、SOD1G93A 低コピーマウスに、26 週齢(マウスの成長、体重増加がほぼ完了する週齢)より既存薬 X (30mg kg⁻¹) を毎日、ゾンデによる経口投与を行った。我々は、既存薬治療群のマウス(n=16)及び vehicle 投与群のマウス(n=16)をモニターし、毎日生存の有無を確認し、1 週間に 2 回体重と ALS 症状スコアを観察した。その結果、既存薬 X 治療群は有意に ALS 症状スコアの悪化を遅延し、体重減少も遅延することが分かった(次頁左上図)。

また、既存薬 X は、SOD1 マウスの発症を 14 days 延長した(既存薬 X 治療群, 233 ± 6 days, vehicle 治療群 219 ± 2 days; log rank, $\chi^2=5.0, P<0.05$)、さらに



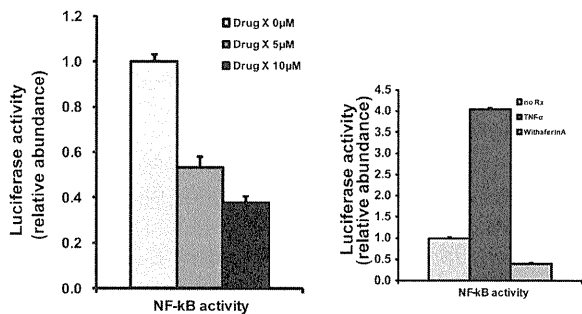
既存薬 X は、SOD1 マウスの生存日数を 16 days 延長した(既存薬 X 治療群, 276 ± 3 days, vehicle 治療群, 260 ± 4 days; log rank, $\chi^2=7.1, P<0.01$) (下図)。



有症状期間(発症から end-stage まで)は 2 群間で統計的に有意な差は認めなかった(既存薬 X 治療群, 44 ± 6 days, vehicle 治療群, 41 ± 4 days; student t-test, $P>0.05$) [data not shown]。

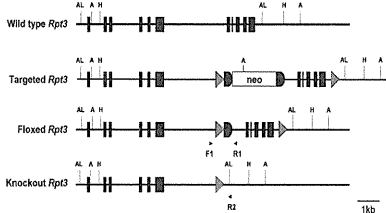
(e) 既存薬 X は NF- κ B 抑制作用を介して SOD1 の転写を調節する

神経炎症は、ALS だけでなく他の神経変性疾患においてもしばしば観察される。NF- κ B は神経炎症に関わる主要な転写因子であり、ALS 患者の脊髄前角においてその発現が亢進することが報告されている。さらに NF- κ B の転写調節領域が、SOD1 の 5' 非翻訳領域にあるプロモータ領域に存在しており、NF- κ B が実際に SOD1 の転写調節因子の一つであるという報告もある。そこで我々は既存薬 X が NF- κ B の活性を抑制するか検討するため、NF- κ B reporter plasmid ((I κ B)₃ conaluc plasmid) をトランスフェクションした H4 細胞を既存薬 X で処理した。その結果、既存薬 X が NF- κ B の活性を低下させていることが示された(下図)。



(f) 運動ニューロン特異的プロテアゾームノックアウトマウスは孤発性 ALS の症状と病理所見を再現する

作製し、交配したマウスのコンストラクトは下図である。



Rpt3-CKO マウスの脊髄運動ニューロンで Rpt3 の欠失、ユビキチンの蓄積、26S プロテアソーム他サブユニットの欠損、TDP-43 の蓄積、進行性の運動ニューロン数減少を認めた。行動解析で Rpt3-CKO マウスでは進行性の運動機能障害を認めた。

D. 考察

本研究で我々の確立したスクリーニング・システムは、SOD1 の転写を抑制する FDA で承認されている既存薬 X を同定した。また既存薬 X を変異 SOD1 マウスに経口投与することでその運動ニューロン疾患症状を実際に改善することを示した。既存薬 X の SOD1 転写抑制効果は、*in vitro* および *in vivo* で、定量的リアル・タイム RT-PCR 及びウェスタン・ブロッティングで mRNA、蛋白レベルともに効果を判定した。既存薬 X は国内で既に抗癌剤として使用されており、その安全性は広く受け入れられている。さらに我々は、安全性の検討をヒト由来の細胞株だけでなく、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトでも確認し、SOD1 転写を抑制する濃度で、これらの細胞に対する毒性が見られないことを示した。我々の研究は既存薬 X の新たな薬理的性質を提示するとともに、ALS 治療薬として新たに再配置できる可能性を示すものである。

既存薬 X が SOD1 の転写をどのように調節しているかは、詳細は本研究では明らかになっていない。しかし、NF-κB レポーターアッセイの結果から、既存薬 X が NF-κB の活性を低下させていることが示された。NF-κB は神経炎症に関わる主要な転写因子で、ALS 患者の脊髄前角においてその発現が亢進することが報告されている。さらに NF-κB の転写調節領域が、SOD1 の 5' 非翻訳領域にあるプロモータ領域に存在しており、NF-κB が実際に SOD1 の転写調節因子の一つであるという報告もある。既存薬 X の SOD1 発現調節作用メカニズムの少なくとも一部は、NF-κB を介している可能性が示唆される。

本研究で我々ほどの細胞腫において既存薬 X が

SOD1 発現抑制効果を最も認めるかは同定できなかった。しかし、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを用いることで、この薬剤は少なくともアストロサイトに対する SOD1 発現抑制作用を有することが示唆された。実際我々の研究では、既存薬 X 投与により SOD1 マウスの発症が延長している。SOD1 マウスの ALS 症状の発症時期を規定しているのは、ニューロンの SOD1 発現量であるという先行研究の報告もあり、ニューロンやミクログリアなどの他の非神経細胞に対する効果も有する可能性はあると思われる。

既存薬 X の効果は、細胞をベースにした実験で見られる SOD1 発現抑制効果に比べると、SOD1 マウスの ALS 症状に対する治療効果は限定的である。この差異は、この薬剤は脳血液関門を通過する程度が低いことに起因するのかもしれない。今後既存薬 X をリード化合物としてさらに調整を加え、より有効で脳血液関門を通過しやすい薬剤に改良していくことが望まれる。

神経変性疾患の特徴は、病原蛋白が蓄積すること、その蛋白が毒性を獲得しその毒性により神経変性が生ずることである。本研究の成果は、SOD1 関連 ALS のような神経変性疾患に対し、マウスモデルと患者 iPS 細胞由来の疾患標的細胞の両者を用いて、病原蛋白の発現を直接薬剤で調節するという新しい治療戦略の可能性を示すものである。

(謝辞 NF-κB reporter plasmid ((Igκ)₃ conaluc plasmid)を供与いただいた山岡昇司先生(東京医科歯科大学医歯学総合研究科ウイルス制御学)に謝意を表します。)

E. 結論

ALS モデルマウスおよび ALS 患者 iPS 細胞由来アストロサイトにおいて、治療効果を有する既存薬の分子標的薬を同定した。この薬剤は NFκB 経路を抑制し、孤発性 ALS に対して有効性を発揮する可能性が示された。

今後、本研究において作出に成功した孤発性 ALS モデルマウスで同定した既存薬の効果を解析する。

F. 健康危険情報(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo T, Takahashi R, Inoue H. (2011) Cellular Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases Using Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Cancer Stem Cells**, Volume 2, chapter 25, Springer, USA. 241-8

近藤孝之, 井上治久, 高橋良輔. iPS 細胞を用いた神経・精神疾患研究. 再生医療叢書 第7巻 神経系第五章, 朝倉書店, 東京 [In press].

Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, Takahashi R, Ito H. (2011) An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. **Neurology**. 77(22): 1993-5

Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H, Takahashi R. (2011) Colocalization of 14-3-3 proteins with SOD1 in Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis cases and the animal model. **PLoS One**

Honjo Y, Kaneko S, Ito H, Horibe T, Nagashima M, Nakamura M, Fujita K, Takahashi R, Kusaka H, Kawakami K. (2011) Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotroph Lateral Scler.** 12(6):444-50

Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, (2011) Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H. Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. **Acta Neuropathol.** 122(2): 223-9

Ito H, Fujita K, Nakamura M, Wate R, Kaneko S, Sasaki S, Yamane K, Suzuki N, Aoki M, Shibata N, Togashi S, Kawata A, Mochizuki Y, Mizutani T, Maruyama H, Hirano A, Takahashi R, Kawakami H, Kusaka H. (2011) Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. **Acta Neuropathol.** 121(4): 555-7

近藤孝之, 高橋良輔, 井上治久. (2011) 再生医療とiPS細胞. **Clinical Neuroscience**, 29(9), 1055-1057

2.学会発表

Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. : Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.15)

Komatsu K, Inoue H, Kondo T, Kitaoka S, Takahashi K, Yamanaka S, Takahashi R. : Establishment of iPS cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice and motor neuronal differentiation. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.15)

Kitaoka S, Tsukita K, Takahashi K, Okita K, Kondo T, Yoshikawa K, Yamawaki S, Naitoh M, Suzuki S, Izumi Y, Kaji R, Takuma H, Tamaoka A, Morita M, Nakano I, Kawata A, Nakahata T, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. : Induction of astrocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells carrying mutant SOD1. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.16)

Tashiro Y, Ito H, Inoue H, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R. : The analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for the mechanisms of neurodegenerative diseases. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.17)

Komatsu K, Inoue H, Kondo T, Kitaoka S, Takahashi R. : Establishment of iPS cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice and motor neuronal differentiation.

The XXth World Congress of Neurology. Marrakesh, Morocco (2011.11.16)

池本明人, 猪原匡史, 平野朝雄, 高橋良輔, 伊東秀文: 筋萎縮性側索硬化症に於ける valosin-containing protein 発現の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋 (2011.5.18)

小松研一, 井上治久, 近藤孝之, 北岡志保, 一阪朋子, 高橋和利, 山中伸弥, 高橋良輔: 筋萎縮性側索硬化症モデルマウス iPS 細胞の樹立および運動ニューロンへの分化. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋(2011.5.19)

田代善崇, 伊東秀文, 井上治久, 山崎真弥, 阿部 学, 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 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋(2011.5.19)

北岡志保, 井上治久, 月田香代子, 高橋和利, 近藤孝之, 吉川勝宇, 山脇聖子, 内藤素子, 鈴木茂彦, 伊東秀文, 和泉唯信, 梶 龍兒, 宅間 浩, 玉岡 晃, 森田光哉, 中野今治, 川田明広, 中畑龍俊, 高橋良輔, 山中伸弥: 変異 SOD1 を有する ALS 患者由来 iPS 細胞の樹立とアストロサイトへの分化. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋(2011.5.19)

村上 学, 井上治久, 月田香代子, 浅井康行, 饗庭一博, 天貝裕地, 下川浩輝, 上杉志成, 中辻憲夫, 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. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋(2011.5.19)

池本明人, 猪原匡史, 平野朝雄, 高橋良輔, 伊東秀文: 筋萎縮性側索硬化症の脊髄に於ける valosin-containing protein の免疫組織化学的検討. 第 52 回日本神経病理学会総会, 京都 (2011.6.4)

山下 博史, 藤森 典子, 片岡 礼音, 井口 洋平, 熱田 直樹, 田中 章景, 祖父江 元, 伊東 秀文, 高橋 良輔, 山中 宏二: 細胞特異的トランスクリプトームを用いた, 弧発性 ALS 患者脊髄の DNA マイクロアレイによる解析. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜 (2011.9.16)

田代善崇, 伊東秀文, 井上治久, 山崎真弥, 阿部学, 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解析. 第 33 回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12.13)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号: 米国出願番号61/379,558、筋萎縮性側索硬化症の予防および治療薬医薬組成物

出願番号: 特願2010-278550、筋萎縮性側索硬化症の予防および治療薬医薬組成物

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞のアストロサイトへの分化誘導とその治療的応用

研究分担者 井上 治久 京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 准教授

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症（ALS）は中年以降に発症し、骨格筋の進行性萎縮をきたす予後不良な運動ニューロン疾患であり、唯一の治療薬（リルゾール）の効果は限定的である。近年、iPS 細胞作製技術が開発され、これまで入手困難であった患者由来の神経系の細胞の入手が可能になったことから、本研究では ALS 患者 iPS 細胞を用いた ALS 治療薬の開発を目指した。

本年度、変異 SOD1 を有する ALS 患者より、iPS 細胞を樹立し、非自律性運動ニューロン変性に寄与していることが知られている ALS 患者 iPS 細胞由来アストロサイトで SOD1 タンパク量を低下させる既存の分子標的薬をさらに1種類同定した。この分子標的薬を変異 SOD1 トランスジェニックマウス（ALS モデルマウス）アストロサイトとヒト iPS 細胞由来運動ニューロンとの共培養でヒト運動ニューロン死を来す ALS モデルに投与したが、コントロールアストロサイト上でも運動ニューロン死を来した。アストロサイトとヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの共培養モデルは薬剤の神経細胞に対する毒性スクリーニングモデルとなりうることが判明した。また、ALS モデルマウス iPS 細胞を用いることによって短期間で運動ニューロン死を観察できる ALS モデルを作製した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（以下、ALS）は中年以降に発症し、骨格筋の進行性麻痺をきたす予後不良な運動ニューロン疾患である。運動ニューロンが選択的に変性・死滅することによって重篤な運動機能障害を引き起こされる難治性神経変性疾患であり、厚生労働省の特定疾患治療研究対象疾患に指定されている。ALS の約 90% 以上は孤発性であり原因は不明である。残り 10% は家族性で、原因の一つとして Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の点突然変異により、変異 SOD1 が新たに獲得した細胞毒性が運動ニューロン死を引き起こすとする (gain-of-toxic function) 説が有力である (Bruijn, L.I., et al. Annu. Rev. Neurosci., 27: 723-749, 2004)。

現在、ALS 治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアンタゴニストであってグルタミン酸抑制作用のあるリルゾール（リルテック TM, アベンティス）のみである (Bensimon, G., et al. N. Engl. J. Med., 330: 585-591, 1994)。近年、マウスおよびヒトの人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が相次いで樹立された。Yamanaka らは、マウス由来の線維芽細胞に、Oct3/4, Sox2, Klf4 及び c-Myc 遺伝子を導入し強制発現させることによって、iPS 細胞を誘導した (Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676, 2006)。その後、c-Myc 遺伝子を除いた 3 因子によっても iPS 細胞を作製できることが明らかとなった (Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106, 2008)。さらに、Yamanaka らは、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にマウスと同様の 4 遺伝子を導入することにより、iPS 細胞を樹立することに成功した (Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872, 2007)。このようにして得られる iPS 細胞は、治療対象となる患者由来の細胞を用いて作製された後、各組織の細胞へと分化させることができるため、*in vitro* で病態の再現することや、死後脳でしか入手が不可能であった患者の神経系細胞の入手が、皮膚生検を行う事によって生存する患者からも可能になった。実際、上記の方法で、ALS

患者由来の iPS 細胞が作製され、神経細胞への分化誘導が成功している (Dimos, J.T., et al., Science, 321:1218-1221, 2008)。しかし、未だ iPS 細胞由来の神経系細胞を用いて、ALS の有力な治療薬の発見には至っていない。

本研究目的は、SOD1 変異を有する ALS 患者由来 iPS 細胞を用いることにより、これまで入手困難であった患者由来の神経系細胞を作製し、それらの細胞を用いて、ALS の予防および治療薬を開発することである。

B. 研究方法

上記の課題を解決すべく、まず変異 SOD1 を有する ALS 患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、非自律性運動ニューロン変性に寄与しているアストロサイト (Yamanaka K, et al, Nat. Neurosci. 11:251-253, 2008; Nagai et al. Nat. Neurosci. 10: 615-622, 2007) へ分化誘導を行った。SOD1 の発現量が ALS 病態の重症度と相関していることに着目し、得られたアストロサイトにスクリーニング化合物を加えることにより、SOD1 発現量を低下させる化合物をスクリーニングした。

さらに、変異 SOD1 を高発現し、強い毒性を有することが考えられる変異 SOD1 トランスジェニックマウスアストロサイトと、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの共培養で、ヒト運動ニューロン変性を生じる新規 ALS モデル構築を試みるとともに、アストロサイトの SOD1 量のスクリーニングで得られた化合物の効果も、この共培養モデルで検証した。一方で、運動ニューロン・アストロサイトを短期間で培養するために変異 SOD1 トランスジェニックマウス iPS 細胞を作製し、ALS モデルマウス iPS 細胞由来新規 ALS モデル構築を試みた。

(a) iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導

ニューロスフェアの形成は、Wada T, et al, PLoS ONE 4(8), e6722, 2009 に記載の方法に変更を加えて行った。詳細には、iPS 細胞を回収後、小細胞塊にした。

その細胞塊を poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) / laminin (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) (PLL/LM) コート (Sigma-Aldrich 社) をしたディッシュにまき直し、DMEM/F12 (Life Technologies) と Neurobasal medium A (Life Technologies) 1:1 の混合培養液に 0.5% N2 (Life Technologies)、1% B27 (Life Technologies)、2 mM glutamine (Life Technologies) を加えた N2B27 培地で培養した。さらに神経系への誘導のために、Human recombinant Noggin (100 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) および SB431542 (10 μ M, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を培地に添加して、10 日間の培養を行った。3 日おきに 100 ng/ml の Noggin を含む培地に交換した。細胞コロニーは 1 mM CaCl₂ を含む 200 U/ml collagenase で小さい塊にした後、再び PLL/LM コート上にまき直し、1 日おきに 100 ng/ml の Noggin を含む培地へ交換し、さらに 7 日間培養した。形成された放射状の神経ロゼッタは Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) で細胞を分離し、1,000,000 cells/ml の濃度で、2-hydroxyethylmetacrylate (HEMA) コーティングディッシュに蒔いた。この時、20 ng/ml EGF (R&D systems)、20 ng/ml bFGF および 50 ng/ml heparin (Sigma-Aldrich 社) を添加した N2B27 培地を用いた。これらの培養は、すべて 37°C、5% CO₂、加湿雰囲気下でインキュベーターで行った。継代は、30 日おきに、ピペッティングを伴って行い、培地は 7 日おきに 1 ml 加えた。

アストロサイト分化誘導は 4 次ニューロスフェアを accutase を用いて分離し、1% FBS (ジャパン・バイオサイラム)、10 ng/ml bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) (R&D systems) および 10 ng/ml leukemia inhibitory factor (LIF) (alomone labs) を含有する N2B27 培地中に 50,000 cells/ml の濃度でゼラチンコーティングしたディッシュ上へ蒔いた。培地は、2 日おきに交換し、1 週間後に 10% FBS および 1% penicillin/streptomycin を添加した DMEM に交換した。この方法により、GFAP 陽性の細胞が得られ、アストロサイトへの分化誘導が確認された。スクリーニング用アストロサイトは、250,000 cells/well の濃度で 6 穴プレートに蒔いた。それぞれ、基剤 (0.5% dimethylsulfoxide (DMSO))、終濃度 5~10 μ g/ml の cycloheximide、各終濃度の試験化合物を加えて 48 時間インキュベーターした。

運動ニューロンの分化誘導は、ニューロスフェアを経ることなく、放射状の神経ロゼッタ形成後の Accutase 処理で細胞分離後、1 μ M retinoic acid (Sigma-Aldrich) および 100 ng/ml Sonic Hedgehog (R&D Systems) を含む N2B27 中で 7 日間の培養を継続した。さらに運動ニューロンの成熟化のために PLL/LM に human plasma fibronectin (Millipore, Billerica, MA) を加えてコートを行った培養ウェル中で、10 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF; R&D Systems)、10 ng/ml glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF; R&D Systems)、10 ng/ml neurotrophin-3 (NT-3; R&D Systems) を含む培地で 7 日間培養を継続した。すべての培養は 37°C、5% CO₂ のインキュベーター中で培養した。

(b) マウスアストロサイトの培養

P3 までのマウス新生児の頭部から脳を取り出し、髄膜を除去した。脳から皮質を取出し、40 μ m のセルストレーナーを通し、flow through を遠心した。上清を取り除き、細胞ペレットを培地で懸濁し培養した。

(c) 免疫染色

細胞は 4% paraformaldehyde (pH 7.4) で 30 分間、室

温で固定し、PBS で洗浄した。さらに、細胞は 0.2% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間透過処理を行った。さらに非特異的反応は 10% donkey serum を含む PBS 中に、60 分間、室温で反応させて防止した。細胞はさらに 1 次抗体を 4 度一晩反応させた。蛍光標識された 2 次抗体を反応させ、観察を行った。核染色のために、DAPI (Life Technologies) を用いた。次の 1 次抗体を用いた。NANOG (R&D Systems, 1:10)、SSEA-4 (Millipore, 1:100)、SOX-17 (R&D Systems, 1:50)、 α SMA (DAKO A/S, Glostrup, Denmark, 1:500)、Tuj1 (Covance, Princeton, NJ, 1:2,000)、Islet-1 (DSHB, Iowa, IA, 1:50)、HB9 (Epitomics, Burlingame, CA, 1:2,000)、ChAT (Millipore, 1:100)、SMI-32 (Covance, 1:500)、synapsin (Millipore, 1:500)、MAP2 (Millipore, 1:200)、GFAP (DAKO, 1:1,000)。

(d) アストロサイト中 SOD1 のウエスタンブロット解析

iPS 細胞由来のアストロサイトは、250,000 cells/well の濃度で 6 穴プレートに蒔いた。それぞれ、基剤 (0.5% dimethylsulfoxide (DMSO))、終濃度 5~10 μ g/ml の cycloheximide、各終濃度の薬剤を加えて 48 時間インキュベーターした。その後、細胞を回収し、1% triton X-100、10% glycerol、5 mM EDTA、120 mM NaCl および protease inhibitor cocktail (Complete; Roche) 含有した 20 mM Hepes pH 7.4 を用いて 30 分間氷上にて溶解させた。細胞溶解液は、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心させ、上清を回収した。この細胞溶解上清を用いてウエスタンブロットングを行った。詳細には、20 μ g 分のタンパク質を SDS-PAGE 法 (4-12% polyacrylamide gels) により分離し、PVDF 膜へトランスファーし、抗 SOD1 抗体 (1:2000 希釈) (stressgen 社) または抗 β -actin 抗体 (1:5000 希釈) (Sigma-Aldrich 社) とインキュベーターした。インキュベーター後、HRP-linked 抗 rabbit IgG 抗体 (1:5000; GEhealthcare) と HRP-linked 抗 mouse IgG 抗体 (1:5000; GE healthcare) を用いて、ECL (Enhanced ChemiLuminescence) により発現量を検出した。イメージは、LAS 4000 (GE Healthcare) にて画像化した。

(e) ヒト運動ニューロン/マウスアストロサイト共培養

分化誘導後の細胞上に mutant SOD1-Tg および non-Tg マウスから採取したアストロサイトを 30,000/well で播種した。共培養開始時から成長因子を含まない基本培地に変更した。共培養開始 10、37 日に IN Cell Analyzer 2000 を用いてレンチウイルスで GFP 標識した運動ニューロン数を定量した。GFP 陽性細胞数は経時的に IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) を用いて計測した。drug X の運動ニューロンに対する効果の検討には、FACS を用いて GFP 陽性細胞を回収した。アストロサイト (20,000/well) を播種した 96 well プレートにソーティングで得られた運動ニューロンを 1,500/well で播種した。基本培地に 10 μ M drug X を添加した。共培養開始後、IN Cell Analyzer 2000 を用いて GFP 陽性の神経細胞数を定量した。

(f) 変異 SOD1 マウス iPS 細胞の作製・分化誘導

変異 SOD1 マウスより、ヒト iPS 細胞と同様の方法で iPS 細胞を樹立した。運動ニューロン分化は既報告のとおり、iPS 細胞をトリプシンでシングルセル状態にした後浮遊培養を行った。48 時間後より 1 μ M retinoic acid (Sigma-Aldrich) と 1 μ M smoothened agonist を加え、その 5 日後にパパイニンでシングルセル状態にし、PDL/ラミニンコートしたプレートにまく。DMEM/F12、5% horse serum、B27、N2、1 μ g/ml BDNF、CNTF、GDNF、NT3 培地で 3 日毎に 2/3 量を培地交換する。リプレート 7 日後に 10 μ M Ara-C で 48 時間処理し、14~28 日後にアッ

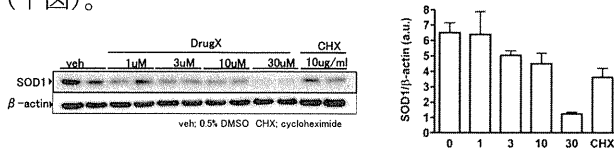
セイに用いた。

(倫理面への配慮)

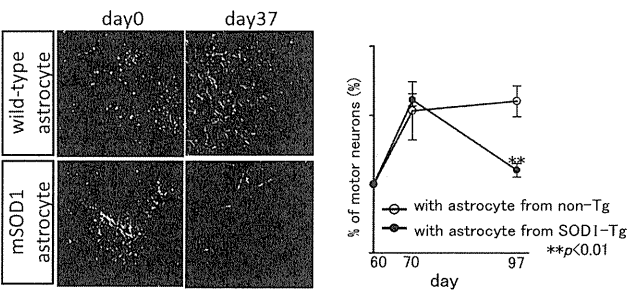
本研究は京都大学医学部倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究』(承認番号第 824 番)および『ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第 G259)として承認されている。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守するものである。

C. 研究結果

昨年度までに同定した薬剤に加えて、本年度さらに異なる既存の分子標的薬 DrugX によって、ALS iPS 細胞由来アストロサイトで、SOD1 タンパク質量が低下した(下図)。



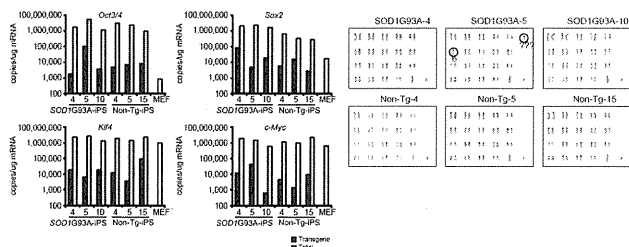
運動ニューロンをレンチウイルスベクターを用いて GFP で標識後、変異 SOD1 マウス(mSOD1 マウス)アストロサイトとの共培養 37 日後(iPS 細胞分化開始から 97 日後)、mSOD1 アストロサイトによって、運動ニューロンが消失した(下図)。



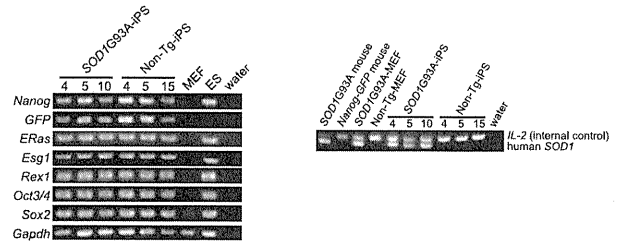
さらに、このモデルにおいて、既存薬 DrugX を加え、運動ニューロン保護を試みたが、変異 SOD1 のみならず、野生型アストロサイト上の運動ニューロン死も生じた。さらなる実験条件の検討が必要であった。

(d) 変異 SOD1 マウス iPS 細胞を用いた短期運動ニューロン変性 ALS モデルの作製

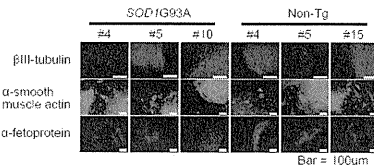
変異 SOD1 マウス iPS 細胞クローンを、ヒト iPS 細胞と同様の手法で樹立した。導入した遺伝子がサイレンシングしている iPS 細胞クローンを選択した(下左図)。選択クローンの核型(下右図)。



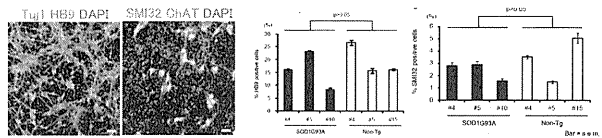
樹立した iPS 細胞クローンは ES 細胞マーカーを発現(下左図)、SOD1 変異を有する(下右図)。



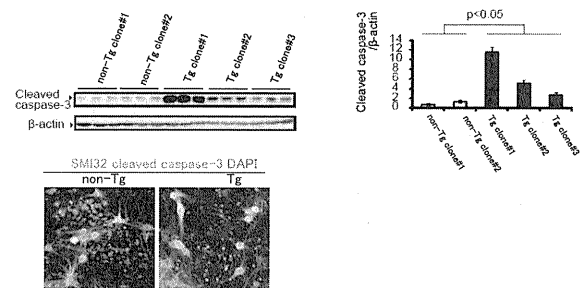
樹立した iPS 細胞クローンは *in vitro* で 3 胚葉に分化した。



また既報告を一部改変し、HB9、SMI32、ChAT 陽性運動ニューロンへの分化誘導方法を確立した(下左図)。運動ニューロンへの分化誘導効率は transgenic と non-transgenic で不変であった(下中図、下右図)。



さらに、この培養系においては培養後 3 週間という短時間で、運動ニューロンにおいて cleaved-caspase-3 が陽性になることを見いだした(下図)。



D. 考察

変異 SOD1 マウス iPS 細胞由来運動ニューロンは cleaved caspase-3 を発現する細胞死を分化誘導後約 20 日間で生じた、一方、ヒト運動ニューロンは変異 SOD1 マウスアストロサイトとの共培養で iPS 細胞からの分化誘導後 100 日で細胞体消失を生じた。またヒト ALS アストロサイトとヒト運動ニューロンの共培養実験を 100 日以上にわたり観察したが、細胞がデブッシュより剥がれる等が生じたため継続できなかった。SOD1 マウスアストロサイトと比較し、ヒト ALS アストロサイトは SOD1 コピー数が小さく、アストロサイトの毒性が小さいため運動ニューロン変性を生じるまでの時間がかかる可能性がある。マウスアストロサイトを使用しないヒト ALS iPS 細胞由来モデル完成のために、分化誘導スピードアップの手法の開発とともに、ミクログリアも含めた培養系が必要であろう。

一方、アストロサイトのスクリーニングで同定し

た DrugX をこの共培養モデルに投与したところ、変異 SOD1 アストロサイトのみならず、コントロールアストロサイト上の運動ニューロン数の減少も認め、DrugX の毒性に対する感受性がアストロサイトと運動ニューロンにおいて異なることを見いだした。アストロサイトとヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養によって、薬剤の神経細胞毒性をスクリーニングできる可能性がある。

E. 結論

変異 SOD1 を有する ALS iPS 細胞より分化誘導したアストロサイトを用いて、SOD1 タンパク量を低下させる既存薬を昨年までの1種類の加えてさらに 1 種類の分子標的薬を同定した。また、変異 SOD1 を有するアストロサイトによって、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロン変性を来す新たな ALS モデルを開発した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo T, Takahashi R, Inoue H. (2011) Cellular Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases Using Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Cancer Stem**

Kitaoka S, Kondoh H, Inoue H. (2011) Induced Pluripotent Stem Cell Technology for the Study of Neurodegenerative Diseases. **Induced Stem Cells**, chapter 5, Nova Science Publishers Inc, New York, p129-42.

近藤孝之, 井上治久, 高橋良輔. iPS 細胞を用いた神経・精神疾患研究. 再生医療叢書 第7巻 神経系第五章, 朝倉書店, 東京 [In press].

Imamura K, Inoue H. Research on neurodegenerative diseases using induced pluripotent stem cells. **Psychogeriatrics** [In Press].

江川齊宏, 井上治久. 眼科領域と iPS 細胞. (2011) **神経眼科**, 28 巻 4 号, 4740-44.

今村恵子, 井上治久. (2011) iPS 細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究. **Annual Review 神経** 2012, 92-96.

八幡直樹, 井上治久. (2011) 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞). **認知症学(上)**, 282-5.

江川齊宏, 井上治久. (2011) RNA 結合タンパク質の機能と神経変性疾患 iPS 細胞を用いた疾患病態の再現と RNA プロセッシング治療の可能性. **Dementia Japan**, 25(2) 137-44.

近藤孝之, 高橋良輔, 井上治久. (2011) 再生医療と iPS 細胞. **Clinical Neuroscience**, 29(9): 1055-57.

北岡志保, 井上治久. (2011) iPS 細胞技術の神経疾患研究での有用性および今後の課題. **脳** 21, 14(3): 20-24.

井上治久. (2011) 天からの蜘蛛の糸を生かすには. **日経サイエンス** 41(6): 72.

井上治久. (2011) iPS 細胞作製技術を用いた ALS 治療法開発. **日本 ALS 協会会報 JALSA** 82: 7-9.

八幡直樹, 井上治久. iPS 細胞作製技術を利用した神経疾患病因機構の解明と創薬開発への取り組み. **遺伝子医学 MOOK** 22 号, [In press].

2. 学会発表

Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. : Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.15)

Komatsu K, Inoue H, Kondo T, Kitaoka S, Takahashi K, Yamanaka S, Takahashi R. : Establishment of iPS cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice and motor neuronal differentiation. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.15)

Kitaoka S, Tsukita K, Takahashi K, Okita K, Kondo T, Yoshikawa K, Yamawaki S, Naitoh M, Suzuki S, Izumi Y, Kaji R, Takuma H, Tamaoka A, Morita M, Nakano I, Kawata A, Nakahata T, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. : Induction of astrocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells carrying mutant SOD1. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.16)

Tashiro Y, Ito H, Inoue H, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R. : The analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for the mechanisms of neurodegenerative diseases. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society –Neuroscience of the Mind–, Yokohama, Japan (2011.9.17)

井上治久: 疾患モデルと創薬スクリーニング. バイオフィナンスギルド第9期第10回セミナー「次の技術突破はこれだ」～次代を担う若手達～, 東京 (2011.5.13)

村上 学, 井上治久, 月田香代子, 浅井康行, 饗庭一博, 天貝裕地, 下川浩輝, 上杉志成, 中辻憲夫, 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. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋 (2011.5.19)

小松研一, 井上治久, 近藤孝之, 北岡志保, 一阪朋子, 高橋和利, 山中伸弥, 高橋良輔: 筋萎縮性側索硬化症モデルマウス iPS 細胞の樹立および運動ニューロンへの分化. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋 (2011.5.19)

田代善崇, 伊東秀文, 井上治久, 山崎真弥, 阿部 学, 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 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋 (2011.5.19)

北岡志保, 井上治久, 月田香代子, 高橋和利, 近藤孝之, 吉川勝宇, 山脇聖子, 内藤素子, 鈴木茂彦, 伊東秀文, 和泉唯信, 梶 龍兒, 宅間 浩, 玉岡 晃, 森田光哉, 中野今治, 川田明広, 中畑龍俊, 高橋良輔, 山

中伸弥:変異 SOD1 を有する ALS 患者由来 iPS 細胞の樹立とアストロサイトへの分化. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋(2011.5.19)

井上治久:iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋(2011.5.20)

井上治久:iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 日本老年精神医学会, 東京(2011.6.16)

井上治久:患者由来 iPS 細胞を用いた神経変性疾患バイオマーカー同定と病態解明. 第 53 回日本老年医学会学術集会 ノバルティス老化および老年医学研究基金 2009 年度受賞講演, 東京(2011.6.17)

井上治久:iPS 細胞技術を用いた神経難病の研究. 熊本県難病相談・支援センター6 周年記念医療講演会, 熊本(2011.7.15)

井上治久:難治性神経変性疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究. 第 38 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「難病創薬のビジネスモデルと可能性—神経変性疾患を中心に—」, 東京(2011.10.3)

井上治久:iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究. 日本 ALS 協会徳島支部 第 12 回定例会, 徳島(2011.10.30)

井上治久:Translational Neuroscience based on iPS cell Technology/iPS 細胞作製技術を用いた神経科学研究. 再生医療・臓器再建医学コースミーティング, 京都(2012.2.10)

井上治久:Disease-specific iPSC research for the exploration of pathomechanisms of intractable neurodegenerative diseases. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都(2012.3.16)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号:米国出願番号61/379,558、筋萎縮性側索硬化症の予防および治療薬医薬組成物

出願番号:特願2010-278550、筋萎縮性側索硬化症の予防および治療薬医薬組成物

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(平成 23 年度)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kondo T, Takahashi R, Inoue H	Cellular Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases Using Induced Pluripotent Stem Cells.	Hayat M. A.	Stem Cells and Cancer Stem Cells Volume 2 chapter 25	Springer	USA	2011	241-8
近藤孝之, 井上治久, 高橋良輔	iPS 細胞を用いた神経・精神疾患研究		再生医療叢書 第7巻 神経系 第五章	朝倉書店	東京		[In press]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, Takahashi R, Ito H.	An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions.	Neurology	77	1993-5	2011
Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H Takahashi R	Colocalization of 14-3-3 proteins with SOD1 in Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis cases and the animal model.	PLoS One	6	e20427	2011
Honjo Y, Kaneko S, Ito H, Horibe T, Nagashima M, Nakamura M, Fujita K, Takahashi R, Kusaka H, Kawakami K	Protein disulfide isomerase -immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis.	Amyotroph Lateral Scler.	12	444-50	2011

Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, Kusaka H, Kaji R, <u>Takahashi R</u> , Kawakami H	Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation.	Acta Neuropathol.	122	223-9	2011
Ito H, Fujita K, Nakamura M, Wate R, Kaneko S, Sasaki S, Yamane K, Suzuki N, Aoki M, Shibata N, Togashi S, Kawata A, Mochizuki Y, Mizutani T, Maruyama H, Hirano A, <u>Takahashi R</u> , Kawakami H, Kusaka H.	Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease.	Acta Neuropathol.	121	555-7	2011
近藤孝之, 高橋良輔, 井上治久	再生医療と iPS 細胞.	Clinical Neuroscience	77	1993-5	2011

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kondo T, Takahashi R, Inoue, H.	Cellular Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases Using Induced Pluripotent Stem Cells.	M.A.Hayat.	Stem Cells and Cancer Stem Cells	Springer	USA	2011	241-248
Kitaoka S, Kondoh H, Inoue H.	Induced Pluripotent Stem Cell Technology for the Study of Neurodegenerative Diseases.	Patrick J. Sullivan Elena K. Mortensen	Induced Stem Cells	Nova Science Publishers, Inc.	USA	2011	129-142
八幡直樹, 井上治久	人工多能性幹細胞 (iPS細胞)	-	認知症学 (上)	日本臨牀社		2011	282-285
近藤孝之, 井上治久, 高橋良輔	iPS細胞を用いた神経・精神疾患研究	-	再生医療叢書第7巻	朝倉書店	東京		[In Press]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imamura K, Inoue H.	Research on neurodegenerative diseases using induced pluripotent cells.	Psychogeriatrics	-	-	[In Press]
江川斉宏, 井上治久	眼科領域とiPS細胞	神経眼科	28 巻 4 号	440-444	2011
今村恵子, 井上治久	iPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究	Annual Review 神経 2012	-	92-96	2011
江川斉宏, 井上治久	RNA結合タンパク質の機能と神経変性疾患 iPS細胞を用いた疾患病態の再現とRNAプロセッシング治療の可能性	Dementia Japan	25(2)	137-144	2011
近藤孝之, 高橋良輔, 井上治久	再生医療とiPS細胞	Clinical Neuroscience	29(9)	1055-1057	2011
北岡志保, 井上治久	iPS細胞技術の神経疾患研究での有用性および今後の課題	脳 21	14(3)	20-24	2011
井上治久	天からの蜘蛛の糸を生かすには	日本サイエンス	41(6)	72	2011
八幡直樹, 井上治久	iPS細胞作製技術を利用した神経疾患病因機構の解明と創薬開発への	遺伝子医学 MOOK	22 号	-	[In Press]

研究成果の刊行物・別刷り

Chapter 25

Cellular Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases Using Induced Pluripotent Stem Cells

Takayuki Kondo, Ryosuke Takahashi, and Haruhisa Inoue

Abstract Neurodegenerative disorders are characterized by progressive neuronal loss, resulting in clinical deficit. Several drugs can improve neural symptoms transiently but cannot halt progression or recover deficits. Stem cell transplantation is focused as upcoming regenerative treatment. After recent advances in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, research is accelerating their application to neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We review the recent progress and present our future vision concerning cell replacement therapy for ALS, and we also emphasize the hurdles to be overcome before clinical trials can be begun. Basic research focusing on the safety of transplantation, besides therapeutic experiments, should lead to a beneficial outcome.

Keywords Cellular replacement therapy · Embryonic stem cells · Parkinson's disease · Huntington's disease · Amyotrophic lateral sclerosis · Central nervous system

Introduction

Resolve Limitations in Cellular Replacement Therapy

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's

disease (HD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), mainly attack the central nervous system (CNS) and result in neuronal loss. A condition of decreasing numbers of neurons leads to dysfunction of the neural network, resulting in disorders such as memory loss, bradykinesia, involuntary movement or limb weakness. In the past several decades, a number of drugs have been developed to compensate at least partially for these disabilities. However, none of the drugs has been able to halt disease progression or replace neuronal loss.

To overcome these limitations of conventional drug therapy, cell replacement therapies are being prepared, step-by-step, toward clinical trials. Clinical trials using stem cells have been described for Huntington's disease, Parkinson's disease, spinal cord injury, and stroke. Several clinical trials have achieved successful improvement in neurological deficits in patients. However, most of these clinical trials were based on somatic stem cells, including fetal neural tissue, nasal mucosa progenitors, or mesenchymal stem cells. Nonetheless, the resource limitation of somatic stem cells remains a major hurdle for the universal application for cell replacement therapy.

Establishment of ESC and iPSC

In 1998 human embryonic stem cells (ESC) were first generated from the inner cell mass of the mammalian blastocyst (Thomson et al., 1998). ESC can proliferate almost indefinitely and differentiate into multiple cell-types of all three germ-layers in vivo. Additionally the molecular basis of reprogramming has been revealed by the exogenous expression of combinations of transcription factors. Four factors,

H. Inoue (✉)
Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto
University, Kyoto, Japan
e-mail: haruhisa@cira.kyoto-u.ac.jp