

and Technology) (HI), a Grant-in-Aid from the Ministry of Health and Labour (HI), a Grant-in-Aid for Scientific Research (21591079) from JSPS (HI), Grant-in-Aid for Scientific Research (22700377) from JSPS (SK), Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Area "Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology" (22110007) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (HI), a research grant from the Takeda Science Foundation (HI), a research grant from the Kanoe Foundation for the Promotion of Medical Science (HI), and a research grant from the NOVARTIS Foundation for Gerontological Research (HI).

## References

- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T. & Yamanaka, S. (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, *321*, 699-702.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Gnirke, A., Eggan, K. & Meissner, A. (2011) Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell*, *144*, 439-52.
- Borghese, L., Dolezalova, D., Opitz, T., Haupt, S., Leinhaas, A., Steinfarz, B., Koch, P., Edenhofer, F., Hampl, A. & Brüstle, O. (2010) Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells*, *28*, 955-64.
- Boulting, G. L., Kiskinis, E., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Wainger, B. J., Williams, D. J., Kahler, D. J., Yamaki, M., Davidow, L., Rodolfa, C. T., Dimos, J. T., Mikkilineni, S., Macdermott, A. B., Woolf, C. J., Henderson, C. E., Wichterle, H., Eggan, K. (2011) A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, [Epub ahead of print]
- Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Lalande M. (2010) Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *107*, 17668-73.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M. & Studer, L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, *27*, 275-80.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E. & Eggan, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, *321*, 1218-21.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A. & Svendsen, C. N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, *457*, 277-80.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V. & Studer, L. (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev*, *22*, 152-65.
- Ghosh, Z., Wilson, K. D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T. & Wu, J. C. (2010) Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One*, *5*, e8975.
- Hastings, M. L., Berniac, J., Liu, Y. H., Abato, P., Jodelka, F. M., Barthel, L., Kumar, S., Dudley, C., Nelson, M., Larson, K., Edmonds, J., Bowser, T., Draper, M., Higgins, P. & Krainer, A. R. (2009) Tetracyclines that promote SMN2 exon 7 splicing as therapeutics for spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med*, *1*, 1-10.

- Heinrich, C., Gascón, S., Masserdotti, G., Lepier, A., Sanchez, R., Simon-Ebert, T., Schroeder, T., Götz, M. & Berninger, B. (2011) Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nat Protoc*, *6*, 214-28.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKelver, R. C., Katibah, G. E., Amora, R., Boydston, E. A., Zeitler, B., Meng, X., Miller, J. C., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. & Jaenisch, R. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, *27*, 851-7.
- Hu, B. Y., Du, Z.W. & Zhang, S.C. (2009) Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, *4*, 1614-22.
- Hu, B. Y., Weick, J. P., Yu, J., Ma, L. X., Zhang, X. Q., Thomson, J. A. & Zhang, S. C. (2010) Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*, 4335-40.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E. A., Altun, G., Laurent, L. C., Loring, J. F., Napierala, M. & Gottesfeld, J. M. (2010) Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA/TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, *7*, 631-7.
- Kustikova, O., Fehse, B., Modlich, U., Yang, M., Düllmann, J., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Li, Z. & Baum, C. (2005) Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science*, *308*, 1171-4.
- Le Prince, G., Delaere, P., Fages, C., Duyckaerts, C., Hauw, J. J. & Tardy, M. (1993) Alterations of glial fibrillary acidic protein mRNA level in the aging brain and in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett*, *151*, 71-3.
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M. & Studer, L. (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, *461*, 402-6.
- Lee, G., Chambers, S. M., Tomishima, M. J. & Studer, L. (2010) Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, *5*, 688-701.
- Marchetto, M. C., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G. & Gage, F. H. (2008) Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *3*, 649-57.
- Marchetto, M. C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H. & Muotri, A. R. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, *143*, 527-39.
- Mhatre, M., Floyd, R. A. & Hensley, K. (2004) Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets. *J Alzheimers Dis*, *6*, 147-57.
- Okita, K., Hong, H., Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2010) Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc*, *5*, 418-28.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R. J., Fitz-Gerald, C. S., Sato, Y., Cowan, C. A., Chien, K. R. & Melton, D. A. (2008) Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, *26*, 313-5.
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K. & Daley, G. Q. (2008) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, *134*, 877-86.
- Pick, M., Stelzer, Y., Bar-Nur, O., Mayshar, Y., Eden, A. & Benvenisty, N. (2009) Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, *27*, 2686-90.
- Placantonakis, D. G., Tomishima, M. J., Lafaille, F., Desbordes, S. C., Jia, F., Socci, N. D., Viale, A., Lee, H., Harrison, N., Tabar, V. & Studer, L. (2009) BAC transgenesis in

- human embryonic stem cells as a novel tool to define the human neural lineage. *Stem Cells*, 27, 521-32.
- Pruszek, J., Sonntag, K. C., Aung, M. H., Sanchez-Pernaute, R. & Isacson, O. (2007) Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem Cells*, 25, 2257-68.
- Pruszek, J., Ludwig, W., Blak, A., Alavian, K. & Isacson, O. (2009) CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells*, 27, 2928-40.
- Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., Consiglio, A., Castellà, M., Río, P., Sleep, E., González, F., Tiscornia, G., Garreta, E., Aasen, T., Veiga, A., Verma, I. M., Surrallés, J., Bueren, J. & Izpisua Belmonte, J. C. (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460, 53-59.
- Rugg-Gunn, P. J., Ferguson-Smith, A. C. & Pedersen, R. A. (2007) Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines. *Hum Mol Genet*, 16, R243-51.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O. & Jaenisch, R. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 136, 964-77.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- Terry, R. D., DeTeresa, R. & Hansen, L. A. (1987) Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann Neurol*, 21, 530-9.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q. & Benvenisty, N. (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6, 407-11.
- Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC. (2003) Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24, 321-31.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C. & Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463, 1035-41.
- von Bernhardi, R., Tichauer, J. E. & Eugenin, J. (2010) Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 112, 1099-114.
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M. & Rossi, D. J. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 618-30.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. & Thomson, J. A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I. & Thomson, J. A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324, 797-801.
- Yue XS, Fujishiro M, Toyoda M, Akaike T, Ito Y. (2010) Reprogramming of somatic cells induced by fusion of embryonic stem cells using hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E). *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 1053-7.

Zhang, Y., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. (2000) Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 7, 240-50.

日本臨牀 69 卷 増刊号 8 (2011 年 10 月 20 日発行) 別刷

# 認知症学 上

—その解明と治療の最新知見—

## II. 基礎編

認知症研究に用いられる動物・細胞実験モデル 各論

### 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)

八幡直樹 井上治久

## II. 基礎編

認知症研究に用いられる動物・細胞実験モデル

## 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)

Induced pluripotent stem cell

八幡直樹 井上治久

Key words : 疾患モデリング, 創薬開発

## はじめに

マウス線維芽細胞にレトロウイルスを用いて4つの初期化遺伝子を導入することにより、胚性幹(ES)細胞に匹敵する多分化能を有する細胞を樹立(初期化)できることが報告された<sup>1)</sup>。この細胞は、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)と命名され、翌年、ヒト線維芽細胞からiPS細胞が樹立された<sup>2,3)</sup>。iPS細胞作製技術によって、体細胞を初期化することにより疾患を有する患者自身の体細胞から、疾患特異的iPS細胞を経て、疾患の標的細胞を入手することが可能になった。iPS細胞を用いることにより神経変性疾患で多くを占める孤発性疾患を解析することが可能になる。また、神経変性疾患においては、神経細胞自身の要因だけでなく、周囲に存在するグリア細胞の神経変性への関与について報告がなされている<sup>4)</sup>。ヒトiPS細胞から神経細胞を含めた様々な細胞への分化誘導法の進展に伴い、更なる疾患メカニズムの解明が期待される。

本稿では、iPS細胞を利用した神経変性疾患研究の現状を概説するとともに、神経変性疾患の病態解明、創薬開発へ向けた疾患モデルとしての可能性を述べる。

## 1. iPS細胞の樹立

ヒトiPS細胞の樹立は、ES細胞で発現している転写因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-MycもしくはOct3/4, Sox2, Nanog, Lin28)をレトロウイルス、レンチウイルスにより皮膚線維芽細胞に導入することで成し遂げられた<sup>2,3)</sup>。iPS細胞はES細胞と同様に、胚様体形成による分化誘導を行うことにより、三胚葉すべてへの分化能力をもつ。iPS細胞の利点の一つは、少量の体細胞から作製可能という点であり、更に高齢者の皮膚細胞からの作製例も報告されている<sup>5)</sup>。よって、高齢認知症患者からでもiPS細胞の作製が可能である。作製されたiPS細胞は疾患患者の遺伝情報を受け継いでおり、疾患の病態メカニズムの解明に利用できる。

レトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いて作製したiPS細胞では導入した遺伝子のmRNAの発現は抑制される(サイレンシング)が、iPS細胞のゲノムには外来遺伝子が挿入される。特に、がん遺伝子であるc-Mycは、当初より再生医療における安全性の問題が懸念されていたが、後にc-Mycを用いない3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)のみ<sup>6)</sup>、あるいはc-Mycの代わりにL-Mycを用いた方法<sup>7)</sup>によって作製可能であることが報告されている。また、ゲノムへの外来

Naoki Yahata, Haruhisa Inoue: Department of Clinical Application, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University 京都大学 iPS細胞研究所 臨床応用研究部門

表1 神経疾患患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデリング

疾患	原因遺伝子	発症年齢	疾患表現型	参考文献
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1, 2</i>	乳幼児期～思春期	1. 脊髄運動神経細胞数の低下 2. SMN タンパク質の発現低下 3. 2の表現型をバルプロ酸投与で改善	Ebert AD, et al: Nature 457: 277-280, 2009.
家族性自律神経失調症	<i>IKBKAP</i>	乳幼児期	1. 神経堤細胞に分化させた際の異常スプライシング 2. 自律神経細胞数の低下・遊走能の低下 3. 1, 2の表現型をカイネチンで改善	Lee G, et al: Nature 461: 402-406, 2009.
レット症候群	<i>MeCP2</i>	乳幼児期	1. グルタミン酸作動性神経シナプス, スパイン数, 細胞体径の減少 2. シナプス減少の IGF1, ゲンタマイシンによる改善 3. 自発的カルシウム移行の減少 4. 自発的後シナプス電流の低下	Marchetto MC, et al: Cell 143: 527-539, 2010.
フリードライヒ失調症	<i>FXN</i>	主に若年期	1. iPS細胞における <i>FXN</i> GAA・TTCリピートの不安定性 2. 1の表現型を MSH2 抑制により改善	Ku S, et al: Cell Stem Cell 7: 631-637, 2010.
パーキンソン病	<i>LRRK2</i>	主に中年期以降	1. $\alpha$ -synuclein 蓄積の上昇 2. $H_2O_2$ , 6-OHDA, MG-132 投与によりドーパミン作動性神経細胞死の誘導	Nguyen HN, et al: Cell Stem Cell 8: 267-280, 2011.

遺伝子の挿入は疾患特異的 iPS 細胞の疾患再現に影響を与える可能性はある。この問題を解消する一つの方法としては、ゲノムの挿入されないベクターを用いた iPS 細胞を用いる樹立方法<sup>8,9)</sup>がある。iPS 細胞樹立にあたって利用される体細胞は皮膚線維芽細胞にとどまらず、様々な組織からの樹立が可能であり<sup>10)</sup>、適切な組織を選ぶことにより、より侵襲の少ない操作で iPS 細胞が作製できる可能性がある。

## 2. 神経変性疾患特異的 iPS 細胞研究の現状

神経変性疾患特異的 iPS 細胞の樹立に関しては、superoxide dismutase 1 (*SOD1*) の変異をもつ筋萎縮性側索硬化症患者皮膚細胞からの作製を皮切りに<sup>5)</sup>、パーキンソン病<sup>11,12)</sup>、ハンチントン病<sup>13)</sup>など、幾つかの報告がある。

これら疾患特異的 iPS 細胞の詳細な性状を正常細胞と比較解析することにより、これまで不明であった疾患の原因、発症メカニズムが解明される可能性がある。神経変性疾患特異的 iPS

細胞を利用し、疾患再現を示した報告としては、脊髄性筋萎縮症、家族性自律神経失調症、レット症候群、フリードライヒ失調症、パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を用いた報告などがある(表1)。これらの報告により、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した細胞を使って、病態を分子生物学、生化学的解析により評価可能であることが示された。更には、疾患特異的 iPS 細胞が創薬開発のためのスクリーニングに利用可能であることを示している。アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞の樹立に関して学会にて報告されている。今後の研究の展開が期待される。

## 3. iPS 細胞を用いた創薬開発

モデル動物や細胞株を使った評価系は、ヒトの病態や生理条件を必ずしも反映しておらず、創薬開発において、候補薬剤がヒトに対して効果が低い、あるいは副作用が確認されることで開発が中止になることも少なくない。ヒト iPS 細胞から分化誘導して得られる細胞を創薬開発や毒性評価などの前臨床試験に利用できれば、

より正確な薬効の確認、毒性評価を行うことができる可能性がある<sup>14)</sup>。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した標的細胞を使って薬剤スクリーニング系を構築する際には、その標的細胞を純度高く、大量に準備することが必要になる。これを実現するためには、目的の細胞を効率よく分化する技術に加え、その細胞を純化する技術が必要になる。iPS 細胞間の比較を行う際にも、クローン間での目的細胞への分化効率や分化速度が異なることが知られており、均一な状態で比較検討することが求められる。具体的には目的細胞特異的な表面抗原を認識する抗体で標識をした細胞をフローサイトメトリーで回収する方法などが提案されている<sup>15)</sup>。今後、疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬開発への応用には、更に効率の良い分化誘導・純化法の開発が望まれる。

#### 4. 神経変性疾患モデルとしての iPS 細胞の可能性

これまで、iPS 細胞作製技術を利用して疾患再現が行われた疾患は発生過程における異常がその病態に反映される疾患が多い。一方で加齢性の神経変性疾患は、発生過程における異常の存在は不明である。更に、神経細胞に分化誘導し、成熟化した後に初めて何らかの違いが見いだされる可能性がある。加齢変化を *in vitro* で再現するために、長期の培養や更には加齢を促進する培養条件の検討が必要かもしれない。

最近、パーキンソン病の原因遺伝子として知られている、leucine-rich repeat kinase 2

(*LRRK2*) 遺伝子の変異 (G2019S) を有する患者由来の iPS (G2019-iPS) 細胞を使った研究が報告された<sup>12)</sup>。中脳ドーパミン作動性神経に分化誘導し、コントロール細胞と比較を行ったところ、G2019-iPS 細胞において酸化ストレス経路にかかわる *HSPB1*, *NOX1*, *MAOB* といった遺伝子の発現上昇が存在していた。また、*LRRK2* の機能獲得型変異を特徴づける  $\alpha$ -synuclein の蓄積が G2019-iPS 細胞において有意に上昇していることが観察された。更に、過酸化水素や 6-hydroxydopamine, MG-132 の投与によって G2019-iPS 細胞から分化誘導したドーパミン作動性神経細胞の神経細胞死が誘導された。この報告では、疾患群、非疾患群の細胞がそれぞれ 1 クローンであるが、加齢性神経変性疾患モデルとしてのプラットフォームを提示している。

アルツハイマー病では患者の大部分が孤発性であり、遺伝的な原因が不明である。遺伝性の変異を有するアルツハイマー病患者から疾患特異的 iPS 細胞を作製し、病態を反映する神経細胞へ分化させて神経細胞の変性・細胞死のメカニズムを解明することにより、孤発性患者の治療法、創薬開発につながる知見が得られる可能性がある。

#### おわりに

本稿では、iPS 細胞の疾患モデルとしての現状および展望について述べた。iPS 細胞技術という革新的な技術が、今後、アルツハイマー病などの認知症の研究に利用されることで、病態解明、治療法開発が進展することが期待される。

#### ■ 文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
- 2) Takahashi K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
- 3) Yu J, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920, 2007.
- 4) Kuchibhotla KV, et al: Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* 323: 1211-1215, 2009.
- 5) Dimos JT, et al: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218-1221, 2008.
- 6) Nakagawa M, et al: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and



- human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**: 101–106, 2008.
- 7) Nakagawa M, et al: Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 14152–14157, 2010.
  - 8) Okita K, et al: Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* **5**: 418–428, 2010.
  - 9) Fusaki N, et al: Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**: 348–362, 2009.
  - 10) Aoi T, et al: Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**: 699–702, 2008.
  - 11) Soldner F, et al: Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**: 964–977, 2009.
  - 12) Nguyen HN, et al: LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* **8**: 267–280, 2011.
  - 13) Park IH, et al: Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**: 877–886, 2008.
  - 14) Inoue H, Yamanaka S: The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther* **89**: 655–661, 2011.
  - 15) Yuan SH, et al: Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS One* **6**: e17540, 2011.



# 眼科領域と iPS 細胞

江川 齊宏, 井上 治久

---

「神経眼科」 第 28 卷 第 4 号 別冊

---

Neuro-ophthalmology Japan Vol.28. No.4.

平成 23 年 12 月 25 日発行

日本神経眼科学会

## 眼科領域とiPS細胞

江川 齊宏, 井上 治久

京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門

### iPS Cells and RNA Splicing in Ophthalmologic Disease

Naohiro Egawa, Haruhisa Inoue

Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University

#### はじめに

本邦において見出された人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell), いわゆる iPS細胞は, 移植治療を中心とした再生医療への応用以外に, 疾患病態再現という新しい研究分野を広げている. 本稿では, iPS細胞を用いた眼科疾患領域の病態再現とその新規治療の可能性について, 最近の知見と合わせて概説する.

#### iPS細胞

2006年高橋らは, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycという転写因子(いわゆる山中4因子)を組み込んだレトロウイルスベクターを用いてヒト皮膚線維芽細胞に導入することにより, iPS細胞を樹立することに成功した<sup>1)</sup>. iPS細胞は, 胚性幹細胞と同様にほぼ限りなく増殖することができるその無限性と理論的にはあらゆる細胞や組織に分化誘導されるといふ多能性をもちあわせており, これらの理由により, いわゆる万能細胞と呼ばれている. さらに, 脊髄性筋萎縮症あるいは家族性自律

神経失調症の患者由来の皮膚線維芽細胞から iPS細胞が樹立された. それらを疾患組織や神経細胞に分化誘導すると, 疾患と類似した病態を示すことが示された<sup>2,3)</sup>. これは, iPS細胞を用いたヒト培養細胞系で疾患の病態を特異的に再現できること, つまり疾患モデリングが可能であることを意味しており, 希少疾患や難治性疾患の治療に光明をもたらした. 最近では2011年Jinらによって成人中途失明の大きな原因である網膜色素変性症においても疾患モデリングが可能であることが報告された<sup>4)</sup>.

#### 網膜色素変性症 (Retinitis Pigmentosa; RP) とは

4000人に一人の割合で罹患し, 進行性網膜変性により, 進行性夜盲, 求心性視野狭窄, 羞明を主症状とする疾患である. 病理学的には, 網膜において網膜色素上皮の変化とともに視細胞とくに光刺激を受容する桿体細胞の変性脱落が特徴である. 孤発性が最も多く, 家族性では常染色体優性, 常染色体劣性, 伴性劣性遺伝がある. 原因遺伝子は多くが報

別刷請求宛先: 井上治久 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門

Reprint Requests to: Haruhisa Inoue, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, 53 Kawahara-Cho Shogoin Sakyoku, Kyoto 606-8507, Japan

告されており、その大部分は網膜に特異的に発現する遺伝子である。(表1)最近、網膜以外の組織にも非特異的に発現する4つの原因遺伝子(PRPF31, PRPF8, PRPF3, PAP1)が同定されたが、興味深いことには、それらはいずれもRNAスプライシングに関係する遺伝子であることが分かった<sup>4)</sup>。(表2)すなわち、すべての細胞に発現しているRNAスプライシングの異常が、選択的に網膜視細胞の変性脱落を引き起こしており、孤発性網膜色素変性症の病態メカニズムに関わっている可能性が示唆された。RNAスプライシングは、網膜色素変性症以外にも先述した脊髄性筋萎縮症を含む神経変性疾患の多くの病態に関わっていることが明らかになっている。脊髄性筋萎縮症あるいは家族性自律神経失調症ではiPS細胞を用いて、スプライシング異常を補正する薬剤スクリーニングが可能であることが示された。これはRNAスプライシング疾患においてiPS細胞を用いた薬剤開発が可能であることを示している。以下では、RNAスプライシングの観点から、網膜色素変性症の発症メカニズムについて述べる。

### RNAスプライシングと網膜色素変性症

セントラルドグマにしたがって、メッセン

ジャーRNA(mRNA)は核内のゲノムDNAから転写されるが、それまでにはいくつかの成熟過程が必要である。転写されたばかりのmRNA前駆体(これをpre-mRNAと呼ぶ)は、キャッピング、ポリA付加、スプライシングとよばれる様々な修飾を受けて最終的にmRNA(mature mRNA)となり、成熟したmRNAはやがてタンパク翻訳のために細胞質へ運ばれる。このpre-mRNAからmature mRNAへの修飾過程をRNAプロセッシングと呼び、この過程には、多くのRNA結合タンパクや、タンパク情報を含まない小分子RNA(non-coding RNA)が関与している。

スプライシングとは、pre-mRNAのタンパク情報を含まない介在配列(イントロン領域とよばれる)を除去してタンパク情報を含む配列(エクソン領域と呼ばれる)をつなぐ役割を担っている。スプライシングには、5種類(U1, U2, U4, U5, U6)の核内低分子RNA(small nuclear RNA; snRNA)、そのsnRNAに結合するタンパク質snRNPとそれらに結合する様々な蛋白から構成される構造物(これをスプライソソームとよぶ)によって触媒されて、mRNAが産生される。スプライシングの過程において、スプライソソームはつぎつぎとその構成成分を変化させる。(図1)

表1 常染色体優性遺伝の網膜色素変性症の原因遺伝子

原因遺伝子	コードする蛋白の名称	機能	発現部位
RHO	Rhodopsin	光刺激の伝達	光受容体
RDS	Peripherin	光受容体の構成成分	光受容体
ROM1	Retinal outer segment membrane protein1	光受容体の構成成分	光受容体
FSCN2	Fascin2	アクチンフィラメントの重合	光受容体
CRX	cone-rod otx-like homeobox transcription factor	転写因子	光受容体
NRL	neural retina leucine zipper transcriptional factor	転写因子	光受容体
RP1	reinitis pigmentosa type 1	微小管関連タンパク	光受容体
IMPDH1	Insine monophosphate dehydrogenase 1	グアニン合成律速段階酵素	網膜, 肺, 脳
PRPF31	Pre-mRNA splicing factor	スプライシングの調節	全身
HPRP3	Pre-mRNA splicing factor	スプライシングの調節	全身
PRPC8	Pre-mRNA splicing factor	スプライシングの調節	全身
PAP1	Pre-mRNA splicing factor	スプライシングの調節	全身

先述した網膜色素変性症の4つの原因遺伝子のうちの3つの遺伝子PRPF31, PRPF8, PRPF3は、いずれも、U4/U5, U6のスプライソーム集合体を構成する蛋白をコードしており、スプライソームの形成には必須の遺伝子であることが明らかになった。(図1) また、残りのPAP1もPRPF3と相互作用をもつ上でU4/U6, U5複合体の形成に重要な機能をもっている。これらの遺伝子の異常により家族性の網膜色素変性症が引き起こされる

ことから、スプライシングにおいてU4/U6, U5複合体形成に何らかの障害が起こり、病態が引き起こされると考えられる。それでは、どのような障害によって選択的な視神経細胞死が起こりうるのかについていくつかの可能性について述べる。

### 網膜色素変性症の発症の分子メカニズム

#### ① スプライシング機能ハプロ不全 (haplo-insufficiency)

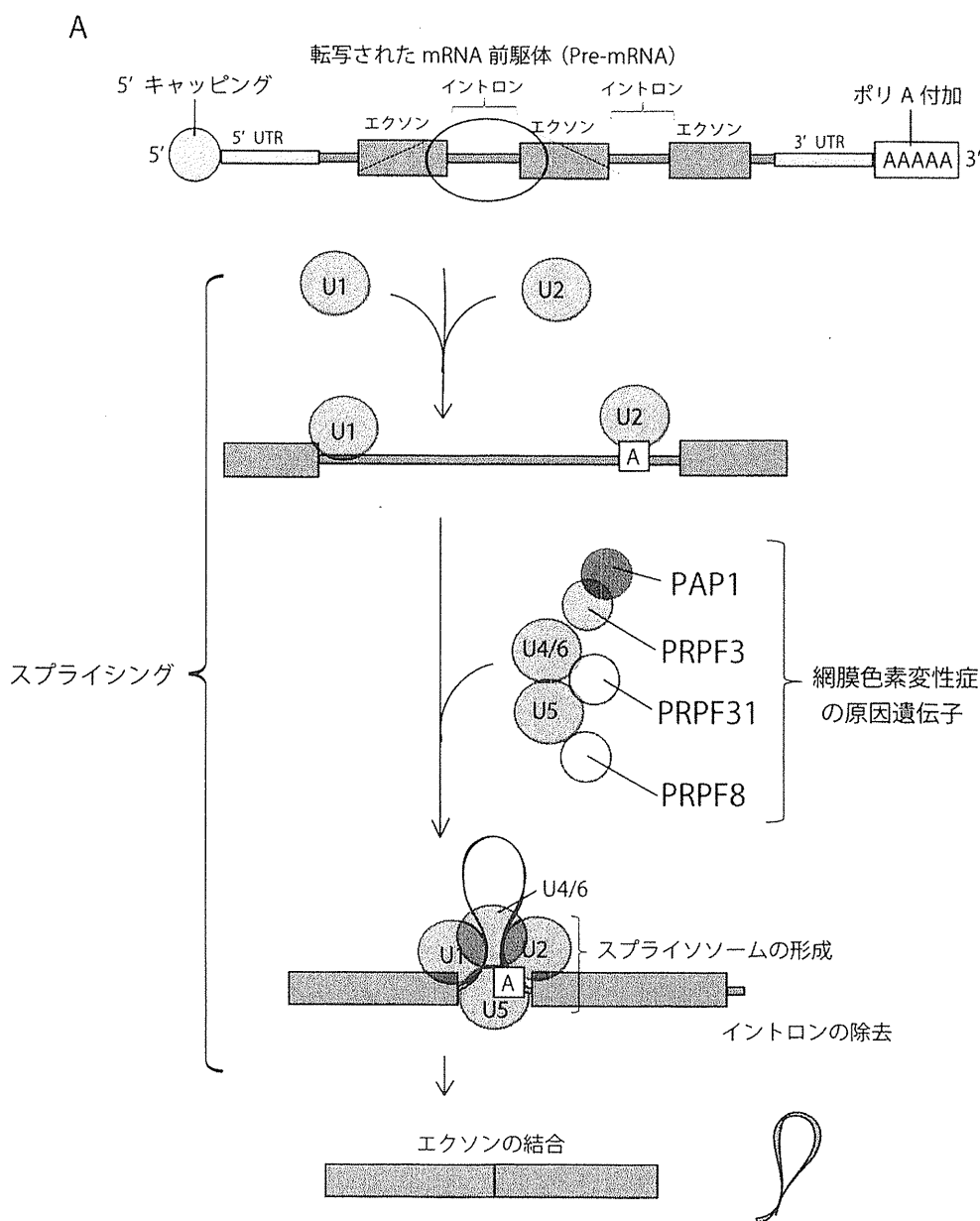


図1 RNA スプライシングと網膜色素変性症

これまで家族性網膜色素変性症において、PRPF31では、エクソン、イントロン領域問わない変異、PRPF8, PRPF3, PAP1 遺伝子異常はいずれもエクソン領域の変異が報告されている<sup>5)</sup>。イントロン領域の変異ではいずれもPRPF31そのものの変異型mRNAが形成されることから、いずれの遺伝子異常においても、変異型タンパクが翻訳されて、正常な機能が低下している可能性がある。ゲノムの正常なアレルでは、たとえ正常なタンパクが発現されても、変異のあるアレルからは機能不全のタンパクが発現され、全体として桿体細胞を中心とした視細胞の機能維持に必要な機能を達成できない、つまりハプロ不全(haploinsufficiency)による発症の可能性があげられる。網膜では、常に細胞の脱落と新生が盛んであり、mRNAと蛋白の発現の需要が高い部位であるため、組織特異性障害を引き起こす可能性がある。実際にPRPF31異常の網膜色素変性症患者由来のリンパ球におけるPRPF31蛋白発現量とその重症度には、相関があるとされる報告がある<sup>6)</sup>。

② スプライシング律速異常 (dominant negative)

PRPF31の遺伝子をノックアウトするとU4/U6 U5複合体が形成されず、PRPF3の遺伝子異常によりU4/U6 U5複合体の形成が阻害されることが報告されている<sup>7)</sup>。変異のあるゲノムから産生された不活性型の変異型蛋白が、活性型の正常な蛋白よりも優位になり、全体としてU4/U6 U5複合体の形成が抑制され、(dominant negative)この過程がスプライシングの律速段階となっている可能性がある。このスプライシングの速度の低下が、より迅速なmRNAとタンパクの合成を必要とする視細胞において特異的な機能障害を引き起こす可能性がある。しかしながらそれら

を示唆する報告は現時点ではみられない。

③ 転写産物が引き起こす毒性の獲得 (gain of function)

翻訳された変異型蛋白によって桿体細胞が毒性を獲得する場合 (gain of function) には、積極的な変性がおこる可能性がある。初代網膜細胞において、変異型RPPF31がロドプシンのpre-mRNAのスプライシングを抑制し、変異型PRPF31を過剰発現することによってロドプシン陽性細胞の細胞死を引き起こすことが報告されている<sup>8)</sup>。これは網膜色素変性症の主要な遺伝子RHOとPRPF31を結びつける興味深い報告である。

④ 自己制御機構の破綻 (autodysregulation)

SR蛋白などスプライシングに関わるRNA結合タンパクの発現量は、自己制御機構によって厳密に制御されていることが知られている。すなわち、RNA結合蛋白が自らのpre-mRNAに結合して、その発現を抑制することによってネガティブフィードバックとして自らの発現をコントロールしている。仮にRNA結合部位の遺伝子変異により、RNA結合蛋白が結合できなくなれば、自ら発現量を制御できなくなるために、スプライシング因子の発現量の変化にともなうスプライシング調節障害がおこる可能性が考えられる。

以上のような病態メカニズムの仮説が挙げられるが、実際にこれらを疾患のヒト網膜細胞の中で検討することが必要である。仮説を実証するためには、病態を修飾(増悪, 抑制)する因子を変化させて得られた結果を時系列のなかで比較検討するが、これまでヒト組織の研究対象(疾患モデル)が存在しなかった。iPS細胞はヒト疾患モデルを提供することで

できる。

### iPS細胞と網膜色素変性症

Jinらは網膜色素変性症由来のiPS細胞から網膜細胞を分化誘導し、長期培養系の中で細胞の変性が起こることを報告した<sup>4)</sup>。PR1, PRPH2, RHO, PAP1の遺伝子変異のあるiPS細胞から網膜桿体細胞を分化誘導して、ロドプシン陽性細胞が出現する120日から150日の長期培養期間において、ロドプシン陽性細胞数を比較すると、疾患群において明らかに細胞数の経時的減少を認めた。とくにPAP1変異では酸化ストレスをともなってアポトーシスをおこしており、抗酸化剤 $\alpha$ -tocopherolの投与により細胞死が抑制された。この報告は、疾患由来のiPS細胞を網膜細胞に分化させることにより、その病態の再現が可能であり、さらに治療薬の効果を検討することが可能であることを示している。網膜色素変性症に対する $\alpha$ -tocopherolの治療効果は、最終的な臨床試験においては有意差が得られなかったが、PAP1変異の疾患を対象に絞ることでその効果が期待できるかもしれないと筆者らは述べている。

### 終わりに

難治性疾患の原因遺伝子が同定されたのち、トランスクリプトーム、プロテオーム、インタラクトームを用いて、転写因子、蛋白レベルで様々な因子の相互作用を網羅的な解析が可能になった。しかしながら、これらの相互関係が、いかにヒト組織において罹患部位の特異性をあたえているのか、いかなる原因と結果をもって疾患の表現形に関係しているか、については十分に検討する余地があ

ると考える。その過程で、iPS細胞は疾患の表現形を再現し、仮説を検討するツールとして非常に有用であると考えられる。疾患特異的iPS細胞を用いた病態の解析が、近い将来に難治性眼科領域の治療開発の突破口になるであろう。

### 文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663–676, 2006
- 2) Ebert AD, Yu J, et al: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**: 277–280, 2009
- 3) Lee G, Papapetrou EP, et al: Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* **461**: 402–406, 2009
- 4) Jin ZB, Okamoto S, et al: Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One* **6**: e17084
- 5) Mordes D, Luo X, et al: Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Mol Vis* **12**: 1259–1271, 2006
- 6) Vithana EN, Abu-Safieh L, et al: Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4204–4209, 2003
- 7) Weidenhammer EM, Ruiz-Noriega M, et al: Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 3580–3588, 1997

Annual Review

# 神 經

編 集 | 鈴木 則宏 慶應義塾大学教授  
| 祖父江 元 名古屋大学教授  
| 荒木 信夫 埼玉医科大学教授  
| 宇川 義一 福島県立医科大学教授  
| 川原 信隆 横浜市立大学教授

Ann Intern Med  
New Engl J Med  
Circulation  
Lancet  
Ann Rev Biochem  
Ann Surg  
Nature  
Ann Rev Immunol  
Ann Intern Med  
JAMA  
Science  
Ann Neurol  
Gastroenterology  
Cell  
J Natl Cancer I  
Annu Rev Neurosci

中外医学社

# 2012



- 2) 脳の可塑性…………… 〈野中美応 金 亮 奥野浩行 尾藤晴彦〉 43

回路可塑性とシナプス可塑性：情報処理の重層性・階層性の意義  
シナプス可塑性を規定するシグナル伝達機構 シナプス可塑性長期化における CREB 依存的遺伝子発現制御の重要性 シナプスでのタギングとキャプチャー：回路可塑性とシナプス可塑性の接点を  
目指して

#### 4. 画像

- 1) 認知症のアミロイド分子イメージング…………… 〈岡村信行〉 50

PiB を用いたアミロイドイメージング PiB-PET による発症前診断の可能性 PiB-PET の特異性について PiB 以外のアミロイド PET トレーサー タウイメージングの可能性

- 2) 320 列 Area Detector CT を用いた CT 灌流画像・Dynamic CTA

〈村山和宏 片田和広 早川基治 大家祐実〉 59

CT 灌流画像 (CTP) Dynamic CT angiography (CTA)

## II. 本年の動向

- 1) 片頭痛の新たな予防治療…………… 〈清水利彦〉 68

片頭痛予防薬と片頭痛の病態 ベータ遮断薬 カルシウム拮抗薬 アンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン II 受容体遮断薬 抗うつ薬 抗てんかん薬 サプリメント  
その他

- 2) 認知症治療薬の新たな展開…………… 〈下濱 俊〉 75

コリン仮説に基づく治療薬開発の経緯 ガラントミン リバスチグミン メマンチン

- 3) 心原性脳塞栓症予防における新たな経口抗凝固薬…………… 〈矢坂正弘〉 85

作用機転 脳梗塞予防効果 出血性合併症 非弁膜症性心房細動患者への投与の実際 モニタリング 食事や薬物影響  
吸収と代謝

- 4) iPS 細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究…………… 〈今村恵子 井上治久〉 92

疾患特異的 iPS 細胞の樹立と疾患モデルの作製 iPS 細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究の課題と今後の展望

- 5) RNA 異常と神経疾患…………… 〈大野欽司〉 97

正常スプライシング機構 スプライシングシス因子の破綻  
スプライシングトランス因子の発現異常・機能異常 RNA gain-of-function diseases

## 4) iPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究

京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門 今村恵子

同 臨床応用研究部門 井上治久

**key words** iPS cell, disease modeling, drug screening, neurodegenerative disease, psychiatric disease

### 要 旨

人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell (iPS細胞) は、体細胞に胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞) で発現している数種類の遺伝子を導入することにより作製され、ES細胞と同様に様々な系譜の細胞に分化させることができる。iPS細胞作製技術の開発により、患者自身の遺伝子情報を有した疾患標的細胞の作製が可能となった。また、原因遺伝子が同定されている疾患だけでなく、遺伝歴のない孤発性疾患においても疾患標的細胞の作製が可能である。本稿では、2007年にヒトiPS細胞作製が可能となってから現在までのiPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究について述べる。

### 動 向

中枢神経は体の深部に位置すること、再生が難しいことなどから、ヒトにおける神経疾患の直接的な病態の解析は困難である。そのため、神経・精神疾患の研究では動物モデルや細胞モデルによる間接的な解析が中心である。近年、様々な遺伝子操作された疾患モデル動物が作製され、神経・精神疾患の病態解明が急速に進んでいる。しかし、疾患モデル動物で有効であると証明された薬剤が

ヒトにおける臨床研究で有効性を認めないことも少なくはない<sup>1)</sup>。その原因として、ヒトとモデル動物の遺伝子発現の違いや解剖学的な違いが関与していることなどが考えられる<sup>2)</sup>。

2006年にマウス<sup>3)</sup>、2007年にヒト<sup>4)</sup>人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell (iPS細胞) が作製された。ヒトiPS細胞は、胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞) で発現している4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) をレトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞に導入することで体細胞を初期化し (リプログラミング)、多能性幹細胞が樹立された。iPS細胞はES細胞に匹敵する多能性を獲得した多能性幹細胞であり、ほぼ無限に増殖し、内胚葉・中胚葉・外胚葉への分化能力を有している。移植後に腫瘍化がみられることがあるため、近年では、より腫瘍化しにくいiPS細胞の樹立方法が開発されている<sup>5,6)</sup>。

iPS細胞作製技術の開発により、患者自身の体細胞からiPS細胞を樹立することで、患者の遺伝子情報を有した神経細胞の作製が可能となった。iPS細胞はすでに原因遺伝子が同定された疾患だけでなく、原因遺伝子が明らかにされていない疾患においてもモデル細胞となり得る利点がある。

## A. 疾患特異的iPS細胞の樹立と疾患モデルの作製

iPS細胞作製技術を用いて、様々な神経・精神疾患患者の体細胞から疾患iPS細胞が作製されている(表1)。iPS細胞を樹立後、疾患標的細胞への分化誘導が行われる。例えば、筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis(ALS) 患者由来iPS細胞では、retinoic acid, sonic hedgehogの添加により神経前駆細胞から脊髄運動神経細胞が誘導される<sup>7)</sup>。また、パーキンソン病患者由来iPS細胞からは、sonic hedgehog, fibroblast growth factor (FGF) 8の添加によりドパミン神経細胞が誘導されている<sup>8)</sup>。現在、iPS細胞が作製されている主な神経・精神疾患を以下に記載する。

1. パーキンソン病(Parkinson's Disease)

2009年にSoldnerらは50歳代から80歳代の5人の孤発性パーキンソン病患者の線維芽細胞より

表1 主な神経・精神疾患患者由来iPS細胞を用いた論文報告

疾患	遺伝形式	遺伝子異常	再現された表現型	reference
パーキンソン病	孤発性	-	-	Soldner 2009 <sup>8)</sup>
パーキンソン病	常染色体劣性遺伝	<i>LRRK</i> (G2019S)	酸化ストレス下で caspase-3の増加, ドパミン神経細胞死の増加	Nguyen 2011 <sup>10)</sup>
パーキンソン病	常染色体劣性遺伝	<i>PINK1</i> (Q456X, V170G)	ストレス下でドパミン神経細胞における Parkin 蛋白のミトコンドリア移動の障害	Seibler 2011 <sup>11)</sup>
筋萎縮性側索硬化症	常染色体優性遺伝	<i>SOD1</i> (L144F)	-	Dimos 2008 <sup>7)</sup>
筋萎縮性側索硬化症	常染色体優性遺伝	<i>SOD1</i> (L144F, G85S)	-	Boulting 2011 <sup>12)</sup>
脊髄性筋萎縮症1型	常染色体劣性遺伝	<i>SMN1</i> deletion	運動神経細胞の減少, 細胞体の小型化, SMN 蛋白の発現量低下	Ebert 2009 <sup>13)</sup>
ハンチントン病	常染色体優性遺伝	<i>IT15</i> (72CAG repeats)	-	Park 2008 <sup>14)</sup>
フリードライヒ運動失調症	常染色体劣性遺伝	<i>FXN</i> (GAA expansion)	-	Ku 2010 <sup>15)</sup> Liu 2011 <sup>16)</sup>
家族性自律神経失調症	常染色体劣性遺伝	<i>IKBKAP</i> (homozygous 2507+6T>C)	スプライシング異常, 神経細胞数の減少および遊走能の低下	Lee 2009 <sup>17)</sup>
統合失調症	孤発性	<i>DISC1</i> (4bp deletion at the exon-intron 12 region)	-	Chiang 2011 <sup>18)</sup>
統合失調症	孤発性	-	synaptic connectivityの低下	Brennand 2011 <sup>19)</sup>
レット症候群	X染色体優性遺伝	<i>MeCP2</i> (1155 del32; Q244X)	神経細胞体の小型化, シナプス数の減少, 電気生理学的機能の異常	Marchetto 2010 <sup>20)</sup>
レット症候群	X染色体優性遺伝	<i>MeCP2</i> (Δ exon 3-4; T158M)	神経細胞体の小型化	Cheung 2011 <sup>21)</sup>

iPS細胞を樹立した<sup>8)</sup>。2011年、Nguyenらは遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子のひとつである *Leucine Rich Repeat Kinase-2 (LRRK2)* 遺伝子にG201S変異を有する患者からiPS細胞を作製し、ドパミン神経細胞に分化させた。これまでのパーキンソン病研究から、変異*LRRK2*の過剰発現により $\alpha$ -synucleinが蓄積することが示されている<sup>9)</sup>。線維芽細胞やiPS細胞には $\alpha$ -synucleinの蓄積はみられなかったが、神経細胞に分化誘導することにより、細胞内に $\alpha$ -synuclein蛋白の蓄積を生じた。また、*LRRK2*遺伝子異常を有する患者由来iPS細胞から分化させた神経細胞では、酸化ストレス関連遺伝子の発現増加がみられた。さらに、hydrogen peroxide, MG132, 6-hydroxydopamineによるストレスに対して、caspase-3の活性化や細胞死がコントロールよりも有意に惹起された<sup>10)</sup>。

Seiblerらは、*PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)* 遺伝子異常を有する遺伝性パーキンソン病患者3人からiPS細胞を作製した。これらのiPS細胞をドパミン神経細胞に分化させたところ、ストレス下でのParkin蛋白のミトコンドリアへの輸送の障害がみられた。この所見はレンチウイルスでPINK1蛋白を過剰発現することにより改善した<sup>11)</sup>。

## 2. ALS

Dimosらは、遺伝性ALSの原因遺伝子のひとつである*SOD1* 遺伝子のL144F変異を有する82歳と89歳の高齢患者の線維芽細胞からiPS細胞を作製し、下位運動神経細胞のマーカーであるHB9およびISLET1/2陽性を示す運動神経細胞へ分化誘導を行った<sup>7)</sup>。Boultingらは、*SOD1* 遺伝子のG85S変異、L144F変異を有する患者由来のiPS細胞を作製した。運動神経細胞へ分化誘導し、免疫染色法および電気生理学的手法を用いて、作製した運動神経細胞の評価を行っている<sup>12)</sup>。し

かし、現時点ではALSにおけるiPS細胞を用いた病態再現は報告されていない。

## 3. 脊髄性筋萎縮症 spinal muscular atrophy (SMA)

SMAは下位運動神経細胞が障害される疾患で、乳児期に発症する重症型のtype1、中間型のtype2、18カ月から思春期の間に発症する軽症型のtype3がある。Ebertらは、3歳のtype1患者由来のiPS細胞を作製し、脊髄運動神経細胞に分化させた。コントロールに比較して脊髄運動神経細胞数の減少と細胞体の小型化がみられた。また、SMN蛋白の発現低下がみられた。このSMN蛋白の減少は、histone deacetylase阻害薬であるvalproic acidやtobramycinによって改善した<sup>13)</sup>。

## 4. ハンチントン病 Huntington disease

Parkらは、*IT15* 遺伝子に伸長CAG repeatを有する20歳の患者からiPS細胞を樹立し、作製したiPS細胞におけるCAG repeatの伸長を示した<sup>14)</sup>。

## 5. 脊髄小脳変性症 spinocerebellar degeneration

脊髄小脳変性症のひとつである、フリードライヒ運動失調症患者由来のiPS細胞が作製されている。フリードライヒ運動失調症は常染色体劣性遺伝を呈し、神経変性と心筋障害などを呈する。原因遺伝子*frataxin*のイントロンのGAAリピート伸長がみられる。Kuらは、フリードライヒ運動失調症患者由来iPS細胞を樹立したところ、クローンによるCAGリピートの不安定性がみられた<sup>15)</sup>。Liuらは、2人の患者からiPS細胞を作製した。作製されたiPS細胞では、GAAリピートの伸長と*frataxin* mRNAの減少を認めた<sup>16)</sup>。