

2011-22016B

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 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

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 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

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 11
-
- ### II. 研究成果の刊行に関する一覧表 19
-
- ### III. 研究成果の刊行物・別刷り 28

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、他に 2 つのヒット化合物が濃度依存的に、細胞毒性を示すことなく、特異的及び部分的に SOD1 の発現を抑制することを見出した。その特徴的な化学構造を共通して持つ、FDA に承認されている既存薬 X が、運動ニューロン毒性を有する ALS 患者 iPS 細胞由来アストロサイトの SOD1 の転写を抑制することを見出した。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 関連家族性 ALS の治療薬開発に強力な手段となりうると考えられる。また、病原蛋白の発現を、モデルマウスおよび患者 iPS 細胞由来疾患標的細胞で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りうる。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

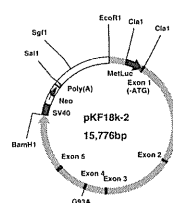
来アストロサイトでも SOD1 転写抑制作用を示し、かつ明らかな細胞毒性の有無についても検討した (研究分担者井上)。

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) SOD1 プロモータ下にルシフェラーゼ・レポーターを発現する細胞株の作製



5' 及び 3' 非翻訳領域を含む、ヒト SOD1 のゲノム・プロモータを用いた (左図)。

このコンストラクトは SOD1 トランスジェニックマウスを作成するのに用いられたものである。そのカセットは SOD1G93A トランスジェニックマウスのもと同じ (gPrSOD1-Luc) で、SOD1 プロモータの生理活性を反映するものである。5' -EcoR1 と 3' -AfeI-BamH1 サイトを含む、計 1.2Kb のヒト SOD1 の 5' 側断片を、PfuUltra 2 Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene, Ceder Creek, TX) を用いて増幅した。次に示す PCR プライマーを用いた: forward primer, 5' -AAAGAATTCTGCCAACCAAATAG-3'; reverse primer, 5' -TTTGGATCCAGCGCTGAAGCCGAAAGCGGAG-3'。断片は pKF18k-2 plasmid (Takara, Otsu, Japan) に入れクローニングした。ClaI サイトを加え、SOD1 エクソン 1 の開始コドン除去するため、カセットは PfuUltra 2 Fusion HS DNA Polymerase で、次の PCR primers を用いて増幅した: forward primer, 5' -GTTATCGATGCGACGAAGGCCGTGT-3'; reverse primer, 5' -TCGCTAGGCCACGCCGAGG-3'。断片は EcoR1 と AfeI で切断し、pKF18k-2-hSOD1G93A に入れクローニングした。SV40-Neo-Poly(A) を SOD1 遺伝子の下流に、BamH1 と SalI サイトの間に組み入れた。最後に、marine copepod, *Metridia longa* (Clontech, Mountain View, CA, USA) 由来の分泌型ルシフェラーゼ遺伝子 (MetLuc) に ATG を付けたものを ClaI サイトで加えた。H4 細胞株は 37°C で、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) に 10% (v/v) 胎児ウシ血清 (FBS)、50 U ml⁻¹ penicillin、50 μg ml⁻¹ streptomycin、及び 200 μg ml⁻¹ G418 (Nacalai, Kyoto, Japan) を加えたもので培養した。SOD1 ゲノム構造を SgfI で切断したものを FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland) でトランスフェクションし、恒常的に発現する株をクローニングした。クローン選別は、サザン・ブロットングで分泌型ルシフェラーゼが高発現していることを確認し、ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイで反応性をみて選別した。サザン・ブロットングは、15 μg の DNA を EcoR1 と BamH1 で切断したものをを用いた。プローブは以下を使用した: forward primer, 5' -ATCTGGGAGACCATGGAAGT-3'; reverse primer, 5' -TTCTTTGAAGCCGCTGATCTC-3'。

(b) 使用化合物ライブラリ

gPrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を用いた HTS アッセイを行い、京都大学化学研究所から供与された 9,600 化合物をスクリーニングした。ライブラリは 96 ウェルのラックに入れ、各化合物は DMSO で 5 mM に溶解されて供与された。最右端と最左端のウェルは化合物を含まない DMSO のみが入っており、アッセイプレート上で対応するウェルに対照群を用いることができるようになっていた。全ての化合物は -20°C で保存した。

(c) HTS アッセイ

PrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を種々の低分子化合物で処理し、白色、平底 96 ウェルプレート (Costar, Bethesda, MD) でルシフェラーゼの発現をアッセイにて検出した。細胞は 3.0 × 10⁴ cells well⁻¹、37°C、overnight で前培養した。テストした化合物は先にプレート上で培地に 50 μM に希釈された。各ウェル 100 μL の内 80 μL を交換し、最終濃度を 40 μM とするにした。細胞はその後さらに 16 時間、37°C で培養した。各化合物で処理した細胞内の SOD1 遺伝子発現を観察するため、細胞から分泌されるルシフェラーゼ蛋白の

活性を測定した。各ウェルの細胞培地を 96 ウェル・アッセイ・プレートの対応するウェルに、Multifunction Tabletop Dispenser EDR-384S2 (Biotec, Tokyo, Japan) を用いて移した。Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System (Clontech) を加え、1420 VICTOR 3 Multilabel Plate Reader with optional dispenser (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。vehicle で処理した群との比を用いて信号の自然減衰を補正した。アッセイの制度は Z factor (Z') で評価した。Z' は以下の

$$Z' = 1 - \frac{3 \times (\sigma_{C+} + \sigma_{C-})}{(\mu_{C-} - \mu_{C+})}$$

等式で定義される:

μ_{C+} と σ_{C+} は各々陽性対照群の平均値と標準偏差 (SD); μ_{C-} と σ_{C-} は各々陰性対照群の平均値と標準偏差 (SD) である。陽性対照は、10 μg mL⁻¹ mitomycin-C (Wako, Osaka, Japan) で処理した細胞を用いた。13 陰性対照は、vehicle (DMSO) で処理した細胞を用いた。Z' 値は、アッセイの質を評価する指標で、シグナルの幅の大きさ ($\mu_{C-} - \mu_{C+}$) とアッセイの精緻性 ($\sigma_{C+} + \sigma_{C-}$) を持って評価する。化合物をヒットとして選別する条件は、陰性対照の (平均値 - 3SD) を下回るルシフェラーゼ活性である場合とした。各試行 4 ないし 5 ライブラリ・プレートをアッセイし、その際、Z' 値計測と陰性対照の平均値及び SD を計測するためのプレートを同時にアッセイした。Z' 値が 0 未満の試行から得たヒット化合物は選別から外した。ヒット化合物の SOD1 発現に対する効果を確認するため、さらに 2 回アッセイを行い、ルシフェラーゼ活性が陰性対照の (平均値 - 3SD) をどちらも下回るかをチェックした。

(d) 濃度依存性試験及び細胞毒性試験

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 μM 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 μM 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 μM に濃度を振る。さらに 16 時間培養し、WST-1 を 10 μL 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 μM 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。

(e) ELISA アッセイ

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) とウエスタン・ブロットングによって、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OptEIAM 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。

(f) 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'。

(g) 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)。

(h) 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。

(i) 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。

(j) 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)。

(k) 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。

(l) 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のエキソン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)。

(m) 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。

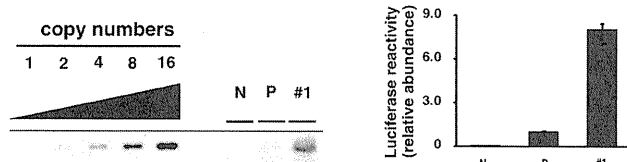
(倫理面への配慮)

京都大学医学部倫理委員会に承認を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析研究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。

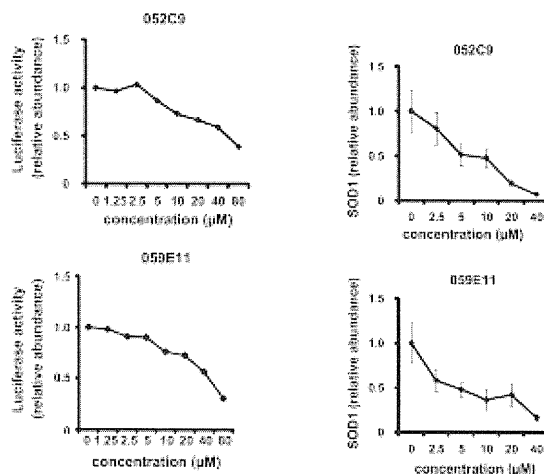
C. 研究結果

(a) HTS アッセイ

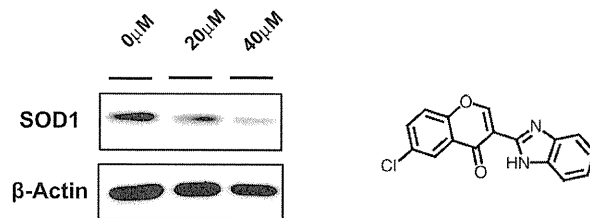
ルシフェラーゼ活性とサザン・ブロットングの結果より(下左右図)、gPrSOD1-Lucを恒常的に発現するクロー



ンは、ゲノム由来のSOD1プロモータのコントロール下に分泌型ルシフェラーゼを発現しており、SOD転写を抑制する化合物を同定のため使用した。gPrSOD1-Lucを用いたHTSアッセイの再現性は良好で、Z'値の平均値は0.39 (range, -0.04-0.75)であった。Z'値が0未満となる試行は1回のみであった。この1回の試行からは我々はヒット化合物を選別しなかった。各化合物の効果は、vehicleで処理した群と比較したルシフェラーゼ活性低下の程度で表された。HTSアッセイ、2回の再現性試験及び濃度依存性試験を行い、我々はSOD1の転写を有意に抑制するヒット化合物を120種類同定した。濃度依存性反応の乏しい化合物は除外した。WST-1アッセイにより非特異的細胞毒性を有すると考え除外した化合物は5種類あった。ELISAにて、残り115化合物の内、2種類が内因性SOD1蛋白レベルを濃度依存的に低下させた。ELISAで有意なSOD1蛋白レベルの低下を認めない化合物は採用しなかった。レポーター・アッセイ(下左図)及びELISA(下右図)でSOD1の発現抑制効果



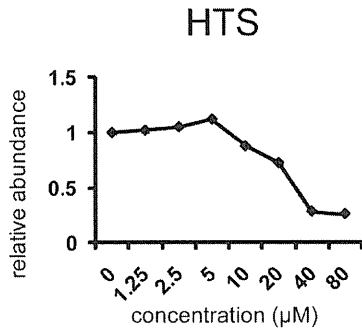
を解析したところ、2化合物の内、50% effective concentration (EC50) が良好な方の1化合物052C9をウェスタン・ブロットングにてさらにその効果を検証した。選別した化合物は、H4細胞において、β-アクチンの発現を低下させることなく、内因性SOD1蛋白レベルを有意に低下させた(下左図)。



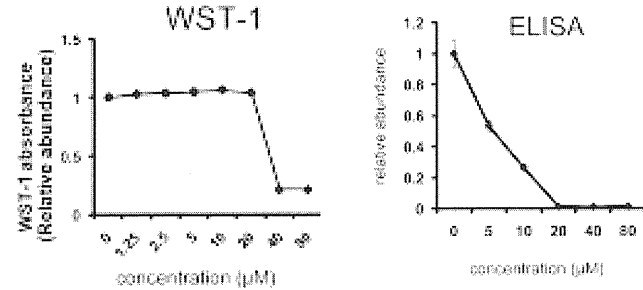
ヒット化合物の構造(上右図)は再合成及び spectroscopic characterizationにより確認した。ヒット化合物は、benzimidazole ringと a chromene unit で構成されており、現在のところALS治療試験に使用されたいずれの薬剤とも類似性を認めなかった。

(b) 既存薬 X は H4 細胞において SOD1 の転写を抑制する

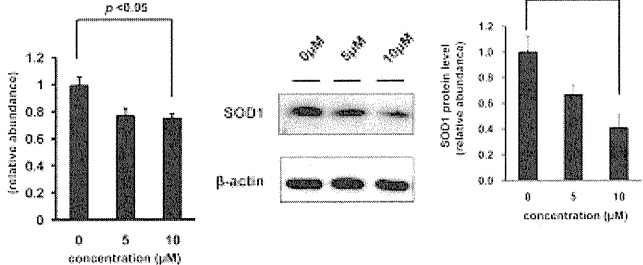
我々は、以前報告したスクリーニング・アッセイを用いて、明らかな毒性を示すことなく、SOD1 プロモータ活性を濃度依存的に抑制する低分子化合物を数種同定した。さらなる解析で我々はその内の 2 つのヒット化合物が、共通の特徴的な化学構造を有していることを突き止めた。同様の構造を持った薬剤が FDA に承認された薬剤に存在したので(既存薬 X)、我々は既存薬 X もまた SOD1 プロモータ活性を抑制するか検討した。予想していたように、既存薬 X は我々のスクリーニング・アッセイでルシフェラーゼ活性を低下させた(下図)。



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。

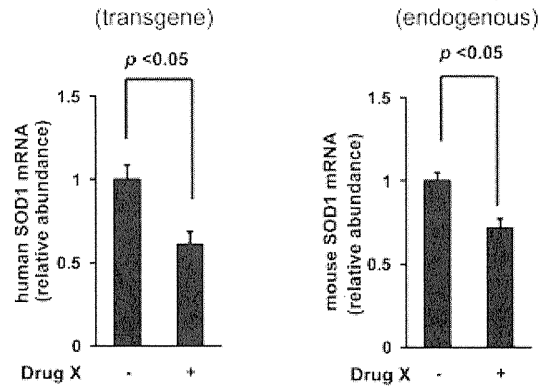


(c) 既存薬 X は、SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS 患者由来 iPS 細胞より分化させたアストロサイトにおいても SOD1 発現を低下させる

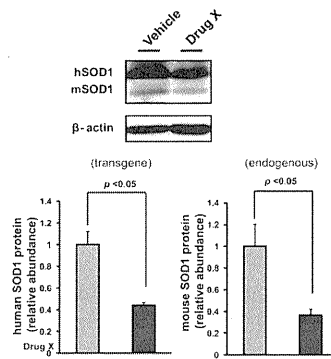
我々は SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS 患者の皮膚細胞から iPS 細胞を樹立した。その iPS 細胞を分化させ、アストロサイトを作成した。既存薬 X が、ヒトアストロサイト内の SOD1 発現を抑制することを認めた。

(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)。



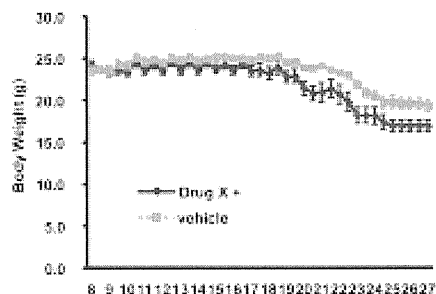
この結果より我々はマウスに既存薬 X をより長期間投与(6週間)した。その結果より我々は、既存薬 X がマウス脊髄内 SOD1 蛋白レベルも減少させるかを検証した。予想したように、既存薬 X を 6 週間経口投与したところ、マウス脊髄の SOD1 蛋白レベルも有意に減少させることがわかった(下図)。



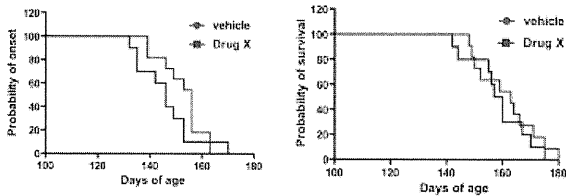
(d) 既存薬 X は SOD1G93A トランスジェニックマウスに投与すると ALS 症状を改善する

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)。

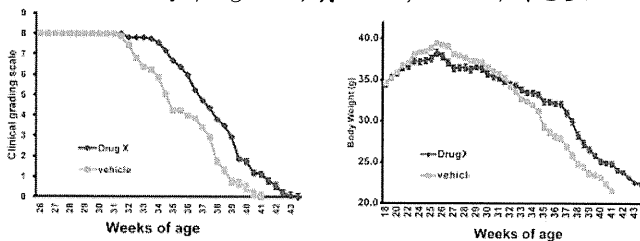


また、SOD1 高コピーマウスの発症の延長も認めず（既存薬 X 治療群, 146 ± 4 days, vehicle 治療群 152 ± 3 days; log rank, $\chi^2=1.7$, $P>0.05$), SOD1 高コピーマウスの生存日数の延長も観察されなかった（既存薬 X 治療群, 159 ± 3 days, vehicle 治療群, 163 ± 4 days; log rank, $\chi^2=0.47$, $P>0.05$) (下図)。

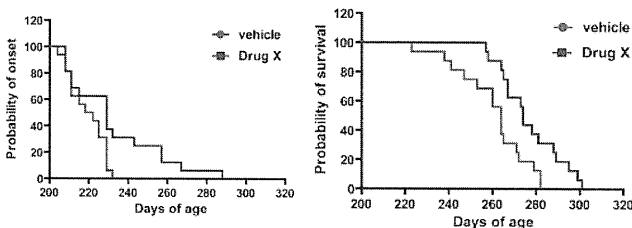


そこで我々は、SOD1G93A 低コピーマウスに、26 週齢（マウスの成長、体重増加がほぼ完了する週齢）より既存薬 X (30mg kg^{-1}) を毎日、ゾンデによる経口投与を行った。我々は、既存薬治療群のマウス ($n=16$) 及び vehicle 投与群のマウス ($n=16$) をモニターし、毎日生存の有無を確認し、1 週間に 2 回体重と ALS 症状スコアを観察した。その結果、既存薬 X 治療群は有意に ALS 症状スコアの悪化を遅延し、体重減少も遅延することが分かった（次頁左上図）。

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)。

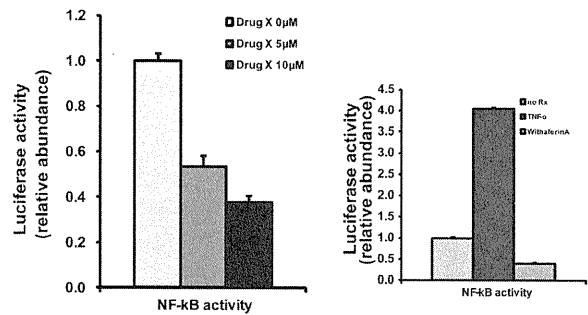


有症状期間（発症から end-stage まで）は 2 群間で統計的に有意な差は認めなかった（既存薬 X 治療群, 44 ± 6 days, vehicle 治療群, 41 ± 4 days; student t-test, $P>0.05$) [data not shown]。

(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

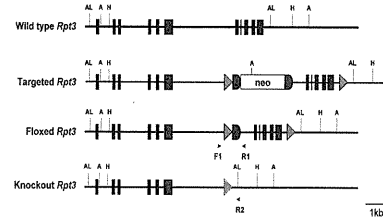
神経炎症は、ALS だけでなく他の神経変性疾患においてもしばしば観察される。NF- κ B は神経炎症に関わる主要な転写因子であり、ALS 患者の脊髄前角においてその発現が亢進することが報告されている。さらに NF- κ B の転写調節領域が、SOD1 の 5' 非翻訳領域にあるプロモータ領域に存在しており、NF- κ B が実際に SOD1 の転写調節因子の一つであるという報告もある。そこで我々は既存薬 X が NF- κ B の活性を抑制するか検討するため、NF- κ B reporter plasmid (Ig κ)3 conaluc plasmid) をトランスフェクションした H4 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

最近、Broom らは SOD1 の発現を抑制する化合物を同定するための HTS アッセイ系を確立したことを報告した (Broom WJ et al.. *Neurosci Lett* 393:184-188, 2006)。この先行研究に基づき、我々は今回、SOD1 の転写をターゲットとしたスクリーニングを、異なるライブラリを用い、レポーター遺伝子の SOD1 プロモータ領域を改変して行った。アストロサイト由来 H4 細胞株を用いた HTS アッセイで、我々はいくつかのヒット化合物を同定することに成功した。我々の HTS アッセイは Z' 値平均 0.39 (range, -0.04-0.75) で良い再現性が得られた。この結果のばらつきは、スクリーニングを行う際、細胞の処置を手法的に行っていること、もしくは分泌型ルシフェラーゼの不安定性によるものと考えられる。我々のアッセイでは高い coefficient of variation が得られているが、これは比較的多くの化合物がヒットしたことに起因すると考えられる。ヒットの確率は正規分布の影響を反映するので、我々はヒット化合物の効果を 2 回の再現性試験及び濃度依存性試験を行うことで確認した。このプロセスを経てヒットの選別における正規分布の影響を減らすことが可能であると考えられる。ほとんどの一次ヒット化合物は ELISA では内因性 SOD1 蛋白レベルを濃度依存的に低下させる作用を認めなかった。この結果は、化合物によるルシフェラーゼ活性の直接抑制を観察していたことによるか、SOD1 の転写と翻訳のタイミングの違いによるものかもしれないと推察する。少なくとも 1 つのヒット化合物 052C9 は濃度依存的に有意に SOD1 蛋白レベルを低下させた。SOD1 発現低下を認める濃度では、

WST-1 アッセイで細胞毒性は検出されなかったため、SOD1 発現抑制作用は、非特異的な細胞毒性によるものではないと考えられる。またこのヒット化合物は β -actin の発現レベルは低下させておらず、転写を全般的に抑制するためでもないと考えられる。

本研究で我々が同定した化合物や既存薬 X は SOD1 の発現を部分的に抑制する。ALS モデルマウスへの効果はまだ未検討であるが、SOD1 発現抑制は、部分的であることが望ましい可能性がある。SOD1 ノックアウトマウスは運動ニューロン疾患の表現型を示さないが、軸索切断に対する軽度の脆弱性を認め、病理学的に神経筋接合部及び軸索の変性を認める (Reaume AG et al. *Nat Genet* 13:43-47, 1996; Flood DG et al., *Am J Pathol* 155:663-672, 1999)。

低分子化合物で野生型 SOD1 の発現を低下させることは、ALS モデルマウスの表現型を緩和するだけでなく、孤発性 ALS 患者にも効果を有する可能性がある。先行研究で野生型 SOD1 トランスジェニックマウスも、変異 SOD1 トランスジェニックマウスと同様の病理変化を認めること、野生型 SOD1 と変異型 SOD1 のダブル・トランスジェニックマウスではその表現型が増悪する (Jaarsma D et al. *Neurobiol Dis* 7:623-643, 2000)。

さらに、SOD1 プロモータの変異により、SOD1 遺伝子発現レベルが低下し、孤発性 ALS 患者の発症の遅延との関連が示唆されている (Broom WJ et al. *Amyotroph Lateral Scler* 9:229-237, 2008)。実際に、Zhong Z らの報告によると、活性化プロテイン (APC) を変異 SOD1 マウスに投与すると、*in vivo* で SOD1 の発現を抑制し、ALS の表現型を緩和させている (Zhong Z et al. *J Clin Invest* 119:3437-3449, 2009)。これらの知見に基づく、変異 SOD1 の毒性とは、「新規毒性の獲得」というよりは、「野生型 SOD1 の毒性の増強」によるものかもしれない。病原蛋白である SOD1 の転写を直接抑制することは、SOD1 関連家族性 ALS の新規治療戦略となるのみならず、同様の戦略が病原蛋白が蓄積する他の神経変性疾患にも応用可能であると考えられる。

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 κ B レポーターアッセイの結果から、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。NF κ B 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 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。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 κ B 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- κ B reporter plasmid ((Ig κ)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 NF κ B 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. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R (2009) Autoimmune autonomic

- ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. **Auton Neurosci.** 146:33-5.
- Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. **Eur J Neurol.** 16:174-82.
- Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R (2009) Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? **Epilepsia** 50:2072-84.
- Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H (2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. **Neuroreport** 20:990-6.
- 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, Kalaria 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.
- Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R (2009) Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Intern Med.** 48:1307-9.
- 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.
- Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R (2009) Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. **Epilepsia.** 2009 Sep 22. [Epub ahead of print]
- Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, Takahashi R, Fukuyama H. (2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. **Clin Neurophysiol.** 120: 1923-6.
- Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T. (2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. **J Neuropathol Exp Neurol.** 68:1084-91.
- Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H. (2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]
- 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.
- Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, Takahashi R (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391:1240-5.
- Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y., Suzuki Y., Ihara M, Kawamata J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R (2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropath. Appl. Neurobiol.** 36: 331-44
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R. (2010) Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. **Stroke** 41:1798-806.
- Matsui H, Ito H, Inoue H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R. (2010) Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson disease. **J Neurochem**, 115:178-87.
- 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.
- Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R. (2010) Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induced Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. **J Neurochem**, 115: 1150-60
- Imai Y, Kanao T, Sawada T, Kobayashi Y, Moriwaki Y, Ishida Y, Takeda K, Ichijo H, Lu B, Takahashi R. (2010) The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. **Plos Genetics**, [Epub Dec 2 ;6(12)]
- Ando K, Uemura K, Kuzuy A, Kubota M, Maesako M, Asada M, Takahashi R, Kinoshita A (2011) N-cadherin regulates p38MAPK signaling via association with JLP: Implications for neurodegeneration

in Alzheimer's disease. **J Biol Chem**, 286: 7619-28

Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R. (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6{alpha}, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. **J Biol Chem**, 286:7947-57

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**, 16: 405-14

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** 6:e20427

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, Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H (2011) 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

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、フェルマシア、45 : 1009-112

田代善崇, 高橋良輔 (2009) : パーキンソン病～基礎・臨床研究のアップデート～タンパク分解異常、**日本臨床**、67(4) : 101-5

高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、**日本医事新報**、4445 : 79-80

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

2. 学会発表

高橋良輔 : 孤発性パーキンソン病の病因 : 環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経学会総会、仙台 (2009. 5. 22)

高橋良輔 : パーキンソン病の最新の治療と展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講演会、仙台 (2009. 9. 6)

高橋良輔 : 家族性パーキンソン病の分子メカニズムー神経保護治療に向けてーシンポジウム神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第32回日本神経科学学会、名古屋 (2009. 9. 18)

・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)

Komatsu K, Inoue H, Kondo T, Kitaoka S, Ichisaka T, Takahashi R, Yamanaka S, Takahashi R : Establishment of iPS cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2010.9.2)

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、神戸 (2010.12.8)

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)

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)

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 出願中
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。

結果として本研究では、1)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患者アストロサイトへの分化誘導手法を確立、2) 患者アストロサイトで病態の重症度を規定する SOD1 タンパク質量を低下させる2種類の既存薬を同定、3) 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、4) 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。また 3) 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事が判明した。一方で、変異 SOD1 を有する ALS 患者アストロサイトと運動ニューロンとの共培養による運動ニューロン死モデル系の構築は今後の課題として残された。

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* で病態の再現をするこ

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を、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細胞の作製

(1) 皮膚線維芽細胞の作製

本申請研究では、患者さんへの適切な説明及びそれに基づく同意取得の下、皮膚線維芽細胞を培養した。

(2) iPS細胞の樹立

さらに、SOX2, Klf4, Oct3/4, c-Mycを搭載したレトロウィルスを皮膚線維芽細胞に導入し、SNL feeder細胞上にまきこんだ。翌日、培地を皮膚線維芽細胞用培地から4 ng/mLのbFGF (Wako Chemicals, Osaka)を含むヒトES細胞用培地 (Reprocell, Kanagawa, Japan)に変更し、隔日に培地交換を行い、30日後に、iPS細胞コロニーを約20個ピックアップした。

(3) qPCRによるサイレンシングの確認

導入したレトロウィルスのサイレンシングを確認するために、各々のiPS細胞クローンよりTrizol (Life Technologies, Carlsbad, CA)を用いてtotal RNAを抽出、ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan)によってcDNAを合成、qPCRによって、totalおよびウイルスベクター由来のSOX2, Klf4, Oct3/4, cMyc遺伝子発現量をSYBR greenによってStepOne software v2.1を用いて解析した。

(4) 核型解析

核型解析は日本遺伝子研究所 (Seandai, Japan) にて施行した。

(5) 遺伝子診断

変異SOD1遺伝子変異解析はfeederを除去したiPS細胞のゲノムを抽出し、PCRで増幅後、ダイレクトシーケンス (3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies) にて施行した。

(6) *in vitro*での3胚葉分化能の解析

iPS細胞をCTKを用いて回収し、EB (embryoid body)形成を行った。細胞塊を20% KSR (Life Technologies)、2mM L-glutamine、0.1M nonessential amino acids、0.1M 2-mercaptoethanol (Life Technologies)、0.5% penicillin/streptomycinを含むDMEM/F12で培養した。隔日で培地交換を行った。3胚葉分化の解析のために、8日後のEBを、ゼラチンコートを行ったカバースリップ上で、10%FBSを含むDMEMでさらに8日間培養した。

(7) *in vivo*での3胚葉分化能の解析 (テラトーマッセイ)

未分化iPS細胞はCTKを用いて細胞塊とし、DMEM/F12中に回収した。その後、NOGマウス (Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan)へ移植した。8週後、腫瘍を切除し、4% PFAで固定後、パラフィン切片にした後、hematoxylin/eosin染色を行った。

(b) 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) をしたデイスシユにまき直し、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S B431542 (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 (In

novative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA)で細胞を分離し、1,000,000 cells/mlの濃度で、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) コーティングデイスシユに蒔いた。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トすることで行った。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・バイオシラム)、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イスシユ上へ蒔いた。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時間インキュベートした。

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のインキュベータ中で培養した。

(c) 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。

(d) 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)、Isl1 (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)。

(e) アストロサイト中SOD1のウェ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時間インキュベートした。その後、細胞を回収し、1% triton X-100、10% glycerol

1, 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ェスタンブロッティングを行った。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) とインキュベートした。インキュベート後、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。

(f) 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。

(g) 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通り、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 smoothed agonist を加え、その 5 日後にノバリンでシングルセル状態にし、PDL/ラミニ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。

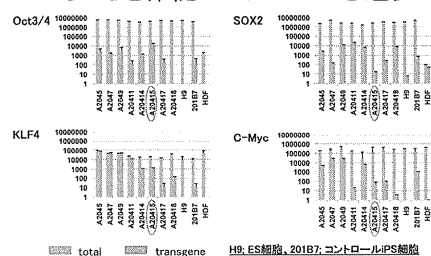
(倫理面への配慮)

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。

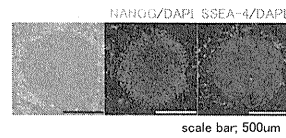
C. 研究結果

(a) ALS iPS 細胞の作製

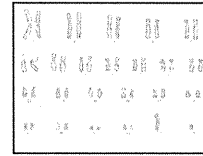
レンチウイルスで導入した 4 つの遺伝子 (Oct3/4, SOX2, KLF4, c-Myc) が qPCR でサイレンシングされていることを確認したクローンを選択した (下図)。



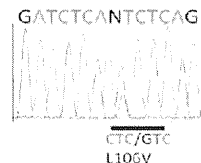
選択した ALS iPS 細胞クローン (最左図) はヒト ES 細胞マーカー NANOG (下中図) / SSEA-4 (下右図) を発現していた。



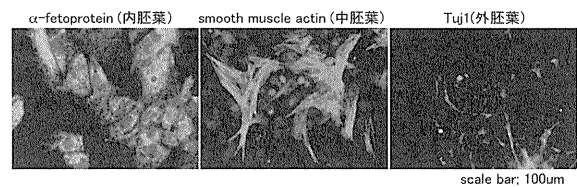
選択した ALS iPS 細胞クローンの核型は正常であった (下図)。



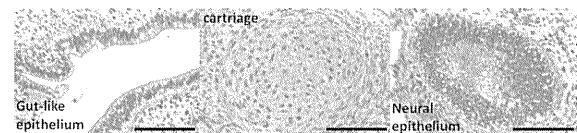
選択した ALS iPS 細胞クローンは患者の有する SOD1 変異を有していた (下図)。



選択した ALS iPS 細胞クローンは *in vitro* で 3 胚葉に分化した (下図)。

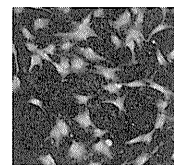


選択した ALS iPS 細胞クローンは *in vivo* で (NOG マウス移植後) 3 胚葉に分化した (下図)。

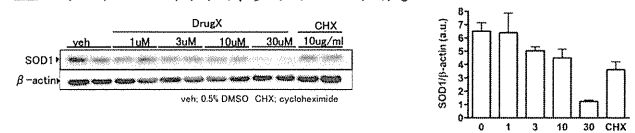


(b) ALS iPS 細胞由来アストロサイトを用いた既存薬の解析

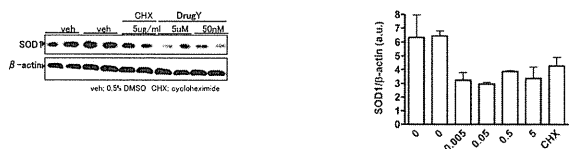
ヒト iPS 細胞クローンをニューロスフェアを経て、GFAP 陽性のアストロサイト様形態を有する接着細胞に分化誘導する手法を確立した (下図: ALS iPS 細胞由来)。



さらに、ヒトアストロサイト細胞株 H4 を用いたスクリーニングで、SOD1 タンパク質量を減少させることが明らかになっていた 2 種類の既存薬 (DrugX, DrugY) によって、ALS iPS 細胞由来アストロサイトでも、SOD1 タンパク質量が低下した (下図、次頁左上図)。

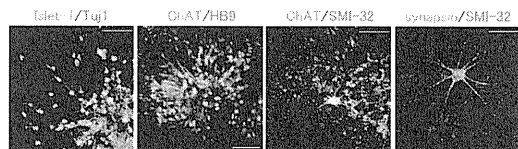


樹立した iPS 細胞クローンは *in vitro* で 3 胚葉に分化した。

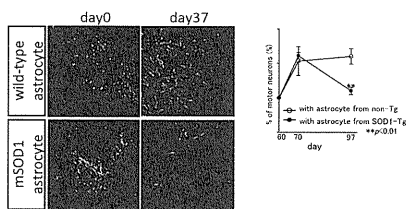


(c) ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと変異 SOD1 マウスアストロサイト共培養を用いた ALS モデルの作製

既報告の手法を一部改変し、ヒト iPS 細胞クローンを Isle-1, HB9, ChAT, SMI-32 陽性の運動ニューロンに分化誘導する手法を確立した(下図)。



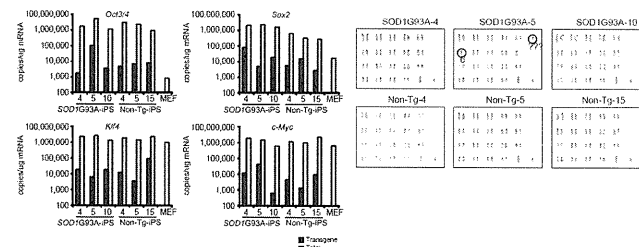
さらに運動ニューロンをレンチウイルスベクターを用いて GFP で標識後、変異 SOD1 マウス(mSOD1 マウス)アストロサイトとの共培養 37 日後(iPS 細胞分化開始から 97 日後)、mSOD1 アストロサイトによって、運動ニューロンが消失した(下図)。



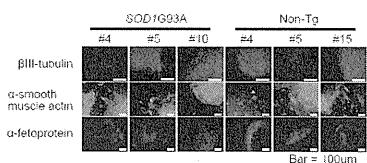
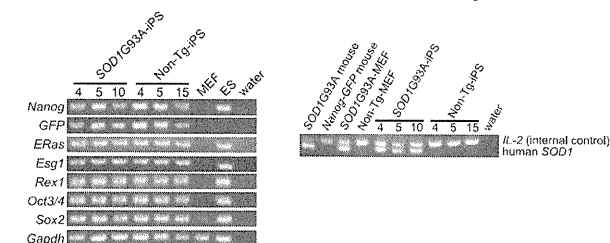
さらに、このモデルにおいて、既存薬 DrugX を加え、運動ニューロン保護を試みたが、変異 SOD1 のみならず、野生型アストロサイト上の運動ニューロン死も生じた。さらなる実験条件の検討が必要であった。

(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

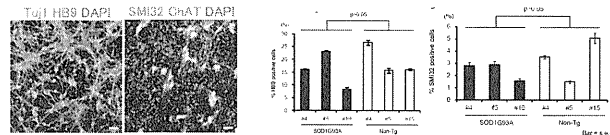
変異 SOD1 マウス iPS 細胞クローンを、ヒト iPS 細胞と同様の手法で樹立した。導入した遺伝子がサイレンシングしている iPS 細胞クローンを選択した(下左図)。選択クローンの核型(下右図)。



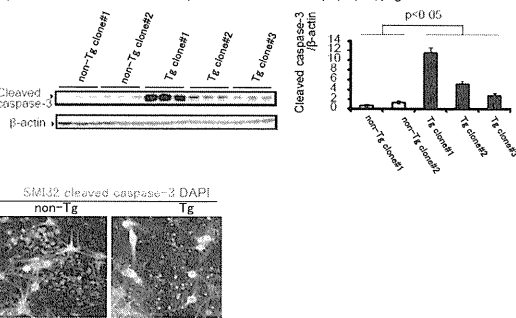
樹立した iPS 細胞クローンは ES 細胞マーカーを発現(下左図)、SOD1 変異を有する(下右図)。



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

ALS に対する唯一の治療薬であるリルゾールは、当初てんかんのグルタミン酸毒性に対する薬剤として開発された。1990 年代はじめ、ALS においてもグルタミン酸毒性仮説を指示するいくつかの実験結果が示されており、SOD1 マウスの実験を経ることなく、ALS においても治験が行われ、導入された。その後、SOD1 マウスが作製され、リルゾールが SOD1 マウスでも治療効果を有することが示された。同時に、いくつかの薬剤(クレアチン等)が SOD1 マウスで治療効果を有することが示された。しかし、ヒト ALS ではクレアチンは効果を発揮しなかった。以上のことは、SOD1 マウスでの有効性が ALS 治療薬としての必要条件ではあるが十分条件ではないこと、ヒト ALS がマウスと異なる側面を有していることを示している。現段階で、ヒト ALS とマウス ALS の違いを規定している因子は不明であるが、ALS 治療薬の開発のために、ヒト細胞由来 ALS モデルと変異 SOD1 マウスモデルの両者での有効性の検討が必要である。本研究では、iPS 細胞技術を用いてヒト ALS モデルを作製、これまでの治療薬スクリーニング方法を補完することを目的とした。

本研究では、ALS iPS 細胞を用いた最もシンプルなモデル細胞として、患者と同様の SOD1 変異・変異 SOD1 のコピー数・ゲノムの配列を有するアストロサイトを作製した。ヒト iPS 細胞からアストロサイトの分化誘導法が論文として海外から報告されたのはごく最近であるが(Krenic et al. Nat Biotech 29: 528-534, 2011)、その報告では機能的にもアストロサイトであるためには数ヶ月の時間を有している。我々の分化誘導法はそれらと比較すると、機能的には十分な検証を行っていないが、スクリーニングには適した短時間で GFAP 陽性(かつ、S100β等の他

のアストロサイトマーカーも陽性) 細胞を分化誘導可能であった。

ヒト ES 細胞より分化誘導した運動ニューロンと SOD1 マウスアストロサイトとの共培養で運動ニューロン死が生じるが (Di Giorgio et al. *Cell Stem Cell* 3: 637-648, 2008) 、本研究では、ヒト ES 細胞由来運動ニューロンのかわりに、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンを用いて、既報告と同様の結果を得たが、既報告と比較し、運動ニューロン数が減少するまでの時間が長かかった。ヒト ES 細胞との実験結果が異なった可能性として、既報告では使用した SOD1 マウスアストロサイト中にミクログリアが含まれていた可能性があるのではないかと推測している (方法の記載の中に、アストロサイトとミクログリアの分離の記載がない) が、正確な理由は不明である。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。さらに、ヒト ALS アストロサイトと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、細胞がデイチッシュより剥がれる等が生じたため継続できなかつた。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。

本研究では、変異 SOD1 を有するヒト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における運動ニューロン死は成功しておらず、ヒト iPS 細胞からの運動ニューロン・アストロサイトの誘導速度の上昇とともに、運動ニューロンが変性するまでの時間を短縮する方法としては、アストロサイト以外に病態に寄与するといわれるミクログリアも含めた共培養が必要かもしれない。

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2種類同定した。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Inoue H. (2010) Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. **Experimental Cell Research**, Vol.316, Issue 16. Elsevier: 2560-64.

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.

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].

Inoue H, Yamanaka S. (2011) The Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 89(5): 655-61.

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 Amyotrophic Lateral Sclerosis, **The Journal of Biomolecular Screening**, 16(4): 405-14.

Inoue H. (2011) Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. **Journal of Pharmacological Sciences**, Vol.115, Supp.1

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

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(11): 1109-12.

井上治久. (2010) iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第1回 ALS フォーラム～ALS 最前線～記録集, 13-15

竹内啓喜, 井上治久, 高橋良輔. (2010) グリア細胞と認知症. **神経内科** 72(Suppl.6) : 62-65.

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.

2. 学会発表

Inoue H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. The JST-CIRM Workshop, San Francisco, USA (2009.6.8)

Inoue H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. New Approach for Molecular Neuropathology, Tokyo, Japan (2009.8.13)

Inoue H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Sweden-Japan Joint Colloquium: Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology, Stockholm, Sweden (2009.9.5)

Inoue H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya Japan (2009.9.16)

Murakami G, Inoue H., Tsukita K, Asai Y, Aiba K, Amagai Y, Uesugi M, Nakatsuji N, 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 (2009.9.16)

Tashiro Y, Inoue H., Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R. : The establishment and analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for exploring the mechanisms of neurodegenerative diseases. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya Japan (2009.9.18)

Inoue, H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. 5th Symposium of the André -Delambre Foundation: Amyotrophic Lateral Sclerosis: Causes and Therapeutic Perspectives, Québec, Canada (2009.9.25)

Tashiro Y, Inoue H., Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R. : The analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for motor neuron degenerative model. Neuroscience 2009, Chicago, USA (2009.10.18)

Inoue H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Gladstone Institute of Cardiovascular Disease Seminar, San Francisco, USA (2009.10.26)

Inoue H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Joint iPSC Meeting, Toronto, Canada (2009.10.28)

Wada T, Aiba K, Tooi N, Inoue H., Takahashi R, Nakatsuji N. : Establishment of A Human Embryonic Stem Cell-Derived Familial ALS Model. 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, Germany (2009.12.9)

Inoue, H. : Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Personalized Stem Cell Medicine- A Canada-California-Japan discussion

workshop. San Francisco, USA (2010.3.25)

Baba S, Hua E, Nakamura K, Sears M, Inoue H., Conklin B.R. : Functional Neuro Muscular Culture Derived From Human Ips Cells. ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, USA (2010.6.16-19)

Kitaoka S, Inoue H., Tsukita K, Kawada M, Naitoh M, Takahashi K, Yoshikawa K, Kondo T, Yamawaki S, Watanabe D, Suzuki S, Nakahata T, Takahashi R, Yamanaka, S. : Differentiation of induced pluripotent stem cells from ALS patients generates motor neurons. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2010.9.2)

Komatsu K, Inoue H., Kondo T, Kitaoka S, Ichisaka T, Takahashi K, Yamanaka S, Takahashi R. : Establishment of iPSC cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2010.9.2)

Komatsu K, Inoue H., Kondo T, Kitaoka S, Takahashi R. : Establishment of iPSC cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice and motor neuronal differentiation. The XXth World Congress of Neurology. Marrakesh, Morocco (2011.11.16)

Kitaoka S, Inoue H., Tsukita K, Kawada M, Naitoh M, Takahashi K, Yoshikawa K, Kondo T, Yamawaki S, Watanabe D, Suzuki S, Takahashi R, Yamanaka S. : Analysis of motor neurons derived from induced pluripotent stem cells from ALS patients. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA (2010.11.17)

Murakami G, Inoue H., Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. : Transcription-targeted drug discovery for SOD1-mediated ALS using high-throughput screening technique. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA (2010.11.17)

Inoue H. : iPSC Cell Banking facilitating Disease-specific iPSC research. CIRM iPSC Cell Banking Workshop. San Francisco, USA (2010.11.17)

Inoue H. : iPSC Cell Technology and Motor Neuron Disease. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyo. Tokyo, Japan (2011.2.22)

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 iPSC 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:疾患特異的 iPS 細胞を用いた ALS 研究. 放射線分子疫学セミナー, 広島 (2009.7.2)

井上治久:疾患 iPS 細胞の樹立から臨床応用へ. 第 2 回 iPS 細胞樹立・維持培養の講習会, 京都 (2009.8.26)

井上治久:iPS 細胞作製技術を用いた神経科学研究. 第 30 回「再生医療・臓器再建医学」コースミーティング, 京都 (2009.9.11)

井上治久:疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患研究. 倉敷神経内科疾患フォーラム, 倉敷 (2009.10.2)

田代善崇, 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32回日本分子生物学会年会, 横浜 (2009.12.9)

井上治久 : iPS 細胞作製技術を用いた筋萎縮性側索硬化症の研究. 第一回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会, 京都 (2010.1.15)

井上治久:iPS 細胞を用いた神経難病の研究. 東海高校・中学サタデープログラム 16th, 名古屋 (2010.2.20)

井上治久:疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究. 日本薬理学会年会 シンポジウム「幹細胞分化の制御機構と再生医療におけるこれからの薬理学研究の方向性」, 大阪 (2010.3.17)

井上治久:iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 鳥取大学医学部附属病院 神経科学講演会, 米子 (2010.2.24)

和田圭樹, 饗庭一博, 遠井紀江, 井上治久, 高橋良輔, 中辻憲夫:ヒト ES 細胞由来家族性 ALS モデル系の樹立, 第 9 回日本再生医療学会総会, 広島 (2010.3.18,19)

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 3 回 iPS 細胞産学合同研究会, 京都 (2010.4.12)

井上治久:疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究. 梅田神経懇話会, 大阪 (2010.4.28)

北岡志保, 井上治久, 月田香代子, 川田三代, 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, 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 細胞の樹立と脊髄運動ニューロンへの分化. 第 51 回日本神経学会総会, 東京 (2010.5.21)

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 1 回 ALS フォーラム, 東京 (2010.8.28)

成田年, 永井拓, 橋本恵理, 今井哲司, 井上治久, 岡野ジェイムス洋尚, 池田和隆: 次世代の精神薬理の研究手法 Research approaches for the new strategy of psychopharmacology. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会 合同年会 スタディグループ 6, 仙台 (2010.9.16)

井上治久:疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究. 第 32 回日本生物学的精神医学会, 福岡 (2010.10.8)

井上治久:変性疾患モデルとしての iPS 細胞. 第 29 回日本認知症学会学術集会, シンポジウム 3「神経変性症としての前頭側頭葉変性症: 症候から分子病態解明の新展開まで」, 愛知 (2010.11.5)

井上治久:疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究. 第 26 回 Wako ワークショップ, 東京 (2010.11.26)

井上治久:iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 鳥取医療センター, 鳥取 (2010.12.8)

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 2 回関西西北陸神経免疫研究会, 京都 (2011.1.22)

井上治久:iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 札幌神経再生医療研究会, 札幌 (2011.2.8)

井上治久:神経疾患と iPS 細胞研究. 第 2 回 iPS 細胞研究講演会, 松本 (2011.3.15)

井上治久:Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. 日本薬理学会, 横浜 (2011.3.22)

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,