

表現型が現れやすいかもしれません。ただし、運動ニューロンがいくつあるのか、または最初に分化誘導から何個あったかをモニタリングするのは非常に困難です。しかし、分化誘導の効率も加味しながら、それらの細胞をモニタリングすると、神経変性、神経細胞死ができるのではと考えています。

会場 | iPS細胞での共培養と、SOD1のトランスジェニックマウスの共培養とでは、コピー数が決定的に異なると思いますが、コピー数をover expressionすることで表現型を呈する時間が短くなると考えれば、逆にsingle copyで変異が出ているiPS細胞で、同様の表現型を再現できるかどうかについて、先生のお考えをお聞かせください。

井上 | 星状膠細胞として選択できるものは疾患遺伝子を有するマウス、有さないマウス、疾患遺伝子を有するヒト、有さないヒト由来の4通りの実験を組み合わせることが可能です。すなわち、コピー数の影響を含め、様々な角度から調べることが可能です。共培養（コカルチャー）というのは、そういう組み合わせができる点が利点になります。

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 斉宏, 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¹⁾. 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う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^{2,3)}. 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⁴⁾.

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 Sakyo-ku, 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⁴⁾。(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 | Inosine 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おり、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お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)

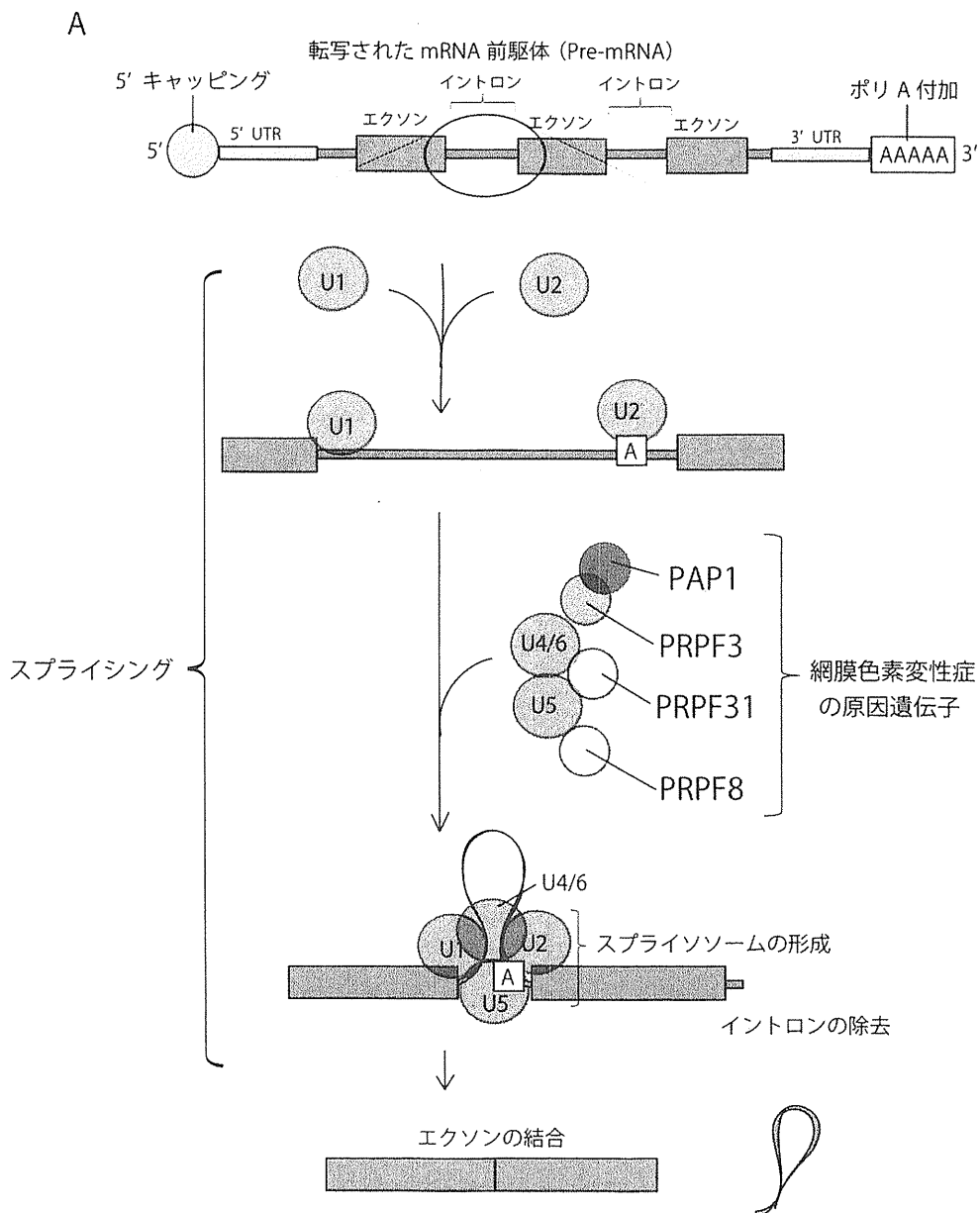


図1 RNA スプライシングと網膜色素変性症

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⁵⁾。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⁶⁾。

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⁷⁾。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⁶⁾。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⁴⁾。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、最終的な臨床治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、プロテオノーム、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 ガランタミン リバスタチグミン 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¹⁾。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²⁾。

2006年にマウス³⁾、2007年にヒト⁴⁾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^{5,6)}。

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⁷⁾。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⁸⁾。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 ⁸⁾ |
| 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 ¹⁰⁾ |
| 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 ¹¹⁾ |
| 筋萎縮性側索硬化症 | 常染色体優性遺伝 | <i>SOD1</i> (L144F) | - | Dimos 2008 ⁷⁾ |
| 筋萎縮性側索硬化症 | 常染色体優性遺伝 | <i>SOD1</i> (L144F, G85S) | - | Boulting 2011 ¹²⁾ |
| 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 ¹³⁾ |
| ハンチントン病 | 常染色体優性遺伝 | <i>IT15</i> (72CAG repeats) | - | Park 2008 ¹⁴⁾ |
| 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 ¹⁵⁾ Liu 2011 ¹⁶⁾ |
| 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 ¹⁷⁾ |
| 統合失調症 | 孤発性 | <i>DISC1</i> (4bp deletion at the exon-intron 12 region) | - | Chiang 2011 ¹⁸⁾ |
| 統合失調症 | 孤発性 | - | synaptic connectivityの低下 | Brennand 2011 ¹⁹⁾ |
| 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 ²⁰⁾ |
| 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 ²¹⁾ |

iPS細胞を樹立した⁸⁾。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 α -synucleinが蓄積することが示されている⁹⁾。線維芽細胞やiPS細胞には α -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 α -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¹⁰⁾。

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¹¹⁾。

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⁷⁾。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¹²⁾。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¹³⁾。

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¹⁴⁾。

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¹⁵⁾。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¹⁶⁾。

6. 家族性自律神経失調症 familial dysautonomia

家族性自律神経失調症は *I- κ -B kinase complex-associated protein (IKBKAP)* 遺伝子の変異によって末梢神経障害を生じる稀な疾患である。Leeらは、10歳の家族性自律神経失調症患者由来のiPS細胞を作製した。このiPS細胞から分化させた神経堤細胞においてスプライシングの異常を認めた。また、自律神経細胞の数の低下や遊走能の低下が認められた。一方、これらの所見は植物ホルモン的一种であるkinetin投与により改善した¹⁷⁾。

7. 精神疾患

Chiangらは、統合失調症やうつ病などの精神疾患発症の危険因子と考えられている *Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DIS1)* 遺伝子の変異を有する統合失調症患者からiPS細胞を樹立した¹⁸⁾。Brennanらは、4人の統合失調症患者由来のiPS細胞を樹立し、神経細胞に分化させた。統合失調症の患者由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞は、コントロールに比較して、神経突起数の減少、シナプス蛋白の減少を呈し、synaptic connectivityの低下を示した。これらの所見は、抗精神病薬のひとつであるloxapineによって改善がみられた¹⁹⁾。

メチル化制御に関連する遺伝子 *MeCP2* の変異で生じるレット症候群患者のiPS細胞由来神経細胞は、神経細胞体の小型化がみられた^{20,21)}。

B. 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

iPS細胞を用いた疾患モデリングにおいて、いくつかの克服すべき点がある。iPS細胞では同じ患者体細胞由来であっても分化誘導効率がクローンによって異なる場合がある。ES細胞でも同様

のクローンによる分化能の違いが報告されている²²⁾。疾患解析で生じた差がクローン間の差であるのか、個体間あるいは疾患による差であるのか、慎重に解析する必要がある。よって、iPS細胞を用いた疾患モデル研究では、クローン間のばらつきを超えた病態再現が必要となる。また全ゲノム関連解析 genome wide association studies (GWAS) などにより、疾患関連single nucleotide polymorphisms (SNPs) を全く有さない人がいることは考えにくく、疾患に応じてコントロールの設定を選択する必要がある²⁾。

多くの神経・精神疾患、特に神経変性疾患は比較的高齢になってから発症すること、孤発性疾患の場合には遺伝的背景以外の環境要因が発症に関連していることから、神経変性疾患の病態再現を行うには、加齢変化を短縮させ、環境要因と関連する因子の導入を行う必要があるかもしれない。

むすび

近年、遺伝子変異を有する神経・精神疾患の病態解明の急速な進歩により、神経・精神疾患の知見が深まってきている。iPS細胞を用いた研究の重要な特徴は、原因遺伝子が同定されている疾患だけでなく、原因遺伝子が不明な遺伝性疾患や孤発性疾患における病態解明や創薬への応用が期待できる点である。神経・精神疾患患者の多くは孤発性であり、iPS細胞を用いた神経・精神疾患病態解明への研究の発展と一日も早い治療開発への応用が望まれる。

文献

- 1) Shefner JM, Cudkovicz ME, Schoenfeld D, et al. NEALS Consortium. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology*. 2004; 63: 1656-61.
- 2) Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89: 655-61.
- 3) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of

- pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 4) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
 - 5) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011; 8: 409-12.
 - 6) Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, et al. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature*. 2011; 474: 225-9.
 - 7) Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008; 321: 1218-21.
 - 8) Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009; 136: 964-77.
 - 9) Cookson MR. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11: 791-7.
 - 10) Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*. 2011; 8: 267-80.
 - 11) Seibler P, Graziotto J, Jeong H, et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci*. 2011; 31: 5970-6.
 - 12) Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, et al. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29: 279-86
 - 13) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009; 457: 277-80.
 - 14) Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008; 134: 877-86.
 - 15) Ku S, Soragni E, Campau E, et al. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA · TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 631-7.
 - 16) Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev*. 2011; 7: 703-13.
 - 17) Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*. 2009; 461: 402-6.
 - 18) Chiang CH, Su Y, Wen Z, et al. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry*. 2011; 16: 358-60.
 - 19) Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 473: 221-5.
 - 20) Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010; 143: 527-39.
 - 21) Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D, et al. Isolation of MECP2-null Rett syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 2103-15.
 - 22) Osafune K, Caron L, Borowiak M, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 313-5.

Annual Review ^{しんけい} 神経 2012 ©

発行 2012年 1月25日 初版 1刷

編集者 鈴木 則 宏
祖父江 元
荒木 信 夫
宇川 義 一
川原 信 隆

発行者 株式会社 中外医学社
代表取締役 青木 滋

〒162-0805 東京都新宿区矢来町 62
電 話 03-3268-2701 (代)
振替口座 00190-1-98814 番

印刷 / 東京リスマチック (株) < TO・HU >
製本 / 田中製本 (株) Printed in Japan
ISBN978-4-498-12896-5

JCOPY < (社) 出版者著作権管理機構 委託出版物 >

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。
複写される場合は、そのつど事前に、(社)出版者著作権管理機構
(電話 03-3513-6969, FAX 03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.
or.jp) の許諾を得てください。

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—

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 —

江川 斉宏, 井上 治久

1. はじめに

RNA のプロセッシングの機構が明らかに進むにつれて、それらが神経変性疾患の病態に大きくかかわっていることが明らかになってきた。とくに、RNA 結合タンパクの遺伝子の変異や RNA 結合タンパク質が結合する領域の遺伝子の異常が神経変性疾患において数多く同定されている。また一方で、疾患由来の人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) を用いた研究がすすむにつれて、ヒト神経細胞が生きている状態で疾患病態を再現することが可能になってきた。ここでは、RNA 結合タンパク質の機能とそれらが神経変性疾患にいかにかかわっているかについて概説し、iPS 細胞を用いた神経変性疾患の病態再現の中での RNA プロセッシングをターゲットにした治療の可能性について考察する。

2. RNA プロセッシングとは

核内のゲノム DNA からメッセンジャー RNA (mRNA) が転写されるが、それまでには転写された mRNA 前駆体 (これを pre-mRNA と呼ぶ) は、キャッピング、ポリ A 付加、スプライシングなどの様々な修飾を受けて mRNA (mature mRNA) へと成熟し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 の過程を 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。

キャッピングとポリ A 付加は mRNA の安定性向上、RNA 修飾の向上の役割をもち、スプライシングは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) を中心にして、RNA に結合するタンパク質で構成されたスプライソソームによって触媒されて、mRNA が産生される (図 1A)。最近では mRNA のみならず、イントロン中にコードされる核小体低

RNA binding proteins in neurodegenerative disease
— Prospect for a therapy in disease modeling using iPSC cells —
Naohiro Egawa, Haruhisa Inoue
京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 [〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53]
Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University (53 Kawahara-Cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

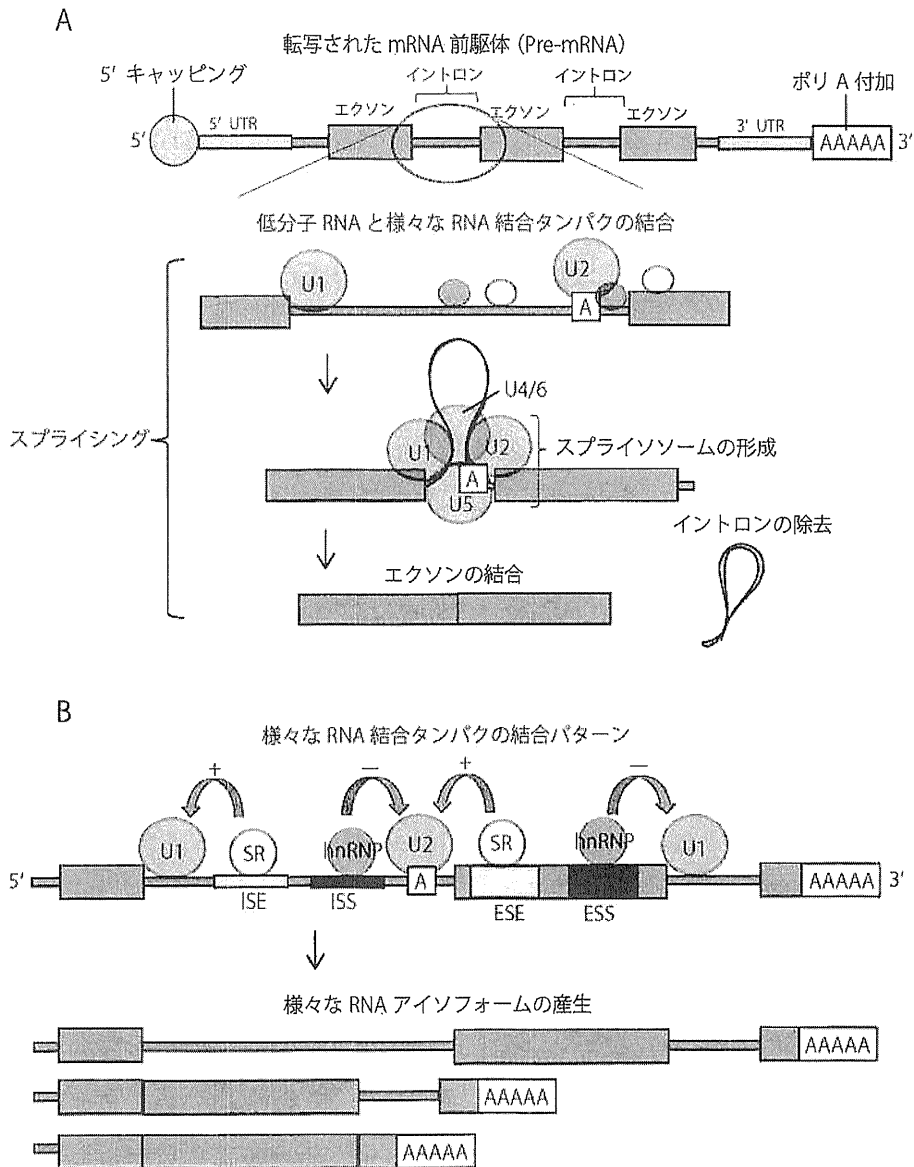


図 1. RNA プロセシングの過程と RNA アイソフォームの誕生

分子 RNA (small nucleolar RNA; snoRNA) が産生されることが分かってきた。snoRNA は snRNA の成熟に関わっており、スプライシングは、これら snRNA と snoRNA を含む non-coding RNA と RNA 結合タンパク質によって調節されている。スプライシングによって、エクソンの持つ情報が翻訳されないことをエクソンスキッピング (exon skipping)、エクソンが翻訳されることをエクソン包含 (exon inclusion) と呼ぶ。mRNA はプロセシング以外にも RNA 編集とよばれる RNA 修飾をうける。たとえばグルタミン酸受容体 GluR2 の mRNA は ADAR2 (adenosine

deaminase 2) によってエクソン 11 のアデノシンがイノシンへ変換される RNA 編集をうけるが、筋萎縮性硬化症 (ALS) では、GluR2 mRNA エディティングが低下していることが指摘されている (Kwak & Kawahara, 2005)。

3. RNA 結合タンパク質

ヒトは、2 万数千個の遺伝子から数十万種類の多様なポリペプチドを産生するが、この多様性はスプライシングのパターンをかえて pre-mRNA から複

表 1. RNA プロセッシング異常をきたす神経変性疾患

| 疾患名 | 原因 (異常) 遺伝子 | RNA プロセッシングの異常 |
|--------------------|-----------------|-----------------------------|
| FTDP-17 | MAPT | スプライシング (エクソン 10 包含) |
| 筋萎縮性側索硬化症 | FUS, TDP-43 | スプライシング, RNA 編集 (GluR2) |
| 脊髄性筋萎縮症 | SMN1 | スプライシング (snRNP の減少) |
| 筋強直性ジストロフィー | DMPK, ZNF9 | スプライシング (制御蛋白 CUGBP1 の機能亢進) |
| Duchenne 型筋ジストロフィー | Dystrophin | スプライシング (エクソン 31 スキッピング) |
| Prader-Willi 症候群 | HB-II-52 snoRNA | スプライシング (HTR2C エクソン 5b 包含) |
| 家族性自律神経失調症 | IKBKAP | スプライシング (エクソン 20 以降の欠損) |
| ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) | mt tRNA Leu | タウリン修飾欠損 |
| ミトコンドリア脳筋症 (MERRF) | mt tRNA Lys | タウリン修飾欠損 |

数の mature mRNA を産生する (これを選択的スプライシングと呼ぶ) ことで達成されている (Nabeshima et al., 1984). エクソンもしくはイントロンには, スプライシングを促進する配列 (exonic/intronic splicing enhancer; ESE, ISE) もしくは, スプライシングを抑制する配列 (exonic/intronic splicing silencer; ESS, ISS) が存在している (図 1B). 前者には, SR プロテインに代表されるスプライシング促進性の RNA 結合タンパク質が, 後者には, hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) などに代表される抑制性の RNA 結合タンパク質が結合し, これら様々なタンパクの結合パターンによって, エクソンスキッピングとエクソン包含がおこり, 多様な RNA 発現パターンが決定されている. RNA 結合タンパク質自身の多くは, RNA レベルではセルフフィードバックをうけて厳密な発現の自己制御, タンパクレベルではリン酸化をうけて厳密な機能制御がされているが, RNA 結合タンパク質の結合パターンの異常あるいは, その制御機構の破綻によって様々な神経疾患を引き起こすことが分かってきた (表 1). 以下にはその代表的な疾患について紹介したい.

4. 前頭側頭葉型認知症 (Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: FTL-17)

FTLD-17 はパーキンソニズムをともなう前頭側頭葉型認知症で, その原因遺伝子は第 17 染色体遺

伝子に存在する原因遺伝子 tau (MAPT) である. tau タンパクは神経細胞に多く存在し, その細胞骨格に重要な機能をもつ微小管を安定化させている. tau タンパクをコードしている MAPT 遺伝子の mRNA は, エクソン 2, 3, 10 が発達段階に応じて選択的スプライシングをうけて変化するが, 成人では 6 個の分子種 (アイソフォーム) が産生される. アイソフォームは主に, 繰り返し配列を 3 つまたは, 4 つ含む 3R, 4R tau に分類され, 4R tau は 3R より微小管の安定化を果たしている. FTL-17 では数多くの点遺伝子変異が報告されているが, エクソン 10 上の N279K, K280del, L284L の 3 種類の遺伝子変異では, エクソン 10 の包含がおこる. 結果的に 4R のアイソフォームの方が相対的に多くなり, 微小管の過剰安定化を招き, 最終的に神経細胞死を引き起こす (Panda et al., 2003). Black らは, エクソン 10 の選択性を制御する低分子化合物をスクリーニングして, 強心剤であるジゴキシンなどの有効性を見出した (Stoilov et al., 2008).

5. 脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy: SMA)

SMA は, 小児科領域では比較的高頻度 (1/6,000) におこり, 脊髄前角の運動神経が選択的に変性脱落する常染色体劣性遺伝性の疾患である. SMN1 遺伝子の欠損または変異ホモ接合子において発症するが, 機能的な SMN タンパクが産生されないことに起因する. ヒトでは SMN1 以外にほぼ同一配列を

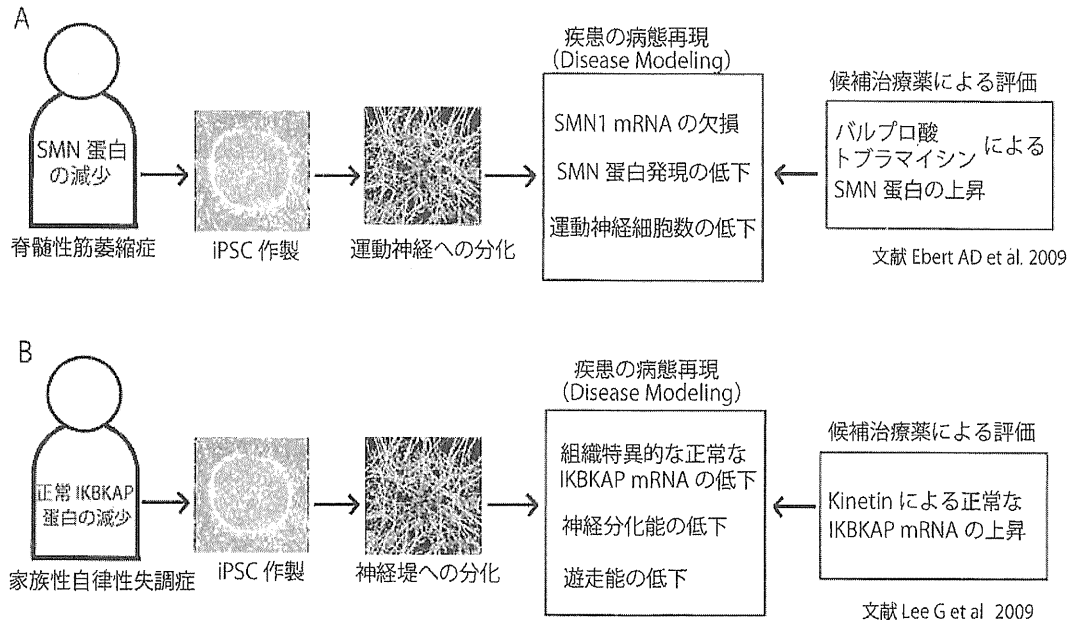


図 2. 神経変性疾患由来 iPSC 細胞を用いた RNA プロセッシング異常の病態再現と治療

もつ SMN2 遺伝子が SMN タンパクを産生するが、イントロン7にスプライシング抑制性 RNA 結合タンパク質である hnRNP A1 が結合する ISS 配列をもっており、エクソン7のスキッピングが起きるため、機能的な SMN を 20% しか産生できないため発症を防ぐことができない (Wirth et al., 2006). SMN タンパクは、RNA 結合タンパク質であり、先述した snRNA に結合して、snRNP を構築して細胞内でそれらを運搬している。SMA では機能的な SMN タンパクが低下することによって、snRNP が低下して、そのスプライシングの不均衡をまねき、広範なスプライシングパターンの変化をもたらし、最終的に運動神経の選択的な細胞死を引き起こす (Zhang et al., 2008). 2009 年、Ebert らは SMA 疾患由来の iPSC 細胞から分化した運動神経は、コントロールの細胞と比較して、SMN タンパク発現の低下が認められ、運動神経のマーカーである ChAT 陽性の細胞が減少することを報告した (Ebert et al., 2009). iPSC 細胞から分化した細胞が疾患病態を再現する可能性を示した最初の報告である。さらに SMN 蛋白の発現は、候補治療薬であるバルプロ酸で改善することが確認された (図 2A).

6. 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis : ALS)

近年になって DNA/RNA 結合タンパク質をコードする TDP-43 と FUS/TLS が原因遺伝子として同定された。ともに構造的に hnRNP に類似しており、主に核に存在する RNA 結合タンパク質である (Lagier-Tourenne et al., 2009). そもそも TDP-43 は HIV-1 遺伝子の転写発現を抑制する因子として同定され、その後嚢胞性線維症の原因遺伝子 CFTR エクソン9スキッピングを惹起することが知られていた (Ayala et al., 2006) が、2006 年にリン酸化された TDP-43 が ALS の脊髄前角運動神経細胞に蓄積することが報告された (Arai et al. 2006 ; Neumann et al., 2006). さらに遺伝性および孤発性の ALS に TDP-43 遺伝子のミスセンス変異が同定され (Sreedharan et al., 2008), 変異はほとんどが TDP-43 C 末端にみとめており、C 末端断片が発症に関わる重要な役割を果たしていると考えられる。その TDP-43 は様々な RNA に結合して、転写、スプライシングや RNA 分解に関わっていると考えられている。スプライシングのターゲットは CFTR 以外に Apolipo-