

牟婁病患者由来 iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導

広川佳史¹⁾

¹⁾ 三重大学医学研究科腫瘍病理学講座

研究要旨

牟婁病患者由来 iPS から神経系の細胞に分化・誘導し、患者と同じ遺伝情報を持った神経系細胞を得る。iPS 細胞樹立は熊本大学発生医学研究所、江良拓実先生との共同研究により行う。それらの細胞を用いて病態の機序解明のため、現在までに神経変性疾患で提唱されている異常の検証を in vitro での実験により行う。

A. 研究目的

牟婁病患者由来の iPS 細胞を分化誘導することで、運動神経やグリア細胞、ドパミン産生細胞を得ることができる。これらの分化誘導された細胞を用いれば、疾患モデルとして環境因子への脆弱性の検討や薬物の効果判定などが可能となる。本研究は病態解明の為の有効な材料を得ることが目的である。

B. 研究方法

患者皮膚より線維芽細胞を採取、培養し、Yamanaka factor である 4 因子、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc をセンダイウイルスを用いて遺伝子導入して作製する。実際の作製作業は熊本大学発生医学研究所にて行う。

iPS 細胞から sonic hedgehog signal pathway の agonist と retinoic acid を用いて embryoid body を作成し、これが運動神経細胞の特徴を有することを確認する。得られた運動神経細胞を用いて、現在まで提唱されている ALS 発症機序が再現できるか検討する。

1) 疫学的環境因子の影響

グアムの類縁疾患の発症機序に、マグネシウムやカルシウム摂取の不足による異常タンパクの蓄積が指摘されている。患者由来と正常人由来の iPS より誘導された運動神経細胞を低マグネシウム、低カル

シウムの条件で長期培養し、タウ蛋白、-synuclein、TDP-43 蛋白の産生に差があるか検討する。

2) 小胞体ストレスのメカニズム

小胞体ストレスは、異常たんぱく質蓄積などにより、小胞体の機能に付加が生じ、神経変性疾患を引き起こすモデルと考えられている。

a) 小胞体ストレスを誘導する

N-glycosylation の阻害剤である、tunicamycin は古典的な小胞体ストレス誘導薬である。患者由来と正常人由来の iPS より誘導された運動神経細胞に、tunicamycin 処理を加えて小胞体ストレス関連因子である、Grp78 や XBP1 などの遺伝子発現に差があるか検討する。

小胞体のカルシウム恒常性の障害が、神経変性の病態として提唱されている。グルタミン酸受容体の過度の興奮が小胞体からのカルシウム放出を過剰にし、神経毒性を引き起こす。細胞をグルタミン酸で処理し、小胞体ストレス関連因子の発現差の有無を検討する。

3) 酸化ストレスのメカニズム

家族性 ALS には酸化ストレスの原因であるスーパーオキシドを消去する酵素、SOD1 遺伝子変異のあるものが報告されている。スーパーオキシドによる神経細胞死が ALS 発症の機序として提唱されている。

患者由来と正常人由来の運動神経細胞を過酸化水素で処理し、アポトーシスなどの細胞死に差があるか検討する。また低濃度の過酸化水素で細胞を長期間培養し、タウ蛋白、 α -synuclein、TDP-43蛋白の産生に差があるか検討する。

4) さらに、運動神経、グリア細胞、ドパミン産生細胞のマーカーを用いて、embryoid bodyから、それぞれの分化細胞を得る。

最近では、ALS 発症機序に神経細胞単独ではなく、グリア細胞を含めた微小環境の関与が提唱されている。この仮説の検証のため、グリア細胞と運動神経細胞を共培養し、上記であげた項目について検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者からの試料の提供を受けるにあたって十分な informed consent を得る。研究計画は、事前に三重大学医学研究科の倫理委員会の承認を得ている。得られた個人情報については、法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して研究を遂行する。

C. 研究結果

4例の患者線維芽細胞から iPS 細胞が樹立された。iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導は、理化学研究所より譲渡された正常ヒト iPS 細胞を用いて、*Nat Protoc.* 2009 ; 4(9): 1295–1304.にあるプロトコールに沿って行い、形態的および分化マーカーの発現から運動ニューロンへの分化が確認された。しかし患者由来の iPS 細胞からは神経細胞様の形態を持つものが誘導されたが、運動ニューロンの分化マーカー発現は認められなかった。

D. 考察

牟婁病患者 iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の過程では正常 iPS 細胞とは異なる培養条件設定が必要と考える。

また別の方法による神経細胞分化について考察

する。皮膚組織にも存在する幹細胞である Muse 細胞は iPS 細胞ほどではないが多分化能を有している。牟婁病患者患者の皮膚生検組織内にも少ないながらこの Muse 細胞は存在しているはずである。論文報告に従って患者皮膚線維芽細胞培養より Muse 細胞を単離し、神経細胞への分化誘導を試みることも検討する。

E. 結論

運動ニューロンへの分化誘導が困難な場合、誘導がより容易なドパミン産生ニューロンを用いて実験を行う必要がある。

Muse 細胞の培養系の確立が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

-Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan.

Kokubo Y, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kuzuhara S. ほか

J Neuropathol Exp Neurol. 2012 Jul;71(7):625-30.

2. 学会発表

本年度はなし。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 本年度はなし。

2. 実用新案登録 本年度はなし。

3. その他 特になし。