

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班

研究代表者 小久保 康昌

三重大学大学院地域イノベーション学研究所

### 研究要旨

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、皮膚由来線維芽細胞に4つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、神経細胞を誘導し作り出すことができるので、神経疾患の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。そこで、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病の病態解析ならびに治療法開発に活用するために、疾患由来のiPS細胞を樹立した。本研究班の協力のもと、5症例の皮膚生検サンプルを現在までに提供していただき、そのうちの4例から皮膚由来線維芽細胞を樹立した。このうちの3症例からiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞は未分化マーカーを発現し形態学的にもiPS細胞である。加えて、樹立したiPS細胞が神経細胞へ誘導可能であること確認した。以上より、樹立したiPS細胞は今後の三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病の病態解析に有用と考えられる。

研究分担者氏名：江良 択実

所属機関名：熊本大学 発生医学研究所

幹細胞誘導分野

#### A.研究目的

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に4つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製した多能性幹細胞である。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、様々な細胞を誘導し作り出すことができる。そこで患者由来のiPS細胞を樹立し、その細胞から病気の標的細胞を作り出して研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。神経疾患においても、通常患者から得ることが困難な神経細胞を誘導し得ることで、疾患解析や治療薬開発に貢献できると期待されている。本研究では、難治性疾患の1つである三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病患者からiPS細胞を樹立することを目的とする。

#### B.研究方法

1. iPS細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞を樹立する。

2. SeVベクターを使ったiPS細胞の確立

SeVベクターによって患者由来線維芽細胞へ初期因子（Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc）を一過性に発現させiPS細胞の樹立を行う。

樹立したiPS細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60の免疫染色によるiPS細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現をPCRにて確認する。

3. 樹立したiPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞マーカー（Nestin等）の発現を調べ、神経細胞であることを確認する。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査

疾患由来のiPS細胞作製とその解析については所属機関である熊本大学倫理委員会での承認を受けて行った。また患者サンプルの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認の後、患者同意を得て行った。

## 2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。作製した iPS 細胞等を用いた病因解析・治療薬開発研究は本研究では行わない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報は公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は熊本大学発生医学研究所において施設できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

## 3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

## C. 研究結果

### 1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 5 例の症例において皮膚生検を行い、うち 4 例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り 1 例は培養中に汚染があり破棄した。

## 2. iPS 細胞の樹立

症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。

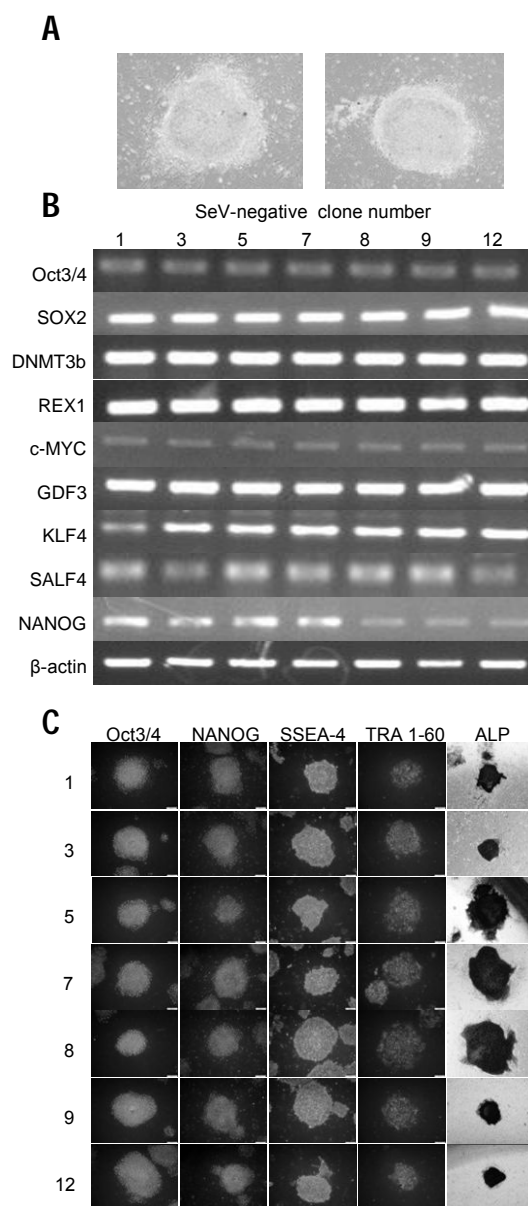


図1 樹立したiPS細胞

- A. iPS細胞のコロニー(明視野)、
- B. 未分化マーカーの発現(RT-PCR)、
- C. 未分化マーカーの発現(免疫染色)と
- D. アルカリフォスファターゼ染色(ALP)

感染から14日後ぐらいからコロニーが出現した。感染から25日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を38度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは温度感受性株のために38度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーのiPS細胞を得ることができる。PCRにてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色とRT-PCRにて調べ、iPS細胞であることを確認した。研究期間内に、3症例(1症例あたり10数株)からウイルスベクターフリーのiPS細胞株を樹立した(図1)。

### 3. 樹立したiPS細胞からの神経細胞への誘導

これまでに樹立したiPS細胞のうち症例1から樹立したiPS細胞を神経細胞へと誘導した(図2)。約2週間あまりで形態学的にも神経細胞へと誘導することに成功した。神経細胞特異的マーカーであるNestinの免疫染色を行い、陽性であることから神経細胞であることを確認した。

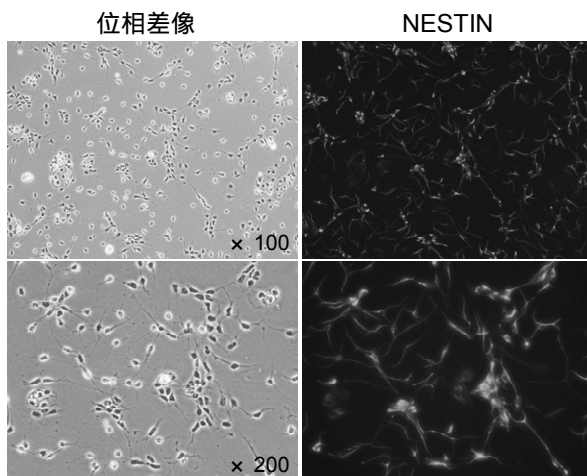


図2 疾患由来iPS細胞から神経細胞への誘導  
iPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞特異的マーカーであるNESTINの抗体にて免疫染色を行った。

### D. 考察

これまでに、患者5例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。研究期間内は、3症例からiPS細胞を樹立した。3症例からのiPS細胞樹立の効率は特に健常者と変わりはなかった。この結果より、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病では、

この疾患の異常は、細胞のリプログラミングやiPS細胞の増殖には影響を与えないことが示唆された。線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、樹立まで1ヶ月かかる。そこで、血液細胞あるいは血液細胞由来の細胞をiPS細胞作製のソースとすることで、生検を行わずに末梢血の採血でiPS細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

さらに、作製したiPS細胞から神経細胞を誘導し神経細胞を得ることができた。神経細胞の誘導効率では、健常者由来のiPS細胞の場合と比較して特に差はなかった。したがって、この疾患の異常が神経細胞の分化に与える影響は、少ないと考えられる。

### E. 結論

患者4例の皮膚生検より皮膚由来線維芽細胞を樹立した。3症例よりiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でもiPS細胞に矛盾することがなく、iPS細胞が樹立されたと言える。さらに神経細胞を樹立したiPS細胞から誘導することに成功した。以上より、樹立したiPS細胞は今後、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病を研究する解析ツールとして有用である。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

#### 1. 論文発表

特になし。

#### 2. 学会発表

- 江良 択実 ES/iPS細胞の分化と臨床への応用 第115回 日本小児科学会学術集会 総合シンポジウム2 iPS細胞を利用した研究の展開 福岡 2012年4月20日
- 江良 択実 iPS細胞研究の進展 第28回 日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 特別講演 福岡 2012年4月21日

3. 江良 択実 初心者でも簡単。センダイウイル  
スベクターを使った外来因子フリー疾患由来  
iPS 細胞の樹立とその応用 第 11 回 日本再生  
医療学会総会 ランチョンセミナー 横浜  
2012 年 6 月 13 日
4. Era, T. Study for iPS cells derived from intractable  
diseases 第 18 回日本遺伝子治療学会、Corporate  
Seminer II、熊本、2012 年 6 月 28 日
5. Era, T. Studying the intractable diseases using  
pluripotent stem cells 第 18 回日本遺伝子治療学  
会、Symposium III、熊本、2012 年 6 月 29 日
6. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T,  
Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N,  
Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived  
from Fibrodysplasia ossificans progressive. The 11<sup>th</sup>  
Stem Cell Research Symposium. Tokyo, 17<sup>th</sup> May  
2013.
7. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T,  
Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N,  
Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived  
from Fibrodysplasia ossificans progressive. Poster  
presentation. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of International  
Society for Stem Cell Research. Boston, 14<sup>th</sup> June,  
2013.
8. 江良 択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、  
解析とそのバンク化 第 130 回 熊本小児科学  
会総会 特別講演 熊本 2013 年 6 月 16 日
9. 江良 択実 iPS 細胞と再生医療 第 14 回 医  
薬品等ウイルス安全性シンポジウム 招待講演  
東京 2013 年 9 月 28 日
10. Era T., Soga M, Fusaki N, Hamasaki M, Yoneda K,  
Nakamura K, Matsuo S, Irie T, and Endo F. Model of  
Niemann-Pick disease type C using iPS cells. The 3<sup>rd</sup>  
Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases and  
The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for  
Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 28<sup>th</sup> November,  
2013.

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

## 作成上の留意事項

### 1. 「A. 研究目的」について

厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。

### 2. 「B. 研究方法」について

(1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。

(2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセント)に関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

### 3. 「C. 研究結果」について

全体の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。

### 4. その他

(1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。

(2) 文字の大きさは、10~12ポイント程度とする。