

Kii ALS/PDC（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と  
病態解析および創薬研究

広川佳史<sup>1)</sup>，森本悟<sup>1)2)</sup>，石川充<sup>2)</sup>，赤松和土<sup>2)</sup>，駒野肇<sup>2)</sup>，  
小久保康昌<sup>3)</sup>，葛原茂樹<sup>4)</sup>，白石泰三<sup>1)</sup>，岡野栄之<sup>2)</sup>

- 1) 三重大学大学院医学系研究科基礎医学講座腫瘍病理学
- 2) 慶應義塾大学医学部生理学教室
- 3) 三重大学大学院地域イノベーション学研究所
- 4) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療福祉学科

**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 細胞樹立から神経細胞分化は慶応大学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や創薬に至る研究を in vitro での実験により行う。

研究分担者氏名：広川佳史

所属機関名：三重大学大学院医学系研究科  
基礎医学講座腫瘍病理学

**A.研究目的**

難治性疾患である Kii ALS/PDC（牟婁病）は病態、発症機序、さらには治療法についての研究が困難であった。それは適切な動物モデルが存在せず、培養実験に使用できる患者由来の細胞を得ることができなかつたことに大きな原因があった。近年 iPS 研究の発展により患者由来の細胞を倫理的に問題にならない方法で調整することができるようになった。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。本研究は病態解明および創薬研究を進展させることが目的である。

**B.研究方法**

Kii ALS/PDC 患者の協力のもと患者から採血を行い、末梢血単核球又は T 細胞を調製する。エピソーマルベクターを用いて、

SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, ドミナントネガティブ p53, LIN28, EBNA1 といった初期化因子を血液細胞に導入し、フィーダー細胞上で 3~5 週間培養をう。各々の患者由来 iPS 細胞で解析に用いることの可能なクローンの選抜を試行する。

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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -synuclein、TDP-43蛋白の産生に差があるか検討する。

### (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

Kii ALS/PDC 患者5名の血液検体を用いて、疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、解析に適したクローンの選抜中である。

### D. 考察

一般的に iPS 細胞は染色体異常が起こりやすい。核型解析を行って異常の認められないクローンを解析用として最終的に選別する必要がある。同時に多分化能を有した状態の確認が必要である。

iPS 細胞から運動神経、ドパミン作動性神経、興奮性神経、抑制性神経、グリア細胞へと分化誘導を行い、研究方法で上げたような各種の生化学的研究を行って病態解明を進める。

創薬研究においても患者 iPS 細胞から分化誘導した各細胞を用いて、既存の薬剤や神経保護作用や異常凝集物除去能を有する新たな治療薬を探索する。

### E. 結論

Kii ALS/PDC 患者5例から iPS 細胞を樹立し、病態解析に用いる iPS 細胞クローンの選抜を進めていく。神経系細胞への分化誘導を行い、病態の解明や新たな治療開発につながる研究を行っていく。

### F. 研究発表

1. 論文発表 本年度はなし。

2. 学会発表 本年度はなし。

### G. 知的所有権の取得状況

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 本年度はなし。