

## V. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表  
(平成25年度)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
近藤孝之、井上治久、高橋良輔	大脳皮質神経細胞への分化誘導	中辻憲夫／監、末盛博文／編	ES・iPS細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識	羊土社	日本	2014	III 217-225
近藤孝之、井上治久	ヒト多能性幹細胞を用いた疾患研究と創薬開発の展開	中辻憲夫／監、末盛博文／編	ES・iPS細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識	羊土社	日本	2014	V 338-344
前伸一、荒岡利和、長船健二	iPS細胞培養法	富野康日己	分子腎臓病学実験操作法	中外医学社	日本	2013	27-36

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., Hori, O., Hibino, S., Choshi, T., Nakahata, T., Hioki, H., Kaneko, T., Naitoh, M., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Hata, R., Ueno, S., Seki, T., Kobayashi, K., Toda, T., Murakami, K., Irie, K., Klein, W.L., Mori, H., Asada, T., Takahashi, R., Iwata, N., Yamanaka, S., Inoue, H.	Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A $\beta$ and Differential Drug Responsiveness.	Cell Stem Cell	12(4)	487-496	2013

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, MC., Gage, FH., Yamanaka, S., <u>Inoue, H.</u>	Response to Comment on "Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells".	Science Translational Medicine	5(188)	188lr2	2013
Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Tomioka, M., Kondo, T., Kuo, T-F., Endo, H., <u>Inoue, H.</u> , Sato, Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata, K., Kawase, E., Chang, Y-T., Suemori, H., Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., Ueda, K., Uesugi, M.	A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells.	Cell Reports	6(6)	1165-1174	2014
<u>Inoue, H.</u> , Nagata, N., Kurokawa, H., Yanamaka, S.	A game changer for future medicine.	The EMBO Journal	33(5)	409-417	2014
Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., <u>Yoshida, Y.</u> , Toyoda, T., <u>Osafune, K.</u> , Sekiguchi, K., Yamanaka, S.	A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells.	Scientific Reports	4	3594	2014
Miki K., <u>Yoshida Y.</u> , Yamanaka S.	Making steady progress on direct cardiac reprogramming toward clinical application	Circ Res.	113	13-15	2013
Kamakura T., Makiyama T., Sasaki K., <u>Yoshida Y.</u> , Wuriyanghai Y., Chen J., Hattori T., Ohno S., Kita T., Horie M., Yamanaka S., Kimura T.	Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture.	Circ J.	77	1307-1314	2013

Nakagawa K., Gonzalez-Roca E., Souto A., Kawai T., Umebayashi H., Campistol JM., Cañellas J., Takei S., Kobayashi N., Callejas-Rubio JL., Ortego-Centeno N., Ruiz-Ortiz E., Rius F., Anton J., Iglesias E., Jimenez-Treviño S., Vargas C., Fernandez-Martin J., Calvo I., Hernández-Rodríguez J., Mendez M., Dordal MT., Basagaña M., Bujan S., Yashiro M., Kubota T., Koike R., Akuta N., Shimoyama K., Iwata N., <u>Saito MK.</u> , Ohara O., Kambe N., Yasumi T., Izawa K., Kawai T., Heike T., Yagüe J., Nishikomori R., Aróstegui JJ.	Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes.	Ann Rheum Dis.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2013
Morishima T., Watanabe KI., Niwa A., Hirai H., Saida S., Tanaka T., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., <u>Saito MK.</u> , Matsubara K., Adachi S., Kobayashi M., Nakahata T., Heike T.	Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. 2013 Aug 23. [Epub ahead of print]	Haematologica	99(1)	19-27	2014
Yanagimachi MD., Niwa A., Tanaka T., Ozaki F., Nishimoto S., Murata Y., Yasumi T., Ito J., Tomida S., Oshima K., Asaka I., Goto H., Heike T., Nakahata T., <u>Saito MK.*.</u>	Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions.	PLoS One	8(4)	e59243	2013
近藤孝之、 <u>井上治久</u>	iPS細胞を用いた神経疾患病態研究	Medical Science Digest	39(5)	25-28	2013
今村恵子、 <u>井上治久</u>	iPS細胞を用いた神経・精神疾患治療薬の開発	医学の歩み 近視研究の新展開	245(10)	885-886	2013
近藤孝之、 <u>井上治久</u>	PS細胞による神経疾患研究	Clinical Neuroscience	31(7)	855-857	2013
今村恵子、 <u>井上治久</u>	ALS病態解明に寄与するiPS細胞の樹立	感染・炎症・免疫	43(2)	64-65	2013
近藤孝之、 <u>井上治久</u>	PS細胞技術を用いたアルツハイマー病の新たな医療開発	認知症の最新医療	3(3)	139-146	2013
近藤孝之、 <u>井上治久</u> 、高橋良輔	iPS細胞の治療応用	日本内科学会雑誌	102(8)	2015-2022	2013

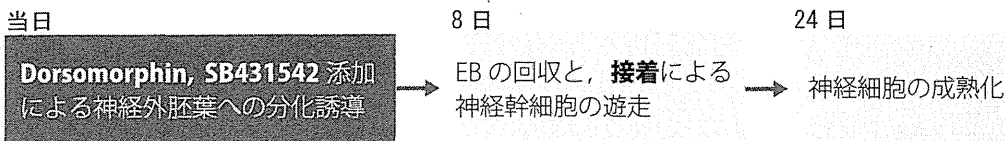
近藤孝之、 <u>井上治久</u>	アルツハイマー病患者由来 iPS細胞を用いた細胞内A $\beta$ 関 連ストレスと薬剤応答性の 解明	細胞工学	32(9)	988-989	2013
<u>井上治久</u>	人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPS細胞) と神経変性疾患	日本内科学 会雑誌	102(9)	2267-2272	2013
今村恵子、 <u>井上治久</u>	iPS細胞作製技術を用いた神 経変性疾患の研究	日本生物学 的精神医学 会誌	24(3)	131-133	2013
近藤孝之、 <u>井上治久</u>	神経再生医療の現状	神経・精神 疾患診療マ ニュアル	142(2)	S356- S357	2013
江川齊宏、 <u>井上治久</u>	神経変性疾患特異的iPS細胞 の樹立と病態解析, 創薬へ の応用	Medical Science Digest	39(11)	10-13	2013
<u>齋藤潤</u>	iPS細胞を用いた難病研究	アレルギー ・免疫	20	1410-1415	2013
<u>齋藤潤</u>	疾患特異的iPS細胞を用いた 難治性血液・免疫疾患の病 態解析	Medical Science Digest	39	522-525	2013

## VI. 研究成果の刊行物・印刷物

# 9 大脳皮質神経細胞への分化誘導

近藤孝之, 井上治久, 高橋良輔

## フローチャート



## はじめに

神経疾患の首座である中枢神経系は、再生が難しいため、限られた場合を除いて生検材料を得ることができない。そのため直接的な病態検討・治療の取り組みには限界があり、ヒト神経細胞を研究に取り入れることが困難であった。しかし、ヒトES細胞が1998年に樹立されて以後、ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導法の開発が進んだ。続いて、2007年に体細胞リプログラミングによるヒトiPS細胞の樹立技術が開発されると、ES細胞で培われた分化誘導に関する知見をもとに、神経疾患患者由来のヒトiPS細胞から神経細胞へと分化誘導・解析を行う疾患モデリングが行われ、医学研究の大きなパラダイムシフトを産み出している。

本項では、ヒトES細胞およびiPS細胞から、特に大脳皮質神経細胞へ分化誘導するための技術について記載する。この方法は、笹井らの開発したSFEBq法 (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation)<sup>1)</sup>をもとに改変したもので、多能性幹細胞から99%を超える高純度の神経幹細胞 (Nestin陽性) を誘導し、さらには成熟神経細胞へと分化させることができる非常に強力な方法である<sup>2)</sup>。

## 準備

### 多能性幹細胞

- ヒトiPS細胞もしくはヒトES細胞

本項では、SNL細胞などのフィーダー上で培養しているものとする\*1。

### 培養関連の消耗品

- 低吸着処理を施したU底の96ウェルプレート  
例えば、Greiner SC U-bottom plate, #650185.
- セルリザーバー

\*1 70~80%コンフルエントの60 mm ディッシュが1枚程度あれば、後述の96ウェルプレート1枚に充分な量の細胞数が得られる。また、神経系細胞への安定かつ純度の高い分化誘導のためには、出発地点である多能性幹細胞の状態が大変重要である。

例えば、アズバイオ ディスポピペッティングリザーバー, #1-6773-01.

- タンパク質低吸着チューブ

例えば、ワトソン, #PK-15C-500.

### 培養関連の試薬

- DMEM/Ham's F12 Glutamax (ライフテクノロジーズ社, #10565-018)
- Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ社, #21103-049)
- KnockOut Serum Replacement (ライフテクノロジーズ社, #10828-028)
- NEAA (x100)
- 2-ME (2-Mercaptoethanol 55 mM)
- Penicillin/Streptomycin (x100)
- N-2 supplement (100x) liquid (ライフテクノロジーズ社, #17502-048)
- B-27<sup>®</sup> Supplement Minus Vitamin A (50x) (ライフテクノロジーズ社, #12587-010)
- Glutamax (ライフテクノロジーズ社, #35050-061)
- Human recombinant BDNF CF  
滅菌蒸留水で500 µg/mLに調製する。-80°Cで6カ月保存可能\*<sup>2</sup>.
- Human recombinant GDNF CF  
滅菌蒸留水で500 µg/mLに調製する。-80°Cで6カ月保存可能\*<sup>2</sup>.
- Human recombinant NT3 CF  
滅菌蒸留水で500 µg/mLに調製する。-80°Cで6カ月保存可能\*<sup>2</sup>.
- Y-27632  
滅菌蒸留水で10 mMに調製する。遮光, -20°Cで6カ月 or 4°Cで1カ月保存可能.
- Dorsomorphin \*<sup>3</sup>  
DMSOで2 mMに調製する。-20°Cで6カ月 or 4°Cで1カ月保存可能.
- SB431542 \*<sup>3</sup>  
DMSOで10 mMに調製する。-20°Cで6カ月 or 4°Cで1カ月保存可能.
- マトリゲル (Becton Dickinson社, #354234)
- Pluronic<sup>®</sup> F-127 (シグマ・アルドリッチ社, #P2443)\*<sup>4</sup>  
エタノールで1% w/vに調製する。常温で6カ月保存可能。アルミホイルで遮光する.
- エタノール

\*<sup>2</sup> タンパク質低吸着チューブを使用.

\*<sup>3</sup> DMSOで希釈したDorsomorphinおよびSB431542は4°Cでも凍結してしまう。凍結・解凍の繰り返しを避けるため使用スケールに合わせてなるべく小分けでストックをする.

\*<sup>4</sup> Pluronic<sup>®</sup> F-127は常温では溶けにくい。ストック保存も溶け残った状態で問題ない.



Accutase (Innovative Cell Technologies社, #AT104)

### その他必要機器

遠心機

96ウェル培養プレートの遠心操作が可能なスイングバスケットが付いたもの。

ウォーターバス

培養インキュベータ

37°C, 5% CO<sub>2</sub>維持ができる装置。

マルチチャンネルピペット

8ch もしくは 12ch。

細胞計数盤

もしくはセルカウンター。

### 培地の調製

神経細胞分化に用いる培地の混和容量を表形式にして記載する。

作製後4週間以内に使用するようにする。

DFK5% DS 培地

2. で使用。

	(最終濃度)
DMEM/Ham'sF12 Glutamax	463.0 mL
KnockOut Serum Replacement	25.0 mL (5% v/v)
NEAA (x100)	5.0 mL (x1)
Penicillin/Streptomycin (x100)	5.0 mL(100/100unit/mL)
2-ME (55 mM)	0.909 mL (0.1 mM)
Dorsomorphin	500 μL (2 μM)
SB431542	500 μL (10 μM)
合計	約500.0 mL

DFN2D 培地

3. で使用, ウォーターバスで加温してはいけない。

	(最終濃度)
DMEM/Ham'sF12 Glutamax	483.6 mL
N2 supplement (100x)	5.0 mL (x1)
NEAA (x100)	5.0 mL (x1)
Penicillin/Streptomycin (x100)	5.0 mL(100/100unit/mL)
2-ME (55 mM)	0.909 mL (0.1 mM)
Dorsomorphin	500 μL (2 μM)
合計	約500.0 mL

## □ NB27full 培地

4. で使用, ウォーターバスで加温してはいけない。

(最終濃度)

Neurobasal Medium	480 mL	
B-27 <sup>®</sup> Supplement Minus Vitamin A (50x)	10 mL	(×1)
Glutamax	5 mL	(×1)
Penicillin/Streptomycin (x100)	5 mL	(100/100 unit/mL)
BDNF	10 μL	(10 ng/mL)
GDNF	10 μL	(10 ng/mL)
NT3	10 μL	(10 ng/mL)
合計	約 500 mL	

## プロトコール

神経分化プロトコールの各段階は, **1.** SFEBq用のプレート準備, **2.** SFEBqによる細胞凝集塊の形成と神経系誘導, **3.** 神経幹細胞の遊走, **4.** 成熟神経細胞, に分けて記載する。

### 1. SFEBq用プレートの準備 (Pluronic F-127 コート)

① ストック溶液中で常温保存時には溶け残っていたPluronic<sup>®</sup> F-127<sup>3)</sup> を, 37°Cウォーターバスで完全に溶かす



② U底96ウェルプレートに, 20 μL/wellで分注する\*1



③ クリーンベンチ内で, 蓋を開けて\*2 2時間もしくはオーバーナイトで完全に乾燥させる



④ 蓋を閉じて, 使用時まで常温・アルミホイル遮光で保存する  
6カ月程度は使用可能。

\*1 析出しないようにすばやく分注する。

\*2 蓋を開けることがポイント。

### 2. SFEBqによる細胞凝集塊の形成と神経系誘導 (Day 0~8)

① CTK処理により, フィーダー細胞を剥がす。続いて, PBSでの洗浄を2回行う\*3



② Accutase 1 mL/dish (60 mmディッシュ) を添加, 37°Cで12~14分間インキュベートし, シングルセルに乖離させる



③ DFK5% DS培地 (9 mL/dish, 60 mmディッシュ) を加え

\*3 フィーダー細胞を神経分化にもち込まないように, 通常の継代時よりもやや強めにCTK処理を行い, PBSでの洗浄も丁寧に行う。

て Accutase を希釈, ES・iPS 細胞を懸濁する

- ↓
- ④ 15 mL チューブに懸濁液の全量に移して, 遠心操作 (200G, 3分間) する

↓

  - ⑤ 上清を吸引, DFK5% DS 培地を加え再度懸濁させ, 細胞数をカウントする

↓

  - ⑥ ⑦で必要となる容量 (200  $\mu$ L/well) の DFK5% DS 培地に, Y-27632 を最終濃度 10  $\mu$ M で添加する

↓

  - ⑦ 45,000 cells/mL となるように, Y-27632 を加えた DFK5% DS 培地で細胞を懸濁する

↓

  - ⑧ 1. ④で Pluronic® F-127 コートを施した 96 ウェルプレートに, 200  $\mu$ L/well で播種する (9,000 cells/well)

↓

  - ⑨ 96 ウェルプレートを遠心操作 (200G, 1分間) することで, U 底中央に細胞を集めたのち, インキュベーターへ戻す

↓

  - ⑩ Day 8 までそのまま培養を継続する\*<sup>4</sup>  
翌日には 1 つの細胞凝集塊ができており, 以後これを EB (Embryoid body) と呼称する (図 1).

\*4 培地液量が乾燥のため減るなら適宜 DFK5% DS 培地を追加する

### 3. EB の接着による神経幹細胞の遊走 (Day8~24)

- ① 氷上で解凍したマトリゲル 100  $\mu$ L と, 4°C で冷蔵した DFN2D 培地 1,900  $\mu$ L とを氷上で混和する

↓

- ② 6 ウェルプレートに, 1 mL/well のコート液を分注 (合計 2 well), 室温で 2 時間コートする

↓

- ③ 2. ⑨で形成された EB を, P1000 マイクロピペットを用いて吸引, 15 mL チューブに 2 本に分けてすべて移す

↓

- ④ 1 分間静置すると EB がチューブ底に沈むので, 上清を吸引除去する

⑤ DFN2D 培地をそれぞれに 3 mL ずつ加える

再度 1 分静置すると EB がチューブ底に沈むので、上清を吸引除去し洗浄する。



⑥ DFN2D 培地をそれぞれに 4 mL ずつ加える

②のマトリゲルコート液をすべて吸引除去。EB が浮いた DFN2D 培地 4 mL 全量を 6 ウェルプレート の 1 ウェルに移し、インキュベーターへ戻す\*5。

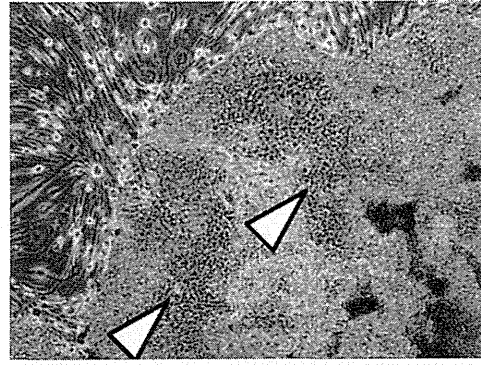
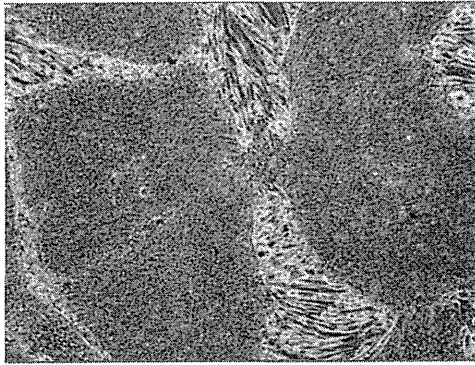


\*5 96 ウェルプレートから EB を取り出し 48 個ずつまとめ、6 ウェルプレートの 1 ウェルに移す計算である

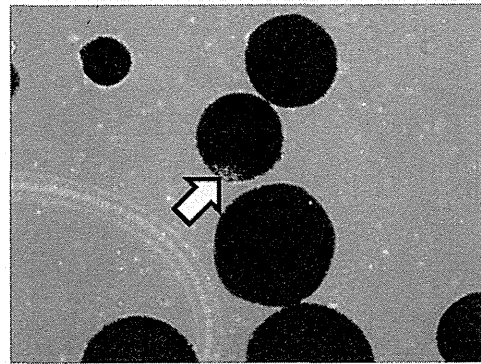
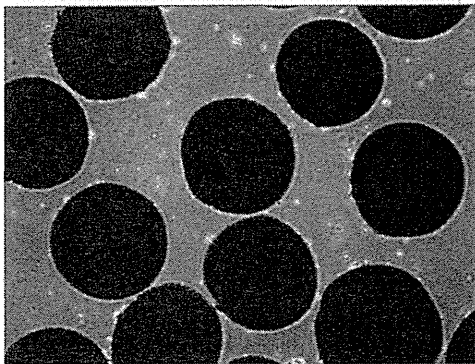
“適切”な状態

“不適切”な状態

iPS 細胞  
(day 0)



EB  
(day 8)



接着した EB  
(day 16)

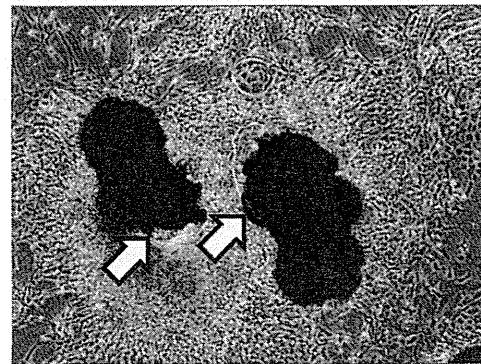
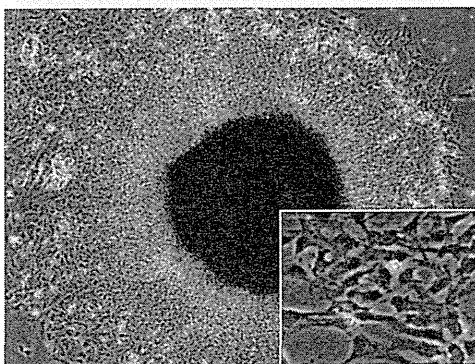


図 1 適切に維持された iPS 細胞を用いることが重要である

分化したコロニー (矢頭) が多く、EB 形成時点で大きさが不均一であったり、嚢胞状の構造物 (矢印) が形成される。神経幹細胞の遊走も不均一で扁平もしくは多角形の細胞がみられる。適切な状態の iPS 細胞を用いた場合、均一かつ球状の EB が形成され、短い突起を伸ばした神経幹細胞が遊走する

- ⑦ 以後、3日おきに培地を全量交換しながら Day 24 まで培養を続けると、EB 接着部を中心として周囲に神経幹細胞が遊走する (図 2) \*6

\*6 EBの張り付きが不良であったり、神経幹細胞の遊走形態が異常であったりしないか、観察を続ける。特に分化誘導開始時点での未分解時の状態の悪さ(分化してしまったコロニーが多いと)が大きく影響する(図1)。

#### 4. 神経細胞の成熟化 (Day24~56)

- ① 3.①②と同様の手順で必要分の培養プレートに、マトリゲルコーティングを施す

ただしマトリゲルの希釈には NB27full 培地を用いる\*7。



- ② 3.⑦から Day24 まで経過した神経幹細胞を、PBS で洗浄する



- ③ Accutase 700  $\mu$ L/well (6 ウェルプレート) を添加, 37°C で 10~20 分間インキュベートし, シングルセルに乖離させる\*8



- ④ NB27full 培地 (7 mL/well, 6 ウェルプレート) を加えて Accutase を希釈, 細胞を懸濁する



- ⑤ 15 mL チューブに懸濁液の全量を移して, 遠心操作 (200G, 3分間) する



Accutase 処理中の  
神経幹細胞 (day 24)

継代後突起を伸長する  
神経細胞 (day 26)

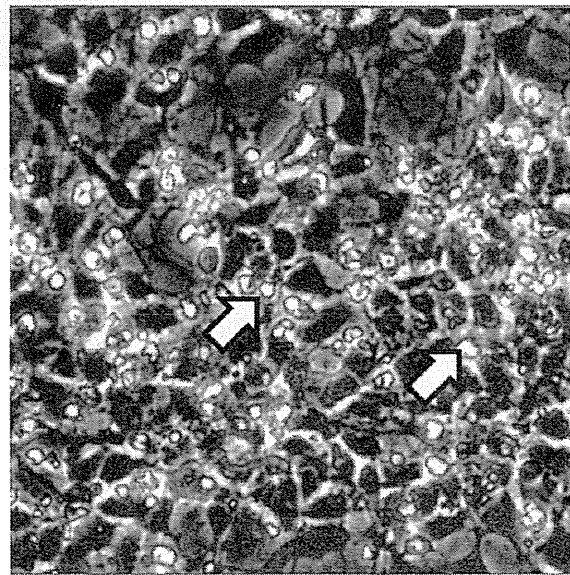
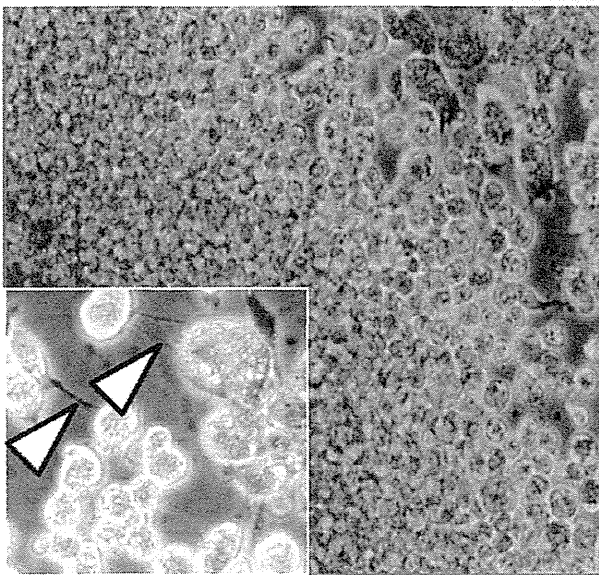


図2 Day 24における神経幹細胞の継代

Day 24の Accutase 処理は長時間行うことで伸長していた神経突起は縮退し, 球状のシングルセルとなる。一部の成熟神経では長い突起がそのままとなる(矢頭)が遠心分離の段階で吸引除去される。継代後48時間の Day 26 では, 神経の突起を伸長している様子が観察される。継代のストレスで死細胞(矢印)が多く含まれるが, 培地交換を続けることで除去される

\*7 24 ウェルプレートの場合は 300  $\mu$ L/well, 12 ウェルプレートの場合は 500  $\mu$ L/well のコート液を使用する。コート済みプレートは, ラップにくるみ冷蔵庫で1週間程度は保存できる(その際, プレート表面が乾燥しないようにやや多めのコート液を入れておく)。

\*8 神経突起を伸ばしている細胞が多く, 数分程度の短時間の酵素処理ではメカニカルな細胞間接着剥離となり細胞にダメージが大きい(図2)。

⑥ 上清を吸引, NB27full 培地を加え再度懸濁させ, 細胞数をカウントする



⑦ ③で必要となる容量のNB27full 培地に, Y-27632 を最終濃度 10 μM で添加する

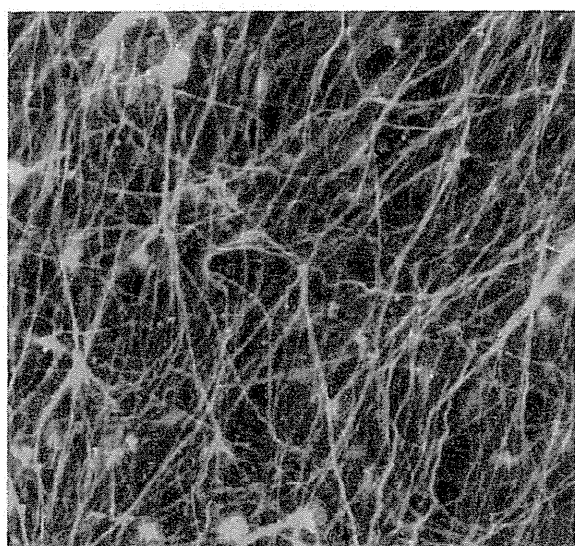


⑧ ①でコート済みのプレートに, 細胞を播種する\*<sup>9</sup>



⑨ 以後, 3日おきに培地を全量交換しながら, Day 56 まで培養を続ける (図3)

分化・成熟した神経細胞 (day 56)



DAPI CTIP2 TUJ1

図3 Day 56 における成熟神経細胞

分化誘導された神経細胞は, TUJ1 やMAP2 といった神経細胞マーカー, および大脳皮質に特異的な転写因子を発現する. DAPIは核, CTIP2は大脳皮質神経細胞の転写因子, TUJ1 は神経細胞をそれぞれ示す

\*<sup>9</sup> 細胞の播種密度は, 細胞のクローン・アッセイ系に応じて調節する (例 100,000 cells/well, 24ウェルプレートなど). 継代播種の翌日はかなり死細胞が混じるが, 培地交換とともに除去される (図2).

## 実験結果

本プロトコールにより分化誘導した神経細胞は, 神経細胞のマーカーであるTUJ1 やMAP2 陽性かつ, 大脳皮質のマーカーであるCTIP2, TBR1, SATB2などの転写因子の発現が観察される (図3). また神経細胞の種類としては, 95%程度がVGLUT1 陽性の投射ニューロンである (残りはChAT 陽性ニューロン, GAD65/67 陽性のGABA ニューロンである).

## おわりに

近年の知見蓄積，もしくはわれわれの研究室においても，クローン間の分化効率に差があることを確認している．そのため，まずは理研細胞バンクから配布されている健常人由来ヒトiPS細胞株を用いてプロトコル手技の確認を行うことも必要である．特に201B7や409B2株は，iPS細胞の適切な維持と継代が容易で，なおかつ神経系細胞への分化が良好である．次の段階として多数のクローンに展開する際は，①多能性幹細胞を分化開始直前まで適切な状態を保つことと，②Day24での細胞播種密度を検討することで，われわれの研究室では少なくとも20を超えるクローンで神経細胞のマーカー陽性率を最低でも60～70%より高く保つことができることを確認している．

神経細胞への分化方法は日々改良されており，今後の本格的な創薬および毒性研究にまで到達するために，より分化期間が短く，安定かつ高効率な分化誘導法開発も期待される．

### ◆ 文献

- 1) Biraku, M. et al. : Cell Stem Cell, 3: 519-532, 2008
- 2) Kondo, T. et al. : Cell Stem Cell, 12: 487-496, 2013
- 3) Dang, S. M. et al. : Biotechnol. Bioeng., 78: 442-453, 2002

# ヒト多能性幹細胞を用いた 疾患研究と創薬開発の展開

近藤孝之, 井上治久

ヒト多能性幹細胞は、無限増殖能と多分化能を有しており、再生医療の材料としての利用だけでなく、創薬における有効性・安全性の評価系構築への利用が期待されている。初代培養細胞とは異なり、無限に増殖することができるため、大量の安定した細胞リソースとしての役割を果たすことができる。また、最近数年で、ヒト多能性幹細胞から疾患の標的臓器の細胞へと分化誘導させる技術が飛躍的に発展している。これらを組み合わせることで、多能性幹細胞は疾患解析や創薬における非常に魅力的な疾患モデルになりうる。本項では、特に神経疾患を例として、多能性幹細胞を用いた疾患解析と薬剤有効性評価研究の背景および最近の動向について紹介したうえで、今後の展望についても述べたい。

## 疾患研究の歴史における多能性幹細胞

神経疾患の研究は、臨床的診断を基盤として、死後脳を用いた病理学的検討に始まった。続いて、疾患を引き起こす遺伝子とその変異の探索研究が1980年代から進んだ。メンデル型の遺伝形式をとる家族性（遺伝性）疾患の原因遺伝子として同定された遺伝子を、不死化細胞株や動物において、過剰発現もしくは欠失させることで、疾患病理や臨床症状を模倣するモデル細胞やモデル動物が開発された（疾患モデリング）。これらの遺伝子改変疾患モデルは、現在でも病態探索と創薬開発における中心的存在であり続けている。一方で、神経疾患の中でも、特定の神経細胞に変性・細胞死を生じる神経変性疾患においては、詳細なメカニズムは未解決の部分が多く、疾患根治につながる治療選択肢はなく、対症療法にとどまっている。既存の遺伝子改変疾患モデルではきわめて高い有効性を示した薬剤であっても、臨床治験の段階で副作用発露や効果が不十分であることがみられたりする。この背景には、マウスとヒトとの違い以外に、原因遺伝子の過剰発現・欠失による人工的に拡大された表現型を解析していた可能性が指摘されている。そのため、ヒト患者細胞を用いての神経疾患研究スキームの開発が望まれていたが、神経系細胞の初代培養細胞の利用は、リソースとしても技術的にもきわめて困難であった。

そのような状況のなか、1998年にヒトES細胞の樹立が報告され、続いて本邦でも日本人由来のヒトES細胞が樹立されるようになった。並行して、ES細胞から神経細胞への分化誘導技術の開発が進められ、このES細胞由来の神経細胞を疾患解析に使う研究がなされてきた<sup>1) 2)</sup>。しかし、倫理面や法的規制での研究応用におけるハードルが存在したことと、ES細胞樹立のための着床前受精卵の供給に限りがあることなどを背景として、疾患モデリン



グへの利用は限定的であった。これらの問題点を解決できる新技術として、2007年にヒトiPS細胞の樹立法が報告された<sup>3)</sup>。そして、患者由来iPS細胞の樹立と疾患モデリングへの応用研究が爆発的に広がった。

## ヒト多能性幹細胞を用いた疾患モデリング

多能性幹細胞を用いた疾患モデリングにおいて、標的となる細胞を適切に誘導することは非常に重要である。このような分化誘導技術の開発は、主にヒトES細胞を用いて研究されてきた。そしてこのES細胞で培われた分化誘導技術は、ヒトiPS細胞にもほぼそのまま利用できることがわかり、患者の体細胞から作製したiPS細胞による疾患モデリング研究が始まった。例えば、遺伝性神経疾患患者のiPS細胞からも、大脳皮質神経細胞・運動神経細胞・ドパミン神経細胞など、個々の疾患に応じた神経細胞腫を分化誘導させることで、既知の病態を再現できることが確認された(表)。

一方で、遺伝的背景が明らかでない孤発例の解析は、主にGWAS (Genome-wide association study) 手法を用いて、その遺伝的・分子的背景の探索が進められてきた。この孤発例においてさえも、患者iPS細胞から分化誘導した細胞で、疾患表現型の検出もなされるようになってきた<sup>4)~9)</sup>。今後は遺伝改変疾患モデルではアプローチが不可能であった孤発性疾患に対しても、患者由来iPS細胞を用いた解析から分子病態や疾患マーカーの探索が進む可能性がある。

さらに、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した細胞は、既存の細胞株よりも生理的状态に近いことが予測されている。その一例として、アルツハイマー病の治療薬として有望視されていた $\gamma$ -セクレターゼ調節薬は、アルツハイマー病関連遺伝子を過剰発現した腫瘍細胞株を用いて開発が進められていた。しかし、この薬剤をヒトES細胞から分化誘導した神経細胞を用いて薬効を評価すると、非常に高濃度でのみようやく効果がみられ、生体薬剤動態を模した低濃度では効果がないことが確認された<sup>10)</sup>。このことは、遺伝子改変疾患モデルで積み上げられた病態に対する知見を見直していく必要性を示唆している。

しかしながら、これまでの患者由来iPS細胞による神経疾患研究は、病理学的知見や遺伝子改変・過剰発現モデルで解き明かされてきた病態の再現にとどまるものが多い。この理由として、疾患関連の変異遺伝子を過剰発現もしくは欠失させた従来の細胞モデルの方が、遺伝的な疾患背景を1~2コピーしかもたないiPS細胞由来の分化誘導細胞よりも、より強い細胞表現型が表出しやすい可能性がある。このような比較的小さな疾患表現型を検出するためには、①より精度の高いiPS細胞維持技術と分化誘導技術を用いること、②疾患表現型検出の感度を上げること、③コントロール・患者それぞれのクローン数を増やすこと、さらには④近年応用が急速に進んでいる遺伝子編集技術を用いること、があげられる<sup>11)</sup>。前二者の技術開発は日進月歩で、特に下記に述べる創薬研究への利用において大変重要である。後二者はともに一長一短の箇所があるが、2013年にZFN (Zinc Finger Nuclease) を用いてパーキンソン病の原因遺伝子であるLRRK2のG2019S変異を正常型に改変し、疾患

V

I

ヒト多能性幹細胞を用いた疾患研究と創薬開発の展開

表 ヒト多能性幹細胞を用いた神経系および筋肉系の疾患モデリングの例

疾患	遺伝子変異	表現型	文献
神経系			
アルツハイマー病	<i>APP</i> E693Δ <i>APP</i> V717L Sporadic	細胞内 Aβ オリゴマーの蓄積 上清 Aβ 42/40 比の上昇 小胞体ストレス・酸化ストレス 神経栄養因子除去条件下での神経細胞死	文献 9
アルツハイマー病	<i>APP</i> duplication	上清 Aβ 40 の増加 リン酸化タウ (T231 部位) の増加 GSK3 β の活性化	文献 6
アルツハイマー病	<i>PS1</i> A246E <i>PS2</i> N141I	上清 Aβ 42/40 比の上昇	Yagi, T. et al. : Hum. Mol. Genet., 20 : 4530-4539, 2011
ダウン症候群	Chr.21 trisomy	上清 Aβ 40 の増加 Aβ フィブリルの細胞外蓄積 リン酸化タウ (T231・S396 部位) の増加	Shi, Y. et al. : Sci. Transl. Med., 4 : 124ra29, 2012
前頭側頭型認知症	<i>PGRN</i> S116X	<i>PGRN</i> の発現減少 PI3-Akt 経路に比べて, MEK-MAPK 経路の活性化	Almeida, S. et al. : Cell Rep., 2 : 789-798, 2012
前頭側頭型認知症	<i>C9ORF72</i> intron GGGGCC repeat expansions	神経分化過程における GGGGCC リピートの不安定性 RNA foci の形成 Gly-Pro ペプチドの蓄積 (RANT ペプチドの蓄積) クロロキン・3-methyladenine への脆弱性	Almeida, S. et al. : Acta Neuropathol., 126 : 385-399, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>TARDBP</i> G298S <i>TARDBP</i> M337V <i>TARDBP</i> Q343R	不溶性画分 TDP-43 増加 神経突起の短小化	Egawa, N. et al. : Sci. Transl. Med., 4 : 145ra104, 2012
筋萎縮性側索硬化症	<i>TARDBP</i> M337V	溶性画分 TDP-43 増加 神経細胞死	Bilican, B. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109 : 5803-5808, 2012
筋萎縮性側索硬化症	<i>TARDBP</i> M337V	溶性画分 TDP-43 増加 アストロサイト細胞死	Serio, A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110 : 4697-4702, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>VAPB</i> P56S	<i>VAPB</i> 発現の低下 <i>VAPB</i> 陽性封入体 MG-132 処理下における <i>VAPB</i> 不安定性増加	Mitne-Neto, M. et al. : Hum. Mol. Genet., 20 : 3642-3652, 2011
筋萎縮性側索硬化症	sporadic	TDP-43 の細胞内凝集体 リン酸化 TDP-43 (p S409/410) 陽性凝集体	文献 8
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i> exon7 deletion	運動神経細胞への分化効率低下 Gem body の減少 神経突起の伸展不良	Chang, T. et al. : Stem Cells, 29 : 2090-2093, 2011
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i> exon7 deletion	運動神経細胞への分化効率低下 Gem body の減少	Ebert, A. D. et al. : Nature, 457 : 277-280, 2009
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i> exon7 deletion	VPA 不応例において, VPA 応答性の低下 VPA 不応例において, CD36 の発現増加	Garbes, L. et al. : Hum. Mol. Genet., 22 : 398-407, 2013
球脊髄性筋萎縮症	<i>AR</i> CAG repeat	Dihydrotestosterone による AR 蓄積	Nihei, Y. et al. : J. Biol. Chem., 288 : 8043-8052, 2013
パーキンソン病	<i>LRRK2</i> G2019S	ドパミン神経細胞突起長の短小化 過酸化水素による TH 陽性細胞の脆弱性 6-OHDA による活性化カスパーゼ 3 の増加	文献 5

疾患	遺伝子変異	表現型	文献
パーキンソン病	<i>LRRK2</i> G2019S Sporadic	$\alpha$ シヌクレインの蓄積 ドパミン神経細胞突起長の短小化 オートファジー活性の亢進 活性化カスパーゼ3陽性神経細胞の増加	文献7
パーキンソン病	<i>LRRK2</i> G2019S	ドパミン神経細胞突起長の短小化 6-OHDA・ロテノンによる活性化カスパーゼ3の増加 タウ・リン酸化タウの増加 $\alpha$ シヌクレインの増加 リン酸化ERKの増加	文献12
パーキンソン病	<i>PINK1</i> V170G	PINK1依存性, PARKINのミトコンドリア局在化とユビキチン化 Mitophagyの異常	Rakovic, A. et al. : J. Biol. Chem., 288 : 2223-2237, 2013
パーキンソン病	<i>PINK1</i> Q456X <i>PINK1</i> V170G	PARKINのミトコンドリア局在化 ミトコンドリア数の減少 PGC-1 $\alpha$ の増加	Seibler, P. et al. : J. Neurosci., 31 : 5970-5976, 2011
パーキンソン病	<i>PINK1</i> Q456X <i>LRRK2</i> R1441C <i>LRRK2</i> G2019S	バリノマイシンによるROS産生の増加 ミトコンドリア呼吸機能異常 軸索内ミトコンドリア輸送のランダム移動化	Cooper, O. et al. : Sci. Transl. Med., 4 : 141ra90, 2012
パーキンソン病	<i>PARKIN</i> exon 2-4 deletion <i>PARKIN</i> exon 6,7 deletion	酸化ストレスの上昇 $\alpha$ シヌクレインの蓄積	Imaizumi, Y. et al. : Mol. Brain, 6 : 35, 2012
パーキンソン病	<i>SNCA</i> triplication	細胞質・細胞上清中の $\alpha$ シヌクレイン増加	Devine, M. J. et al. : Nat. Commun., 2:440, 2011
パーキンソン病	<i>SNCA</i> triplication	$\alpha$ シヌクレイン増加, 過酸化水素による活性化カスパーゼ3の増加	Byers, B. et al. : PLoS One, 6 : e26159, 2011
ゴーシェ病	<i>GBA</i> N370S/84GG insertion	$\alpha$ シヌクレイン蓄積 不溶性画分の $\alpha$ シヌクレイン増加	Mazzulli, J. R. et al. : Cell, 146 : 37-52, 2011
ハンチントン病	<i>HTT</i> CAG repeat	神経栄養因子除去条件下での神経細胞死	Zhang, N. et al. : PLoS Curr., 2 : RRN1193, 2010
ハンチントン病	<i>HTT</i> CAG repeat	活性化カスパーゼ3の増加 神経栄養因子除去条件下での神経細胞死	HD iPSC Consortium, Cell Stem Cell, 11:264-278, 2012
ハンチントン病	<i>HTT</i> CAG repeat	活性化カスパーゼ3の増加 相同組換えによるCAGリピート延長の正常化	An, M. C. et al. : Cell Stem Cell, 11:253-263, 2012
脆弱X症候群	<i>FMR1</i> CGG repeat expansion	FMR1エピゲノム修飾変化 FMRタンパク発現量の低下 神経突起長の短小化	Sheridan, S. D. et al. : PLoS One, 6 : e26203, 2011
家族性自律神経失調症	<i>IKBKAP</i> Exon20 skip	異常型スプライシング多型の増加 遊走能異常	Lee, G. et al. : Nature, 461: 402-406, 2009
家族性自律神経失調症	<i>IKBKAP</i> Exon20 skip	IKBAPの発現量低下	文献16
脊髄小脳変性症2型	<i>ATXN2</i> hetero	神経幹細胞・線維芽細胞のアタキシン2発現量低下 神経細胞の脆弱性	Xia, G. et al. : J. Mol. Neurosci., 51: 237-248, 2013
脊髄小脳変性症3型 (Machado-Joseph病)	<i>ATXN3</i> CAG repeat	グルタミン酸刺激による, 不溶性画分アタキシン3の増加	Koch, P. et al. : Nature, 480: 543-546, 2011
ドラベ症候群	<i>SCN1A</i> R1645*	GABA作動性神経の活動性低下	Higurash, N. et al. : Mol. Brain, 6: 19, 2013

(次ページへ続く)



ヒト多能性幹細胞を用いた疾患研究と創薬開発の展開

表 (続き)

疾患	遺伝子変異	表現型	文献
ドラベ症候群	<i>SCN1A</i> F1415I <i>SCN1A</i> Q1923R	発作性脱分極変位の増加	Melko, M. et al. : Hum. Mol. Genet., 22:2984-2991, 2013
ティモシー症候群	<i>CACNA1C</i> G406	THの発現増加 ノルエピネフリン・ドパミン分泌量の増加	Pasca S. P. et al. : Nat. Med., 17:1657-1662, 2011
レット症候群	<i>MECP2</i> T158M	MeCP2の発現低下 神経幹細胞への分化は正常 成熟神経細胞数への分化効率は減少	Kim, K. Y. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: 14169-14174, 2011
レット症候群	<i>MECP2</i> Q244X <i>MECP2</i> R308C	MeCP2の発現低下 VLUT1 puncta減少 細胞体サイズの低下 spontaneous firing頻度の減少 EPSP発火頻度の減少	Marchetto, M. C. et al. : Cell, 143:527-539, 2010
統合失調症	Sporadic	シナプス形成数の低下 神経突起長の短小化 spontaneous firing頻度正常 EPSP発火頻度正常	文献4
HSV-1 脳炎	<i>UNC93B1</i> c.1034_1037del4 <i>TLR3</i> c.1660C>T <i>TLR3</i> c.2236G>T	dsRNA アナログ投与もしくはHSV1感染による, IFN-β and/or IFN-γ1誘導の障害	Lafaille, F. G. et al. : Nature, 491:769-773, 2012
多発性硬化症	Sporadic	なし	Song, B. et al. : Stem Cell Res., 8: 259-273, 2012
<b>骨格筋系</b>			
Duchenne型筋ジストロフィー	<i>DMD</i> del exons 4-43	なし	Kazuki, Y. et al. : Mol. Ther., 18: 386-393, 2010
ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群	<i>LMNA</i> c.1824C>T (splice alteration)	低酸素化におけるDNA損傷と細胞死の増加 虚血性マウス後肢障害に対する移植治療での効果が減弱	Zhang, J. et al. : Cell Stem Cell. 8: 31-45, 2011
三好型ミオパチー	<i>DYSF</i> not discribed	ジスフェリンの発現量低下 FM1-43の取り込み増加	Tanaka, A. et al. : PLoS One., 8: e61540, 2013

表現型をレスキューしたという報告がなされた<sup>12)</sup>。また、ヒトES細胞やiPS細胞は、維持培養条件の違いやクローン特性の差により、その分化誘導の効率に差が出るということが知られている。この点を克服するため、多能性幹細胞の均質性を評価するための基準づくりも進んでいる<sup>13) 14)</sup>。

## ヒト多能性幹細胞を用いた創薬

多能性幹細胞を用いた疾患モデリングの、1つのゴールは薬剤を開発することである。この創薬研究においては、ES細胞もしくはiPS細胞から分化誘導した心筋細胞への応用が先行している。これは、洗練された分化誘導系が開発されていること、対象となる機能アッセイ(例えば、QT時間の延長による毒性評価)が比較的安定して行えることなどがあげら