

れる<sup>15)</sup>。神経疾患においては、神経細胞の機能を直接的にハイスループット評価することは現時点で技術的に難しいが、疾患特異的分子を標的としたスクリーニング研究と新薬開発はすでに報告され始めている<sup>16)</sup>。

一方で、多能性幹細胞を用いた細胞系を用いる場合の課題は、数千～数万の薬剤候補の検討に必要な $1 \times 10^9$ オーダーだけの細胞数を供給する目的においては、長期に渡り分化誘導の安定性が得られにくいことがある。この背景として、分化誘導の出発地点を多能性幹細胞（ES細胞およびiPS細胞）においた場合、アッセイに用いる細胞種を誘導し終えるまでに通常複数回の継代ステップと数週間の培養期間を要するためである。これは、分化誘導実験ごとのロット間差に繋がる可能性を意味しており、創薬研究で用いるためには、より少ない操作ステップで、より短い培養期間の分化誘導法開発も併せて進める必要がある。

最終的に、前臨床試験にヒト多能性幹細胞由来の分化誘導細胞を用いることができれば、生理的疾患状態で薬効と毒性を評価できるだろう。そして、臨床治験段階においても期待通りの薬効が発揮され、副作用リスクを回避できる可能性が高まる。つまりは、新薬開発コスト低減・開発期間短縮を経て、上市までの道のりを迅速化することが期待され、大変有望視されている。

## 今後の展開への期待

これまでは多くの場合、多能性幹細胞を用いた疾患モデリングや創薬開発は、平面培養に限られていた。しかし本来、神経組織を含むあらゆる臓器は立体構造をとっているため、分化誘導した細胞がどの程度まで生体内細胞の特性を保有しているかは不明な点が多い。そこで、生理的条件に近い細胞環境を模倣するために、*in vitro*においても三次元の立体培養法の開発が始まっている。例えば、ヒトES細胞もしくはiPS細胞から数ミリの大きさの脳神経塊をつくり、その中に脳皮質に特有の層構造を再現したという報告がある<sup>17) 18)</sup>。現時点では、疾患解析に用いるための安定性・スループットの観点においては改善の余地が残るが、きわめて重要な方向性であり、今後も研究が加速するものと思われる。

iPS細胞を用いた疾患モデリング研究において、多能性幹細胞から標的分化誘導細胞まで1～3カ月の培養期間を経て、疾患解析を行っている。1～3カ月という培養期間は、*in vitro*の培養系としては際立って長いといえる。しかし、10カ月間をかけて母胎内で進むヒト正常発生と比較すると、その前半部である器官形成期に相当する段階で疾患解析をしていることになる。そのため、壮年～老年期という数十年の時間を経て発症する神経変性疾患のモデルとしては不十分ではないかという議論がなされてきた。おそらく既報の疾患モデリングでは、培養環境自体が人工的な加速因子となって、疾患表現型を呈している可能性や、臨床症状がなくても遺伝子変異の影響が周産期の時点で始まっている可能性が考えられている。

しかしながら、神経変性疾患の病理学的特徴であるユビキチン化された異常タンパク質の封入体はこれまでのiPS細胞モデルでの観察は難しいとされてきた。最近、早老症の原因

変異遺伝子を導入することで、*in vitro*での老化を加速させる試みが報告された<sup>19)</sup>。具体的には、パーキンソン病患者のiPS細胞から誘導したドパミン神経細胞内に、早老症の原因となる変異ラミンA遺伝子由来のプロジェリンを過剰発現させることで、パーキンソン病の病理学的特徴であるレビー小体の再現できたとされている。このような分子的手法による細胞レベルでの老化促進も、神経疾患のみならずより広い老化関連疾患の創薬開発においても、重要な役割を担うと考えられる。

これらの技術を用いて、より生理的な病態環境をモデリングすることで、薬剤有効性評価における、感度と精度が上がることが期待される。

## おわりに

すでに、国内外でヒト多能性幹細胞を用いた薬剤有効性の研究は爆発的な広がりを見せているが、いまだ黎明期にあるといえる。患者を対象とした臨床的研究やゲノム解析研究、既存の細胞・動物モデル研究と、緊密に連携を取りながらパラダイムシフトを起こし、疾患の制圧に向けた取り組みが加速されることに期待したい。

### ◆ 文献

- 1) Marchetto, M. C. et al. : Cell Stem Cell, 3 : 649-657, 2008
- 2) Wada, T. et al. : Stem Cells Transl. Med., 1 : 396-402, 2012
- 3) Takahashi, K. et al. : Cell, 131 : 861-872, 2007
- 4) Brennand, K. J. et al. : Nature, 473 : 221-225, 2011
- 5) Nguyen, H. N. et al. : Cell Stem Cell, 8 : 267-280, 2011
- 6) Israel, M. A. et al. : Nature, 482 : 216-220, 2012
- 7) Sánchez-Danés, A. et al. : EMBO Mol. Med., 4 : 380-395, 2012
- 8) Burkhardt, M. F. et al. : Mol. Cell. Neurosci., 56 : 355-364, 2013
- 9) Kondo, T. et al. : Cell Stem Cell, 12 : 487-496, 2013
- 10) Mertens, J. et al. : Stem Cell Reports. 2013.
- 11) Inoue, H. et al. : EMBO J., 2014, in press.
- 12) Reinhardt, P. et al. : Cell Stem Cell, 12 : 354-367, 2013
- 13) Cahan, P. & Daley, G. Q. : Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 14 : 357-368, 2013
- 14) Koyanagi-Aoi, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, , 2013
- 15) Navarrete, E.G. et al.:Circulation,128 : S3-13, 2013
- 16) Lee, G. et al. : Nat. Biotechnol., 30 : 1244-1248, 2012
- 17) Kadoshima, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110 : 20284-20289, 2013
- 18) Lancaster, M. A. et al. : Nature, 501 : 373-379, 2013
- 19) Miller, J. D. et al. : Cell Stem Cell, 13 : 691-705, 2013

## 7

## iPS 細胞培養法

理論上、全身のすべての細胞種に分化しうる多能性幹細胞である ES 細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) とほぼ同等の性質を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞) が、マウスに続いてヒトにおいて作製可能となった。iPS 細胞は、個々の患者由来の体細胞から樹立できるため、それから作製された臓器細胞を患者本人に移植した際に拒絶反応が生じない。また、ヒト ES 細胞と異なり、その樹立にヒト胚を必要としないため倫理的問題が少ない。これらの利点により、iPS 細胞を起点とした細胞移植療法をはじめとする再生医療の実現化への期待が高まっている。

本稿においては、ヒト iPS 細胞の培養方法、凍結保存方法などの基本的な実験操作法を解説する。

## 1 フィーダー細胞

フィーダー細胞とは、iPS 細胞の継代維持に必要な栄養分や足場を供給する役割で使われる下敷き細胞のことを指し、マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) とよばれる初代培養細胞が世界的にも広く使用されている。しかし、iPS 細胞の安定した維持に影響を及ぼす要因は多いが、その1つとして、フィーダー細胞自体の品質があげられる。京都大学 iPS 細胞研究所では、フィーダー細胞として MEF よりも操作が容易であるため品質を維持しやすい SNL 細胞 (SNL 76/7) を主に使用している。本稿においては SNL 細胞を用いたヒト iPS 細胞の培養法について解説する。

SNL 細胞とは、マウス胚線維芽細胞である STO 細胞に、ネオマイシン耐性遺伝子とマウス LIF (leukemia inhibitory factor, 白血病阻止因子) 遺伝子を形質転換したクローンに由来する細胞株のことである。

## 準備するもの

## 【細胞】

SNL 細胞 (European Collection of Cell Cultures: ECACC <http://www.ecacc.org.uk/>)

## 【試薬】

- PBS (-) (ナカライテスク社, 14249-95)
- SNL 培地

Fetal bovine serum (FBS, Japan Bioserum 社, S1650-500) 35 mL

L-glutamine (Invitrogen 社, 25030-081) 5 mL

Penicillin/streptomycin (Invitrogen 社, 15140-122) 2.5 mL

DMEM (ナカライテスク社, 08459-35) 457.5 mL

フィルターに通して濾過滅菌する。4℃で1週間保存可。

- 0.25% Trypsin/1 mM EDTA solution (Invitrogen 社, 25200-056)

- Mitomycin C 溶液 (0.4 mg/mL)

マイトマイシン注用 (協和発酵キリン, GSI-RSS) 2 mg

PBS (-) 5 mL

直前調製, もしくは-20℃で保存する。

- ゼラチン溶液 (0.1%)

ゼラチン (Gelatin: Sigma 社, G1890) 0.5 g

超純水 500 mL

オートクレーブ滅菌し, 4℃で保存する。

#### 【器具】

- 100 mm 培養ディッシュ (FALCON 社, 353003)

- ゼラチンコートディッシュ: 3 mL の 0.1% ゼラチン溶液をディッシュ全体を覆うように行き渡らせ, 37℃で30分以上インキュベートする。使用前にゼラチン溶液を除去する。

- 15 mL チューブ (FALCON 社, 26523)

- 50 mL チューブ (FALCON 社, 26524)

- 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL デイスパーザブルピペット (FALCON 社など)

- Pipet aid (FALCON 社など)

- 0.22  $\mu$ m フィルター (Millex GP: Millipore 社, SLGP033RS)

- 2 mL クライオバイアル (SARSTEDT 社, 72.694.006)

- バイセル 凍結処理容器 (日本フリーザー社)

- ピペットマン, チップ (GILSON 社など)

- Coulter counter (Beckman Coulter 社, Z2)

- CO<sub>2</sub>インキュベーター (Thermo 社など)

### ■フィーダー細胞 (SNL 細胞) の調製

#### ① 凍結 SNL 細胞ストックの起眠

- ① 9 mL の SNL 培地を 15 mL チューブに準備する。

- ② 液体窒素から凍結保存している SNL 細胞のバイアルを取り出し, 37℃の恒温槽中で解凍する (完全には溶かさずに, 小さな氷が残っている程度まで溶かす) (図 1)。

- ③ バイアルにエタノール噴霧による消毒を行い, クリーンベンチ内へ移動し, キャップを開け, P-1000 ピペットマンを用いて, 細胞液を①の 15 mL チューブの培地に懸濁する。

- ④ 160 g (約 900 rpm) で 5 分間遠心後に上清を可能な限り除去し, 細胞ペレットを残す。

- ⑤ 新鮮な SNL 培地 10 mL で細胞ペレットを再懸濁した後, ゼラチンコートした 100 mm ディッシュに播種する。

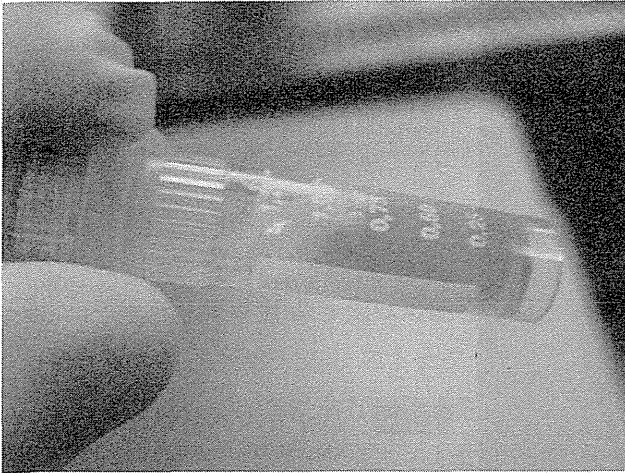


図1 解凍した SNL 細胞

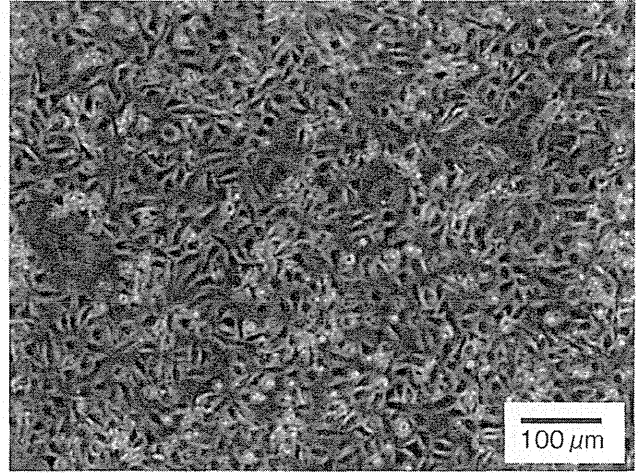


図2 80~90%コンフルエントまで培養した SNL 細胞

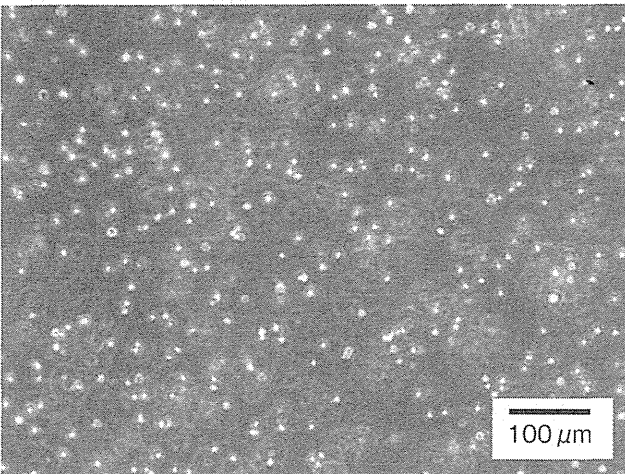


図3 単一細胞まで解離した SNL 細胞

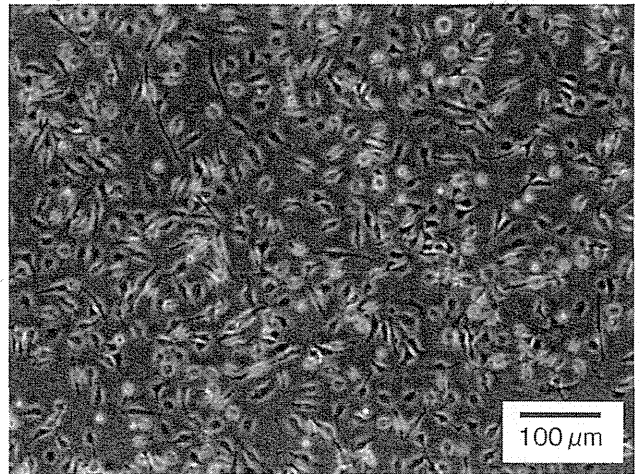


図4 iPS 細胞を播種可能な SNL フィーダー細胞

⑥ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 80~90% コンフルエントに達するまで培養する (図 2)。

## ② SNL 細胞の継代

① 培地を除去し, 5 mL の PBS (-) で細胞を洗う。

② 0.5 mL の 0.25% trypsin/1 mM EDTA を加え, 室温で 1 分間インキュベートする。

③ 4.5 mL の SNL 培地を加え, ディスポーザブルピペットを用いて数回程度ピペッティングし, 単一細胞の状態になるまで解離させる (図 3)。

④ 総量が 160 mL となるように SNL 培地で希釈し, ゼラチンコートした 16 枚の 100 mm ディッシュに 1 枚当たり 10 mL の細胞懸濁液を播種する。希釈割合は 1:16 となる。37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 80~90% コンフルエントに達するまで培養する。継代から次の継代まで 3~4 日かかる。

## ③ Mitomycin C 処理による SNL 細胞の増殖能不活性化

① 100 mm ディッシュ 1 枚当たり 0.3 mL の 0.4 mg/mL Mitomycin C 溶液を SNL 細胞培養液中に直接添加し, 穏やかに揺らして薬剤をディッシュ全体に行き渡らせる。37°C, 5

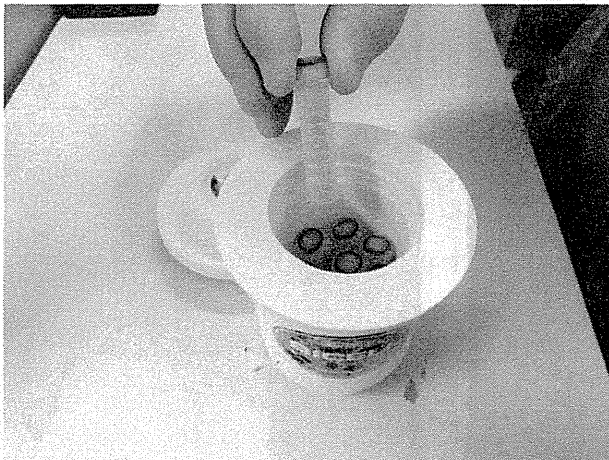


図5 バイセル凍結処理容器でのSNL細胞の凍結

- %CO<sub>2</sub>で2.25時間インキュベートする。Mitomycin Cの最終濃度は12 μg/mLとなる。
- ②培養後，Mitomycin Cを含む培養上清を完全に除去し，10 mLのPBS（-）で細胞を2回洗う。
  - ③PBS（-）を除去し，0.5 mLの0.25% trypsin/1 mM EDTAを加えてディッシュ全体を覆うように揺する。室温で1分間インキュベートする。
  - ④5 mLのSNL培地を加えてtrypsinを中和し，ディスプレイブルピペットを用いたピペティングにより単一細胞の状態になるまで解離させる。細胞懸濁液は50 mLチューブに回収しCoulter counterを用いて細胞数を計測する。ゼラチンコートしたディッシュに細胞を播種する（100 mmディッシュ1枚当たり1.5×10<sup>6</sup> cellsとなるように細胞を播種する）。
  - ⑤翌日には，約50%コンフルエントの状態で広がり，使用可能となる（図4）。

※ Mitomycin C 処理より4日以上経ったSNLフィーダー細胞は，ヒトiPS細胞を維持する栄養作用が低下する。また，ヒトiPS細胞用培地に含まれるbasic fibroblast growth factor（bFGF）の影響で剥がれてしまう恐れがあるため使用しないこと。

#### ④ Mitomycin C 処理 SNL 細胞の凍結ストック作製

大量のSNL細胞をまとめてMitomycin C処理して，凍結ストックを作っておくと便利である。

- ① バイセル凍結処理容器はあらかじめ4℃で冷やしておく。
- ② 凍結保存用のクライオバイアルを準備する（細胞名，日付，継代数，細胞数等を記入しておく）。
- ③ ストック用培地として10% DMSO/SNL培地を調製し，4℃で冷やしておく。
- ④ ③と同様のMitomycin C処理を行う。
- ⑤ Mitomycin Cを含む培養上清を完全に除去し，10 mLのPBS（-）で細胞を2回洗う。
- ⑥ PBS（-）を除去し，0.5 mLの0.25% trypsin/1 mM EDTAを加えてディッシュ全体を覆うように揺する。室温で1分間インキュベートする。
- ⑦ 5 mLのSNL培地を加えてtrypsinを中和し，ディスプレイブルピペットを用いたピ

ペッピングにより単一細胞の状態になるまで解離させる。細胞懸濁液は 50 mL チューブに回収し Coulter counter を用いて細胞数を計測する。

- ⑧細胞数が、 $5 \times 10^6$  cells  $\times$  クライオバイアル数となるように細胞懸濁液を 15 mL または 50 mL チューブに分注する（クライオバイアル 1 本当たり  $5 \times 10^6$  cells となるようにストックを作製するため）。
- ⑨160 g (約 900 rpm) で 5 分間遠心後に上清を可能な限り除去し、細胞ペレットを残す。  
※これより先は可能な限り速やかに行う。
- ⑩⑧の SNL ストック用培地を必要量（クライオバイアル数  $\times$  1 mL）加え、ピペティングにより細胞を懸濁する。
- ⑪クライオバイアルに P-1000 のピペットマンを用いて 1 mL ずつ分注する。
- ⑫細胞を分注したクライオバイアルをバイセル凍結処理容器に入れ、容器ごと  $-80^\circ\text{C}$  に移し一晩置く（図 5）。
- ⑬翌日に凍結保管場所に移す。
- ⑭ヒト iPS 細胞の継代前日に、必要量の凍結 SNL 細胞ストックを起眠させ、ゼラチンコートしたディッシュ上に播種し、フィーダー細胞として使用する（60 mm ディッシュ 1 枚当たり  $5 \times 10^5$  cells, 100 mm ディッシュ 1 枚当たり  $1.5 \times 10^6$  cells となるように播種する。播種後 4 日以上経った SNL フィーダー細胞は使用しないこと）。

## 2 ヒト iPS 細胞

ヒト iPS 細胞は、マウス iPS 細胞の作製法を部分的に改変し樹立された。しかし、培養条件などにおいて、ヒトとマウスでは異なる点も多い。

### 準備するもの

#### 【細胞】

ヒト iPS 細胞 (RIKEN BIORESOURCE CENTER CELL BANK <http://www.brc.riken.jp/lab/cell/hps/>)

#### 【試薬】

- PBS (-) (ナカライテスク社, 14249-95)
- ヒト iPS 細胞用解離液 (CTK solution)
  - 2.5% Trypsin (Invitrogen 社, 15090-046) 5 mL
  - 1 mg/mL Collagenase IV (Invitrogen 社, 17104-019, 超純水で溶解しフィルター滅菌したもの) 5 mL
  - KSR (Knockout serum replacement: Invitrogen 社, 10828) 10 mL
  - 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  (ナカライテスク社, 14249-95, 超純水で溶解しフィルター滅菌したもの) 500  $\mu\text{L}$
  - オートクレーブ処理超純水 30 mL
- 10 mL ずつ分注後、 $-20^\circ\text{C}$  保存。
- 解凍は  $4^\circ\text{C}$  もしくは氷中で行う。解凍後は  $4^\circ\text{C}$  で 1 週間程度保存可。

● bFGF 溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

0.1% Bovine serum albumin (BSA)/PBS (-) 溶液 5 mL

Recombinant basic fibroblast growth factor, human (bFGF; WAKO 社 064-04541)

50  $\mu\text{g}$

0.2 mL ずつ分注して  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存する.

● ヒト iPS 細胞用培地

Primate ES medium (ReproCELL 社, RCHEMD001) 500 mL

Penicillin/streptomycin (Invitrogen 社, 15140-122) 2.5 mL

bFGF 溶液 0.2 mL

調製後は  $4^{\circ}\text{C}$  で保存し, 2 週間以内に使用する.

※ Primate ES medium は以下の培地で代用されることもある.

DMEM-F12 (Sigma 社, D6421) 500 mL

Non-Essential Amino Acid ( $\times 100$ ) (Sigma 社, M7145) 6.25 mL

200 mM L- glutamine (Invitrogen 社, 25030-081) 6.25 mL

KSR (Invitrogen 社, 10828) 125 mL

0.1 M 2-mercaptoethanol (Sigma 社, M7522) 500  $\mu\text{L}$

DMEM-F12 に順に添加していく形で作製する. フィルターに通して濾過滅菌する.

【凍結保存溶液】 (DAP213)

① 0.59 g Acetamide (WAKO 社, 015-00115) を 6 mL 程度のヒト iPS 細胞用培地に溶解.

② 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過滅菌.

③ DMSO 1.42 mL, Propylene glycol (WAKO 社, 164-04996) 2.2 mL を添加.

④ 総量 10 mL になるようにヒト iPS 細胞用培地を追加する.

1 mL ずつ分注し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存. 数回の融解, 凍結は可.

【ゼラチン溶液】 (0.1%)

ゼラチン (Gelatin: Sigma 社, G1890) 0.5 g

超純水 500 mL

オートクレーブ滅菌し,  $4^{\circ}\text{C}$  で保存する.

【器具】

● 60 mm 培養ディッシュ (FALCON 社, 353002)

● 100 mm 培養ディッシュ (FALCON 社, 353003)

● ゼラチンコートディッシュ: 3 mL の 0.1%ゼラチン溶液をディッシュ全体を覆うように行き渡らせ,  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分以上インキュベートする. 使用前にゼラチン溶液を除去する.

● 15 mL チューブ (FALCON 社, 26523)

● 50 mL チューブ (FALCON 社, 26524)

● 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL ディスポーザブルピペット (FALCON 社など)



- Pipet aid (FALCON 社など)
- 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (Millex GP: Millipore 社, SLGP033RS)
- 2 mL クライオバイアル (SARSTEDT 社, 72.694.006)
- セルスクレイパー (IWAKI 社, 9000-220)
- ピペットマン, チップ (GILSON 社など)
- CO<sub>2</sub>インキュベーター (Thermo 社など)

### 培養方法

#### ① 凍結ヒト iPS 細胞ストックの起眠

通常, 起眠は 60 mm デイッシュの SNL フィーダーを用いて行う。

- ①起眠を行う前日に, 60 mm デイッシュに Mitomycin C 処理を施した SNL 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/60 mm デイッシュ) を播種し準備しておく。
  - ②15 mL チューブに入れた 10 mL のヒト iPS 細胞用培地をあらかじめ 37°C 恒温槽で温めておく。
  - ③凍結保管場所から細胞バイアルを取り出し, 素早く液体窒素に浸けて, クリーンベンチまで移動する。
  - ④液体窒素中から細胞バイアルを取り出し, エタノール噴霧によりバイアルを消毒する。
  - ⑤クリーンベンチ内へ移動し, キャップを開け, ②で温めた培地から 800  $\mu\text{L}$  程度をバイアルに添加し, P-1000 ピペットマンを用いて穏やかにピペッティングを行い, 素早く細胞を解凍する (図 6)。
  - ⑥⑤の細胞懸濁液を残りの培地の入っている②の 15 mL チューブに移す。
  - ⑦160 g (約 900 rpm) で 5 分間遠心後に上清を可能な限り除去し, 細胞ペレットを残す。
  - ⑧新しいヒト iPS 細胞用培地 4 mL を添加し, 軽く懸濁する。
  - ⑨①で準備した SNL 細胞培養デイッシュに細胞懸濁液を播種する。
  - ⑩37°C, 5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。
  - ⑪翌々日 (48 時間後) まで静置させる。
  - ⑫翌々日 (48 時間後) に新しいヒト iPS 細胞用培地 4 mL を添加・重層する。
  - ⑬次の日 (24 時間後) に新しいヒト iPS 細胞用培地で培地交換する。
- 以後, 継代可能となるまで, 原則毎日 (24 時間毎に) 培地交換を行う。

#### ② ヒト iPS 細胞の継代

通常, ストックから起眠した直後の 2~3 継代では, デイッシュ 1 枚から 2 枚程度へ播種するが, その後はコロニー数が十分であれば 1 枚から 3~6 枚へも播種可能である。隣り合うコロニー同士が接触・融合する前に継代を行う (典型的には 70% コンフルエント)。

- ①継代を行う前日に, Mitomycin C 処理を施した SNL 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/60 mm デイッシュ,  $1.5 \times 10^6$  cells/100 mm デイッシュ) を播種し, 準備しておく。
- ②コロニーが十分大きくなったヒト iPS 細胞の培養デイッシュ (通常, 継代後 5~7 日) (図 7) の培地を除去し, 5 mL の PBS (-) で細胞を 2 回洗う。

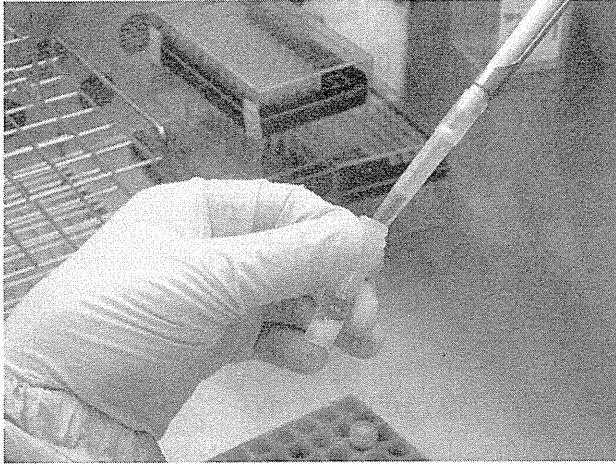


図6 ヒト iPS 細胞の解凍

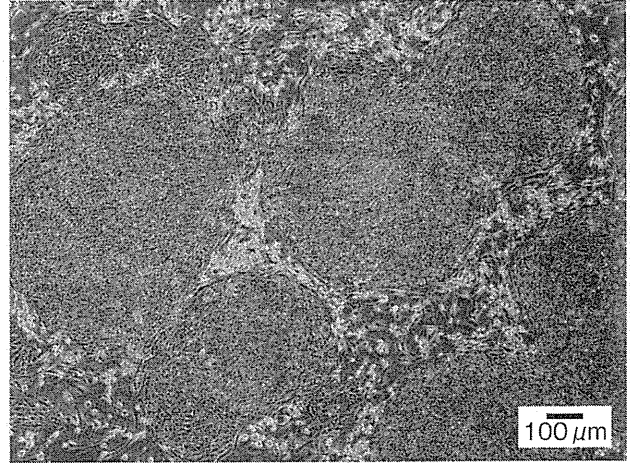


図7 継代可能なヒト iPS 細胞のコロニー

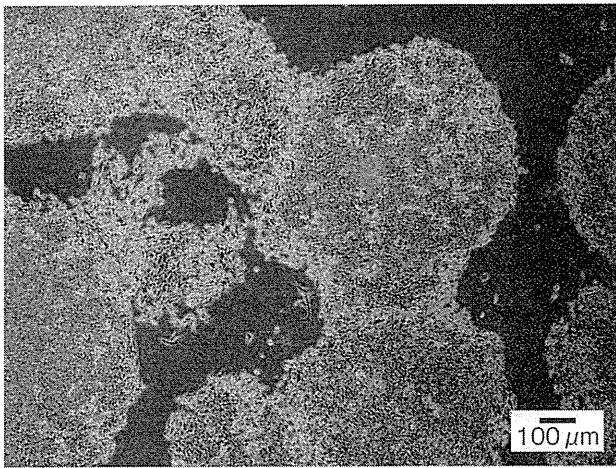


図8 SNL 細胞除去後のヒト iPS 細胞

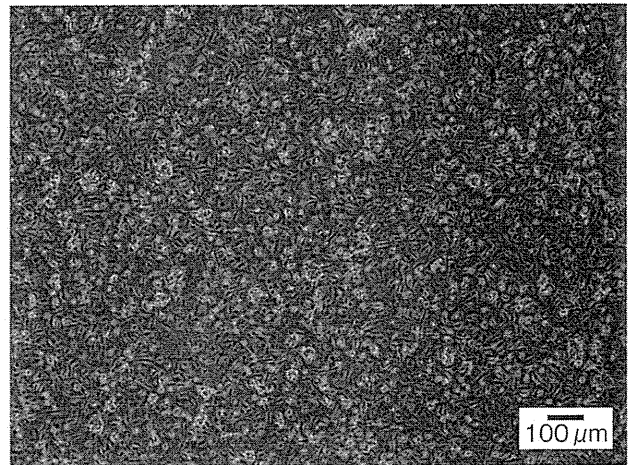


図9 ヒト iPS 細胞の播種  
(播種時のコロニーの大きさに注意)

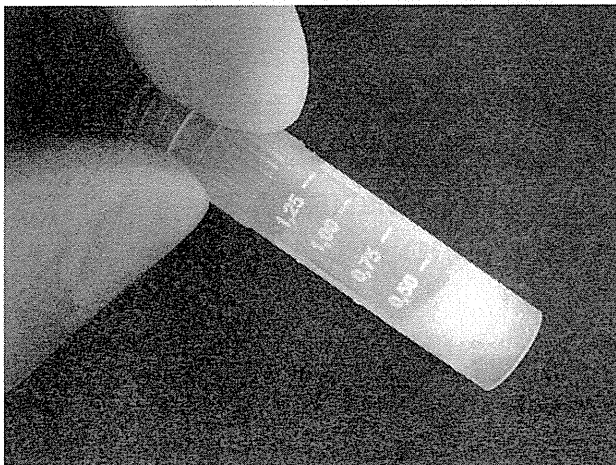


図10 ヒト iPS 細胞の凍結

③CTK solution (500  $\mu$ L/60 mm ディッシュ, 1 mL/100 mm ディッシュ) を添加し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで3分間インキュベートし, SNL 細胞のみを培養皿から解離させる.

- ④ PBS (-) で細胞を 2 回洗い, SNL 細胞のみを除去する (図 8).
- ⑤ 4 mL のヒト iPS 細胞用培地を添加し, セルスクレイパーでコロニーを剥がす.
- ⑥ P-1000 のピペットマンにて, 1 細胞塊当たり 50~100 個程度の細胞数に碎けるまで注意深くピペッティングを続ける (単一細胞近くまで解離させると生存率が低下する).
- ⑦ ① で準備した SNL 細胞培養ディッシュの培地を除去し, ヒト iPS 細胞用培地 (4 mL/60 mm ディッシュ, 10 mL/100 mm ディッシュ) を添加しておく.
- ⑧ ⑦ で準備したディッシュに ⑥ の細胞懸濁液を播種する (図 9).
- ⑨ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する.
- ⑩ 翌々日 (48 時間後) まで静置させる.
- ⑪ 翌々日 (48 時間後) に新しいヒト iPS 細胞用培地 (4 mL/60 mm ディッシュ, 10 mL/100 mm ディッシュ) を添加・重層する.
- ⑫ 次の日 (24 時間後) に新しいヒト iPS 細胞用培地で培地交換する.

以後, 継代可能となるまで, 原則毎日 (24 時間毎に) 培地交換を行う (4 mL/60 mm ディッシュ, 10 mL/100 mm ディッシュ).

### ③ ヒト iPS 細胞の凍結ストック作製

- ① 液体窒素を準備する.
- ② 凍結保存液 (DAP213, 事前にストックを融解しておく) と凍結用細胞バイアルを準備する.
- ③ 80% コンフルエントになったヒト iPS 細胞を ② のヒト iPS 細胞の継代の ①~⑤ までと同じ手順にて, 100 mm ディッシュ 1 枚分の細胞懸濁液を 15 mL チューブ 3 本に均等に回収する.
- ④ 160 g (約 900 rpm) で 5 分間遠心後に上清を可能な限り除去する.
- ⑤ 細胞ペレットに 200  $\mu$ L の DAP213 を加え, P-1000 のピペットマンでごく軽くピペッティングして, 懸濁液を凍結用バイアルに移す (細胞塊を碎かないように注意する. DAP213 を加えてから次項の液体窒素に浸すまで 15 秒以内で完了させることが望ま

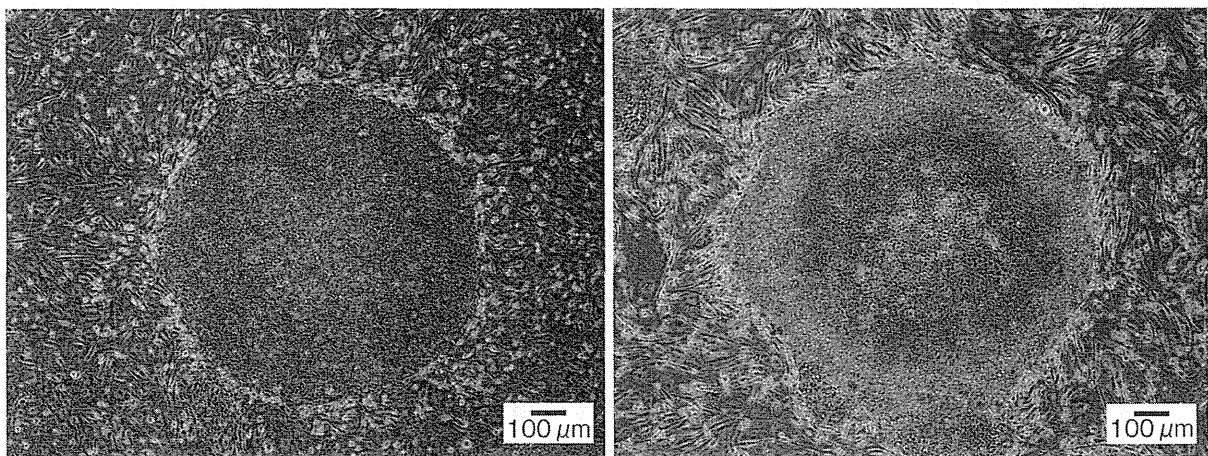


図 11 (左) 未分化なヒト iPS 細胞のコロニー, (右) 中心が分化したヒト iPS 細胞のコロニー

しい).

- ⑥素早くバイアルを液体窒素に浸し、中まで完全に凍結するまで液体窒素中で保持する。約1分間で完全に凍結する(図10)。
- ⑦バイアルを液体窒素に浸した状態のまま、凍結保管場所まで移動する。
- ⑧バイアルを素早く液体窒素から凍結保管場所に移す。

## ■トラブルシューティング

- Q1 Mitomycin C処理によるSNL細胞の不活性化を行ったが、SNL細胞が増殖する。どうすればよいか?
- A1 Mitomycin C処理時間を延長する。
- Q2 凍結ヒトiPS細胞ストックを起眠したが、コロニーが出現しない。どうすればよいか?
- A2 ヒトiPS細胞の生存率は凍結、起眠に要する時間が大きく影響する。そのため、ヒトiPS細胞の凍結、起眠操作は可能な限り素早く行う。また、ヒトiPS細胞は大きめの細胞塊の方が、あるいは、細胞密度が高い方が、生存率が高い傾向があるため、凍結、起眠時にはコロニーをあまり小さく碎き過ぎないことや同じ細胞数当たりのストックの本数を減らして、高い細胞密度にしてストックすることを試してみる。
- Q3 コロニーの中に分化した細胞が多い。何が考えられるか?
- A3 ヒトiPS細胞は継代が遅れると、コロニーの中央や周辺から細胞質の大きな分化した細胞が現れる。また、隣同士のコロニーが融合するような状況も好ましくない。そのため、通常、コロニー同士が接触する前のタイミングで継代を行う。ヒトiPS細胞の継代を行う際、あらかじめ分化した細胞をアスピレーターなどを用いて吸引しておくことで、分化した細胞をある程度除去することが可能である(図11)。
- Q4 境界部が不明瞭なコロニーが多い。コロニー全体が分化する。コロニーを形成するiPS細胞の多くが死滅して剥がれる。何を考えるか?
- A4 上記のような兆候が現れた場合、マイコプラズマ感染を疑う。マイコプラズマに感染した細胞は死滅することなくそのまま増え続けることもあるため、数カ月に一度マイコプラズマ汚染検査を行うことが望ましい。また、普段通りに分化誘導ができなくなった場合も他の原因検索に加えてマイコプラズマ感染も疑う。

## ●文献

- 1) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
- 2) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007; 2: 3081-9.
- 3) Fujioka T, et al. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*. 2004; 48: 1149-54.

<前 伸一, 荒岡利和, 長船健二>

# Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A $\beta$ and Differential Drug Responsiveness

Takayuki Kondo,<sup>1,2,7</sup> Masashi Asai,<sup>7,9,10</sup> Kayoko Tsukita,<sup>1,7</sup> Yumiko Kutoku,<sup>11</sup> Yutaka Ohsawa,<sup>11</sup> Yoshihide Sunada,<sup>11</sup> Keiko Imamura,<sup>1</sup> Naohiro Egawa,<sup>1</sup> Naoki Yahata,<sup>1,7</sup> Keisuke Okita,<sup>1</sup> Kazutoshi Takahashi,<sup>1</sup> Isao Asaka,<sup>1</sup> Takashi Aoi,<sup>1</sup> Akira Watanabe,<sup>1</sup> Kaori Watanabe,<sup>7,10</sup> Chie Kadoya,<sup>7,10</sup> Rie Nakano,<sup>7,10</sup> Dai Watanabe,<sup>3</sup> Kei Maruyama,<sup>9</sup> Osamu Hori,<sup>12</sup> Satoshi Hibino,<sup>13</sup> Tominari Choshi,<sup>13</sup> Tatsutoshi Nakahata,<sup>1</sup> Hiroyuki Hioki,<sup>4</sup> Takeshi Kaneko,<sup>4</sup> Motoko Naitoh,<sup>5</sup> Katsuhiko Yoshikawa,<sup>5</sup> Satoko Yamawaki,<sup>5</sup> Shigehiko Suzuki,<sup>5</sup> Ryuji Hata,<sup>14</sup> Shu-ichi Ueno,<sup>15</sup> Tsuneyoshi Seki,<sup>16</sup> Kazuhiro Kobayashi,<sup>16</sup> Tatsushi Toda,<sup>16</sup> Kazuma Murakami,<sup>6</sup> Kazuhiro Irie,<sup>6</sup> William L. Klein,<sup>17</sup> Hiroshi Mori,<sup>18</sup> Takashi Asada,<sup>19</sup> Ryosuke Takahashi,<sup>2</sup> Nobuhisa Iwata,<sup>7,10,\*</sup> Shinya Yamanaka,<sup>1,8</sup> and Haruhisa Inoue<sup>1,7,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Center for iPS Cell Research and Application (CiRA)

<sup>2</sup>Department of Neurology, Graduate School of Medicine

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Medicine and Department of Molecular and Systems Biology, Graduate School of Biostudies

<sup>4</sup>Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine

<sup>5</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of Medicine

<sup>6</sup>Organic Chemistry in Life Science, Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>7</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST)

<sup>8</sup>Yamanaka iPS Cell Special Project

Japan Science and Technology Agency (JST), Saitama 332-0012, Japan

<sup>9</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Saitama 350-0495, Japan

<sup>10</sup>Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Department of Molecular Medicinal Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

<sup>11</sup>Department of Neurology, Kawasaki Medical School, Okayama 701-0192, Japan

<sup>12</sup>Department of Neuroanatomy (Biotargeting), Kanazawa University Graduate School of Medical Sciences, Ishikawa 920-8640, Japan

<sup>13</sup>Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Hiroshima 729-0292, Japan

<sup>14</sup>Department of Functional Histology

<sup>15</sup>Department of Psychiatry

Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime 791-0295, Japan

<sup>16</sup>Division of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan

<sup>17</sup>Department of Neurobiology, Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA

<sup>18</sup>Department of Neuroscience, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 545-8585, Japan

<sup>19</sup>Department of Neuropsychiatry, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan

\*Correspondence: haruhisa@cira.kyoto-u.ac.jp (H.I.), iwata-n@nagasaki-u.ac.jp (N.I.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.009>

## SUMMARY

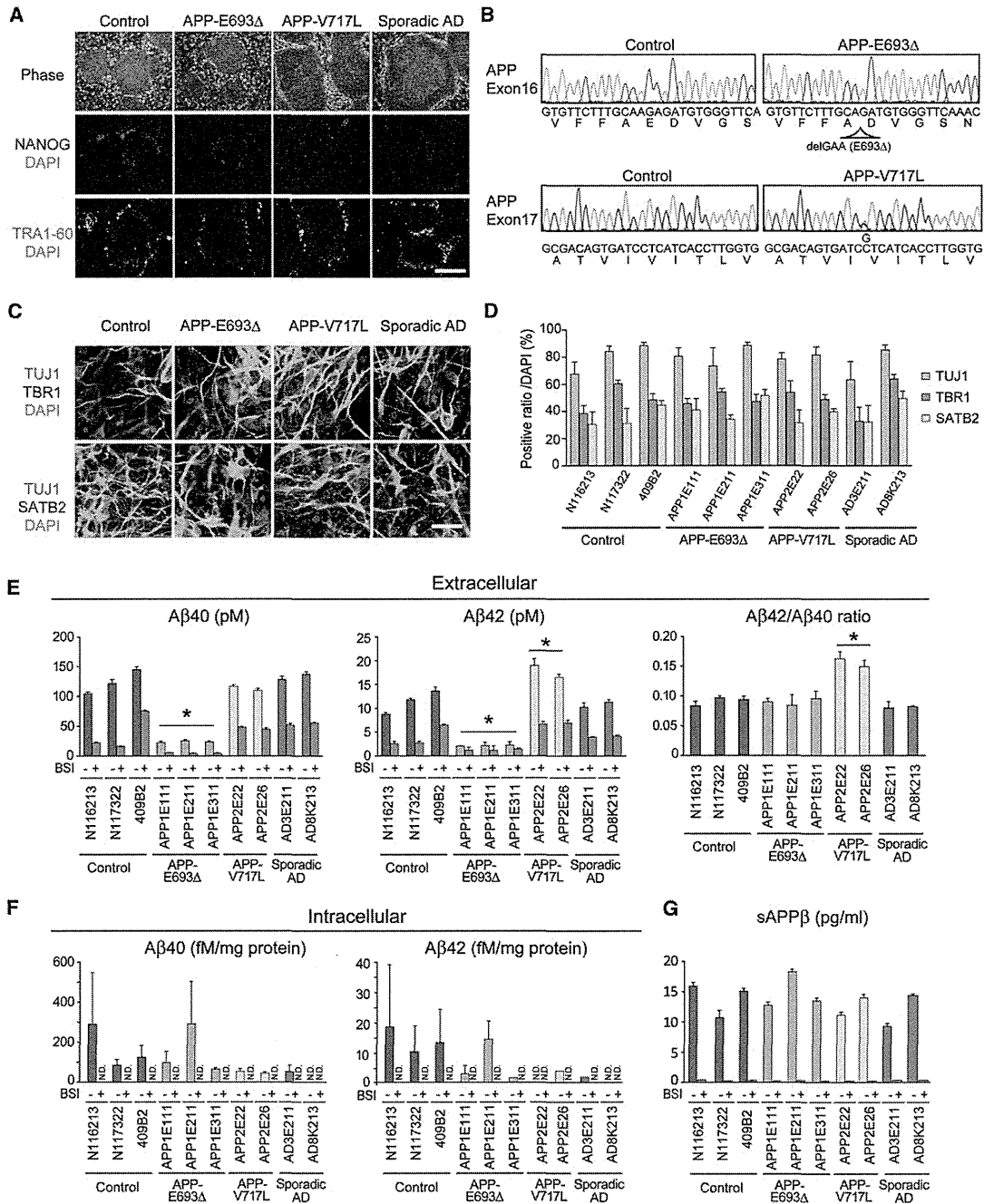
Oligomeric forms of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) are thought to play a pivotal role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), but the mechanism involved is still unclear. Here, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from familial and sporadic AD patients and differentiated them into neural cells. A $\beta$  oligomers accumulated in iPSC-derived neurons and astrocytes in cells from patients with a familial amyloid precursor protein (APP)-E693 $\Delta$  mutation and sporadic AD, leading to endoplasmic reticulum (ER) and oxidative stress. The accumulated A $\beta$  oligomers were not proteolytically resistant, and docosahexaenoic acid (DHA) treatment alleviated the stress responses in the AD neural cells. Differential manifestation of ER stress and DHA responsiveness may help explain variable clinical

results obtained with the use of DHA treatment and suggests that DHA may in fact be effective for a subset of patients. It also illustrates how patient-specific iPSCs can be useful for analyzing AD pathogenesis and evaluating drugs.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder. One of the pathological features of AD is the oligomerization and aggregation and accumulation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ), forming amyloid plaques in the brain. Cognitive impairment observed in clinical AD is inversely well correlated with the amount of A $\beta$  oligomers in the soluble fraction rather than the amount of A $\beta$  fibrils (amyloid plaques) constituting the oligomers (Haass and Selkoe, 2007; Krafft and Klein, 2010). Increasing evidence has shown that A $\beta$  oligomers extracted from AD model mice or made from synthetic peptides cause





**Figure 1. Establishment of Control and AD Patient-Specific iPSCs, and Derivation of Cortical Neurons Producing Aβs from iPSCs**

(A) Established iPSCs from both controls and AD patients showed embryonic stem cell-like morphology (Phase) and expressed pluripotent stem cell markers NANOG (red) and TRA1-60 (green). The scale bar represents 200 μm.

(B) Genomic DNA sequences showed the presence of the homozygous genotype for E693 deletion and the heterozygous genotype for V717L mutation on the APP gene only in AD iPSCs.

(C) Estimation of neuronal differentiation from control and AD-iPSCs. After 2 months of differentiation, neurons were immunostained with antibodies against the neuronal marker TUJ1 and the cortical neuron markers TBR1 and SATB2. The scale bar represents 30 μm.

(D) Proportions of TUJ1-, TBR1-, and SATB2-positive cells in control and AD-iPSCs. Data represent mean ± SD (n = 3 per clone).

(E) Aβ40 and Aβ42 secreted from iPSC-derived neural cells into the medium (extracellular Aβ) were measured at 48 hr after the last medium change. Data represent mean ± SD (n = 3 per clone). Levels of Aβ40 and Aβ42 in AD(APP-E693Δ) without β-secretase inhibitor IV (BSI, 1 μM) were significantly lower than those of the others (\*, p < 0.006), and the level of Aβ42 and the ratio of Aβ42/Aβ40 in AD(APP-V717L) without BSI were significantly higher than those of the others

(legend continued on next page)

neurotoxicity and cognitive impairments in vitro and in vivo (Walsh et al., 2002; Gong et al., 2003; Lesné et al., 2006), and this was also true in humans (Kuo et al., 1996; Shankar et al., 2008; Noguchi et al., 2009). Therefore, the formation and accumulation of A $\beta$  oligomers has been presumed to play a central role in the pathogenesis and clinical symptoms of AD. A $\beta$ s are composed of 38–43 amino acid residues and are generated from the amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase-mediated sequential cleavages. A number of mutations linked to familial AD in the *APP* gene have been identified. Recently, an atypical early-onset familial AD, caused by an E693 $\Delta$  mutation of an APP-producing variant A $\beta$  lacking 22<sup>nd</sup> Glu was discovered in Japan (Tomiyama et al., 2008). This APP-E693 $\Delta$  mutation presents rare, autosomal-recessive mutations of the *APP* gene related to familial AD. Patients with the mutation show overt early-onset symptoms of AD but lack A $\beta$  deposition, according to positron emission tomography (PET) scan analysis with a [<sup>11</sup>C] Pittsburgh compound-B (PIB) radioprobe (Tomiyama et al., 2008; Shimada et al., 2011). The 22<sup>nd</sup> Glu within the A $\beta$  sequence has a destabilizing effect on the formation of oligomeric structures because of the electrostatic repulsion between the adjacent side chain of 22<sup>nd</sup> Glu (Kassler et al., 2010), and the deletion of the amino acid residue leads to the ready formation of A $\beta$  oligomers in vitro (Nishitsuji et al., 2009). APP-E693 $\Delta$  transgenic mice show AD-like pathology, including intracellular oligomer accumulation, but lack extracellular amyloid plaque formation (Tomiyama et al., 2010). However, it remains unclear whether A $\beta$  oligomers are accumulated in familial and sporadic AD patient neural cells and how intracellular A $\beta$  oligomers play a pathological role. The compound and/or drugs that might rescue the A $\beta$  oligomer-induced pathological phenotypes are also unclear. Recent developments in induced pluripotent stem cell (iPSC) technology have facilitated the investigation of phenotypes of patient neural cells in vitro and have helped to overcome the lack of success in modeling sporadic AD.

Here, we report the derivation and neuronal and astroglial differentiation of iPSCs from a familial AD patient with an APP-E693 $\Delta$  mutation, a familial case with another APP mutation, as well as other sporadic cases. Using patient neurons and astrocytes, we addressed the accumulation and possible pathological roles of intracellular A $\beta$  oligomers in familial and sporadic AD. We found that A $\beta$  oligomers were not proteolytically resistant and that docosahexaenoic acid (DHA) treatment attenuated cellular phenotypes of AD neural cells with intracellular A $\beta$  oligomers in both familial and sporadic AD patients.

## RESULTS

### iPSC Generation and Cortical-Neuronal Differentiation

Dermal fibroblasts were reprogrammed by episomal vectors (Okita et al., 2011). Control iPSC lines from three unrelated indi-

viduals, three and two familial AD iPSC lines from patients with E693 $\Delta$ [AD(APP-E693 $\Delta$ )] and V717L[AD(APP-V717L)] APP mutations, respectively, and two sporadic iPSC lines (AD3E211 and AD8K213) from two unrelated patients (Figure S1A available online) were generated (Figures 1A, 1B, and S1B–S1H). To characterize cortical neurons derived from the iPSC lines, we established differentiation methods for cortical neurons by modifying previous procedures (Morizane et al., 2011) (Figure S1I). The differentiated cells expressed the cortical neuron subtype markers SATB2 and TBR1 (Figure 1C), and the differentiated neurons were functionally active (Figures S1J and S1K). There was no prominent difference in the differentiation propensity between control and AD neurons (Figures 1D and S1L).

We analyzed the amounts of extra- and intracellular A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 (Figures 1E and 1F). As expected, both A $\beta$  species were strongly decreased in all cloned AD(APP-E693 $\Delta$ ) neural cells in comparison to those in control neural cells. In familial AD(APP-V717L) neural cells, an increase in the extracellular A $\beta$ 42 level and a corresponding decrease in the intracellular A $\beta$ 42 level were observed, and the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the culture medium was increased up to 1.5-fold, suggesting that the abnormality of APP metabolism in AD is dependent on the mutation sites in *APP*. Extracellular A $\beta$  levels in sporadic AD neural cells were not changed in comparison to those in control neural cells, but intracellular A $\beta$  in sporadic AD8K213 neural cells apparently decreased (that is, below the detection limit). APP expression levels in the AD(APP-E693 $\Delta$ ) neural cells were lower than in the others, but the levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase-mediated APP processing remained unaltered in all neural cells (Figures 1G, S1M, and S1N). Soluble APP $\beta$  production was strongly inhibited by treatment with  $\beta$ -secretase inhibitor IV (BSI) (Figure 1G). A $\beta$  levels in the original fibroblasts and iPSC-derived astrocytes, in which APP expression levels were relatively higher than those in neural cells (data not shown), were lower than those of the corresponding neural cells (Figures S1O and S1P).

### Intracellular Accumulation of A $\beta$ Oligomers in AD(APP-E693 $\Delta$ ) and in One of the Sporadic AD Neural Cells

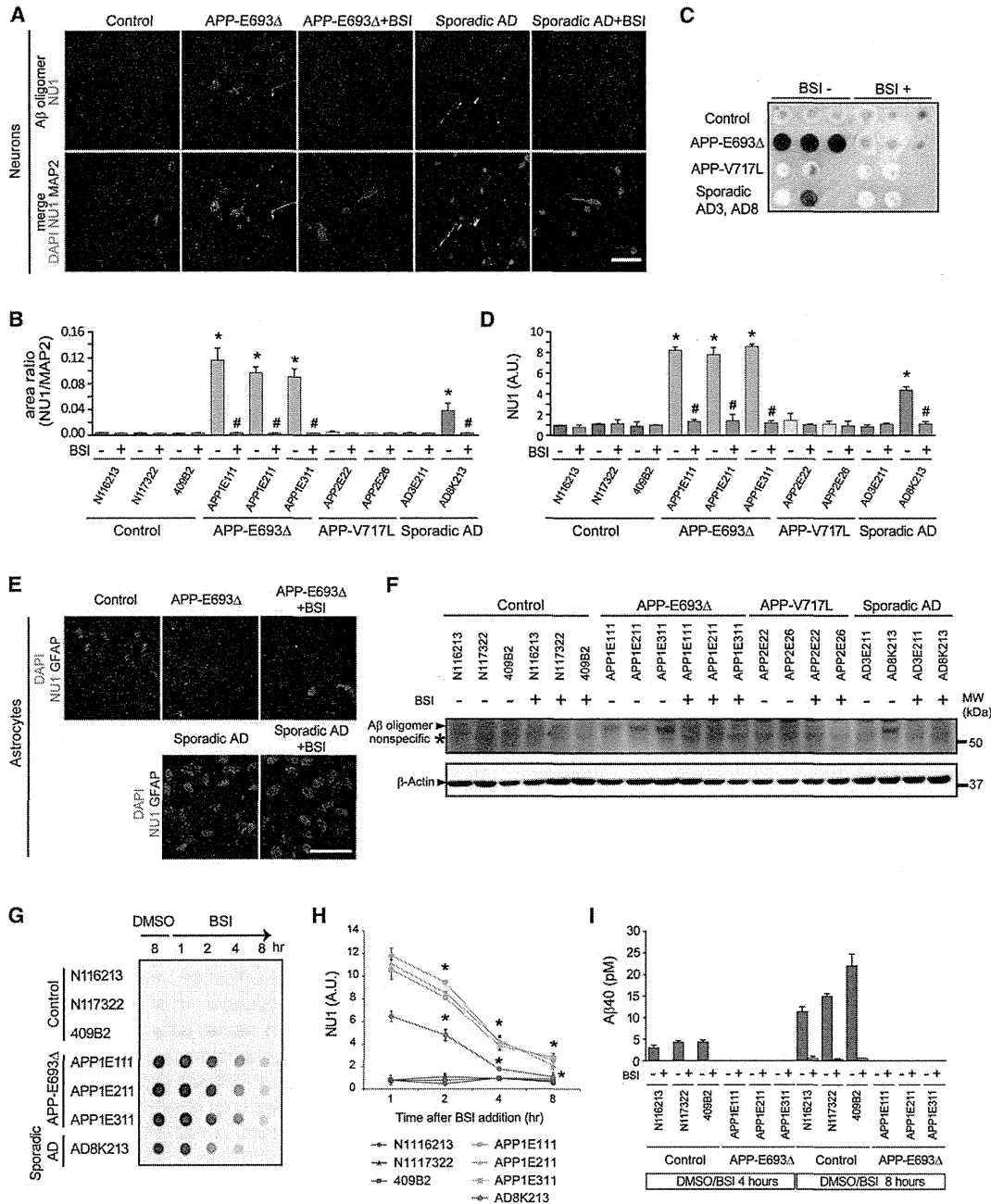
Using an immunocytochemical method with the A $\beta$ -oligomer-specific antibody NU1 (Lambert et al., 2007), we investigated whether AD(APP-E693 $\Delta$ ) neural cells harbor A $\beta$  oligomers or not. We found that A $\beta$  oligomers were accumulated as puncta in the neurons of AD(APP-E693 $\Delta$ ) and in one of the sporadic AD cases (Figure 2A). The area of A $\beta$ -oligomer-positive puncta was significantly increased in AD(APP-E693 $\Delta$ ) neuronal cells relative to control neuronal cells (Figure 2B). Dot blot analysis using cell lysates revealed that A $\beta$  oligomers were markedly elevated in the AD(APP-E693 $\Delta$ ) and sporadic AD8K213 neural cells (Figures 2C and 2D), whereas A $\beta$  oligomers were not detected in the culture medium (data not shown). Another antibody against A $\beta$ , 11A1, which detects low-molecular-weight oligomers rather than the A $\beta$  monomer (Murakami et al., 2010), showed results similar to those observed with NU1 (Figures

(\* ,  $p < 0.001$ ). There are significant differences between dimethyl sulfoxide (DMSO)-control and BSI treatment in each case (\* ,  $p < 0.001$ ) except that of AD(APP-E693 $\Delta$ ) for A $\beta$ 42.

(F) A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 in cell lysates (intracellular A $\beta$ ). N.D., not detected. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone).

(G) The amount of soluble APP $\beta$  was not altered in control and AD. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone).

See also Figure S1.



**Figure 2. Familial AD (APP-E693Δ) and Sporadic AD iPSC-Derived Neurons Have Intracellular Aβ Oligomers**

(A) Intracellular Aβ oligomer accumulation in iPSC-derived neurons (red, MAP2-positive cells) was detected by the Aβ-oligomer-specific monoclonal antibody NU1 (green) with a punctate pattern. Aβ oligomer accumulation was massive in AD (APP-E693Δ) and sporadic AD (AD8K213) neurons but only faint in control neurons. Treatment with 1 μM BSI decreased Aβ oligomer accumulation. DAPI, nuclear staining (blue). The scale bar represents 30 μm.

(B) Quantification of Aβ oligomer accumulation in (A); the ratio of the NU1-positive area in the MAP2-positive area was analyzed. Data represent mean ± SD (n = 3 per clone). Aβ oligomer levels in the AD (APP-E693Δ) and sporadic AD (AD8K213) neural cells without BSI were significantly different from those of other neural cells (\*, p < 0.005) and from corresponding neural cells with BSI (#, p < 0.005).

(C) Dot blot analysis with the use of NU1 antibody. Control (N116213, N117322, 409B2), APP-E693Δ (APP1E111, APP1E211, APP1E211), APP-V717L (APP2E22, APP2E26), and sporadic AD (AD3E211, AD8K213) neural cells were dotted from the left. Blank is RIPA buffer only.

(D) Signals of blot in (C) were quantified. Data represent mean ± SD (n = 3 per clone). Aβ oligomer levels in AD (APP-E693Δ) and sporadic AD (AD8K213) neurons without BSI were significantly different from those of other neurons (\*, p < 0.001) and from corresponding neurons treated with 1 μM BSI (#, p < 0.001).

(E) Aβ oligomer accumulation in AD astrocytes. The scale bar represents 30 μm.

(legend continued on next page)



S2A–S2D). However, A $\beta$  oligomers were not detected in cell lysates from the fibroblasts that generate iPSC lines (Figure S2E). To confirm whether A $\beta$  oligomers were derived from mutant APP(E693 $\Delta$ ), we transduced a lentiviral vector driven by an EF1 $\alpha$  promoter to overexpress wild or mutant APP(E693 $\Delta$ ) in control iPSC-derived neural cells and found that A $\beta$  oligomers emerged inside control neural cells overexpressing mutant APP(E693 $\Delta$ ) (Figure S2F).

To investigate the intracellular accumulation of A $\beta$  oligomers in astrocytes derived from control and AD iPSCs, we established an astrocyte-enrichment culture by modifying the method previously reported (Krencik et al., 2011) (Figures S2G–S2J). Dot blot analysis using A $\beta$  oligomer antibodies revealed that the astrocytes of AD(APP-E693 $\Delta$ ) and one of the sporadic AD iPSCs accumulated A $\beta$  oligomers intracellularly (Figures 2E, S2K, and S2L), which was compatible with the results of neurons. On the other hand, we detected no difference in the uptake of extracellular glutamate between control and AD astrocytes (Figure S2M).

A $\beta$  oligomers were also detected as a protein band with a molecular mass of 50~60 kDa by western blot analysis (Figures 2F and S2N). The accumulation of A $\beta$  oligomers was inhibited by treatment with BSI (Figures 2A–2G, S2A–S2D, and S2N). To clarify whether the E693 $\Delta$  mutation results in accelerated A $\beta$  oligomerization and/or in a proteolytically resistant and stable form of A $\beta$  oligomers, we analyzed the levels of A $\beta$  oligomers over a course of time after BSI treatment. Intracellular A $\beta$  oligomers started to disappear from 2 hr after the treatment with BSI, almost reaching the control level by 8 hr (Figures 2G and 2H). Secretion of A $\beta$ 40 from control neural cells was already inhibited at 2 hr after BSI treatment, but the secretion from AD neural cells was under the detection limit in both the presence and absence of BSI (Figure 2I).

#### Cellular Stress Responses Caused By Intracellular A $\beta$ Oligomers in AD iPSC-Derived Neural Cells

Extracellular A $\beta$  deposition in patient brains carrying APP with an E693 $\Delta$  mutation is predicted to be extremely low, as amyloid PET imaging with a [<sup>11</sup>C] PIB probe revealed a far lower signal in the patients than those observed in sporadic AD brains (Tomiya et al., 2008). Given that processing by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases largely proceeds within vesicular endosomal compartments, it was possible that A $\beta$  oligomers were associated with specific organelles. We characterized the A $\beta$  oligomer-positive punctate structures in AD(APP-E693 $\Delta$ ) neural cells and astrocytes by coimmunostaining with antibodies for markers of vesicular compartments and subcellular organelles. Subpopulations of A $\beta$  oligomer-positive puncta in the AD neurons showed positive immunostaining for an endoplasmic reticulum (ER) marker, binding immunoglobulin protein (BiP); an early endosomal marker, early endosome-associated antigen-1 (EEA1); and

a lysosomal marker, lysosomal-associated marker protein 2 (LAMP2) (data not shown).

To uncover molecules that might be implicated in the dysfunction of AD(APP-E693 $\Delta$ ) neural cells, we analyzed gene expression profiles of control and AD neural cells (Figure 3A and Table S1). Gene ontology analysis revealed that oxidative-stress-related categories, including peroxiredoxin, oxidoreductase, and peroxidase activities, were upregulated in the AD, whereas glycosylation-related categories were downregulated (Figures 3B and 3C and Table S1), suggesting that ER and Golgi function might be perturbed in AD neural cells. Western blot analysis clarified that the amounts of both BiP and cleaved caspase-4 were elevated in the neurons and astrocytes of the AD(APP-E693 $\Delta$ ) case, and that of BiP in one of the sporadic AD cases, AD8K213, but not in fibroblasts (Figures 3D–3F and S3A–S3F). We also found that BSI treatment not only prevented the increase in A $\beta$  oligomer-positive puncta area per cell in the context of AD(APP-E693 $\Delta$ ) lines but also decreased the amount of BiP and cleaved caspase-4 (Figures 3D–3F). *PRDX4*-coding antioxidant protein peroxiredoxin-4 was the most highly upregulated gene (Figure 3C). Western blot analysis confirmed that the amount of peroxiredoxin-4 was increased up to approximately 5- to 7-fold in lysates from AD(APP-E693 $\Delta$ ) and in one of the sporadic AD cases, AD8K213 neural cells, but not in fibroblasts, and was decreased by the BSI treatment (Figures 3D, 3G, S3A, S3D, S3G, and S3H), indicating that the antioxidant stress response was provoked by A $\beta$  oligomer formation in AD(APP-E693 $\Delta$ ) and sporadic AD8K213. To identify pathogenic species evoking oxidative stress in AD(APP-E693 $\Delta$ ), we visualized reactive oxygen species (ROS) and found that ROS was increased in both neurons and astrocytes in AD(APP-E693 $\Delta$ ) and AD8K213 (Figures 3H–3J and S3I–S3L). This increase was counteracted by the BSI treatment. These results indicated that intracellular A $\beta$  oligomers provoked both ER and oxidative stress, and the increase in ROS most likely occurred via a vicious cycle between ER and oxidative stress (Malhotra and Kaufman, 2007).

#### Alleviation of Intracellular A $\beta$ Oligomer-Induced Cellular Stress by DHA

We evaluated BSI and three additional drugs that had been reported to improve ER stress or to inhibit ROS generation: (1) DHA (Begum et al., 2012), (2) dibenzoylmethane (DBM14-26) (Takano et al., 2007), and (3) NSC23766 (Lee et al., 2002) (Figures 4 and S4). DHA treatment significantly decreased the protein level of BiP, cleaved caspase-4, and peroxiredoxin-4 in AD (APP-E693 $\Delta$ ) neural cells (Figures 4A, 4B, S4A, and S4B), and BiP and peroxiredoxin-4 in sporadic AD8K213 (Figures S4C and S4D). Furthermore, DHA treatment also decreased the generation of ROS in AD(APP-E693 $\Delta$ ) neural cells (Figures 4C and 4D), whereas the amount of A $\beta$  oligomers in cell lysates

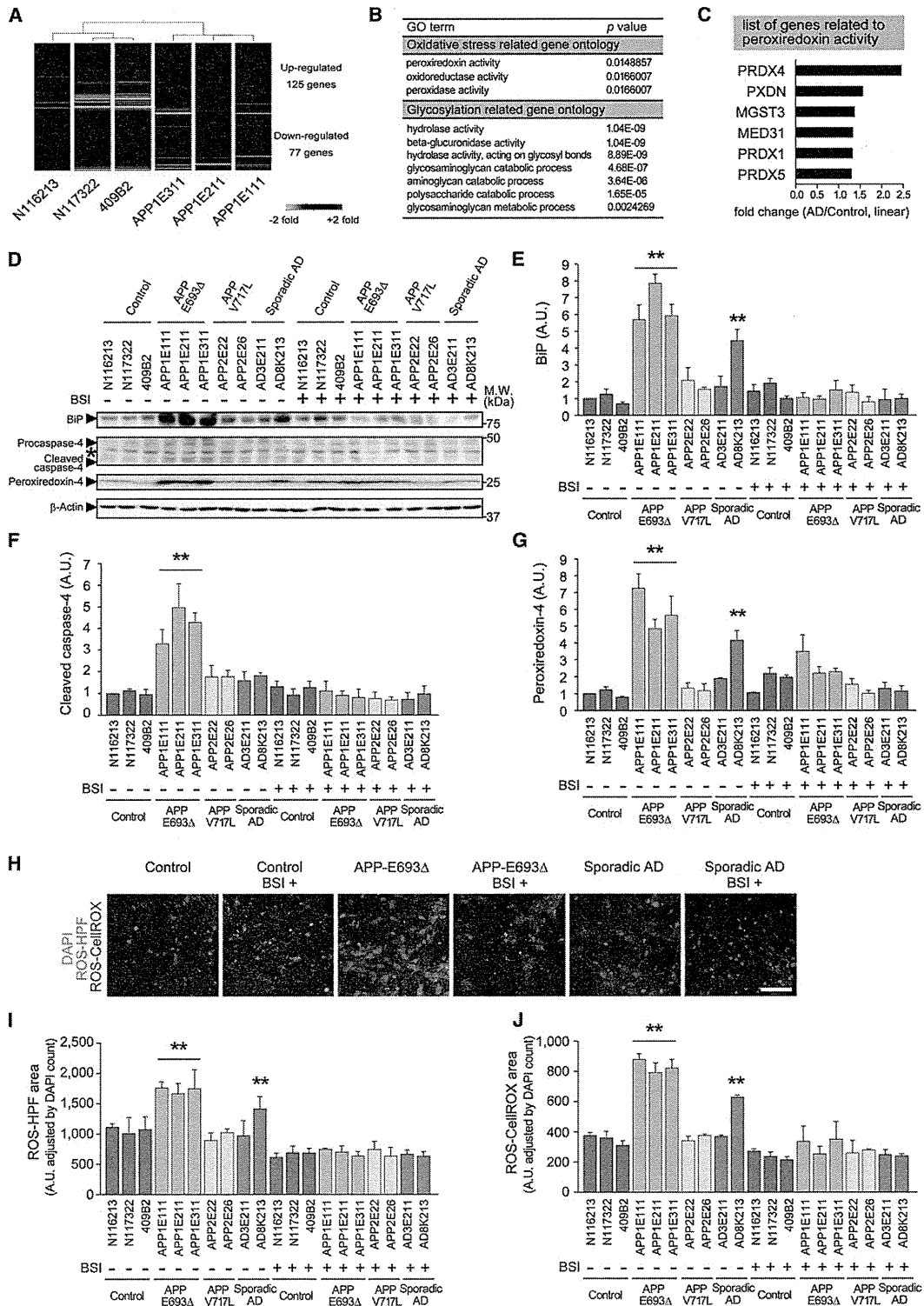
(F) Western blot analysis of control and AD neural cells in the presence or absence of BSI. BSI treatment (1  $\mu$ M) disappeared 6E10-positive  $\approx$ 55 kDa protein bands in cell lysates of AD(APP-E693 $\Delta$ ) and sporadic AD(AD8K213) neural cells.

(G) Disappearance of A $\beta$  oligomers after BSI treatment was analyzed by dot blot analysis with the use of the NU1 antibody. Intracellular A $\beta$  oligomers started to disappear 2 hr after BSI treatment.

(H) Signals of blots in (G) were quantified. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone). BSI treatment (1  $\mu$ M) decreased intracellular A $\beta$  in AD neural cells and was reduced to 16~23% of vehicle control by 8 hr. Post hoc analysis revealed that the amounts of A $\beta$  oligomers at 2 hr after BSI treatment were significantly decreased in comparison to those of DMSO control oligomers (\*,  $p < 0.005$ ).

(I) Changes in extracellular A $\beta$ 40 levels were analyzed in the experimental condition of (G). Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone).

See also Figure S2.



**Figure 3. Cellular Stress Responses Caused by Intracellular A $\beta$  Oligomers in Familial AD (APP-E693A) and Sporadic AD (AD8K213) iPSC-Derived Neural Cells**

(A) Hierarchical clustering analysis of differentiated neuronal cells and a heatmap of significantly up- and downregulated genes in AD neural cells. The statistically significant cutoff p value is  $< 0.05$ .

was not altered (Figures S4E–S4G). In contrast, the high concentration of DHA, DBM14-26, or NSC23766 treatment increased the protein level of BiP (Figure S4B). Finally, to confirm the protective effects of DHA in short-term screening, we analyzed the effect on the survival of AD(APP-E693Δ) neural cells. Neuronal cells were labeled with a lentiviral vector expressing synapsin I-promoter-driven EGFP and cultivated in the medium depleted of neurotrophic factors and neural culture supplements mix. The real-time survival rate of AD(APP-E693Δ) neurons was lower than that of normal control neurons; however, DHA treatment for 16 days partially rescued AD(APP-E693Δ) cell viability (Figures 4E–4G). The real-time survival rate of sporadic AD(AD3E211, AD8K213) neurons for 16 days was unchanged (Figures 4E and 4F and Table S2). We confirmed these results through a lactate dehydrogenase (LDH) assay (Figure 4G). The AD(APP-E693Δ) neurons were also vulnerable to oxidative stress by hydrogen peroxide treatment (Figure S4H). Extracellular Aβ levels were not altered in the assay (Figure 4H).

## DISCUSSION

The present study shows that neural cells derived from a patient carrying the pathogenic APP-E693Δ mutation and a sporadic AD patient produce intracellular Aβ oligomers, and the use of these neural cells provided an experimental system for addressing whether such oligomers would cause cellular stress and the killing of neurons and how such intracellular Aβ oligomers might contribute to the disease pathogenesis, despite only one patient carrying the E693Δ mutation being available. Our findings also suggest that the possible heterogeneity of familial and sporadic AD stems from phenotypic differences of intracellular Aβ oligomers and suggests the possibility that DHA, a drug that failed in some clinical trials of AD treatment, might be effective in a portion of AD patients.

We demonstrated that Aβ oligomers were formed and accumulated inside AD(APP-E693Δ) and sporadic AD(AD8K213) neurons by immunostaining (Figures 2A and 2B), dot blot analysis (Figures 2C and 2D), and western blot analysis (Figures 2F and S2N). In addition, intracellular accumulation of Aβ oligomers, which has been supposed to be proteolytically resistant, disappeared after treatment with BSI in both AD neurons (Figures 2G and 2H), indicating that AD(APP-E693Δ) and sporadic AD(AD8K213) neurons still seemed to retain a degrading activity toward Aβ oligomers in which proteasomes, auto-

phagosomes, and/or lysosomes may be involved and, thereby, that the pathological property of Aβ oligomers in a part of AD might be completely abrogated. The sporadic AD(AD8K213) neurons may retain a specific cellular environment that permits the formation of Aβ oligomers. Additional studies aimed at identifying the factors causing such an environment are needed.

We observed that the accumulation of Aβ oligomers induced ER and oxidative stress both in AD(APP-E693Δ) and in sporadic AD(AD8K213) neurons, although caspase-4 activation appeared not to accompany sporadic AD, probably because of the lesser extent of ER stress in comparison to AD(APP-E693Δ). Previously, Nishitsuji et al. (2009) reported that accumulated Aβ oligomers in ER provoke ER stress. This result suggests that oligomers represent a self-aggregating state of Aβ. During this process, Aβ generates ROS, which is supported by the fact that Aβ coordinates the metal ions zinc, iron, and copper, which induce the oligomerization of Aβ. Iron and copper then cause the generation of toxic ROS and calcium dysregulation (Barnham et al., 2004), leading to membrane lipid peroxidation and the impairment of the function of a range of membrane-associated proteins (Hensley et al., 1994; Butterfield, 2003), antioxidant factors being thought to protect ER-stress-induced cellular toxicities (Malhotra and Kaufman, 2007).

We found that intracellular Aβ oligomers were accumulated not only in a case of familial AD with APP-E693Δ mutation but also in a sporadic AD case, although only three clones derived from one familial AD patient carrying an APP-E693Δ mutation and two clones from two sporadic AD patients were analyzed in this study because of the limited number of patients. In contrast, in familial AD with the APP-V717L mutation, of which only one case was available, intracellular Aβ oligomers were not detected, but the extracellular Aβ42/Aβ40 ratio, which is increased in mutant presenilin-mediated familial AD, as reported previously (Yagi et al., 2011), was increased, lending support to the notion that AD could be classified into two categories: extracellular Aβ type and intracellular Aβ type. Although it has been supposed that environmental factors and/or the aging process contribute to neurodegenerative diseases, our findings support the idea that a genetic factor might play a role in a part of sporadic AD, a finding that is compatible with a previous report (Israel et al., 2012). However, identifying the genetic factor would require a larger sample size. The sporadic AD case with intracellular Aβ oligomers might correspond to the case without extracellular Aβ40 elevation of Israel et al. (2012). Analysis of neurons

(B) The gene ontology (GO) term list, calculated from the significantly altered gene expression patterns in the microarray analysis of AD versus control neural cells.

(C) Altered expression levels of genes related to peroxidation activity detected by GO analysis. All values were significantly different from that of the control ( $p < 0.05$ ).

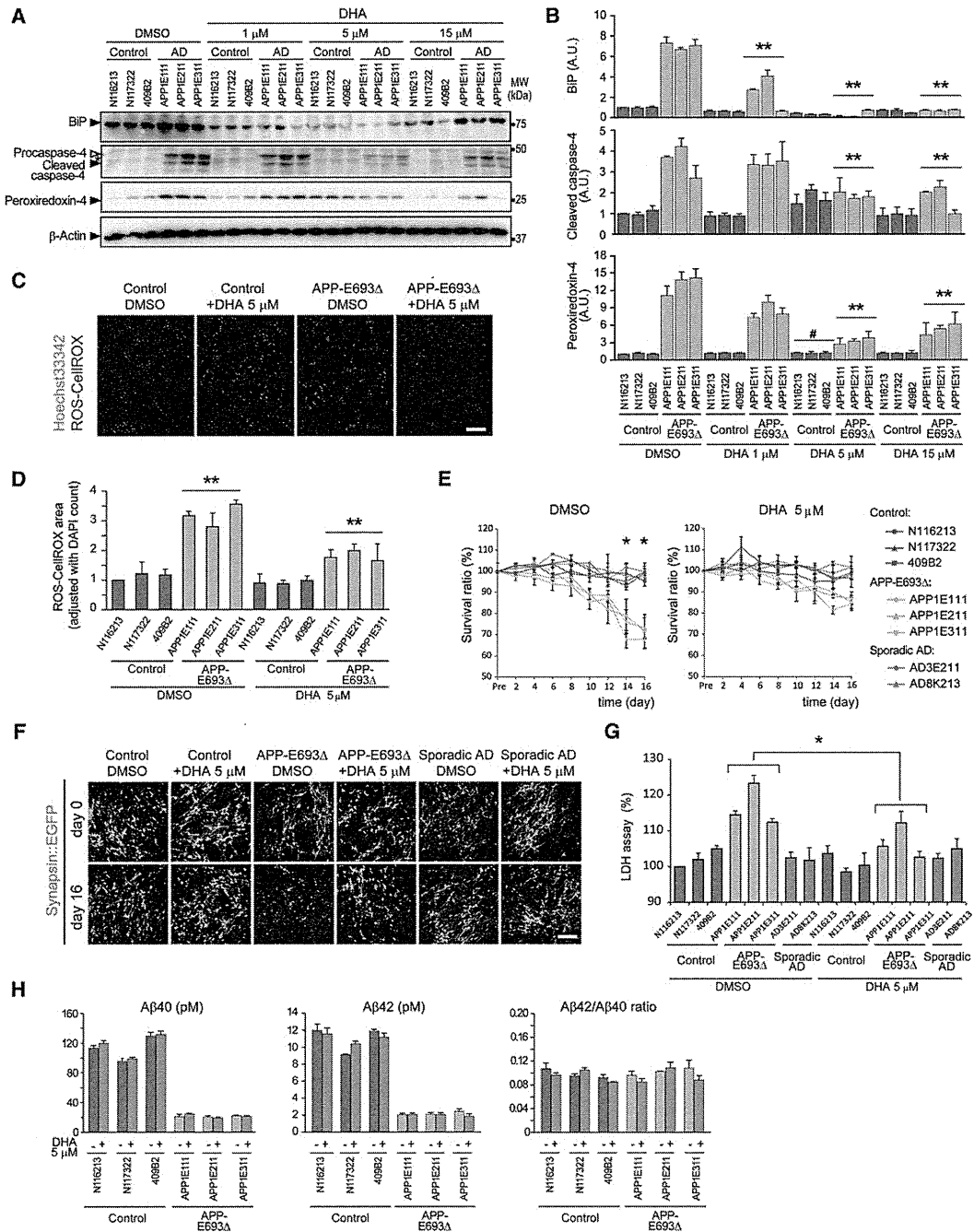
(D–G) Western blot analysis of ER stress markers (BiP and caspase-4), peroxiredoxin-4, and a reference protein (β-actin) in the presence or absence of BSI.

(E–G) Densitometric analysis of (D) are shown. Measured values of proteins were normalized by β-actin. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone). Levels of BiP (E), cleaved caspase-4 (F), and peroxiredoxin-4 (G) in AD(APP-E693Δ) and sporadic AD(AD8K213) neural cells without BSI were significantly different from those of the other neural cells (\*\*,  $p < 0.005$ ).

(H) Typical images of reactive oxygen species (ROS) staining, detected by HPF or CellROX, in control and AD neural cells with or without BSI treatment. Scale bars represent 30  $\mu$ m.

(I and J) Quantitative data of (H), ROS-HPF (I), and ROS-CellROX (J). Each value was shown as a ratio of the HPF-stained or CellROX area (average of random 25 fields per sample) adjusted with DAPI counts. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone). ROS-generation levels in AD(APP-E693Δ) and sporadic AD(AD8K213) neural cells were significantly different from those of the others (\*\*,  $p < 0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  per clone).

See also Figure S3 and Table S1.



**Figure 4. DHA-Alleviated Cellular Stress Caused By Intracellular Aβ Oligomers**

(A) Control and AD(APP-E693Δ) neural cells at day 72 were treated with DHA for 48 hr. Then, cells were lysed and subjected to immunoblot analysis (1 μM, 5 μM, and 15 μM of docosahexaenoic acid [DHA]).

(B) Densitometric analysis of (A) is shown. Measured values were normalized by that of β-actin. Data represent mean ± SD (n = 3 per clone). Two-way analysis of variance (ANOVA) showed significant main effects of DHA treatment (BIP,  $F_{[3,64]} = 136.712$ ,  $p < 0.001$ ; cleaved caspase-4,  $F_{[3,64]} = 50.855$ ,  $p < 0.001$ ) with a significant interaction between APP mutation and DHA treatment (BIP,  $F_{[3,64]} = 99.658$ ,  $p < 0.001$ ; cleaved caspase-4,  $F_{[3,64]} = 53.005$ ,  $p < 0.001$ ). Post hoc analysis revealed significant differences between DMSO (control) and DHA treatment (1, 5, and 15 μM) in AD(APP-E693Δ) neural cells (\*\*,  $p < 0.001$ ). Two-way ANOVA for peroxiredoxin-4 showed significant main effects of DHA treatment ( $F_{[3,64]} = 16.995$ ;  $p < 0.001$ ) with a significant interaction between APP mutation and DHA treatment ( $F_{[3,64]} = 32.093$ ;  $p < 0.001$ ). Post hoc analysis revealed significant differences between DMSO-control and DHA treatment (5 and 15 μM) in AD(APP-E693Δ) neural cells (\*\*,  $p < 0.001$ ). In control neural cells, the 5 μM DHA group was significantly different from the other groups (#,  $p < 0.005$ ).

(C) Typical images of ROS-CellROX and Hoechst33342 signals after treatment with vehicle or 5 μM DHA. The scale bar represents 50 μm.

(legend continued on next page)