

変異を有する運動神経細胞のRNA合成・RNA代謝の異常を見出し、RNA代謝に作用する薬剤のひとつであるアナカルジン酸がTDP-43の発現量を低下させ、運動神経細胞のストレスに対する脆弱性と神経突起の長さを改善させることを示した⁸⁾。iPS細胞由来疾患標的細胞が治療薬シーズを探索する病態モデルとして有効であることを示している。

さらに、iPS細胞を用いたハイスループット薬剤スクリーニングが行われている。LeeらはFA患者由来iPS細胞から作製した神経堤細胞を用いて、6,912個のcompoundのスクリーニングを行い、正常型IKBKAPを増加させる8個のcompoundを同定し、そのなかのひとつであるSKF-86466がFAで低下する神経マーカーの発現を改善することを見出した⁹⁾。

今後の課題

iPS細胞を用いたハイスループットスクリーニングを含む創薬開発の加速が期待される。ハイスループットスクリーニングを構築するために、できるだけ高純度かつ大量の標的細胞を入手する系の確立が重要である。また、スクリーニングの安定化およびコストの低減のために、iPS細胞から標的細胞を作製するまでの分化誘導時間の短縮が有効であろう。

- 1) Ebert, A. D. et al.: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, **457**: 277-280, 2009.
- 2) Lee, G. et al.: Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using. *Nature*, **461**: 402-406, 2009.
- 3) Marchetto, M. C. et al.: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced. *Cell*, **143**: 527-539, 2010.
- 4) Yagi, T. et al.: Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells.

Hum. Mol. Genet., **20**: 4530-4539, 2011.

- 5) Cooper, O. et al.: Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells. *Sci. Transl. Med.*, **4**: 141ra190, 2012.
- 6) Brennand, K. J. et al.: Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, **473**: 221-225, 2011.
- 7) Pasca, S. P. et al.: Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy. *Nat. Med.*, **17**: 1657-1662, 2011.

8) Egawa, N. et al.: Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.*, **4**(145): 145ra104, 2012.

9) Lee, G. et al.: Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.*, **30**(12): 1244-1248, 2012.

今村恵子, 井上治久 /

Keiko IMAMURA and Haruhisa INOUE
京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

循環器内科学

腎動脈内アブレーションによる 高血圧治療の現状と将来の適応拡大

Intra-renal artery ablation for hypertension and beyond

腎動脈内に挿入した電極カテテルを介して高周波通電を行うことで、薬剤抵抗性的高血圧症例において持続的降圧効果が得られることが探索的臨床試験で示された¹⁾。この降圧は高周波通電によって腎動脈周囲を走行する腎神経(知覚神経および交感神経)が傷害されたためと考えられている。本稿ではこの治療法の背景、降圧効果を検証した臨床試験、高血圧以外に対する効果、今後の解決すべき問題点について解説したい。

背景

コントロール不良の高血圧はもっとも重要な心血管病リスクである²⁾。治療抵抗性高血圧は3種類の降圧薬(基本的には1剤は利尿薬)を最大効果が得られる用量で使用しても降圧目標に達しない高血圧で³⁾、解決すべき大きな課題として認識されてきた。

高血圧発症・維持における腎交感神経系の役割

腎実質障害や腎虚血は腎知覚神経を介して交感神経中枢を活性化し、その結果、全身的な交感神

経の活性化を引き起こす。腎交感神経は、傍糸球体装置、尿細管、血管床に達しており、その活性化はすべて昇圧に働く。

腎機能が低下するにつれて交感神経活性が亢進することが、筋への血管に分布する交感神経活性の測定によって示されている⁴⁾。極初期の腎実質障害による交感神経の活性化が血圧の上昇をもたらす。この血圧上昇が腎実質障害を進行させ、さらに交感神経活性の亢進を引き起こすという悪循環が、高血圧の病態生理において本質的かつもっとも重要な役割を果たしている可能性が高い。

カテテルを介した腎神経(知覚神経+交感神経)への介入(腎動脈内アブレーション)

Krumらは利尿薬を含む3種類以上の降圧薬を服用しても収縮期血圧が160 mmHg未満にコントロールできない薬物治療抵抗性高血圧患者50名を対象に、腎動脈内アブレーション治療の安全性および降圧効果を検討した成績を報告した¹⁾。5名は解剖学的な理由に

iPS 細胞による神経疾患研究

近藤 孝之 京都大学 iPS 細胞研究所
こん どう たか ゆき

井上 治久 同 准教授
いの う え はる ひさ

はじめに

人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells : iPS 細胞)^{1,2)} は、医学と生物学の世界に革命を起こした。2012 年、その産みの親である山中伸弥教授にはノーベル生理学・医学賞の栄誉がもたらされた。神経疾患領域においても、iPS 細胞技術により患者自身の体細胞から中枢神経系組織を含めた疾患の標的細胞を入手することが可能となり、これまでにない全く新たな医療開発が始まっている。

本稿では、現在までの iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究について紹介するとともに、最近われわれが報告したアルツハイマー病の研究について論じる。さらに、今後期待される iPS 細胞技術を用いた医療応用研究の展望について述べる。

ヒト多能性幹細胞の歴史と iPS 細胞技術の開発

ヒト由来の代表的な多能性幹細胞である胚性幹細胞 (Embryonic Stem cells : ES 細胞) は、1998 年に初めて樹立された³⁾。ヒト ES 細胞はその未分化状態を保ったまま、ほぼ無限に増殖を繰り返すことが可能であり、心筋細胞・肝細胞・神経細胞などへの *in vitro* における分化誘導法研究が進められてきた。特に神経・精神疾患領域においては、生検材料などの生きたヒト研究検体を得ることができなかつたため、ヒト ES 細胞から分化誘導して得られる神経細胞には大きな期待が寄せられてきた。一方で 2006 年にマウスで、2007 年にはヒトで、ES 細胞特異的に発現している遺伝子を体細胞に導入することにより ES 細胞類似の多能性幹細胞樹立がなされ、induced Pluripotent Stem cells (iPS 細胞) と命名された^{1,2)}。具体的には、皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスベクターを用いて ES 細胞発現遺伝子である *Oct3/4*・*Sox2*・*Klf4*・*c-Myc* を導入することで、ほぼ無限に増殖し、内・中・外胚葉それぞれへの分化能力を有する細胞株が樹立された。その後も、より効率的な iPS 細胞の樹立法研究が展開されるとともに、幹細胞の未分化性維持・遺伝子発現特性の解析、さらには癌研究など広範な研究領域に大きなインパクトを与えている。

iPS 細胞を用いた神経・精神疾患モデリング

2008 年、ハーバード大学のグループが高齢の遺伝性筋萎縮性

側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製した⁴⁾。その iPS 細胞は患者の遺伝子変異をそのままひきついでいること、運動ニューロンに分化誘導可能であることが示された。2009 年、脊髄性筋萎縮症患者から樹立した iPS 細胞由来運動神経数減少と、核ジエム数の減少が報告された⁵⁾。そして *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein (IKBKAP)* 遺伝子のスプライシング異常が原因である家族性自律神経失調症患者から樹立した iPS 細胞由来自律神経細胞数の減少と、遊走能の低下、さらには Kinetin による *IKBKAP* 遺伝子の RNA スプライシング異常の改善が示された⁶⁾。さらに、遺伝性パーキンソン病^{7,8)}、遺伝性 ALS^{9,10)}、レット症候群^{11,12)} など、非常に多岐にわたる神経疾患の iPS 細胞を用いた病態再現が報告されるようになった。2011 年には、遺伝性ではなく孤発性の統合失調症患者からの iPS 細胞樹立、分化誘導した神経細胞で神経突起・シナプス密度の減少が報告された¹³⁾。このように、患者由来 iPS 細胞を用いた神経・精神疾患研究が近年急速に広がっており、今後も状況が継続すると予測される。

iPS 細胞を用いたアルツハイマー病疾患モデリングと先制医療開発の試み

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は進行性の記憶力低下・見当識障害を中心とする神経変性疾患である。AD は加齢が大きな発症リスクとなるため、高度高齢化社会を迎えつつあるわが国の医療においても非常に重要な疾患といえる。AD の病理学的特徴としては脳内に老人斑といわれる蛋白質の沈着が見られ、この老人斑の主成分はアミロイド前駆蛋白 (amyloid precursor protein : APP) から二段階の酵素切断により切り出されるアミロイドベータ蛋白 (amyloid beta : A β) であることが知られている。老人斑に蓄積する A β は不溶性の線維状重合構造をとり、強い細胞毒性を有する。さらに、脳内老人斑の分布解析や、線維状 A β を蓄積する遺伝子改変マウスや培養細胞の実験結果に基づいて、細胞外 A β を起点として神経細胞死が導かれるとする「アミロイドカスケード仮説」が広く受け入れられてきた。この仮説に基づき A β のワクチン療法治験が実施され、老人斑を取り去ることに成功したものの、認知症状の進行を抑制することはできなかった¹⁴⁾。一方で、不溶性線維

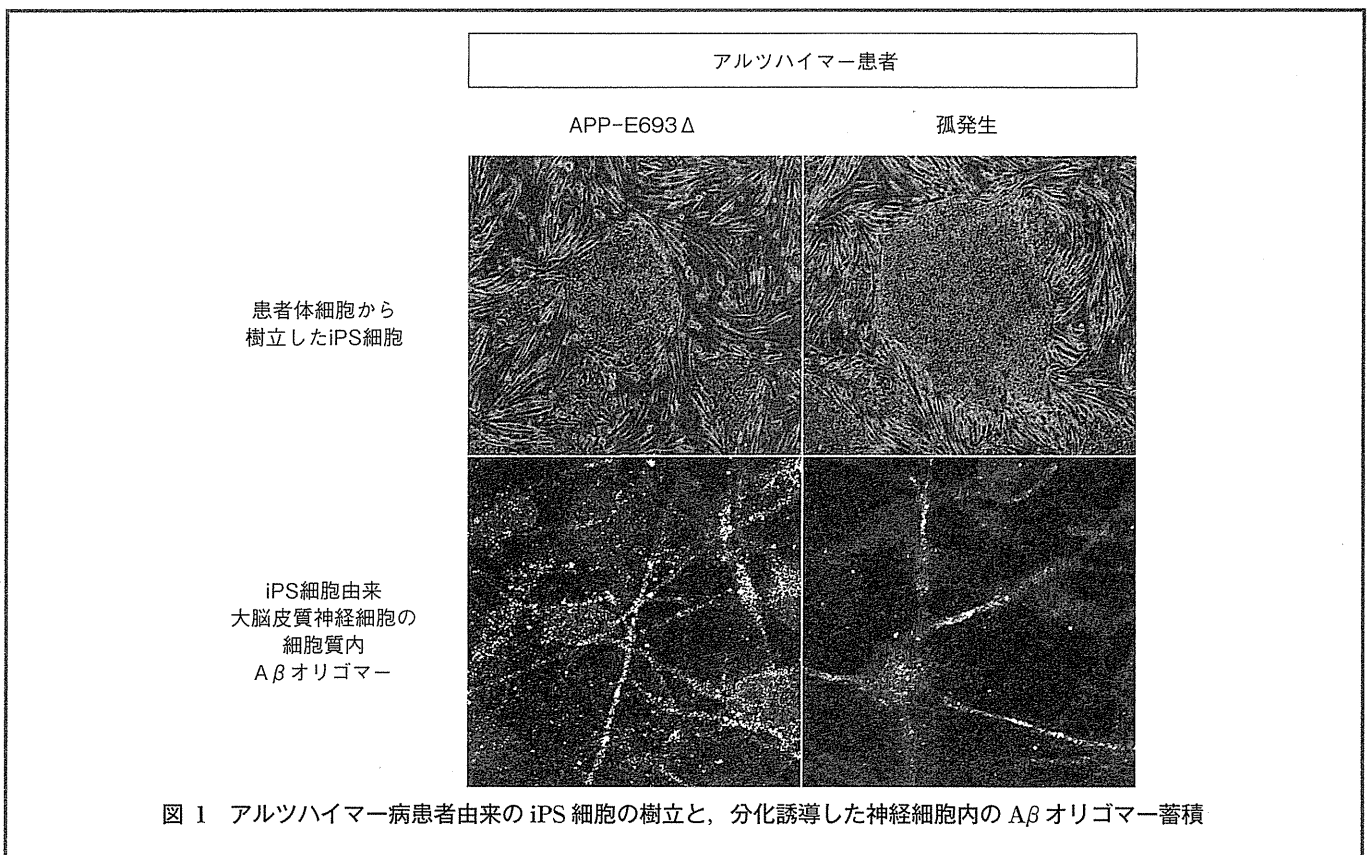


図 1 アルツハイマー病患者由来の iPS 細胞の樹立と、分化誘導した神経細胞内の Aβ オリゴマー蓄積

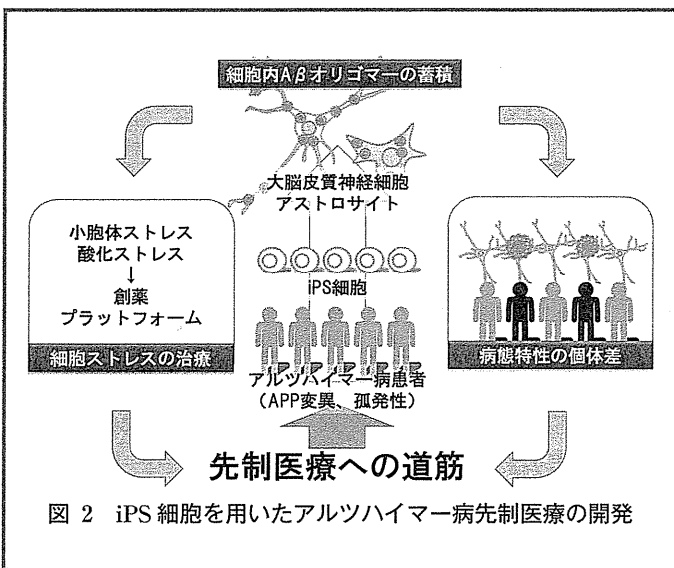


図 2 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病先制医療の開発

状 Aβ ではなく、シナプス機能異常を引き起こし、より強い細胞毒性を持つ可溶性 Aβ 凝集物 (Aβ オリゴマー) が重要であるという仮説が提唱され、AD 患者神経の Aβ オリゴマー蓄積量は認知機能低下と相関することが示されている^{15, 16)}。そのような状況の中、本邦において APP E693delta の新規変異を有する家族性 AD 家系が同定された。この家系の AD 患者は典型的な AD 様の臨床症状を呈する一方で、老人斑を検出できる PIB-

PET では脳内に線維状 Aβ が検出されなかった。培養細胞を用いた実験で、APP E693delta 変異が存在すると線維状 Aβ ではなく、細胞内に可溶性 Aβ オリゴマーが蓄積することがわかった¹⁷⁾。

これまで、AD 患者 iPS 細胞を用いた研究^{18, 19)}は細胞外 Aβ に着目していた。そこでわれわれは家族性 AD の中でも、細胞内に Aβ が蓄積するタイプの変異である APP E693delta 変異を有する家族性 AD の患者から iPS 細胞を樹立し (図 1)、解析を試みた²⁰⁾。APP E693delta 変異を有する家族性 AD 患者 iPS 細胞を、新たに開発した方法を用いて大脳皮質神経細胞へ分化誘導させると、細胞外に分泌される Aβ が健常人由来の細胞に比べて著しく少なく、細胞質内に Aβ オリゴマーの蓄積が確認できた (図 1)。さらに、細胞質内 Aβ オリゴマーの蓄積が、小胞体ストレスと酸化ストレスという細胞ストレスを生じさせ、細胞死を誘導することを見出した。そしてこの小胞体ストレスをターゲットとして、複数種の化合物を用いて評価したところ、ドコサヘキサエン酸 5 μM を培地に添加すると小胞体ストレスを緩和し、細胞死を抑制した。このドコサヘキサエン酸の添加濃度を 20 μM 以上に上げると逆に小胞体ストレスが増加し、至適濃度の存在が示唆された。さらにわれわれは、複数の孤発性 AD 患者からも iPS 細胞を樹立し、同様に大脳皮質神経細胞へ分化させた解析を行った結果、1 人の孤発性 AD 患者由来神経細胞において、APP E693delta 変異がないにもかかわらず細胞

質内 A β オリゴマーの蓄積(図 1)と細胞ストレスが生じていることを見出した。以上のことから、臨床症状から孤発性 AD として診断される患者群において、背景にひそむ病態は一元的ではなく、治療を行う際には個々の患者の病態特性に基づく必要がある可能性が考えられた。iPS 細胞技術は、疾患の病態解明・治療法開発のみならず、「病気の原因や進行に関する研究知見を基に、体内の異常を早期に診断し、病気を発症する前から治療を開始することで病気の発症を遅らせる、もしくは防ぐことを目指す先制医療」に役立つ可能性が考えられた(図 2)。

克服すべき課題と展望

ヒト iPS 細胞を用いた神経研究は今後さらに加速するものと予想されるが、2013 年現在までの iPS 細胞を用いた神経疾患研究は、既存の疾患概念を再現することにとどまる報告が多い。これは、iPS 細胞の樹立自体に半年を超える時間と実験工

フォートを要することや、樹立した iPS 細胞の性質がクローン間差をはらむことなどが背景にあると考える。これらの問題を解決する一つ的手段として、iPS 細胞の樹立法は、短期間・高効率の樹立法が次々と報告される²¹⁾とともに標準化が進みつつある。またクローン間差の問題については、多能性を安定保持し分化指向性に偏りのない iPS 細胞を選別するための評価法に関する検討が進んでいる²²⁾など、近い将来課題は克服されるであろう。

むすび

iPS 細胞の樹立方法開発からわずか 7 年で、神経疾患領域を含めた疾患研究応用が広がりをみせている。iPS 細胞を用いた疾患研究は、原因遺伝子の過剰発現やノックアウトでは検討が難しかった孤発例の検討や生理的遺伝子発現量における病態解明・治療薬開発に繋がる可能性が高く、今後の発展が期待される。

文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 ; 131 : 861-72.
- 2) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 ; 126 : 663-76.
- 3) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 ; 282 : 1145-7.
- 4) Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008 ; 321 : 1218-21.
- 5) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009 ; 457 : 277-80.
- 6) Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*. 2009 ; 461 : 402-6.
- 7) Devine MJ, Rytan M, Vodicka P, et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the alpha-synuclein locus. *Nat Commun*. 2011 ; 2 : 440.
- 8) Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*. 2011 ; 8 : 267-80.
- 9) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*. 2012 ; 4 : 145ra04.
- 10) Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet*. 2011 ; 20 : 3642-52.
- 11) Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D, et al. Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*. 2011 ; 20 : 2103-15.
- 12) Marchetto MC, Carron ME, Acab A, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010 ; 143 : 527-39.
- 13) Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 ; 473 : 221-5.
- 14) Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease : follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008 ; 372 : 216-23.
- 15) Krafft GA, Klein WL. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2010 ; 59 : 230-42.
- 16) Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration : lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 ; 8 : 101-12.
- 17) Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, et al. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol*. 2008 ; 63 : 377-87.
- 18) Yagi T, Ito D, Okada Y, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 ; 20 : 4530-9.
- 19) Israel MA, Yuan SH, Bardy C, et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2012 ; 482 : 216-20.
- 20) Kondo T, Asai M, Tsukita K, et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 2013 ; 12 : 487-96.
- 21) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011 ; 8 : 409-12.
- 22) Vitale AM, Matigian NA, Ravishankar S, et al. Variability in the generation of induced pluripotent stem cells : importance for disease modeling. *Stem Cells Transl Med*. 2012 ; 1 : 641-50.

ALS病態解明に寄与する iPS細胞の樹立

*京都大学iPS細胞研究所(CiRA)

今村恵子, 井上治久

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) は中高年期以降に筋力低下・筋萎縮等で発症する神経変性疾患である。家族性ALSおよび孤発性ALSの病理学的解析によって、運動神経細胞・アストロサイトの細胞質にTar DNA binding protein-43 (TDP-43)の蓄積が認められることが知られている¹⁾。In vivoおよびin vitroのALSモデルで変異型TDP-43が毒性を有することが報告されているが²⁾、その詳細なメカニズムは不明である。これまでの疾患モデルは、神経細胞以外の細胞株あるいはヒト以外の神経細胞を用いたものであり、ヒト神経細胞選択的な脆弱性や分子生物学的な変化を解析することはできなかつた。iPS細胞技術の開発により、患者自身の体細胞からiPS細胞を樹立することで、患者の遺伝子情報を有した神経細胞やアストロサイトの作製が可能となった。

1. TDP-43変異を有するiPS細胞由来運動神経細胞の解析

Bilicanら³⁾は、TDP-43 M377V変異を有する患者皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製した。作製したiPS細胞は、TDP-43 M377V変異を維持し、運動神経細胞に分化し

た。変異を有する神経系細胞において、蛋白生化学的解析を行ったところ可溶性および不溶性分画のTDP-43蛋白が増加しており、生存する運動神経が脆弱性を有していた。変異型TDP-43を有するALSのiPS細胞由来のヒト運動神経細胞で、表現型を明らかにした。

我々⁴⁾は、それぞれTDP-43の3種類の変異(Q343R変異, M337V変異, G298S変異)を有する3人のALS患者皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製し、変異を有するiPS細胞から作製した運動神経細胞において、細胞質での凝集体形成および神経突起の短縮を認めた。これらは、ALS患者病理やゼブラフィッシュALSモデルでみられる所見を再現していた。また、蛋白生化学的解析によって、不溶性分画のTDP-43蛋白の増加を認め、さらにspliceosomal factorであるSNRBP2が増加していることを見出した。また、運動神経細胞においては、TDP-43自身を含むRNA代謝に関連する遺伝子発現の増加、細胞骨格蛋白遺伝子発現の減少を認めた。さらに、histone acetyltransferase inhibitorの1つであるanacardic acidがALS運動神経細胞の表現型を改善することを示した。

2. TDP-43変異を有するiPS細胞由来アストロサイトを用いた研究

ALSを含む神経変性疾患の病態において、cell autonomous mechanismとグリア細胞を介したnon-cell autonomous mechanismの関与が着目されている⁵⁾。変異型SOD1遺伝子に関連したALSでは、non-cell autonomous mechanismが病態に関与することが報告されているが、変異型TDP-43遺伝子を介したALSではその関与はこれまで不明であった。Serioら⁶⁾は、TDP-43 M377V変異を有するヒトiPS細胞からアストロサイトを作製した。変異を有するアストロサイトにおいて、TDP-43蛋白量の増加、TDP-43蛋白の細胞質へのmislocalizationがみられ、またアストロサイト自体の細胞脆弱性を有していた。さらにこのアストロサイトと、健康人由来またはTDP-43 M377V変異を有するALS患者由来iPS細胞から作製した運動神経細胞との共培養を行ったところ、TDP-43変異を有するアストロサイトは運動神経細胞の脆弱性に影響を与えない結果であった。このことから、変異型TDP-43遺伝子によるALSでは、アストロサイトのnon-cell autonomous mechanismは運動神経変性に関与しない

*〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53

可能性が示唆された。今後、別のアプローチを含め、さらなる解析が待たれる。

おわりに

疾患iPS細胞を用いたALS病態解明に関する研究の加速が期待される。現在の運動神経細胞分化誘導法では、体細胞からiPS細胞樹立、iPS細胞からアッセイに使用する運動神経細胞作製までに数カ月以上を要する。実験系の安定化およびコストの低減のために、iPS細胞から標的細胞を作製するまでの分化誘導時間の短縮等により、疾患iPS細胞を用いたALS病態解明に関する研究がさらに加速するかもしれない。

参 考 文 献

- 1) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, *et al.* Ubiquitinated tdp-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006 ; 314 : 130-3.
- 2) Wegorzewska I, Baloh RH. Tdp-43-based animal models of neurodegeneration : New insights into als pathology and pathophysiology. *Neurodegener dis* 2011 ; 8 : 262-74.
- 3) Bilican B, Serio A, Barmada SJ, *et al.* Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 5803-8.
- 4) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, *et al.* Drug screening for als using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 2012 ; 4 : 145ra104.
- 5) Garden GA, La Spada AR. Intercellular (mis)communication in neurodegenerative disease. *Neuron* 2012 ; 73 : 886-901.
- 6) Serio A, Bilican B, Barmada SJ, *et al.* Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 4697-702.

iPS細胞技術を用いた アルツハイマー病の 新たな医療開発

近藤 孝之 井上 治久

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

アルツハイマー病 (AD) の病態として、線維状アミロイド β 蛋白 ($A\beta$) が神経細胞外に老人斑として蓄積し、リン酸化タウの蓄積と神経細胞死に至るアミロイドカスケード仮説が広く支持されてきた。しかしワクチン療法により老人斑が除去できても、認知機能改善には至らず、AD 病態の多くは未解明のままである。一方で可溶性 $A\beta$ オリゴマーは、高い神経毒性を有することが知られている。我々は、アミロイド前駆体蛋白 *APP* に E693delta 変異を有する家族性 AD 患者から iPS 細胞を作製し、大脳皮質神経細胞に分化誘導させた。すると細胞内に $A\beta$ オリゴマーが蓄積し、小胞体および酸化ストレスを介して細胞脆弱性を呈した。この脆弱性は低濃度のドコサヘキサエン酸で改善された。さらに *APP* E693delta 変異がない一部の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来の神経細胞内でも $A\beta$ オリゴマーが蓄積し、細胞ストレスが生じていることを明らかにした。これらの結果は、高齢発症の AD においても iPS 細胞を用いた疾患再現が可能であり、孤発性 AD に潜む病態を弁別し、病態特性に応じた創薬へとつなげる先制医療の可能性を示している。

KEY WORDS:

アルツハイマー病, $A\beta$ オリゴマー, iPS 細胞, 疾患モデリング, 創薬

はじめに

2006年に誕生した人工多能性幹細胞（iPS細胞：induced Pluripotent Stem cells）^{1,2)}は、医学と生物学の世界に革命を起こしつつある。2012年、その産みの親である山中伸弥教授には、ノーベル生理学・医学賞の栄誉がもたらされた。認知症を含む神経疾患領域においても、iPS細胞技術により患者自身の体細胞から中枢神経系組織を含めた疾患の標的細胞を入手することが可能となり、これまでにないまったく新たな医療開発が始まっている。

本稿では、現在までのiPS細胞技術を用いた神経疾患研究について紹介するとともに、認知症のなかで最も大きな一角を占めるアルツハイマー病について、最近我々が報告した研究について論じる。さらに、今後期待されるiPS細胞技術を用いた医療応用研究の展望について述べる。

1. ヒト多能性幹細胞の歴史とiPS細胞の誕生

1998年にヒト由来の多能性幹細胞である胚性幹細胞（ES細胞：embryonic stem cells）が、初めて樹立された。ヒトES細胞はその未分化状態を保ったまま、ほぼ無限に増殖を繰り返すことが可能であり、心筋細胞・肝細胞・神経細胞などへの*in vitro*における分化誘導法研究法が進められてきた。特に神経・精神疾患領域においては、生検材料などの生きたヒト研究検体を得ることができなかつたため、ヒトES細胞から分化誘導して得られる神経細胞には大きな期待が寄せられてきた。一方、2006年にマウスで、2007年にはヒトで、ES細胞で発現している遺伝子を体細胞に導入することによりES細胞に匹敵する多能性をもつ幹細胞が樹立され、induced Pluripotent Stem cells（iPS細胞）と命名された^{1,2)}。具体的には、皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いてES細胞特異的遺伝子である*Oct3/4*・*Sox2*・*Klf4*・*c-Myc*を導入することでほぼ無限に増殖し、内・中・外胚葉それぞれへの分化能力を有する細胞株が樹立された。

2. 患者iPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル開発

患者の皮膚線維芽細胞やリンパ球などの体細胞を採取し、iPS細胞を樹立したのち、様々な種類の神経細胞へ分化誘導する技術が開発され、神経疾患研究に応用が進みつつある(図1)。2008年、ハーバード大学のグループが高齢の遺伝性筋萎縮性側索硬化症(ALS: amyotrophic lateral sclerosis)の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製した³⁾。そのiPS細胞は、患者の遺伝子変異をそのままひきついでいること、運動神経細胞に分化誘導可能であることが示された。2009年、脊髄性筋萎縮症患者から樹立したiPS細胞由来運動神経細胞数減少と、核ジェム数の減少が報告された⁴⁾。そして、*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein (IKBKAP)* 遺伝子のスプライシング異常が原因である家族性自律神経失調症患者から樹立したiPS細胞由来自律神経細胞数の減少と、遊走能の低下、さらにはKinetinによる*IKBKAP* 遺伝子のRNAスプライシング異常の改善が示された⁵⁾。さらに、遺伝性パーキンソン病^{6,7)}、遺伝性ALS^{8,9)}、レット症候群^{10,11)}など、非常に多岐にわたる神経疾患のiPS細胞を用いた病態再現が報告されるようになった。2011年には、遺伝性ではなく孤発性の統合失調症患者からのiPS細胞樹立、

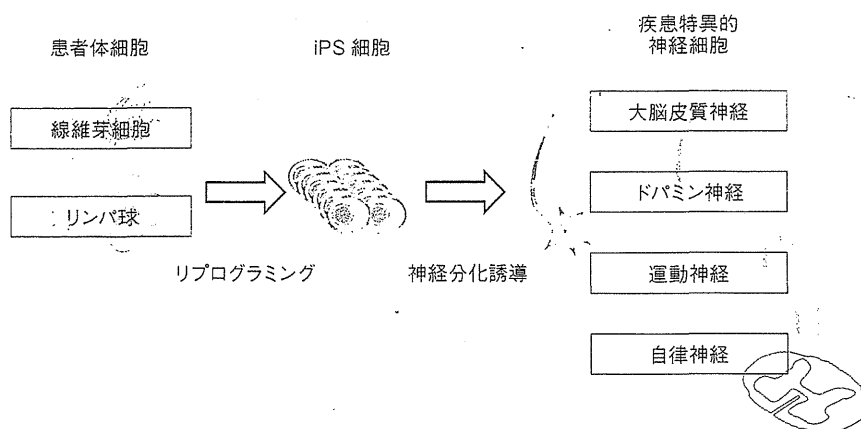


図1 疾患特異的iPS細胞の樹立と種々の神経細胞への分化誘導

分化誘導した神経細胞で神経突起・シナプス密度の減少が報告された¹²⁾。今後、患者 iPS 細胞を用いた、神経・精神疾患モデル開発がさらに加速するであろう。

3. 患者iPS細胞を用いたアルツハイマー病モデル開発

アルツハイマー病 (AD: Alzheimer's disease) は進行性の記憶力低下を中心とした臨床症状を呈する神経変性疾患である。AD は加齢が大きな発症リスクとなるため、高度高齢化社会を迎えつつあるわが国の医療経済的な観点からも、極めて重要な疾患である。AD の病理学的特徴としては、脳内にアミロイド β 蛋白 ($A\beta$: amyloid beta) が細胞外に老人斑として沈着する。老人斑の主成分である $A\beta$ は、アミロイド前駆蛋白 (APP: amyloid precursor protein) から β セクレターゼ・ γ セクレターゼによる二段階の酵素切断で切り出され、主にシナプス間隙を含む細胞外に分泌されると考えられてきた。老人斑に蓄積する $A\beta$ は不溶性の線維状重合構造をとり、強い細胞毒性を有する。さらに、脳内老人斑の分布解析や、線維状 $A\beta$ を蓄積する遺伝子改変マウスや、培養細胞の実験結果に基づき、細胞外 $A\beta$ を起点として神経細胞死が導かれるとする「アミロイドカスケード仮説」が広く受け入れられてきた。この仮説に基づき $A\beta$ のワクチン療法治験が実施され、老人斑は除去されたが、認知機能低下の進行を抑制することはできなかった¹³⁾。一方で、不溶性線維状 $A\beta$ ではなく、シナプス機能異常を引き起こし、より強い細胞毒性をもつ可溶性 $A\beta$ 凝集物 ($A\beta$ オリゴマー) が重要であるという仮説が提唱された (図 2)。AD 患者神経の $A\beta$ オリゴマー蓄積量は認知機能低下と相関することが示されている^{14, 15)}。この $A\beta$ オリゴマー仮説を強く支持する、APP E693delta 変異を有する新たな家族性 AD 家系が本邦において同定された。この家系の AD 患者は典型的な AD の臨床症状を呈する一方で、老人斑を検出できる PIB-PET では脳内に線維状 $A\beta$ が検出されなかった。その後、この APP E693delta 遺伝子を用いた実験で、APP E693delta 変異が存在すると細胞内に可溶性 $A\beta$ オリゴマーが蓄積することが判明した¹⁶⁾。

これまで、アルツハイマー病患者 iPS 細胞を用いた研究^{17, 18)} は、細胞外 $A\beta$ に着目されていた。そこで我々は家族性 AD のなかでも、細胞内に $A\beta$ が蓄積

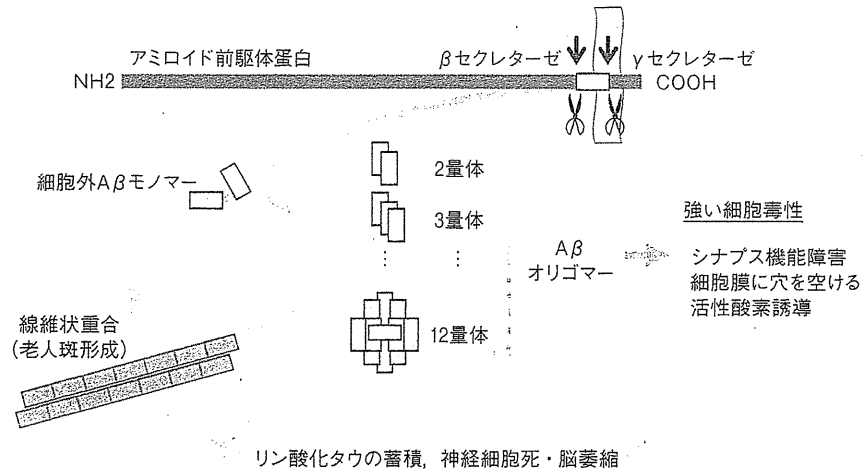


図2 アルツハイマー病のAβオリゴマー仮説

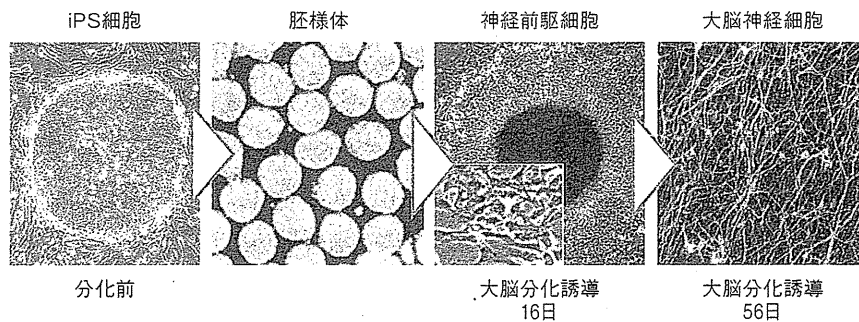


図3 ヒトiPS細胞から大脳皮質神経細胞への分化誘導

するタイプの変異である *APP* E693delta 変異を有する家族性 AD の患者から iPS 細胞を樹立し、解析を行った¹⁹⁾。*APP* E693delta 変異を有する家族性 AD 患者 iPS 細胞を樹立し、新たに改変した分化誘導方法を用いて大脳皮質の分子マーカーである *TBR1* や *SATB2* といった転写因子を発現する、成熟神経細胞へ分化誘導させた (図 3)。すると、細胞外に分泌される Aβ 量が健常人由来の細胞に比べて著しく少なく、細胞質内に Aβ オリゴマーの蓄積を認めた (図

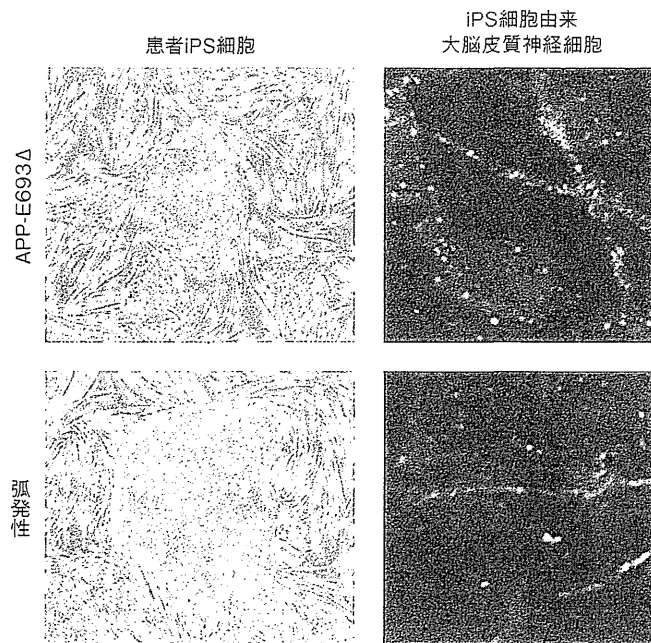


図4 アルツハイマー病患者由来のiPS細胞の樹立と分化誘導した神経細胞内のAβオリゴマー蓄積

患者のiPS細胞から分化した大脳皮質神経細胞の細胞質内に、Aβオリゴマー（白色ドット）が蓄積している。

4)。さらにiPS細胞から6カ月以上かけてアストロサイトを分化誘導させると、神経細胞と同様にAβの細胞外分泌が少なく、細胞質内にAβオリゴマーの蓄積を認めた。次に、細胞質内Aβオリゴマーの蓄積が、小胞体ストレスと酸化ストレスという細胞ストレスを生じさせ、細胞死を誘導することを見出した。そしてこの小胞体ストレスを標的として、複数種の化合物を用いて評価したところ、ドコサヘキサエン酸5μMを培地に添加すると小胞体ストレスを緩和し、細胞死を抑制した。このドコサヘキサエン酸の添加濃度を20μM以上に上げると逆に小胞体ストレスが増加し、至適濃度の存在が示唆された（図5）。さらに我々は、複数の孤発性AD患者からもiPS細胞を樹立し同様に大脳皮質神経細胞へ分化させた解析を行った結果、一人の孤発性AD患者由来神経細胞において、APP E693delta変異がないにもかかわらず、細胞質内Aβオリゴマー

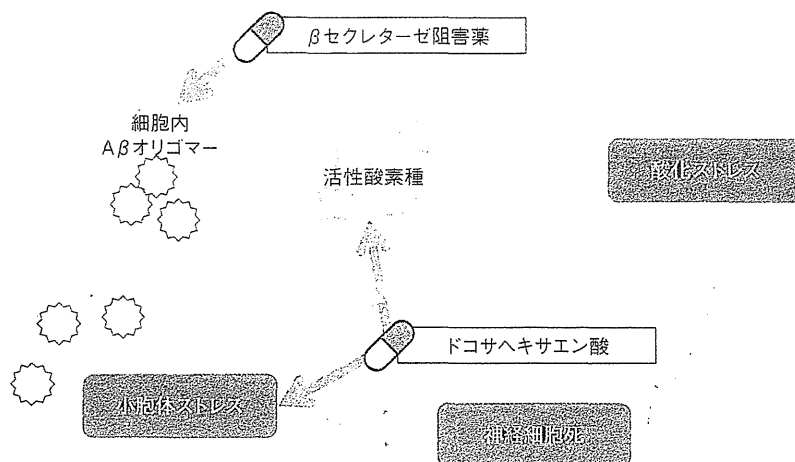


図5 細胞内Aβオリゴマーによる細胞ストレスとドコサヘキサエン酸による改善

の蓄積と細胞ストレスが生じていることを見出した。

以上のことから、臨床症状から孤発性ADとして診断される患者群において、背景にひそむ病態は単一ではなく、個々の患者の病態特性に基づいた治療を行う必要性が示唆された。今後、iPS細胞技術により背景病態が弁別された孤発性ADの網羅的な蛋白動態解析による病態診断マーカーの探索や、iPS細胞由来神経細胞の細胞ストレスを標的とした創薬開発が期待される。

おわりに

iPS細胞を用いたアルツハイマー病研究は、原因遺伝子の過剰発現やノックアウトでは検討が難しかった孤発例の検討や生理的遺伝子発現量における病態解明・治療薬開発に繋がる可能性が高い。本研究結果が、個々の患者のiPS細胞を用いることによって、病気の発症を予測し、治療を開始することにより病気の発症を防ぐことを目指す「iPS医療」の幕開けとなることを期待したい。

文 献

- 1) Takahashi K et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872. 2007
- 2) Takahashi K et al: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676. 2006
- 3) Dimos JT et al: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218-1221. 2008
- 4) Ebert AD et al: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277-280. 2009
- 5) Lee G et al: Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461: 402-406. 2009
- 6) Devine MJ et al: Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the alpha-synuclein locus. *Nat Commun* 2: 440. 2011
- 7) Nguyen HN et al: LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 8: 267-280. 2011
- 8) Egawa N et al: Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 4: 145ra104. 2012
- 9) Mitne-Neto M et al: Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet* 20: 3642-3652. 2011
- 10) Cheung AY et al: Isolation of MECP2-null rett syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 20: 2103-2115. 2011
- 11) Marchetto MC et al: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143: 527-539. 2010
- 12) Brennand KJ et al: Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473: 221-225. 2011
- 13) Holmes C et al: Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372: 216-223. 2008
- 14) Krafft GA et al: ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 59: 230-242. 2010
- 15) Haass C et al: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101-112. 2007
- 16) Tomiyama T et al: A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63: 377-387. 2008
- 17) Yagi T et al: Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 20: 4530-4539. 2011
- 18) Israel MA et al: Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482: 216-220. 2012
- 19) Kondo T et al: Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12: 487-496. 2013

Profile

近藤 孝之 (Takayuki Kondo)

2013 年京都大学 iPS 細胞研究所研究員

2004 年滋賀医科大学卒業。2009 年京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学大学院入学。2010 年京都大学 iPS 細胞研究所リサーチアシスタント。2013 年現職。

15. iPS細胞の治療応用

近藤 孝之^{1) 2)} 井上 治久²⁾ 高橋 良輔¹⁾

要 旨

ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS cells) は 2006 年にその樹立が報告されて以来, 患者由来のiPS細胞をもちいた疾患モデル研究が進み, 一方で再生治療の細胞リソースとしてのiPS細胞利用も始まりつつある. 今後も, iPS細胞技術に基づいた創薬研究や安全な臨床治験の実施へ向け, ますますの医学・生物学分野への幅広い貢献が期待されている.

[日内会誌 102 : 2015~2022, 2013]

Key words iPS細胞, 創薬研究, 再生医療

はじめに

2006年に初めて報告された人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS細胞)¹⁾の開発は, 大きな衝撃を持って受け止められた. これは体細胞から幹細胞を誘導できるという科学的な重要性もさることながら, 神経系疾患の基礎研究および臨床医学のフィールドにおいても革新的な発見であった. 実際iPS細胞の技術開発からわずか数年で, 疾患特異的iPS細胞を用いた神経疾患研究成果が次々と報告されるようになり, iPS細胞を用いた再生治療研究も始まろうとしているなど, 研究と治療の両者における応用が爆発的に進んでいる. 本稿では, iPS細胞を用いた神経疾患研究と再生医療の現状を, 我々が最近報告した知見とともに紹介しながら, 今後の展望について述べたい.

1. ヒト多能性幹細胞の歴史とiPS細胞の開発

1998年に, ヒト由来の多能性幹細胞である胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES細胞) は, 初めて樹立された. ヒトES細胞はその未分化状態を保ったまま, ほぼ無限に増殖を繰り返すことが可能であり, 心筋細胞・肝細胞・神経細胞などへの*in vitro*における分化誘導法研究法が進められてきた. 特に神経・精神疾患領域においては, 生検材料などの生きたヒト研究検体を得ることができなかつたため, ヒトES細胞から神経細胞への分化誘導法についても精力的に研究されてきた. このような状況の中で山中らは, 2006年にマウスで¹⁾, 2007年にはヒトで²⁾, ES細胞に発現している遺伝子を体細胞に導入することによりES細胞に匹敵する多能性をもつ幹細胞

1) 京都大学医学研究科臨床神経学, 2) 京都大学iPS細胞研究所
New and Future Treatments for Neurological Disorders—Knowledge Essential to Daily Clinics and Future Prospects. Topics : 15. Therapeutic application of iPS cells.

Takayuki Kondo^{1) 2)}, Haruhisa Inoue²⁾ and Ryosuke Takahashi¹⁾ : ¹⁾Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan and ²⁾Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Japan.

トピックス

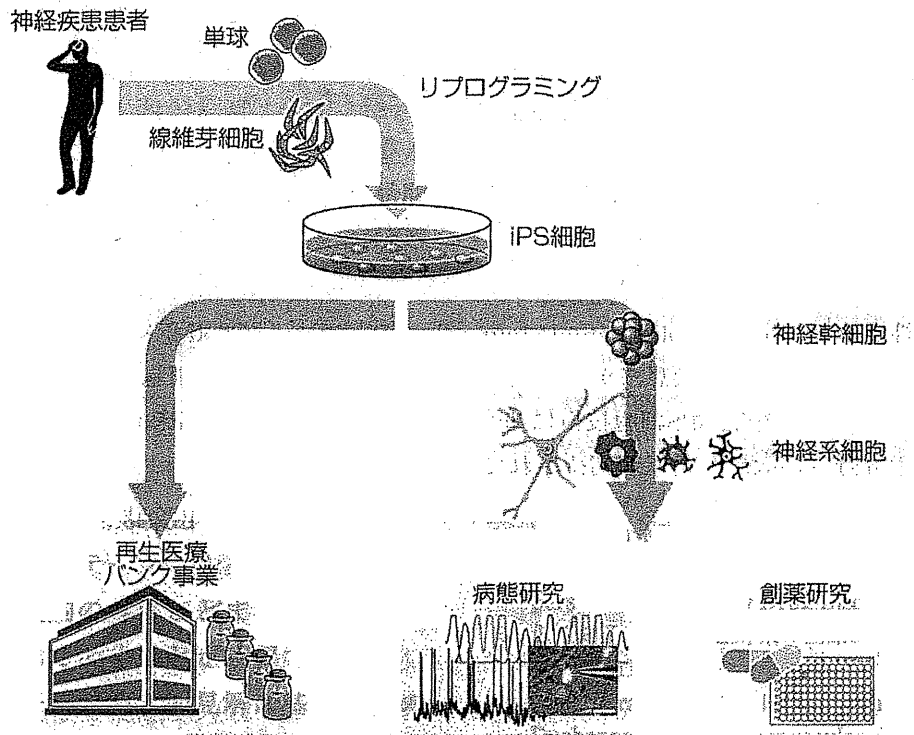


図 1. iPS細胞による神経疾患研究と再生医療

胞を樹立し、iPS細胞と命名した。すなわち皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスベクターを用いてES細胞に発現している遺伝子であるOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することで、ほぼ無限に増殖し、内・中・外胚葉それぞれへの分化能力を有する細胞株が樹立された(図1)。そしてiPS細胞の樹立もより効率でより安定した方法を目指して開発が進み、皮膚線維芽細胞のみではなくリンパ球・抜歯後の歯髄・臍帯血幹細胞・毛根角化細胞なども樹立材料として使用できるようになった。さらに、先行開発されていたES細胞からの神経細胞分化誘導技術がほぼそのままiPS細胞に応用出来ることもわかり、神経疾患研究および再生医療開発の基盤が整った。

2. 患者iPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル開発

2008年、ハーバード大学のグループが遺伝性

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製した。そのiPS細胞は患者の遺伝子変異をそのままひきついでいること、運動神経細胞に分化誘導可能であることが示された。これ以後、非常に多岐にわたる神経疾患のiPS細胞を用いた病態再現が報告されるようになった(表)。iPS細胞をもちいた神経疾患のモデリングは、遺伝子変異を伴う家族性疾患を中心に始まったが、アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)・パーキンソン病・統合失調症ではそれぞれ孤発性患者由来のiPS細胞をもちいた病態再現が行われている。そして、2012年には家族性自律神経失調症のiPS細胞を用いて、大規模化合物スクリーニングが報告されるなど創薬研究も始まっている³⁾。

3. 患者iPS細胞を用いたアルツハイマー病モデル開発

ADは進行性の記憶力低下を中心とした臨床症状を呈する神経変性疾患である。ADの脳内では、アミロイドベータ蛋白 (amyloid beta protein: A β) が不溶性の線維状重合構造をとり、細胞外に老人斑として沈着する。A β は、アミロイド前駆蛋白 (amyloid precursor protein: APP) から β セクレターゼ・ γ セクレターゼによる二段階の酵素切断で切り出され、シナプス間隙を含む細胞外に分泌される。剖検脳における老人斑の分布解析、線維状A β を蓄積する遺伝子改変マウスの解析、APP遺伝子過剰発現する培養細胞株の解析などから、細胞外A β を起点として神経細胞死が導かれるとする「アミロイドカスケード仮説」が広く受け入れられてきた。この仮説に基づいたA β のワクチン療法試験が実施され、老人斑の除去には成功したが、認知機能低下の進行を抑制することはできなかった⁴⁾。一方で、不溶性線維状A β ではなく、シナプス機能異常を引き起こし、より強い細胞毒性を持つ可溶性A β 凝集物 (A β オリゴマー) が重要であるという仮説が提唱された。AD患者神経のA β オリゴマー蓄積量は認知機能低下と相関することが示されている。そしてこのオリゴマー仮説を支持する例としてAPP E693delta変異による家族性ADが報告され、老人斑を可視化するPIB-PET検査では線維状A β の蓄積は認められず、この変異APP E693delta過剰発現マウスでは細胞内A β オリゴマーの蓄積が示されていた⁵⁾。

そこで我々は、疾患特異的iPS細胞を用いてA β オリゴマー仮説を検討した⁶⁾。APP E693delta変異を有する家族性AD患者からiPS細胞を樹立し、APP E693delta変異を有する家族性AD患者iPS細胞を樹立し、新たに改変した分化誘導方法を用いて大脳皮質の分子マーカーであるTBR1

やSATB2といった転写因子を発現する、成熟神経細胞へ分化誘導させた (図2)。するとAPP E693delta変異をもつ神経細胞およびアストロサイトでは、細胞外に分泌されるA β 量が著しく少なく、細胞質内にA β オリゴマーの蓄積を認めた。そして、細胞質内A β オリゴマーの蓄積が、小胞体ストレスと酸化ストレスという細胞ストレスを生じさせ、細胞死を誘導することを見出した。そしてこの小胞体ストレスを標的として、複数種の化合物の薬剤評価をしたところ、ドコサヘキサエン酸5 μ Mを培地に添加すると小胞体ストレスを緩和し、細胞死を抑制した。このドコサヘキサエン酸の添加濃度を20 μ M以上に上げると逆に小胞体ストレスが増加し、至適濃度の存在が示唆された。さらにわれわれは複数の孤発性AD患者からもiPS細胞を樹立し同様に大脳皮質神経細胞へ分化させた解析を行った結果、一人の孤発性AD患者由来神経細胞において、APP E693delta変異がないにもかかわらず細胞質内A β オリゴマーの蓄積と同様の細胞ストレスが生じていることを見いだした。

以上のことから、臨床症状で規定された孤発性ADの背景にひそむ病態は単一ではなく、個々の患者の病態特性に基づいた治療を行う必要性が示唆された。

4. 患者iPS細胞を用いた神経・精神疾患モデリングの展望

現在までの所、iPS細胞をもちいた神経疾患モデリングの多くが既知の病態再現にとどまっている。この背景として、樹立したiPS細胞のclonal variation (細胞の分化特性などが少しずつクローン毎に異なること) が病態解析のノイズとなってしまうことが原因の一つに挙げられる⁷⁾。しかし、iPS細胞の樹立と評価法の検討がなされ、神経系細胞への分化誘導技術は日進月歩で改善され続けており克服されるであろう。また、単一

トピックス

表. ヒトiPS細胞を用いた疾患モデリング研究

| 疾患 | 遺伝子変異 | 表現形 | 文献 |
|-----------|---|--|---|
| アルツハイマー病 | APP E603Δ homo APP V717L hetero 孤発例 | 細胞内Aβオリゴマー (E693Δ, 孤発例) Aβ42/40 ↑ (V717L) 小胞体ストレス・酸化ストレス 神経細胞死 | Kondo et al. Cell Stem Cell. 2013 Apr 4; 12(4): 487-96. |
| アルツハイマー病 | APP duplication | Aβ40 ↑ タウリン酸化 (pT231) ↑ GSK-3β活性化 | Israel et al. Nature. 2012 Jan 25; 482(7384): 216-20. |
| アルツハイマー病 | PS1 A246E hetero PS2 N141I hetero | Aβ42/40 ↑ | Yagi et al. Hum Mol Genet. 2011 Dec 1; 20(23): 4530-9. |
| ダウン症候群 | Chr.21 trisomy | Aβ40 ↑ 線維状Aβ42 沈着 タウリン酸化 (pT231, pS396) ↑ | Shi. Et al. Sci Transl Med. 2012 Mar 7; 4(124): 124ra29. |
| 筋萎縮性側索硬化症 | TARDBP G298S hetero TARDBP M337V hetero TARDBP Q343R hetero | TDP43 ↑, 不溶性TDP43の蓄積 神経突起の短縮 | Egawa/Kitaoka et al. Sci Transl Med. 2012 Aug 1; 4(145): 145ra104. |
| 筋萎縮性側索硬化症 | TARDBP M337V hetero | 細胞質可溶性TDP43 ↑ 神経細胞死 | Billican et al. PNAS. 2012 Apr 10; 109(15): 5803-8. |
| 筋萎縮性側索硬化症 | TARDBP M337V hetero | 細胞質可溶性TDP43 ↑ アストロサイト細胞死 | Serio et al. PNAS. 2013 Mar 19; 110(12): 4697-702. |
| 筋萎縮性側索硬化症 | VAPB P56S hetero | VAPB ↓ (線維芽細胞・iPS・神経) 過剰発現と異なりVAPB封入体なし MG132 存在下VAPB不安定性 ↑ | Mitne-Neto et al. Hum Mol Genet. 2011 Sep 15; 20(18): 3642-52. |
| 脊髄性筋萎縮症 | SMA Exon7 deletion | 運動神経細胞誘導効率低下 核内GEM数の低下 | Ebert et al. Nature. 2009 Jan 15; 457(7227): 277-80. |
| 球脊髄性筋萎縮症 | AR CAG repeat | アンドロゲン受容体凝集亢進 (Dihydrotestosterone負荷時) | Nihei et al. J Biol Chem. 2013 Mar 22; 288(12): 8043-52. |
| パーキンソン病 | LRRK2 G2019S hetero | ドパミン神経分化 神経突起の短縮 TH陽性細胞 ↓ (H2O2 負荷) 活性型Caspase3 ↑ (6-OHDA負荷) | Nguyen et al. Cell Stem Cell. 2011 Mar 4; 8(3): 267-80. |
| パーキンソン病 | LRRK2 G2019S hetero 孤発例 | αシヌクレイン蓄積 神経突起の短縮, オートファジー ↑ 活性型Caspase3 ↑ | Sanchez et al. EMBO Mol Med. 2012 May; 4(5): 380-95. |
| パーキンソン病 | LRRK2 G2019S hetero 患者・健常人由来細胞に遺伝子編集 | 神経突起の短縮 活性型Caspase3 ↑ (6-OHDA負荷) 活性型Caspase3 ↑ (Rotenone負荷) Tau ↑, pTau ↑, αシヌクレイン ↑ ERKリン酸化 ↑ | Reinhardt et al. Cell Stem Cell. 2013 Mar 7; 12(3): 354-67. |
| パーキンソン病 | PINK1 V170G homo | PINK1 依存性PARKINのミトコンドリア局在 移動とコヒキチン化, Mitophagyの障害 (Valinomycin刺激下) | Rakovic A et al. J Biol Chem. 2013 Jan 25; 288(4): 2223-37. |
| パーキンソン病 | PINK1 Q456X homo PINK1 V170G homo | Parkinのミトコンドリア局在変化 ミトコンドリアの数 ↑, PGC-1α ↑ | Seibler P et al. J Neurosci. 2011 Apr 20; 31(16): 5970-6. |
| パーキンソン病 | PINK1 Q456X homo LRRK2 R1441C hetero LRRK2 G2019S hetero | ROS ↑ (Valinomycin負荷) ミトコンドリア呼吸鎖機能異常 軸索内ミトコンドリア輸送ラシダム化 | Cooper et al. Sci Transl Med. 2012 Jul 4; 4(141): 141ra90. |
| パーキンソン病 | PARKIN ex2-4 deletion PARKIN ex6,7 deletion | 酸化ストレス亢進 αシヌクレイン蓄積 | Mol Brain. 2012 Oct 6; 5: 35. |
| パーキンソン病 | SNCA triplication | 細胞内・上清中のαシヌクレイン ↑ | Devine et al. Nat Commun. 2011 Aug 23; 2: 440. |

表. 続き

| 疾患 | 遺伝子変異 | 表現形 | 文献 |
|-----------------|--|--|---|
| パーキンソン病 | SNCA triplication | α シヌグレイン↑ 活性型Caspase3 ↑ (H2O2 負荷) | Byers et al. PLoS One. 2011; 6(11): e26159. |
| 前頭側頭葉型認知症 | PGRN S116X hetero | PGRN↓ MEK-MAPK経路優位 (>PI3-AKT経路) | Almeida et al. Cell Rep. 2012 Oct 25; 2(4): 789-98. |
| 家族性自律神経失調 | IKBKAP Exon20 skip homo | 神経提細胞でのスライシング変化 遊走能低下 | Nature. 2009 Sep 17; 461(7262): 402-6. |
| 家族性自律神経失調 | IKBKAP Exon20 skip homo | IKBKAP発現低下 | Nat Biotechnol. 2012 Dec; 30(12): 1244-8. |
| Machado-Joseph病 | ATXN3 CAG繰り返し配列延長 hetero | ATXN3 不溶性凝集 (グルタミン酸刺激過剰興奮下) | Nature. 2011 Nov 23; 480(7378): 543-6. |
| ハンチントン病 | Huntingtin CAG繰り返し配列延長 hetero | 細胞死 (神経栄養因子除去条件) | PLoS Curr. 2010 Oct 28; 2: RRN1193. |
| ハンチントン病 | Huntingtin CAG繰り返し配列延長 hetero | 活性型Caspase3 ↑ 細胞死 (神経栄養因子除去条件) | Cell Stem Cell. 2012 Aug 3; 11(2): 264-78. |
| ハンチントン病 | Huntingtin CAG繰り返し配列延長 hetero | 細胞死, Caspase3 活性化↑ (神経栄養因子除去条件) | Cell Stem Cell. 2012 Aug 3; 11(2): 253-63. |
| 脆弱X症候群 | FMR1 CGG繰り返し配列延長 homo | FMR1 遺伝子座メチル化↑ FMR1 発現↓ 神経突起長↓ | PLoS One. 2011; 6(10): e26203. |
| Dravet症候群 | SCN1A R1645* hetero | GABA神経の発火頻度低下 | Mol Brain. 2013 May 2; 6: 19 |
| Dravet症候群 | SCN1A F1415I hetero SCN1A Q1923R hetero | 発作性脱分極変位 | Hum Mol Genet. 2013 Jun 27 |
| Timothy症候群 | CACNA1C G406 hetero | TH発現↑, ノルエピネフリン放出↑, ドパミン放出↑ | Nat Med. 2011 Nov 27; 17(12): 1657-62 |
| Rett症候群 | MeCP2 T158M | MeCP2 発現低下 Tuj1 陽性神経細胞減少 | Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Aug 23; 108(34): 14169-74. |
| Rett症候群 | MeCP2 Q244X MeCP2 R308C | 神経細胞でMeCP2 発現↓ 軸索上のVGLUT1 陽性puncta↓ 神経細胞体サイズ↓ 神経自発興奮頻度↓ シナプス後電位発火頻度↓ | Cell. 2010 Nov 12; 143(4): 527-39. |
| 統合失調症 | 孤発例 | シナプス結合能↓ 神経突起↓, シナプス数↓ シナプス発火頻度・興奮頻度↑ | Nature. 2011 May 12; 473(7346): 221-5. |
| ゴーシェ病 | Gcase N370S/S46G insertion | α シヌグレイン蓄積↑ 不溶性 α シヌグレイン貯留 | Cell. 2011 Jul 8; 146(1): 37-52. |

APP: amyloid precursor protein, PS: presenilin, TARDBP: TAR DNA-binding protein, VAPB: vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C, SMA: spinal muscular atrophy, AR: androgen receptor, LRRK2: leucine-rich repeat kinase 2, PINK1: PTEN-induced putative kinase 1, SNCA: synuclein-alpha, PGRN: progranulin, IKBKAP: inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, ATXN: ataxin, FMR1: fragile X mental retardation 1, SCN1A: sodium channel gene 1A, CACNA1C: calcium channel alpha 1C, MeCP2: methyl CpG binding protein 2, GSK3: glycogen synthase kinase 3, TH: tyrosine hydroxylase, 6-OHDA: 6-hydroxydopamine, PGC-1: PPAR- γ co-activator-1, ROS: reactive oxygen species, VGLUT: vesicular glutamate transport protein, vesicular glutamate transporter

トピックス

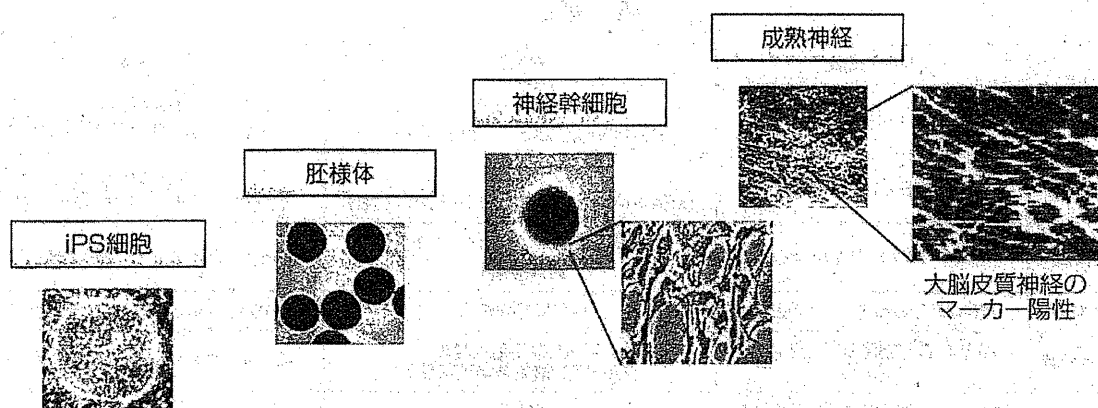


図2. ヒトiPS細胞から大脳皮質神経細胞への分化誘導

| | | 若年性アルツハイマー | | 高齢発症アルツハイマー | |
|-----------------|--------------------|------------|-----------|-------------|-------|
| | | APP-E693A | APP-V717L | 孤発性1 | 孤発性2 |
| 細胞外Aβ (42/40 比) | | ± (→) | + (↑) | + (→) | + (→) |
| 細胞内Aβオリゴマー | iPS細胞から作製した神経細胞 | +++ | なし | なし | ++ |
| | iPS細胞から作製したアストロサイト | + | なし | なし | ± |
| βセクレターゼ阻害剤の反応 | | あり | N.D. | N.D. | あり |
| 小胞体ストレス | | ++ | — | — | + |
| 酸化ストレス | | ++ | — | — | + |
| DHAの反応 | | あり | N.D. | N.D. | あり |

図3. アルツハイマー病患者由来のiPS細胞をもちいた、Aβオリゴマー病態の再現と薬剤評価

遺伝子病については、TALEN (transcription activator-like effectors) やCRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9による遺伝子改変技術⁸⁾を用いて、clonal variationを克服する試み⁹⁾もなされ日々進歩し続けている。

また、既存のモデル動物や細胞株では孤発性疾患の解析は困難である。しかしiPS細胞の大きな利点として、孤発性疾患患者の一次ゲノム情報をすべて引き継いだ神経系細胞が得られる点がある。そして、孤発例の臨床病型や、外的環境因子に基づいた病態修飾の知見、近年技術革新が著しい次世代シーケンサーをもちいたエク

ソーム解析結果などと融合する形で、iPS細胞の疾患表現形を基盤として孤発性疾患を再分類し、再分類に準じた治療法選択を提案できるようになる可能性がある。

5. iPS細胞を用いた神経疾患の再生医療

ヒト神経系細胞の中でも神経細胞は、一度障害・脱落すると有意な自然再生をすることはないと考えられており、臓器再建をゴールとする再生医療においては何らかの外来細胞を移植する必要がある。この外来細胞のリソースとしては、間葉系幹細胞を始めとした体性幹細胞、胎