

児神経細胞、ES細胞が先行してきた。体性幹細胞は自家移植できる点で優れるが、神経系疾患の治療リソースとしては効果が不十分であった。

胎児神経細胞は、パーキンソン病に対する中絶胎児中脳組織を用いた脳内細胞移植治療として1980年に始まり、欧米を中心に現在までに約400例の手術が行われてきた。一部の症例では劇的な効果が認められ、移植後10年以上経っても移植した細胞が脳内で生存し続け臨床的な効果も持続したと報告されている<sup>10)</sup>。一方で、二重盲検試験における治療効果が60歳以下あるいは中軽症例に限られたこと、移植片による不随意運動の合併症が一部の症例で生じたことなど問題点もあるが、最も有望な対象疾患の一つと考えられる。最近になり、米国ではEmory大学とNeuralstem社が中心となり胎児脊髄由来神経幹細胞をALS患者脊髄に移植する臨床試験が始まっている。既に第一相試験で安全性が確認され、2013年4月に第二相試験が米国食品医薬品局（US Food and Drug Administration：FDA）により承認された。

ES細胞は、1998年に初めて樹立された後再生医療リソースとして大いに期待されたが、宗教および倫理的側面・安全性の確保・異種動物由来因子除去の問題から臨床試験になかなか進むことができなかった。しかし2010年にFDAが2社3案件の申請を承認、Geron社によるES細胞由来のオリゴデンドログリア前駆細胞を用いた亜急性脊髄損傷治療（2011年11月に経営的問題で中止）、ACT社によるES細胞由来の網膜色素上皮細胞を用いたスタガルト病・加齢性黄斑変性治療が（2013年4月に初めての移植施行と公表）、それぞれ第一相臨床試験として開始された。また、California Stem Cell社が脊髄性筋萎縮症I型に対してES細胞由来運動神経細胞の移植治療を、FDA申請中だが2013年7月現在保留中である。

iPS細胞は、ES細胞を用いた臨床試験実施への

取り組みをふまえ、本邦でも厚生労働省の審査委員会を中心に法整備が進んでいる。中でも加齢性黄斑変性症を対象として、iPS細胞から分化誘導した網膜細胞移植治療が2014年夏からの開始に向けて認可された。続けて、パーキンソン病や脊髄損傷に対しても、臨床治験を目指した取り組みが進んでおり、数年前には予想し得なかったスピードでiPS細胞の再生医療応用が進んでいる。

一方で克服すべき課題も残されており、iPS細胞の樹立メカニズム自体や、多能性幹細胞から分化誘導した移植グラフトに混じた未分化細胞からの腫瘍形成能について、いまだ未解明の点も多い。そのため慎重な安全性評価も、徹底する必要がある。さらにもう一つの課題として、移植に伴う拒絶反応が挙げられる。iPS細胞の自家移植は、樹立と安全性確認に要する時間・コストの観点から現実的でないため、免疫抑制剤の投与が必要となる。そこで本邦においてはHLA-A, B, DRの3遺伝子座についてホモ型であるドナー由来のiPS細胞株を50株作成しバンク化しておくことで、将来的な移植治療を見据えた時日本人の90.7%をカバーできることが報告されている<sup>11)</sup>。このバンク化されたiPS細胞の安全性をあらかじめ十分確認しておくことで、比較的病状進行の速い疾患においても、安全性が高く拒絶反応の少ない細胞移植治療を速やかに実施できることが、将来的に期待される。

おわりに

iPS細胞を用いた神経疾患研究と再生医療は、iPS細胞技術の開発からわずか数年で創薬や再生医療開発にまで達しようとしている。今後もこのトレンドはますます加速されることが予想される。医療者として冷静に有用性と安全性を念頭におきつつ、最終ゴールである患者の治療につながる展開に期待したい。

## トピックス

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

### 文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006.
- 2) Takahashi K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007.
- 3) Lee G, et al: Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol* 30 : 1244-1248, 2012.
- 4) 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.
- 5) Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, et al: A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci* 30 : 4845-4856, 2010.
- 6) Kondo T, et al: Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular Abeta and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell* 2013.
- 7) Onder TT, Daley GQ: New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 22 : 500-508, 2012.
- 8) Wei C, et al: TALEN or Cas9 - Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. *J Genet Genomics* 40 : 281-289, 2013.
- 9) Reinhardt P, et al: Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell* 12 : 354-367, 2013.
- 10) Kordower JH, et al: Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14 : 504-506, 2008.
- 11) Nakatsuji N, et al: HLA-haplotype banking and iPSC cells. *Nat Biotechnol* 26 : 739-740, 2008.

## 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

近藤孝之\*1,2,☐ 井上治久\*1  
Takayuki Kondo Haruhisa Inoue

\*1 京都大学iPS細胞研究所 \*2 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(神経内科)  
☐ E-mail: takayuki.kondo@cira.kyoto-u.ac.jp

神経疾患の病態解析は、家族例から同定された原因遺伝子を不死化細胞やマウス・線虫などの動物モデルに導入することで進んできた。しかし、導入遺伝子のコピー数が生理的ではない点、ヒトの細胞ではない点、患者の大多数を占める孤発例の解析が難しい点などにおいて、技術的限界があった。その技術的課題を克服する手法として、2006年に登場した人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS細胞)は期待されており、現在までiPS細胞を用いたモデリング研究が相次いで報告されている。

筆者らは、最も頻度の高い神経変性疾患であるアルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)に着目し、患者由来のiPS細胞を用いた疾患モデリングに取り組んだ。進行性の記憶力低下・見当識障害を呈するADの病理学的特徴として、脳内に老人斑と言われるタンパク質の沈着が見られる。この老人斑の主成分はアミロイド前駆タンパク質(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タンパク質(amyloid  $\beta$ ; A $\beta$ )である<sup>1)</sup>。老人斑に蓄積する細胞外のA $\beta$ は不溶性の線維状重合構造(A $\beta$ フィブリル)をとり、神経細胞死を導くとする「アミロイドカ

スケード仮説」が広く受け入れられ、この仮説に着目したiPS細胞疾患モデリングも報告されていた<sup>2), 3)</sup>。しかし、この仮説に基づいたA $\beta$ のワクチン療法で老人斑を取り去ることはできなかったもの、認知症状の進行は抑制できなかった<sup>4)</sup>。

この仮説とは別に、A $\beta$ 単体が2~12分子集まって重合した可溶性のオリゴマー体(A $\beta$ オリゴマー)が、シナプス機能異常や神経細胞毒性を持ち<sup>5), 6)</sup>、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から<sup>7), 8)</sup>、A $\beta$ オリゴマーを重要視する仮説も提唱された。この仮説を支持する家族性ADの報告として、本邦でAPP E693deltaの新規変異を有する家族性AD家系が同定された。この家系では、典型的なAD様の臨床症状を呈する一方で、老人斑検出イメージング法であるPIB-PET検査では脳内A $\beta$ フィブリルが検出されなかった。さらに培養細胞株にE693delta変異APPを過剰発現させると、A $\beta$ フィブリルではなく、細胞内にA $\beta$ オリゴマーの蓄積が示された<sup>9)</sup>。そこで筆者らは、既報の細胞外A $\beta$ フィブリルではなく細胞内A $\beta$ に着目し、APP E693delta変異を有する家族性ADの患者由来iPS細胞を用いて、細胞内A $\beta$ オリゴマーと関連する病態につ

いて解析した<sup>10)</sup>。

### ①APP E693delta変異では細胞外へのA $\beta$ 分泌が低下し細胞内にA $\beta$ オリゴマーが蓄積する

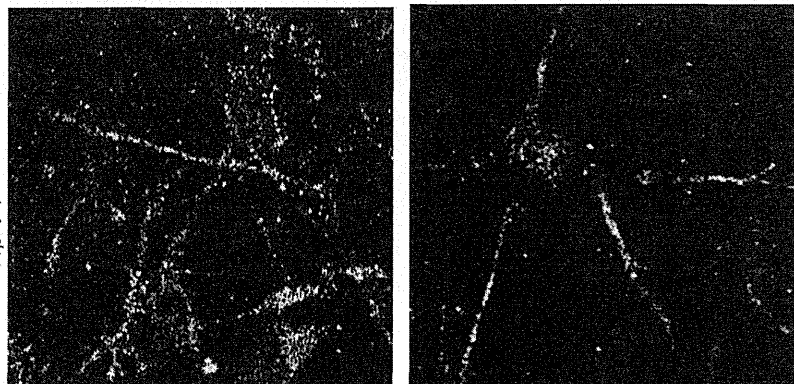
筆者らは、健常人および家族性ADの患者(APP E693delta変異, APP V717L変異)・孤発性AD患者由来のiPS細胞を樹立し、それぞれのiPS細胞から大脳皮質神経細胞を分化誘導した。大脳皮質神経細胞の培養上清中A $\beta$ 量を計測すると、健常人由来と比較して、APP E693delta変異を有する神経細胞のA $\beta$ 40およびA $\beta$ 42分泌量は1/10~1/20程度ときわめて低いことがわかった。APP V717Lの神経細胞においては、細胞外A $\beta$ 42が1.5倍程度に増加しており、細胞株を用いた既報告と一致する結果であった。さらに、iPS細胞から200日以上かけてアストロサイトを分化誘導して細胞外A $\beta$ を測定すると、神経細胞の結果と同様に、APP E693delta変異を有するアストロサイトの細胞外A $\beta$ 分泌は健常人と比べて著しく少ないことがわかった。そして、A $\beta$ オリゴマーを特異的に認識する抗体を用いると、APP E693delta変異を有する神経細胞およびアストロサイトの細胞質および神経突起内に、A $\beta$ オリゴマーの蓄積が見られた(図1)。

iPS細胞由来大脳皮質神経細胞

APP E693delta

孤発性

Aβオリゴマー



■図1 アルツハイマー病患者iPS細胞由来の神経細胞内Aβオリゴマーの蓄積

### ②細胞内Aβオリゴマー蓄積による小胞体・酸化ストレスと薬剤評価

細胞内Aβオリゴマーが蓄積する神経系細胞(神経細胞・アストロサイト)では、小胞体ストレスのマーカータンパク質であるBiPの上昇が見られた。さらにマイクロアレイチップを用いた網羅的遺伝子発現解析では抗酸化ストレス関連タンパク質の遺伝子発現が上昇しており、ウェスタンブロットによるタンパク質レベルの解析でも酸化ストレスマーカーの1つであるベルオキシレドキシン-4量が増加していた。さらに酸化ストレスを惹起する細胞内活性酸素種(ROS)も、APP E693delta変異を有する神経系細胞で増加していた。最終的に、これらの小胞体ストレスおよび酸化ストレスが、神経栄養因子を添加しない培養条件において、APP E693delta変異を有する神経細胞の細胞死を誘導

することを見いだした。そして小胞体ストレスを指標として複数種の化合物の効果を評価したところ、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が緩和され、細胞死が抑制された。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。

### ③孤発性AD患者由来神経細胞内にもAβオリゴマーが蓄積する

さらに筆者らは2名の孤発性AD患者由来iPS細胞を用いて同様の検討を行った。1人の孤発性AD患者由来神経細胞においてはAPP E693delta変異がないにもかかわらず細胞内Aβオリゴマーの蓄積と細胞ストレスが生じていたが、もう1人の孤発性AD患者由来神経細胞では、細胞内Aβオリゴマーを認めなかった。

### ④iPS細胞を用いたアルツハイマー病先制医療・個別化医療開発への道

今回の結果は単なる家族性ADの疾患モデリングにとどまらない。すなわち、孤発性AD患者のiPS細胞由来神経細胞の解析結果は、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が潜在する可能性を示唆する。そしてその治療選択においては、個々の病態背景を念頭に置くことが重要であると考える。本研究結果は、iPS細胞技術を用いた疾患の病態解明・治療法開発のみならず、孤発性疾患患者層別化による先制医療・個別化医療への可能性を示した。

#### 文献

- 1) Goedert M, et al: Science (2006) 314: 777-781
- 2) Yagi T, et al: Hum Mol Genet (2011) 20: 4530-4539
- 3) Israel MA, et al: Nature (2012) 482: 216-220
- 4) Holmes C, et al: Lancet (2008) 372: 216-223
- 5) Gong Y, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2003) 100: 10417-10422
- 6) Walsh DM, et al: Nature (2002) 416: 535-539
- 7) Krafft GA, et al: Neuropharmacology (2010) 59: 230-242
- 8) Haass C, et al: Nat Rev Mol Cell Biol (2007) 8: 101-112
- 9) Tomiyama T, et al: Ann Neurol (2008) 63: 377-387
- 10) Kondo T, et al: Cell Stem Cell (2013) 12: 487-496

## シンポジウム

### 2. 幹細胞異常と内科系疾患，現況と展望

### 3) 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS細胞) と神経変性疾患

井上 治久

**Key words :** ALS, 創薬基盤開発, Alzheimer病, 個別化医療開発

はじめに神経変性疾患の病態の首座である神経系は、生体内では損傷後の再生が難しいことなどから、生検等による直接的な病態の解析は困難である。そのため、神経変性疾患の研究では動物モデルや細胞モデルによる間接的な解析が中心であった。近年、様々な遺伝子操作された疾患モデル動物が作製され、神経変性疾患の病態解明が急速に進んでいる。しかし、疾患モデル動物で有効であると証明された薬剤がヒトにおける臨床研究で有効性を認めないことも知られている。その原因として、ヒトとモデル動物の遺伝子発現や解剖学的な違いが関与していることなどが考えられる<sup>1)</sup>。2006年にマウス<sup>2)</sup>、2007年にヒト<sup>3)</sup>人工性多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS

細胞)が誕生した。ヒトiPS細胞は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES細胞)で発現している4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) をウイルスベクター群を用いてヒト線維芽細胞に導入することによって、体細胞初期化 (リプログラミング)を行い、誕生した。iPS細胞はES細胞に匹敵する多能性を獲得した多能性幹細胞であり、ほぼ無限に増殖し、内胚葉・中胚葉・外胚葉への分化能力を有している。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の作製が可能となったことから、シャーレの中で疾患モデル (図1) を作製することが可能となり、iPS細胞技術を用いた新たな医療研究開発がはじまった。

2008年に初めて神経変性疾患の一つである、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS)患者の線維芽細胞からiPS細胞の樹立が報告された<sup>4)</sup>が、運動神経細胞の減少など、疾

京都大学iPS細胞研究所 (CiRA) 臨床応用研究部門, CREST

110th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Symposium : 2. Diseases originated from stem cell abnormalities ; 3) iPS cell technology for neurodegenerative disease.

Haruhisa Inoue : Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Japan and Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan.

本講演は、平成25年4月13日 (土) 東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

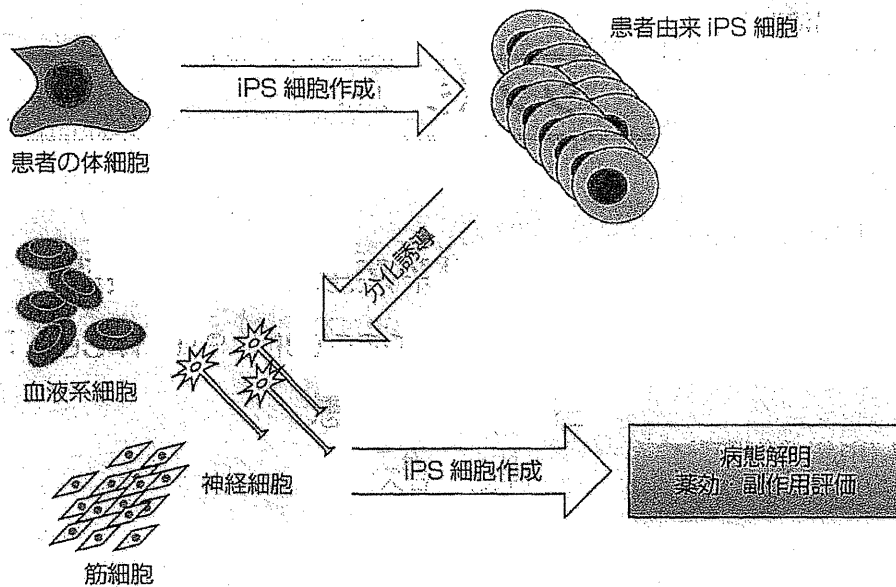


図 1. 患者自身の体細胞からiPS細胞を用いたシャーレの中での疾患モデリング

患表現型の再現はされなかった。しかし、2009年以降、多くの神経変性疾患での疾患再現が報告されている。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が減少すること<sup>6)</sup>、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<sup>7)</sup>等である。その後も現在まで、Parkinson病<sup>8~10)</sup>など、非常に多岐にわたる神経変性疾患のiPS細胞を用いた疾患再現が報告されるようになった。2011年には、精神疾患である、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ている<sup>11)</sup>。

私たちは、神経変性疾患の中でも、ALSとAlzheimer病iPS細胞を用いて、それぞれの研究によって、iPS細胞による創薬基盤開発、個別化医療開発へつながる研究(図2)を進めている。

## 1. ALS患者iPS細胞を用いた創薬基盤開発

ALSは、運動神経細胞が選択的に変性する神経変性疾患であり、全身の筋萎縮をとともう筋

力低下を主徴とする。ALSは1869年に初めて、著名なフランスの神経学者Jean-Martin Charcotにより報告されたが、いまだその治療法は確立されていない。ALSの発病率は約1人/10万人、男女比は、やや男性に多く、発症のピークは70歳代である<sup>12)</sup>。90%以上の症例が、遺伝的な背景をもたない孤発性ALSであり、残りの約10%が家族性ALSである。ALSの病理学的特徴は、封入体をとともう、選択的な運動神経細胞の変性である。2006年にNeumann, Araiらは、前頭葉側頭葉変性症と孤発性ALSのエピキチン陽性封入体の主要構成成分がTAR DNA binding protein (TARDBP: 以下TDP-43)であることを報告した<sup>13,14)</sup>。その後TDP-43遺伝子変異を持つ家族性ALSの家系が報告され、TDP-43が家族性ALSの責任遺伝子の一つであることが判明した<sup>15)</sup>。

TDP-43は、RNAに結合するタンパクであり、転写、RNAスプライシング、RNAの輸送など、様々なRNAの代謝に関わっていることが明らかになった<sup>16)</sup>。また、その後の細胞やモデル動物の研究から、変異型TDP-43は、タンパクとして不溶性の性質をもち、通常存在する核から細胞質

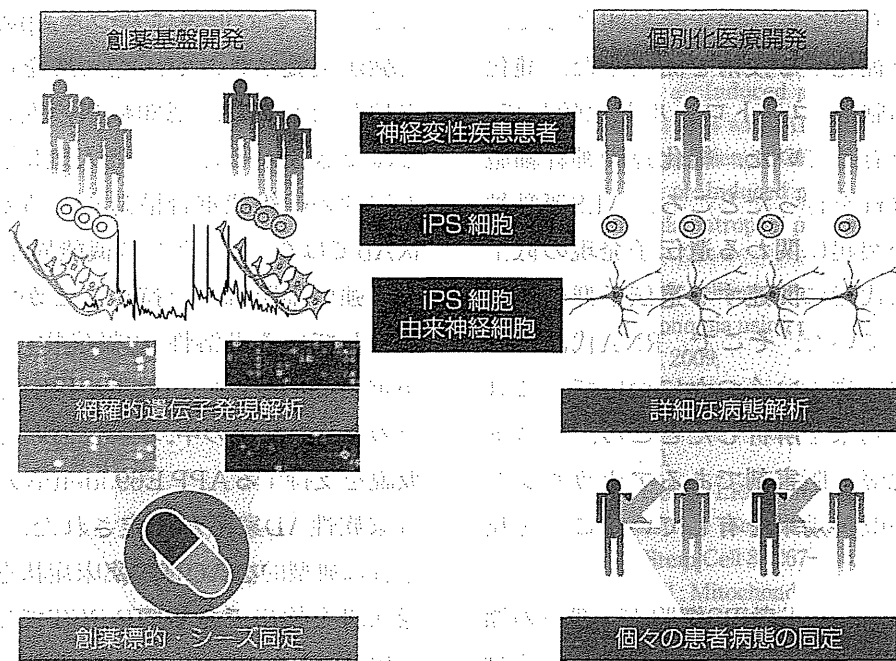


図2. iPS細胞技術を用いた神経変性疾患研究

に異所性に局在する性質をもつことが明らかになった。しかし、変異型TDP-43がこれらの性質を獲得することが、いかにヒト運動神経細胞の細胞死をひき起こすかについての研究は、ヒト運動神経細胞を入手することができないため、困難であったが、iPS細胞の誕生によって、iPS細胞からALS由来の運動神経細胞を作製して研究材料として利用することが可能になった。私たちとエジンバラ大学のグループは、それぞれTDP-43変異を有するALS患者由来のiPS細胞を樹立し、それらから運動神経細胞を分化誘導し、ALSの病態の一部を再現することに成功した。さらに、それらをもとに、創薬シーズを見いだした<sup>17,18)</sup>。

私たちは、3名の家族性ALSの患者皮膚線維芽細胞を入手し、それらから、レトロウイルスもしくはプラスミドベクターを用いてiPS細胞を樹立した。それぞれTDP-43変異として、G298S, Q343R, M337Vを有していた。樹立したiPS細胞はいずれもES細胞に類似した性質を備え、それらから、特定の誘導因子を用いて、機能的な運

動神経細胞にまで分化誘導した。ALS由来iPS細胞は、コントロールから作製したiPS細胞と比較して、神経細胞、運動神経細胞、グリア細胞に分化する能力は、コントロールと差はなく、ALSが発生過程で生じる疾患ではなく、晩発性の疾患であることと合致していた<sup>17)</sup>。

ALS病理組織を用いたこれまでの研究によって、ALS運動神経細胞では、細胞質でのTDP-43の凝集が認められている。また、生化学的研究によって、ALS脊髄組織では、TDP-43が不溶性を獲得している（凝集しやすい）ことが判明している。ALS iPS細胞から分化誘導した運動神経細胞でも、TDP-43の凝集が認められ、生化学的にTDP-43は不溶性を獲得している（凝集しやすい）ことが判明した。また、加齢変化をシャーレの中で、促進させるために、培養系に酸化ストレスを与えるとTDP-43の不溶性はさらに増加し、ALS運動神経細胞が細胞死を生じることがわかった<sup>17)</sup>。

さらに、運動神経細胞の分化誘導では、運動神経細胞以外の細胞も混入していることから、

運動神経細胞特異的な転写因子を目印として、運動神経細胞を純化する技術を開発した。純化した運動神経細胞は、コントロールと比較して、短い神経突起を有していた。純化運動神経細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、ALS運動神経細胞は、神経突起に関わる遺伝子発現の低下とともに、RNA代謝に関連する遺伝子群の遺伝子発現が上昇していた。そこで、RNA代謝を修飾する低分子化合物のいくつかについて、これらの表現型への効果を解析したところ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるアナカルジン酸が、表現型の改善効果を有していることを見いだした<sup>17)</sup>。

以上の結果は、ALS患者iPS細胞が、創薬の標的となりうる分子病態や、それを改善する物質といった創薬シーズを同定することに寄与していることを示していた。今後、これらの分子病態がALSの大多数を占める孤発性ALSにどのように関わっているかについて、解析を進める必要がある。

## 2. Alzheimer病iPS細胞を用いた個別化医療開発

Alzheimer病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。Alzheimer病は加齢が大きな発症リスクであり、高度高齢化社会を迎えつつある我が国においても今後とも患者数の増大が見込まれる。Alzheimer病の病理学的特徴としては、脳内に老人斑といわれるタンパク質の沈着が見られ、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β蛋白 (Amyloid beta: Aβ) であることが知られている。脳内老人斑の分布解析や、遺伝子改変マウス、培養細胞の実験結果に基づいて、細胞の外に分泌されるAβ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Aβのワクチン療法治療が実施されたが、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<sup>19)</sup>。老人斑に蓄積するAβは、不溶性の線維状重合構造をとるが、不溶性線維状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ことが実験レベルで証明されている可溶性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ている<sup>20, 21)</sup>。そのような状況の中、本邦においてAβオリゴマー仮説を支持する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<sup>22)</sup>。

これまで、Alzheimer病患者iPS細胞を用いた研究<sup>23, 24)</sup>は、細胞外Aβに着目されていた。そこで私たちは家族性Alzheimer病の中でも、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Alzheimer病の患者からiPS細胞を樹立し、解析を行った<sup>25)</sup>。APP E693delta変異を有する家族性Alzheimer病患者iPS細胞を、大脳皮質神経細胞へ分化誘導させると、細胞質内にAβオリゴマーが蓄積し、小胞体ストレスと酸化ストレスを生じさせ、細胞死を誘導することを見出した<sup>25)</sup>。

次に、小胞体ストレスを指標として、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 (docosahexaenoic acid: DHA) 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。さらに私たちは複数の孤発性Alzheimer病患者からも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Alzheimer病患者由来神経細胞において、APP E693delta変異が無いにもかかわらず細胞質内Aβオリゴマーの蓄積と細胞スト



レスが生じていることを見いだした<sup>25)</sup>。

以上の結果は、これまで一括りにされていた Alzheimer病の中にも異なる表現型があり、Alzheimer病を層別化することによって将来的に各々の患者の病態に合った治療法(例えば、DHA)を提案できる可能性を示唆した<sup>25)</sup>。iPS細胞技術は、疾患の病態解明・治療法開発のみならず、将来的には、個別化医療開発に役立つ可能性が考えられた。

### 3. 課題と展望

iPS細胞技術を用いた神経変性疾患研究は今後さらに加速するものと予想されるが、iPS細胞の樹立に大きなエフォートを要することや、iPS細胞クローン間差等の課題がある。これらを解決する方法として、iPS細胞樹立法の時間短縮・高効率化や、iPS細胞樹立法の標準化や評価法の検討等が進んでいる。

iPS細胞の誕生から、わずか7年で神経変性疾患を含めた疾患研究応用が広がりを見せている。iPS細胞技術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が可能であり、さらなる発展が期待される。

著者のCOI(conflicts of interest)開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞 多くの共同研究者の先生方に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Shefner JM, et al; NEALS Consortium: A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 63: 1656-1661, 2004.
- 2) Inoue H, Yamanaka S: The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 89: 655-661, 2011.
- 3) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
- 4) Takahashi K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
- 5) Dimos JT, et al: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218-1221, 2008.
- 6) Ebert AD, et al: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277-280, 2009.
- 7) Lee G, et al: Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461: 402-406, 2009.
- 8) Cookson MR: The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 11: 791-797, 2010.
- 9) Nguyen HN, et al: LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 8: 267-280, 2011.
- 10) Seibler P, et al: Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 31: 5970-5976, 2011.
- 11) Brennand KJ, et al: Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473: 221-225, 2011.
- 12) Logroscino G, et al: Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 6-11, 2008.
- 13) Arai T, et al: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 602-611, 2006.
- 14) Neumann M, et al: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133, 2006.
- 15) Kabashi E, et al: TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40: 572-574, 2008.
- 16) Lagier-Tourenne C, et al: TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19: R46-64, 2010.
- 17) Egawa N, et al: Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4: 145ra104, 2012.
- 18) Bilican B, et al: Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5803-5808, 2012.
- 19) 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.
- 20) Krafft GA, Klein WL: ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 59:

- rum IgG in Graves' disease. *Horm Metab Res* 24:319-321, 1992.
- 30) Yokoyama A, et al: The C-terminal domain of the adenomatous polyposis coli (Apc) protein is involved in thyroid morphogenesis and function. *Med Mol Morphol* 44: 207-212, 2011.
- 31) Heemstra KA, et al: Rituximab in relapsing Graves' disease, a phase II study. *Eur J Endocrinol* 159: 609-615, 2008.
- 32) Mao X-M, et al: Prevention of relapse of Graves' disease by treatment with an intrathyroid injection of dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 4984-4991, 2009.
- 33) Gan EH, Pearce SHS: The thyroid in mind: Cognitive function and low thyrotropin in older people. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 3438-3449, 2012.
- 34) Baskin HJ, et al: American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Pract* 8: 457-469, 2002.
- 35) Nanchen D, et al: Subclinical thyroid dysfunction and the risk of heart failure in older persons at high cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 852-861, 2012.
- 36) Razvi S, et al: The incidence of ischemic heart disease and mortality in people with subclinical hypothyroidism: Reanalysis of the Whickham survey cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1734-1740, 2010.
- 37) Negro R, et al: Universal screening versus case finding for detection and treatment of thyroid hormonal dysfunction during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1699-1707, 2010.
- 38) Dosiou C, et al: Cost-effectiveness of universal and risk-based screening for autoimmune thyroid disease in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 1536-1546, 2012.
- 39) Stagnaro-Green A, et al: Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid* 21: 1081-1125, 2011.
- 40) He X, et al: Thyroid antibodies and risk of preterm delivery: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Endocrinol* 167: 455-464, 2012.

## 特別寄稿

## iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究

今村 恵子\* 井上 治久\*

抄録：人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS細胞) は、体細胞に胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES細胞) で発現している数種類の遺伝子を導入することにより作製され、ES細胞と同様に様々な系譜の細胞に分化させることができる。iPS細胞作製技術の開発により、患者自身の遺伝子情報を有した疾患標的細胞の作製が可能となった。本稿では、筆者らの研究を含め、iPS細胞作製技術を用いたアルツハイマー病等神経変性疾患の研究について述べる。

日本生物学的精神医学会誌 24 (3) : 131-133, 2013

Key words : iPS細胞, アルツハイマー病, 筋萎縮性側索硬化症, TDP-43

## はじめに

胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES細胞) は胚盤胞の内部細胞塊と呼ばれる部分を取り出して作製した細胞で、ほぼ無限に増殖することができる高い増殖能力と、論理的にはあらゆる細胞へ分化できる高い分化能力を有している。ヒトES細胞が1998年に樹立され<sup>1)</sup>、再生医療や創薬への応用への期待が高まるようになったが、作製にヒト受精卵を用いる必要があった。2007年にヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS細胞) が作製された<sup>2)</sup>。iPS細胞は、皮膚線維芽細胞や血液細胞などの体細胞にOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycなどの特定の遺伝子の導入により作製可能で、ヒトES細胞での倫理的課題を回避できる。また、ES細胞に匹敵する高い増殖能力と内胚葉・中胚葉・外胚葉への分化能力を有している。中枢神経は再生が難しいことなどから、これまではヒトにおける神経疾患の直接的な病態の解析は困難であったが、iPS細胞の誕生により、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の作製が可能となった。本稿では、ヒトiPS細胞を用いたアルツハイマー病薬剤探索基盤開発、アルツハイマー病患者iPS細胞を用いた研究、前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration : FTL D)

や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) を来す transactivation responsive region-DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) プロテインオパチー患者由来iPS細胞を用いた研究について述べる。

## 1. アルツハイマー病薬剤探索基盤開発

アルツハイマー病は、アミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein : APP) から切り出されるアミロイドβペプチド (amyloid-β peptide : Aβ) の蓄積によって生じる老人斑、タウ蛋白の蓄積による神経原線維変化、脳萎縮を特徴とする。神経細胞から産生されるAβの過剰がタウ蛋白の蓄積、さらに神経細胞死を引き起こすとされるアミロイド・カスケード仮説が有力である。筆者らは、Aβの産生を制御する薬剤探索基盤として、ヒトiPS細胞から大脳皮質神経細胞を分化誘導し、培養上清中のAβを検出するシステムを確立した<sup>3)</sup>。このシステムを用いて、Aβ産生を抑制するとされる既存の薬剤に対する反応性を調べたところ、βセクレターゼ阻害薬やγセクレターゼ阻害薬により、Aβ40およびAβ42の産生が阻害された。γセクレターゼ阻害剤は、iPS細胞から神経細胞に分化誘導する期間によって薬剤感受性が異なっていた。また、γ

iPSC research toward neurodegenerative diseases

\*京都大学iPS細胞研究所 (〒606-8507 京都府左京区聖護院川原町53) Keiko Imamura, Haruhisa Inoue : Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), 53 Shogoin-Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

セクレターゼ阻害薬は、ある濃度でA $\beta$ の急激な上昇を示した。 $\gamma$ セクレターゼ調節薬はA $\beta$ の産生抑制に高濃度が必要であった。これらの結果は、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬や $\gamma$ セクレターゼ調節薬が、現時点ではヒトの治験で有効性が証明されていないということとの関連があるかもしれない。この薬剤探索基盤は、アルツハイマー病治療薬剤探索のための強力な基盤となる可能性があると考えている。

## 2. アルツハイマー病患者 iPS 細胞を用いた研究

Israelらは、APP duplication 変異を有した家族性アルツハイマー病患者および孤発性アルツハイマー病患者のiPS細胞を作製し、神経細胞への分化誘導を行ったところ、培養上清中のA $\beta$  40の上昇が見られ、さらにリン酸化タウ蛋白の上昇、活性化glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )の上昇を認めた<sup>2)</sup>。この研究結果によって、アルツハイマー病の病態として提唱されていたA $\beta$ の蓄積を患者由来の神経細胞で再現し、さらにA $\beta$ の上昇がリン酸化タウ蛋白の上昇と関連することが示された。

一方、筆者らは、APPに遺伝子変異を有する家族性アルツハイマー病患者および孤発性アルツハイマー病患者由来iPS細胞を作製し、大脳の神経系細胞に分化させて解析を行った<sup>3)</sup>。APP-E693 $\Delta$ 変異を有するiPS細胞由来神経系細胞では、A $\beta$ オリゴマーが細胞内に蓄積し、小胞体ストレスと酸化ストレスを引き起こし、細胞死を生じた。これらの細胞内ストレスは、 $\beta$ セクレターゼ阻害薬により改善した。アルツハイマー病における細胞内A $\beta$ オリゴマーを介した病態が患者由来神経細胞で明らかになった。

## 3. TDP-43 プロテノパチー患者 iPS 細胞を用いた研究

TDP-43は、ユビキチン陽性封入体を伴うFTLDとALSの両方で蓄積することが知られている蛋白である。アルツハイマー病等のタウ蛋白が蓄積するタウオパチー、パーキンソン病等の $\alpha$ -シヌクレインが蓄積するシヌクレオパチーに対して、TDP-43が蓄積する疾患群をTDP-43プロテノパチーと呼ぶ<sup>4)</sup>。TDP-43プロテノパチーは、アミロイド沈着を生じず、神経細胞内やグリア細胞内に封入体を形成する特徴がある。TDP-43は、RNAの安定化やスプライシング、転写調節などのプロセスに関

与し、正常では核内に非リン酸化の状態が存在するが、異常TDP-43はユビキチン化およびリン酸化されており、C末端断片としてFTLDとALSの脳や脊髄に存在する。これらの疾患は相似するメカニズムが働いている可能性があると考えられている。

筆者らは、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、運動神経細胞に分化誘導を行った。作製した運動神経細胞において、細胞質でのTDP-43凝集体形成の増加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モデルで見られる所見を再現していた。また、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、TDP-43プロテノパチーを再現していた。

## まとめ

iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患について、筆者らの研究を中心に述べた。患者iPS細胞を用いた認知症を含めた神経変性疾患の病態解明や創薬開発に関する研究の加速が期待される。

## 文 献

- 1) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, et al (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*, 4 (145): 145ra104
- 2) Israel MA, Yuan SH, Bardy C, et al (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482 (7384): 216-220.
- 3) Kondo T, Asai M, Tsukita K, et al (2013) 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.
- 4) Neumann M, Kwong LK, Sampathu DM, et al (2007) TDP-43 proteinopathy in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis: protein misfolding diseases without amyloidosis. *Arch Neurol*, 64 (10): 1388-1394.
- 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131 (5): 861-872.
- 6) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al

- (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282 (5391) : 1145-1147.
- 7) Yahata N, Asai M, Kitaoka S, et al (2011) Anti-A $\beta$  drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 6 (9) : e25788

---

**■ ABSTRACT**

---

**iPSC research toward neurodegenerative diseases**

Keiko Imamura, Haruhisa Inoue

*Center for iPS Cell Research and Application (CiRA)*

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are derived through reprogramming somatic cells into a pluripotent embryonic stem cell (ESC)-like state. Generated iPSCs are capable to differentiate into various cell types including neuronal cells. The disease modeling using patient iPSC-derived neuronal cells would elucidate disease pathogenesis and contribute to drug discovery for neurodegenerative diseases. We report our recent progress toward understanding of neurodegenerative diseases using iPSC technology.

---

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 24 (3) : 131-133, 2013)

---

# 神経再生医療の現状

Topics of regenerative medicine in neurological disorders

近藤孝之 Takayuki Kondo 井上治久 Haruhisa Inoue

再生医療とは、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、細胞を積極的に利用して、その機能の再生をはかるものとして定義される。神経機能は血管障害・変性疾患・外傷などにより機能障害に陥るが、完全に自然回復することはほとんどなく、この機能を回復させるためには、多種存在する神経系の細胞を適切に配置し機能的な線維連絡を再構築する必要がある。神経栄養因子投与による内在性神経幹細胞活性化・神経保護作用・血管誘導作用を誘導し、病態進行の抑制をはかる研究が先行しているが、失われた機能を回復させるには必ずしも十分でない。そしてヒト神経系細胞のなか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場合、なんらかの外来細胞を移植する必要がある。本稿ではこの細胞移植による神経疾患の再生医療を、細胞リソースごとに分類しながら述べ、近年発展の著しいヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) を用いた再生医療とその展望についても紹介したい。

## 細胞リソース 1 : 体性幹細胞

神経再生医療に用いられる体性幹細胞としては、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) や血管血球系幹細胞 (CD34 陽性細胞など) があげられる。これらは、患者自身の骨髄・脂肪組織もしくは末梢血液から単離可能であり、体外 *in vitro* 環境で一時的に培養増殖させたのち自家移植のリソースとなる点や、腫瘍形成リスクが比較的低い点で優れている。

神経系における標的疾患としては、脳梗塞亜急性期への移植治療応用について、少数例ながら自家移植での良好な成績も報告されて

いる。さらに、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の臨床治験として MSC を脊髄内注入する自家移植がイタリア、イスラエルなどから報告されており、少数例の第 1 相試験では安全性と、一部の症例で ALS 症状進行抑制を認めている。しかし継時的な脊髄 MRI では、移植部の膨隆が認められるなど長期的な観察を必要としている。

## 細胞リソース 2 : 胎児神経細胞

パーキンソン病に対する中絶胎児中脳組織を用いた脳内細胞移植治療は 1980 年に始まり、欧米を中心に現在までに約 400 例の手術が行われてきた。一部の症例では劇的な効果が認められ、移植後 10 年以上経っても移植した細胞が脳内で生存し続け臨床的な効果も持続したと報告されている。一方で、二重盲検試験における治療効果が 60 歳以下あるいは中軽症例に限られたこと、移植片による不随意運動の合併症が一部の症例で生じたことなど問題点もあるが、最も有望な対象疾患の一つと考えられる。

最近になり、アメリカでは Emory 大学と Neuralstem 社が中心となり胎児脊髄由来神経幹細胞を ALS 患者脊髄に移植する臨床試験が始まっている。すでに第 1 相試験で安全性が確認され、2013 年 4 月に第 2 相試験がアメリカ食品医薬品局 (US Food and Drug Administration : FDA) により承認された。

このように中絶胎児神経細胞を用いた再生医療が進む一方で、倫理的な点から慎重な運用が必要となる点や、細胞リソースがきわめて限られる (1 人の患者に用いる細胞を準備するためには約 10 体の胎児が必要) など、課題は多い。

## 細胞リソース 3 : ヒト ES 細胞

ヒト由来の代表的な多能性幹細胞であるヒ

トES細胞は世界では1998年、わが国では2003年に初めて樹立されて以来、現在までに5クローンがつくられた。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。

ES細胞が有する多能性は、再生医療への応用が期待されていたが、倫理的側面・安全性の確保・異種動物由来因子除去を中心として、越えるべきハードルが高かった。しかし2010年にFDAが2社3案件の申請を承認、Geron社によるES細胞由来のオリゴデンドログリア前駆細胞を用いた亜急性脊髄損傷治療と(2011年11月に経営的問題で中止)、ACT社によるES細胞由来の網膜色素上皮細胞を用いたスタガルト病・加齢性黄斑変性治療が(2013年4月に初めての移植施行と公表)、それぞれ第1相臨床試験として開始された。また、California Stem Cell社が脊髄性筋萎縮症I型に対するES細胞由来の運動神経細胞を用いた移植治療を、FDA申請中だが2013年4月現在保留中である。

ES細胞の樹立には、体外受精に用いた余剰胚を用いるため、倫理的課題が指摘されてきた。この倫理的課題からわが国やEUの一部の国においてはES細胞の臨床応用が法的に認められていなかったが、わが国では2013年1月に厚生労働省によりES細胞を用いた臨床研究を解禁する改正指針案が示されている。

#### 細胞リソース4: ヒトiPS細胞

ヒト成人皮膚線維芽細胞に、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*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ヒトiPS細胞が誕生した。

わが国においても、ヒト幹細胞を用いる臨

床研究に関する指針が2010年に改訂され、ヒトiPS細胞の臨床研究が法的に認可された。

iPS細胞を用いた再生医療は、ES細胞樹立で議論される倫理的問題点が少なく、患者個人々人から樹立したiPS細胞を用いることで拒絶反応を避けられる可能性もある。しかしながら、iPS細胞の安全性確認にかかる時間・コストなどについてはES細胞と同様に克服すべき課題を有する。

そのような問題を克服し、わが国において、iPS細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞を、加齢黄斑変性病患者に移植する臨床研究が予定され、大きな期待が寄せられている(2013年7月厚生労働省承認)。

#### 多能性幹細胞の再生医療応用に向けた課題

ES細胞・iPS細胞に共通の課題として、造腫瘍性がある。造腫瘍性には大きく分け、未分化細胞から生じる奇形腫と、ある程度分化した細胞から生じる腫瘍性増殖の可能性がある。

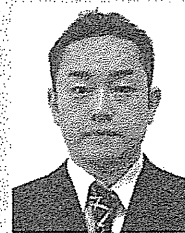
また、移植に伴う拒絶反応もあげられる。ES細胞の患者投与は基本的に他家移植が前提となり、またiPS細胞の自家移植は樹立と安全性確認に要する時間・コストの観点から現実的でない。わが国においてはHLA遺伝子座についてホモ型であるドナー由来のiPS細胞株を50株作成し、バンク化しておくことで、日本人の90.7%をカバーするセルリソースとなることが報告されている。このバンク化されたiPS細胞の安全性をあらかじめ十分確認しておくことで、安全性が高く拒絶反応の少ない細胞移植治療を実施できることが、将来的に期待される。

#### 今後の展望

体性幹細胞に端を発した神経疾患の再生医療は、着実に進歩しすでに臨床試験が始まる段階に達した。今後より一層の安全性確保と有用性、検討に基づく神経再生医療実現化に向けた着実な進歩に期待したい。

# 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

Disease modeling and clinical application for neurodegenerative disease using disease specific iPS cells



江川 斉宏 (えがわ なおひろ)  
2001年京都大学医学部卒業。'11年京都大学大学院医学研究科博士課程卒業。  
研究テーマ: 神経変性疾患

江川 斉宏・井上 治久

京都大学iPS細胞研究所 (CiRA), JST CREST

Key Words: iPS cell, neurodegenerative disease, disease modeling, ALS

## Abstract

疾患特異的iPS細胞を樹立し、それらを治療対象になる細胞へ分化誘導して、神経変性疾患の複雑な病態を紐解こうとする試みがなされている。分化誘導した細胞を用いて病態を再現し、それらの表現型を改善させる既存、新規の薬剤候補の薬剤の効果を判定する試みが行われている。病態が多岐で複雑である神経変性疾患に対して、今後、さらに迅速かつ有効な創薬を行うためには、疾患特異的なiPS細胞を用いることによって、特定のニューロンとそれを取りまくグリア細胞間の病態機序を明確にすること、あるいは、孤発例と異なる責任遺伝子をもつ家族性疾患間で共通する分子機序を同定することである。これらの分子レベルの病態機序を通して、創薬研究の進展が期待される。

## はじめに

アルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) のような神経変性疾患では、ある特定のニューロン群が死滅することによって、特徴づけられる。これまで蓄積された知見を通して、特定のニューロンのみを治療標的、すなわちニューロン自体の病態を改善することを目的にした従来の研究から、周囲のグリア細胞がニューロンへ与える作用・病態に着目して、その改善を目的とする研究への展開がなされている。iPS細胞を用いることによって、

ヒト疾患由来のニューロンを培養皿の上であつかうことができるようになっただけでなく、ニューロン以外のアストロサイト, ミクログリア, オリゴデンドロサイトといったグリア細胞の細胞群 (サブタイプ) への分化誘導を行い、その特定のサブタイプの解析を行うことによって、ニューロン-グリア細胞間の病態に着目することが可能になった。また、多岐にわたる原因遺伝子間で、RNA, タンパク発現の網羅的解析を横断的に解析することによって、それらに共通するメカニズムに着目し、遺伝的にヘテロ (不均一) な集団である疾患に対する根本的な治療開発につながる可能性が広がる。本稿では、神経変性疾患の中のALSの病態解析, 創薬研究について述べたい。

## ■疾患特異的iPS細胞を用いたALSの病態解析

ALSの90%以上が遺伝的な背景を持たない孤発例であり、残りの約10%が、家族性ALSである。これまでの研究によって、その責任遺伝子の役割は、DNA修復, RNA代謝, 免疫応答性, 細胞内輸送, 軸索輸送など多岐にわたることが報告されている<sup>1)</sup>が、その共通する発症メカニズムについてはわかっていない。また、欧米で孤発例の多くで、

■Naohiro Egawa, Haruhisa Inoue  
Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University JST CREST



chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72) の非翻訳領域に6塩基の反復配列が同定されたが, 国内では稀であることから, ゲノムDNAレベルでも, 発症機序が不均一であり, 個々の原因遺伝子が複雑に作用していると予想される。

責任遺伝子の一つである変異型スーパーオキシドジスムターゼ1 (superoxide dismutase1: SOD1)(G93A) を過剰発現したマウスは, ALSの病態を再現する動物モデルである<sup>2)</sup>。このマウスを用いた研究によって, グリア細胞に発現する変異型SOD1が, 病状の発症, 進行度を規定することが見いだされ, グリア細胞がニューロンに対して毒性を発揮するという概念 (non-cell autonomous effect) が提唱された<sup>3)</sup>。さらに, マウス胚性幹細胞由来の変異型SOD1アストロサイトのみならず, ヒト死後脊髄由来の変異型SOD1を有するALSもしくは, 孤発性ALS由来アストロサイトが, マウス胚性幹細胞由来の野生型の運動ニューロンに対して毒性をもつことが報告された<sup>4)</sup>。

それでは, アストロサイトのみをALSの治療ターゲットと考えるべきであろうか。死後病理組織でみられる変性ニューロン周囲のアストロサイトの活性化, 増生は, 神経変性疾患に共通して認められる特徴であり, 特に運動ニューロンへの選択的障害について説明が困難である。実際の病変部位において, 様々なニューロンとグリア細胞が複雑に関連しあう不均一な環境の中で, 特定のニューロン, グリア細胞がそれぞれ異なる役割をもち, 互いに病態に寄与しているとすれば, それらをどのように分離して, 解析を行うことができるのであろうか。

疾患特異的なiPS細胞を用いることによって, これらの病態を解析する基盤を確立できるようになった。すなわち, iPS細胞から, 運動ニューロン, グリア細胞を分離して分化誘導し, サブタイプ間の異なる特性について解析ができる (図1)。あるいは, それらを異なる遺伝子間で交差培養することによって, グリア細胞の特性, 運動ニューロンの脆弱性について検討することができる。最近,

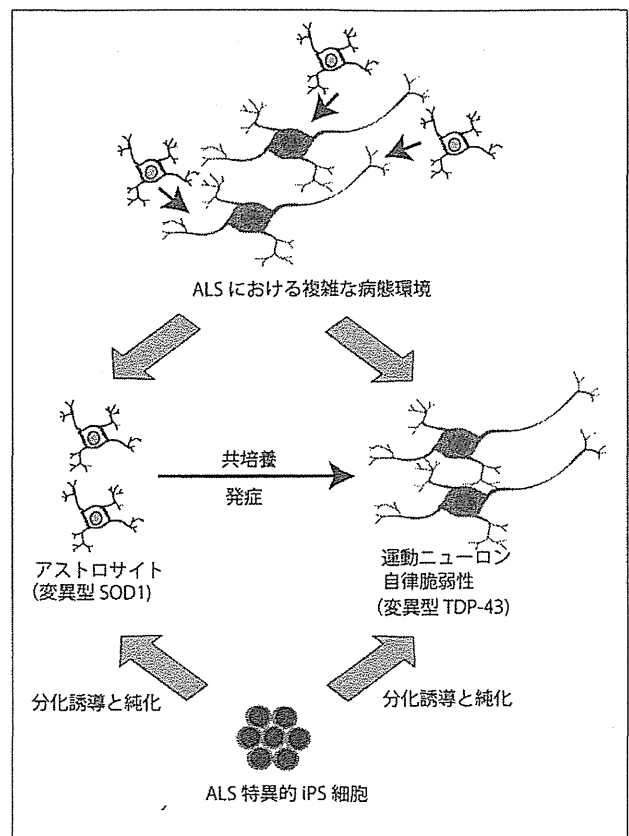


図1 疾患特異的iPS細胞を用いたニューロン, グリア細胞間における相互作用機序の解析

我々と他の研究グループは, 責任遺伝子のひとつであるtransactive response DNA binding protein 43 kDa (TDP-43) にアミノ酸変異を持つ家族性ALS由来のiPS細胞を樹立して, 単離した運動ニューロンの, 神経突起やRNA代謝に関連する機能が低下していること, 運動ニューロンそのものが脆弱であることを示し, 運動ニューロン自律脆弱性 (motor neuron-autonomous vulnerability) を示した<sup>5, 6)</sup>。

さらに, 最近では, 家族性ALS由来のiPS細胞から分化誘導した変異型TDP-43アストロサイトを, コントロール由来の運動ニューロンと交差培養することによって, その毒性を調べた結果, 変異型TDP-43アストロサイトは運動ニューロンに対しては, 毒性を持たないことが報告された<sup>7)</sup>。興味深いことに, この報告では, アストロサイト自体の細胞死を観察している。これは, SOD1とTDP-43の異なる原因遺伝子間では, グリア細胞が運動ニ

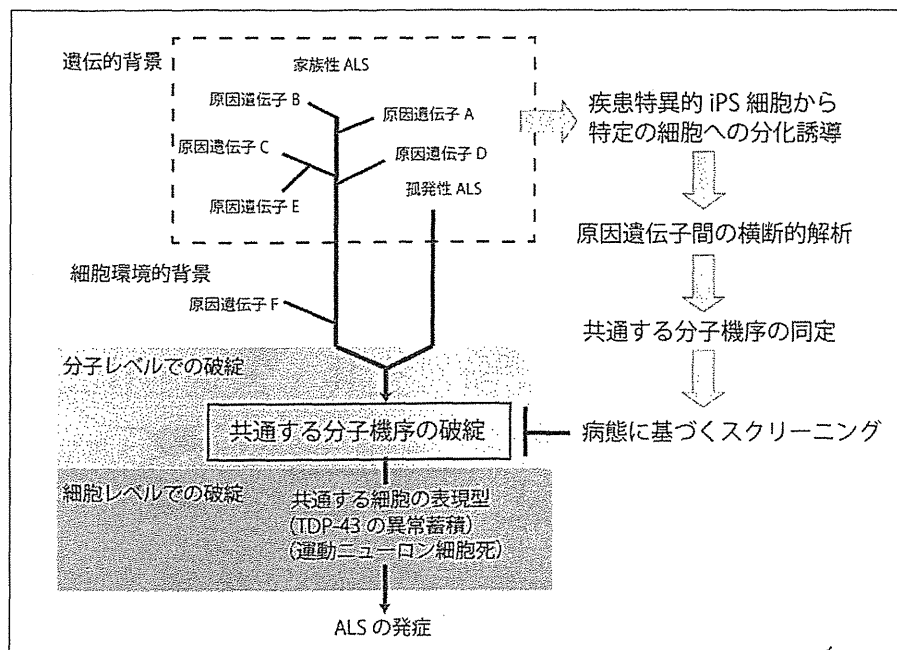


図2  
疾患特異的iPS細胞を用いた分子レベルの病態機序の抽出と創薬スクリーニングへの応用

ニューロンへあたえる毒性の機序が異なる可能性を示しており、ALSの発症メカニズムは細胞のサブタイプ間においても、不均一である可能性が高い。

■疾患特異的iPS細胞を用いたALSへの創薬応用

以上のように、原因遺伝子間、細胞サブタイプ間で異なる病態を示す場合に、疾患特異的iPS細胞を用いてどのようなアプローチでALSの創薬研究を考えるかについて、以下の点を検討しながら、解析の準備を進める必要がある。

1) iPS細胞株（クローン）の選択

クローン間に表現型のばらつきによって、軽微の差であるが、非常に重要な病態が隠されてしまう可能性が生じる。そのためには、複数のクローンで表現型を検討して、各クローンの特性を把握するのが望ましいであろう。そのうえで、多くの薬剤から候補を効率的にスクリーニングを行なう際には、その中から少数の適切なクローンを選択することが必要であると考えられる。単一の責任遺伝子の変異由来iPS細胞を用いて、スクリーニングを行なうことは簡便である反面、孤発例、他の家族性ALSへの汎用性と有用性について十分に検討する必要がある。

2) 分化誘導するサブタイプの選択

治療標的に合わせて、たとえば、SOD1変異をもつアストロサイトなど、分化誘導するサブタイプの選択が必要である。他の細胞による影響を避けるため、分化誘導の効率を高める培養方法の検討、目的細胞を純化する手段の確立が必要である。そのうえで、サブタイプの特性を異なる遺伝子間で比較したり、前述のように異なる遺伝子をもつ異なるサブタイプの細胞を交差培養したりすることによって、より明確に病態のメカニズムを追究することが可能になると予想される。

3) 病態再現（既知の表現型抽出）

ある特定の家族性ALSについて病態再現が可能であった場合には、他の家族性ALS、孤発例を検討し、可能な限り共通する病態であることが望ましい。ALSにおいては、ALSの大部分、前頭側頭型認知症（Frontotemporal Dementia: FTD）の約半数に観察されるTDP-43のタンパク蓄積や運動ニューロンの選択的細胞死がその対象になると考えられる。しかしながら、ある薬剤が、ある特定の変異を持つiPS細胞由来の運動ニューロンの表現型を、細胞レベルにおいて改善させたとしても、分子レベルにおいて発症機序を改善させたかどうかについて

は不明瞭である。疾患の病態機序と薬理作用の関連性が明確にならないかぎり、濃度による表現型の変化、他の遺伝子変異を持つ家族性ALS、孤発性ALS由来のiPS細胞への有効性、他の細胞群・生体での臓器への安全性、ヒトへの安全性など、創薬に向けて多くの検討されるべき課題が残る。

したがって、さらに迅速で有効な創薬のためには、細胞株などで試された従来の手法のように、病態に寄与する分子機序を基本として、簡素化したスクリーニングを構築することが望ましい。そこで、病態が不明である疾患において、未知の分子メカニズムを見出すために、疾患特異的iPS細胞を用いることは非常に有効であると考えられる。すなわち、孤発例を含め、異なる遺伝子変異をもつ複数の疾患特異的iPS細胞から、あるサブタイプの細胞のみを分化誘導、あるいは純化によって濃縮し、それらの機能、RNA、やタンパク発現を横断的に網羅的解析を行なうことによって、細胞死が起こる前段階での共通する分子レベルの病態機序を抽出することができる(図2)。さらに、得られた分子機序を通して、再びiPS細胞から分化誘導した細胞を用いて、細胞レベルの検討を行うことができる。ただし、得られた新しい知見については、培養系でのみならず、生体レベルや実際の疾患でも再現されるのか、モデル動物、ヒト組織を用いて、その妥当性を検討する必要がある。

## ■最後に

疾患特異的iPS細胞を用いて、病態を再現し、表現型を改善しうる低分子化合物(シーズ)を見出すことが可能になり、臨床応用に多くの期待が寄せられる。特に病態機序が一元的に明確である疾患の場合では、疾患特異的なiPS細胞は非常に強力な手法であろう。発症機序が多岐、複雑である神経変性疾患に対して期待されることは、疾患特異的iPS細胞を用いて、ニューロン-グリア細胞間の病態機序を明確にすること、あるいは、孤発例をふくめ様々な責任遺伝子間に共通する分子機序を同定することであり、そのことによって、新たな創薬基盤を確立することができるであろう。

## 文献

- 1) Turner MR, *et al.* (2013) Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet neurology* 12(3):310-322.
- 2) Gurney ME, *et al.* (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264(5166): 1772-1775.
- 3) Yamanaka K, *et al.* (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11(3): 251-253.
- 4) Haidet-Phillips AM, *et al.* (2011) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29(9): 824-828.
- 5) Egawa N, *et al.* (Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4(145): 145ra104.
- 6) Bilican B, *et al.* (2012) Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(15): 5803-5808.
- 7) Serio A, *et al.* (2013) Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(12): 4697-4702.

## News (学会情報)

### 第72回日本癌学会学術総会のご案内

開催日：10月3日(木)～5日(土)  
 代表者：中村祐輔  
 (シカゴ大学教授・東京大学医科学研究所教授)  
 会場：パシフィコ横浜  
 特別講演  
 特別シンポジウム  
 がんの基礎研究から臨床開発へ  
 コアシンポジウム  
 1. 抗がん薬のファーマコゲノミクス  
 2. がんペプチドワクチン療法の最近の進歩と臨床応用  
 JCA-AACR合同シンポジウム  
 がんゲノムシーケンス  
 JCA-JSMO合同シンポジウム  
 分子標的治療のカッティングエッジ  
 JCA-JDS合同シンポジウム

糖尿病とがん  
 パネルディスカッション  
 International Sessions  
 1. エピゲノムによるがん細胞の動的制御  
 2. A new horizon of neuroblastoma research and its supporting systems in Asia  
 3. がんゲノム解読研究と臨床シーケンスの展開  
 4. がん細胞の分泌する細胞顆粒とマイクロRNA  
 5. がん幹細胞  
 6. 遺伝子解析に基づいた個別化治療  
 7. がんナノメディシン  
 8. 非侵襲性個別化医療

事務局連絡先：日本コンベンションサービス  
 TEL：03-3508-1214 FAX：03-3508-1302

## Ⅱ. iPS 細胞を用いた難病研究

Saito Megumu

齋藤 潤

京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門准教授

### Summary

患者由来のヒト人工多能性幹細胞 (induced-pluripotent stem cells : iPS cells) iPS 細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞は、疾患の病態解析や創薬などへの応用研究が進められている。血液疾患についても様々な疾患ですでに疾患 iPS 細胞による病態解析が報告されている。我々はヒト iPS 細胞からの血球分化系を開発し、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析を行っており、本稿では自己炎症性疾患の病態解析の実例を提示する。

### Key Words

iPS 細胞 / 血球分化 / CINCA 症候群

### はじめに

炎症反応は生体防御において極めて重要な反応であるが、その一方過剰な炎症性応答は様々な疾患の原因となる。自己炎症性疾患は自然免疫系の異常によって発症する炎症性疾患の総称であり、遺伝子異常を伴うものが多い。責任遺伝子は炎症性シグナル経路に関連していることが多く、したがって自己炎症性疾患に認められる遺伝子変異が細胞生物学的な表現型をもたらす機構を解析することは、分子標的治療などの治療法開発にとって極めて重要である。

人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cells : iPS 細胞) とは、京都大学の山中らによっ

て樹立された幹細胞の一種である。その特徴は、①すべての細胞・組織に分化できる多能性 (pluripotency) を有する、②体細胞より誘導できる、という点にある。2006年にマウス iPS 細胞<sup>1)</sup>、2007年にヒト iPS 細胞<sup>2)</sup>が樹立された。ヒトの初期胚から作られる ES 細胞 (embryonic stem cells) は、個体のすべての組織へ分化することができるが、iPS 細胞も同等の万能性を持つ。しかし、大きく異なるのは、ES 細胞はヒトの受精卵を滅失して作成する必要があるのに対し、iPS 細胞は線維芽細胞や血球など、ある個体の体細胞から人工的に樹立することができる点である。これらの万能性細胞から心筋や神経、内分泌細胞などを分化・作出し、再生医療のソースと

iPS 細胞 (inducible pluripotent stem cells ; 人工多能性幹細胞)

ES 細胞 (embryonic stem cells)