

**Figure 3. Transplanted Cells Differentiated Mainly into Astrocytes**

(A) Transplanted GFP-labeled grafts (green) survived in the spinal cord. Scale bars, 500  $\mu$ m.

(B) Most of the GFP-labeled grafts in ventral horn parenchyma differentiated into mature astrocytes, which were positive for astrocyte markers (red), including GFAP, ALDH1L1, and GLT1, in vivo. A relatively small population of grafts also differentiated into CNPase<sup>+</sup> oligodendrocytes or MAP2<sup>+</sup> neurons. A limited number of grafts remained as NESTIN<sup>+</sup> neural progenitors. Scale bar, 50  $\mu$ m.

(C) Quantification of positive ratio of cell type markers in (B). A small number of GFP-labeled grafts were also positive for A2B5, an oligoprogenitor marker, MAP2, a neuronal marker, or Nestin, a neural precursor marker, in vivo. The total number of GFP-positive cells, counted to calculate the positive ratio, was  $113.3 \pm 14.7$  for NESTIN,  $75.9 \pm 11.8$  for GFAP,  $68.7 \pm 5.5$  for GLT1,  $76.9 \pm 9.4$  for ALDH1L1,  $67.3 \pm 13.0$  for A2B5,  $69.3 \pm 19.2$  for CNPase,  $70 \pm 13.6$  for TUJ1, and  $66.7 \pm 20.2$  for MAP2, respectively. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  mice per group). See also Figure S2.

insult (Figure 2B), evaluated by clinical grading system (Table S1 available online).

At 10–40 days after the procedure, we observed improvement in clinical motor score in the hiPSC-GRNPs transplantation group (Figure 2C). Surviving lifespan was extended by 7.8% in the hiPSC-GRNPs transplantation group ( $n = 21$ , male:female = 14:7,  $162.2 \pm 12.8$  days) compared to the control group ( $n = 21$ , male:female = 14:7,  $150.4 \pm 12.1$  days) (Figures 2D and 2E). When the effect of transplantation was evaluated separately in male and female mice, a greater survival improvement was noted in males than in females (Figure S1). Survival lifespan was significantly expanded only in males ( $145.3 \pm 9.8$  days for control,  $158.5 \pm 11.2$  days for the hiPSC-GRNPs transplantation group, extended by 9.1%), not in females ( $160.5 \pm 9.5$  days for control,  $169.7 \pm 12.6$  days for the hiPSC-GRNPs transplantation group, extended by 5.7%). To evaluate motor neuron degeneration at the symptomatic phase, three male mice from each group were sacrificed

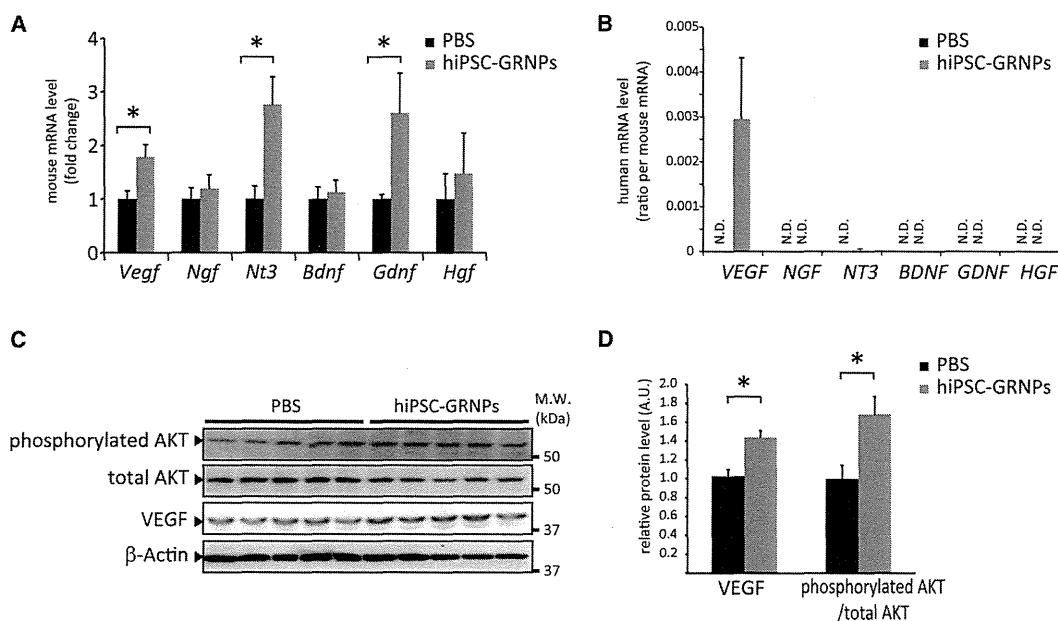
at 120 days of age. The number of 6–8  $\mu$ m large-caliber fibers was increased in the hiPSC-GRNPs transplantation group (Figures 2F and 2G). We could not detect GFP signals, derived from transplanted hiPSC-GRNPs, in nerve root slices.

#### Transplanted hiPSC-GRNPs Differentiated into Astrocytes in Spinal Cord of ALS Model Mice without Tumorigenic Formation

We continued to evaluate clinical motor function (Table S1) and defined clinical grade 0 as end stage. At the end stage of disease progression, around 140–170 days after birth, the animals were sacrificed and histological analysis was performed to investigate the state of the engraftment. Transplanted hiPSC-GRNP-derived cells, which are positive for GFP signals, continued to survive in the lumbar spinal cord of ALS model mice (Figure 3A). Engraftment could be observed at least 5 mm away from the injection site. We assessed some cell subtype markers by immunostaining,

comparisons were made using Bonferroni adjustment ( $*p < 0.05$ ). The number of 1–2  $\mu$ m caliber axons was significantly decreased and the number of 6–8  $\mu$ m caliber axons was significantly increased in the hiPSC-GRNPs transplantation group. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  mice per group).

Scale bars, 100  $\mu$ m. hiPSCs, human induced pluripotent stem cells; hiPSC-GRNPs, hiPSC-derived glial-rich neural progenitors. See also Figure S1 and Table S1.



**Figure 4. hiPSC-GRNPs Transplantation Increased Neurotrophic Factors and Activated AKT Signal**

(A) Gene expressions of neurotrophic factors, including *Vegf*, *Ngf*, *Nt3*, *Bdnf*, *Gdnf*, and *Hgf* were quantitatively analyzed using mouse-specific primers. The levels of *Vegf*, *Nt3*, and *Gdnf* were significantly increased in the hiPSC-GRNPs transplantation group (\* $p < 0.05$ ). Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  mice per group).

(B) Gene expressions of neurotrophic factors, including *VEGF*, *NGF*, *NT3*, *BDNF*, *GDNF*, and *HGF* were quantitatively analyzed using human-specific primers and the human-origin/mouse-origin ratio was calculated. Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  mice per group).

(C) Western blot analysis of phosphorylated AKT, total AKT level, and VEGF in lumbar spinal cord in the PBS injection group and hiPSC-GRNPs transplantation group.

(D) Densitometric analysis of (C). Measured values of proteins were normalized by that of  $\beta$ -actin. The levels of VEGF and AKT phosphorylation were significantly increased in the hiPSC-GRNPs transplantation group (\* $p < 0.05$ ).

Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 5$  mice per group). N.D., not detectable. See also Figure S3 and Table S2.

including GFAP/GLT1/ALDH1L1 for astrocytes (Figure 3B), A2B5 for oligodendroglial progenitors, and NESTIN for neural progenitors (Figure 3C). Around 60%–80% of the cells at the grafts were double-positive for GFP fluorescence and GFAP marker, suggesting that transplanted hiPSC-GRNPs had differentiated into astrocytes (Figure 3C). Although we hardly observed the immunoreactivity of functional/mature astrocyte markers including GLT1 and ALDH1L1 in vitro before transplantation, we did observe it after transplantation. The rate of neurons or oligodendrocytes was low (Figure 3C). Only a small population of grafts retained positive staining for NESTIN, that is, remaining in the neural progenitor stage of differentiation (Figure 3C).

It is important to note that, during our observation period (up to 3 months posttransplantation), the injection sites showed no signs of tumor formation. Gross pathological examinations of other organs outside the CNS did not reveal any heterotopic engraftment.

#### Transplanted hiPSC-GRNPs Upregulated Neurotrophic Factors and Activated Cell Survival Signal

We investigated the expression level of neurotrophic factors in lumbar spinal cord. We designed mouse- or human-specific primers to evaluate host- or graft-derived mRNA separately (Table S2). Quantitative RT-PCR revealed that upregulated expressions were observed in mouse (host)-originated *Vegf*, *Nt3*, and *Gdnf*, but not in *Ngf*, *Bdnf*, or *Hgf* (Figure 4A). However, human (graft)-originated expression, equal to hiPSC-GRNPs origin, was observed only in *VEGF* (Figure 4B). Western blot analysis demonstrated a significant increase in VEGF level in the hiPSC-GRNPs transplantation group (Figures 4C and 4D). Furthermore, hiPSC-GRNPs transplantation increased phosphorylated AKT and activated AKT signaling, which is downstream from the VEGF signal and is important for cell survival in ALS (Lunn et al., 2009) (Figures 4C and 4D).



## DISCUSSION

Here, we describe that transplantation of human iPSC-derived GRNPs produced astrocytes *in vivo* and prolonged the survival period of mSOD1 mice. We used hiPSC-GRNPs for testing the efficacy in mSOD1 mice, because replacement therapy using astrocytes from rodent glial-restricted progenitors in the cervical spinal cord of ALS rodent models is already well established (Xu et al., 2011).

We showed that glial cells represent a potential target of ALS therapy. However, we observed transient improvement of lower limb function, as shown in Figure 2C, and a similar previous study failed to show improvement in the rescue of clinical manifestations and neuronal survival by transplantation of human-derived glial-restricted progenitor cells from 17- to 24-week fetus into SOD1 transgenic mouse spinal cord despite the survival and proliferation of exogenous astrocytes (Lepore et al., 2011). Although the transient improvement in our study might have stemmed from neuroprotective effects of the transplanted cells only in the lumbar region, with a possible broader effect of neurotrophic factors on other regions or behavioral alteration for food intake, as previously discussed (Table S1), we comprehensively compared the two studies as well as others regarding lumbar transplantation in terms of a number of aspects (Table S1), speculating that there were differences in graft type, transplantation condition, and/or transplantation timing. Regarding the timing of transplantation, the survival improvement in our study might have resulted in attenuation of the glial contribution to the disease pathogenesis at an early symptomatic stage (Boill  e et al., 2006; Yamanaka et al., 2008). Regarding the cell injection site, instead of the cervical cord, we injected the cells into the lumbar spinal cords of ALS model mice, which resulted in improved clinical scores of lower limbs. These data supported the possibility of targeting not only the cervical cord but also the lumbar spinal cord in ALS clinical trials, depending on the symptoms to be treated. Following previous transplantation research (Table S1), we selected PBS, which is a vehicle solution for grafts, as control agent of transplantation. Dead cells or fibroblasts can be appropriate control agents but may also possibly secrete various factors. Furthermore, previously an extensive study showed that, as a control agent, there was no significant difference among vehicle solution, dead cells, and fibroblasts (Lepore et al., 2008).

iPSCs were previously reported to induce T cell-dependent immune response by direct transplantation of undifferentiated cells into syngeneic mice. However, a more detailed investigation proved that autologous transplantation of terminally differentiated cells derived from iPSCs or embryonic stem cells elicits only negligible immunoge-

nicity (Araki et al., 2013; Okano et al., 2013). In our study, we did not observe excess inflammatory responses around transplanted cells under treatment of low-dose immunosuppression, suggesting that even if transplanted cells were not autologous, we could control the immune responses of the recipients by immunosuppressant treatment.

The increase in the levels of neurotrophic factors had been commonly observed in transplantation therapy of ALS models (Nizzardo et al., 2014; Teng et al., 2012). We observed that the transplanted hiPSC-GRNPs produced VEGF, and expressions of endogenous VEGF and other neurotrophic factors in the host mice were upregulated. A previous study showed that VEGF retrograde delivery with lentiviral vector could prolong the survival of ALS model mice by 30% (Azzouz et al., 2004) and that activated AKT signaling, which is downstream of VEGF, is important for cell survival in ALS (Lunn et al., 2009). Similarly in this study, transplanted hiPSC-GRNPs increased the VEGF level and prolonged the survival of mSOD1 mice. We could observe positive immunostaining for VEGF and phosphorylated AKT in both remaining motor neurons and astrocytes. However, we could not observe any morphological difference in motor neurons between control and transplanted groups at end-stage. We also speculated that, as shown in previous studies (Howland et al., 2002), transplanted hiPSC-GRNPs differentiated into astrocytes expressing glutamate transporter 1 (GLT1) might restore glutamate homeostasis in our study.

In our study, the males in both the control and hiPSC-GRNPs transplantation groups died long before the females, and this result is consistent with the previous reports of ALS model mice (Cervetto et al., 2013; Choi et al., 2008). However, improvement in male mice was greater than in females (Figure S1). Interestingly, a similar gender-dependent difference of therapeutic efficacy was reported in ALS model mice (Cervetto et al., 2013; Li et al., 2012). The epidemiological studies of sporadic ALS have shown that both incidence and prevalence of ALS are greater in men than in women and onset of the disease is also earlier for men than it is for women (McCombe and Henderson, 2010). Sex steroids are suggested to be involved in the gender difference in ALS, but the direct importance of estrogen is still controversial (Choi et al., 2008; Li et al., 2012). Moreover, male neural cells are reported to be more vulnerable to oxidative stress, induced by mutant SOD1 overexpression, than female neural cells (Li et al., 2012). In our study, transplanted cells were mainly differentiated into GFAP-positive astrocytes and upregulated VEGF. Furthermore, astrocytes can play neuroprotective roles from oxidative stress via VEGF (Chu et al., 2010). These findings suggest that hiPSC-GRNPs transplantation may ameliorate male-specific vulnerability to oxidative



stress and improve the survival lifespan of male mice. Further analysis would be necessary to elucidate VEGF-associated mechanisms in transplantation therapy.

In regard to safety, the potential tumorigenicity of grafts is a predominant concern. We used the human iPSC line “201B7,” which was previously reported to be safe from the viewpoint of tumorigenesis (Kobayashi et al., 2012). Furthermore, we found no signs of tumor formation or Ki67-positive grafts (Figure S2). However, a very small proportion of grafts remained positive for the neural progenitor marker NESTIN at 3 months posttransplantation. We cannot exclude the risk of tumor formation from the remaining NESTIN-positive NPCs. It is important to evaluate tumorigenicity by longer-term observations for future clinical trials.

We tested the potential of cell therapy after onset of the disease in ALS model mice, because most human cases of ALS are sporadic and any treatment would be initiated after onset. Our study showed a modest lifespan prolongation compared to previous studies testing cell therapy before disease onset in ALS model mice. Future studies of transplantations, such as combinations with MN engraftment, will be required to accelerate ALS treatment toward restoration of MN function and ultimately the complete cure of ALS.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Preparation of hiPSC-GRNPs for Transplantation

We differentiated hiPSCs into neural lineage cells using a previously described differentiation protocol (Kondo et al., 2013), under the condition of additional 10 ng/ml human BMP4 (R&D Systems) and 10 ng/ml human LIF (R&D) during the patterning stage (days 8–28).

### Transplantation

We transplanted 40,000 hiPSC-GRNPs into bilateral lumbar spinal cords of 90-day-old Tg SOD1-G93A mice. Each mouse received two grafts (bilaterally at L3-L4) of  $4 \times 10^4$  cells (in 0.5  $\mu$ l PBS) into the ventral horn.

### Statistical Analysis

The Mann-Whitney test was used for the analysis of two populations of means, and p values <0.05 were considered significant. Repeated-measures two-way ANOVA, followed by the Tukey-Kramer test, was used for clinical motor scoring analysis. The Kaplan-Meier plot was used to evaluate survival time, and the log-rank test was applied to compare cumulative curves.

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, three figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.017>.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.I. conceived the project; T.K. and H.I. designed the experiments; T.K., M.F., K.T., A.Y., and S.N. performed the experiments; T.K., M.N., H.O., and H.I. analyzed the data; A.H. and S.Y. contributed reagents, materials, and analysis tools; A.Y., S.N., S.K., M.N., R.T., and H.O. provided critical reading and scientific discussions; T.K., A.H., H.O., and H.I. wrote the paper.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our sincere gratitude to all of our coworkers and collaborators; to Yoshiko Karatsu for technical assistance; to Yasuhiro Watanabe for technical advice; and to Katsura Noda and Kazumi Murai for their valuable administrative support. We thank Astellas Pharma Inc. for FK506. This study was supported in part by a grant from the Funding Program of World-Leading Innovative R&D on Science and Technology (FIRST Program) of the Japan Society for the Promotion of Science (S.Y.), from the Leading Project of MEXT (S.Y. and H.I.), from CREST (H.I.), and from a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Area “Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology” (22110007) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (H.I.). S.Y. is a member without salary of the scientific advisory board of iPS Academia Japan. H.O. is a paid scientific consultant to San Bio, Inc., Eisai Co., Ltd., and Daiichi Sankyo Co., Ltd.

Received: December 9, 2013

Revised: May 22, 2014

Accepted: May 23, 2014

Published: June 26, 2014

## REFERENCES

- Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., and Abe, M. (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494, 100–104.
- Azzouz, M., Ralph, G.S., Storkebaum, E., Walmsley, L.E., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Carmeliet, P., and Mazarakis, N.D. (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429, 413–417.
- Boill  e, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52, 39–59.
- Brujn, L.I., Miller, T.M., and Cleveland, D.W. (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723–749.
- Cervetto, C., Frattaroli, D., Maura, G., and Marcoli, M. (2013). Motor neuron dysfunction in a mouse model of ALS: gender-dependent effect of P2X7 antagonism. *Toxicology* 311, 69–77.
- Choi, C.I., Lee, Y.D., Gwag, B.J., Cho, S.I., Kim, S.S., and Suh-Kim, H. (2008). Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* 268, 40–47.



- Chu, P.W., Beart, P.M., and Jones, N.M. (2010). Preconditioning protects against oxidative injury involving hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor in cultured astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **633**, 24–32.
- Corti, S., Locatelli, F., Donadoni, C., Guglieri, M., Papadimitriou, D., Strazzer, S., Del Bo, R., and Comi, G.P. (2004). Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* **127**, 2518–2532.
- Garbuzova-Davis, S., Sanberg, C.D., Kuzmin-Nichols, N., Willing, A.E., Gemma, C., Bickford, P.C., Miller, C., Rossi, R., and Sanberg, P.R. (2008). Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose. *PLoS ONE* **3**, e2494.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772–1775.
- Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., et al. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* **29**, 824–828.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., et al. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1604–1609.
- Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., et al. (2005). Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J. Neurosci. Res.* **80**, 182–190.
- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., et al. (2012). Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS ONE* **7**, e52787.
- Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, 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**, 487–496.
- Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2008). Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat. Neurosci.* **11**, 1294–1301.
- Lepore, A.C., O'Donnell, J., Kim, A.S., Williams, T., Tuteja, A., Rao, M.S., Kelley, L.L., Campanelli, J.T., and Maragakis, N.J. (2011). Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS. *PLoS ONE* **6**, e25968.
- Li, R., Strykowski, R., Meyer, M., Mulcrone, P., Krakora, D., and Suzuki, M. (2012). Male-specific differences in proliferation, neurogenesis, and sensitivity to oxidative stress in neural progenitor cells derived from a rat model of ALS. *PLoS ONE* **7**, e48581.
- Liour, S.S., and Yu, R.K. (2003). Differentiation of radial glia-like cells from embryonic stem cells. *Glia* **42**, 109–117.
- Lunn, J.S., Sakowski, S.A., Kim, B., Rosenberg, A.A., and Feldman, E.L. (2009). Vascular endothelial growth factor prevents G93A-SOD1-induced motor neuron degeneration. *Dev. Neurobiol.* **69**, 871–884.
- McCombe, P.A., and Henderson, R.D. (2010). Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend. Med.* **7**, 557–570.
- Nizzardo, M., Simone, C., Rizzo, F., Ruggieri, M., Salani, S., Riboldi, G., Faravelli, I., Zanetta, C., Bresolin, N., Comi, G.P., and Corti, S. (2014). Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDH-hiSSCioVLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 342–354.
- Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., et al. (2011). Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 16825–16830.
- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., Ikeda, E., Yamanaka, S., and Miura, K. (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.* **112**, 523–533.
- Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 17803–17808.
- Piccini, P., Brooks, D.J., Björklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehnström, S., Widner, H., and Lindvall, O. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosci.* **2**, 1137–1140.
- Teng, Y.D., Benn, S.C., Kalkanis, S.N., Shefner, J.M., Onario, R.C., Cheng, B., Lachyankar, M.B., Marconi, M., Li, J., Yu, D., et al. (2012). Multimodal actions of neural stem cells in a mouse model of ALS: a meta-analysis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 165ra164.
- Xu, L., Shen, P., Hazel, T., Johe, K., and Koliatsos, V.E. (2011). Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats. *Neurosci. Lett.* **494**, 222–226.
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **11**, 251–253.

## STEM CELL Regenerative medicine for ALS using human iPS cells

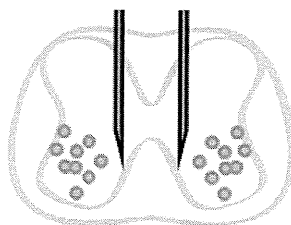
*Transplanted glial cells improve the disease environment in spinal cords of ALS mice.*

There is currently no effective cure for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which is characterized by a loss of motor neurons. Diseased glial cells are thought to accelerate motor neuron degeneration. My colleagues and I have found that transplanted healthy glial cells derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) can protect motor neurons in spinal cords and prolong the lifespan of ALS mice. Despite the hurdles ahead for human trials, all possible avenues provided by iPSC technology should be considered and tested to combat this pervasive disease.

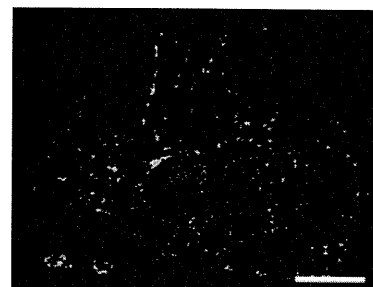


**Haruhisa Inoue, PhD**

Professor, Center for iPS Cell Research and Application  
[www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/research/inoue\\_summary.html](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/research/inoue_summary.html)



Schema of spinal cord transplantation

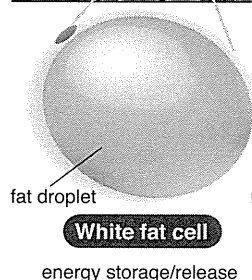
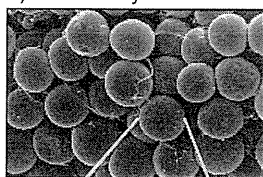


Transplanted cells expressing green fluorescent protein in spinal cords of ALS mice (Kondo et al., "Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice," *Stem Cell Reports*, 3, 242-249 (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.017>)

## FOOD-SCI Combating the middle-age spread

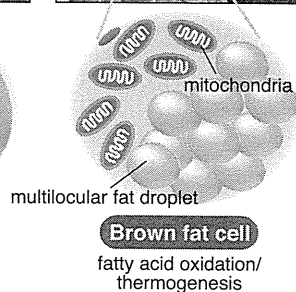
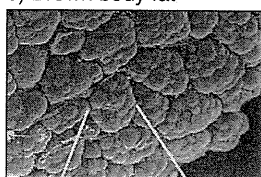
*Activation and regeneration of brown fat by food components.*

a) White body fat



energy storage/release

b) Brown body fat



fatty acid oxidation/thermogenesis

Scanning electron microscope images and inner structures of (a) white and (b) brown body fat. Lipids in unilocular lipid droplets exist as one large globule as opposed to multiple small globules in multilocular droplets. Photograph Source: Professor Emeritus Hajime Sugihara, Saga University.

The question of why we gain weight is far from straightforward. Obesity — defined as an excess accumulation of white body fat — is becoming an increasingly urgent issue. The primary function of white body fat is to store lipids converted from food-derived sugar and fat. Brown body fat, on the other hand, uses stored lipids to generate heat. Recently, brown body fat loss and depression have been shown to lead to middle-aged spread known as *chunen butori* in Japanese. My aim is to help improve the prevention of obesity-related diseases using food components. By elucidating the differentiation mechanism and physiological roles of brown body fat, my study aims to promote the development of novel therapies for obesity-related common diseases.



**Teruo Kawada, PhD**

Professor, Graduate School of Agriculture  
[www.foodfunc.kaiss.kyoto-u.ac.jp/index.html](http://www.foodfunc.kaiss.kyoto-u.ac.jp/index.html)

## The Center for Southeast Asian Studies



AS I majored in Southeast Asian studies at Kyoto University, for me, this Center for Southeast Asian Studies building is one of the most familiar features of the campus. The century-old brick building formerly belonged to the Kyoto Textile Company, but is currently used as a library.

In my first year of postgraduate study, many lectures and seminars used to be given on the second floor of the East building next to this building. At that time, as I couldn't understand what was discussed in class, or what "area studies" actually was, I sat facing

## □ CASE REPORT □

## A Second Pedigree with Amyloid-less Familial Alzheimer's Disease Harboring an Identical Mutation in the *Amyloid Precursor Protein* Gene (E693delta)

Yumiko Kutoku<sup>1</sup>, Yutaka Ohsawa<sup>1</sup>, Ryoza Kuwano<sup>2</sup>, Takeshi Ikeuchi<sup>2</sup>, Haruhisa Inoue<sup>3</sup>,  
Suzuka Ataka<sup>4</sup>, Hiroyuki Shimada<sup>4</sup>, Hiroshi Mori<sup>5</sup> and Yoshihide Sunada<sup>1</sup>

---

### Abstract

---

A 59-year-old woman developed early-onset, slowly progressive dementia and spastic paraplegia. positron emission tomography (PET) imaging revealed a large reduction in the level of glucose uptake without amyloid deposition in the cerebral cortex. We identified a homozygous microdeletion within the amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) coding sequence in the *amyloid precursor protein* (APP) gene (c.2080\_2082delGAA, p.E693del) in three affected siblings and a heterozygous microdeletion in an unaffected sibling. The identical mutation was previously reported in the first Alzheimer's pedigree without amyloid deposits. Furthermore, an increase in high-molecular-weight A $\beta$ -reactive bands was detected in the patient's CSF. Our findings suggest that soluble A $\beta$ -oligomers induce neuronal toxicity, independent of insoluble A $\beta$  fibrils.

**Key words:** Alzheimer's disease, familial Alzheimer's disease, APP gene, A $\beta$  oligomers, PET

(Intern Med 54: 205-208, 2015)

(DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3021)

---

### Introduction

---

Alzheimer's disease (AD) is distinguished pathologically from other forms of dementia by amyloid deposition in the brain (1). Amyloid deposits are comprised of insoluble fibrils of 40 and 42-residue amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptides, derived from the amyloid precursor protein (APP). To date, approximately 40 missense mutations in the APP gene have been identified in over 80 AD families, most of which are located near processing sites or within the A $\beta$  coding sequence (2). Almost all mutations in the APP gene cause the disease in a dominant manner, suggesting that these mutations confer a gain-of-function that results in the enhanced formation and deposition of insoluble A $\beta$  fibrils (3, 4). However, one AD pedigree was reported to have a single amino acid deletion within the A $\beta$  coding sequence (E693delta), inherited as a recessive trait, with a lack of A $\beta$  deposition (5). Recently,

soluble A $\beta$  oligomers, the precursors of insoluble A $\beta$  fibrils, have been suggested to play a pivotal role in the pathogenesis of AD (6, 7). In this study, we report a second recessive AD pedigree negative for amyloid plaque, harboring the identical E693 deletion. Our findings suggest a link between this recessive mutation and the enhanced formation of soluble A $\beta$  oligomers.

---

### Case Report

---

We examined three patients from a single generation in a pedigree from an isolated island in the Seto Inland Sea, Japan (Fig. 1A). The subjects' parents were first cousins and had no history of apparent episodes of memory or motor impairment.

The proband (II-8) was a 59-year-old woman admitted to our hospital for treatment of aspiration pneumonia. She had been well until 35 years of age, when her family members

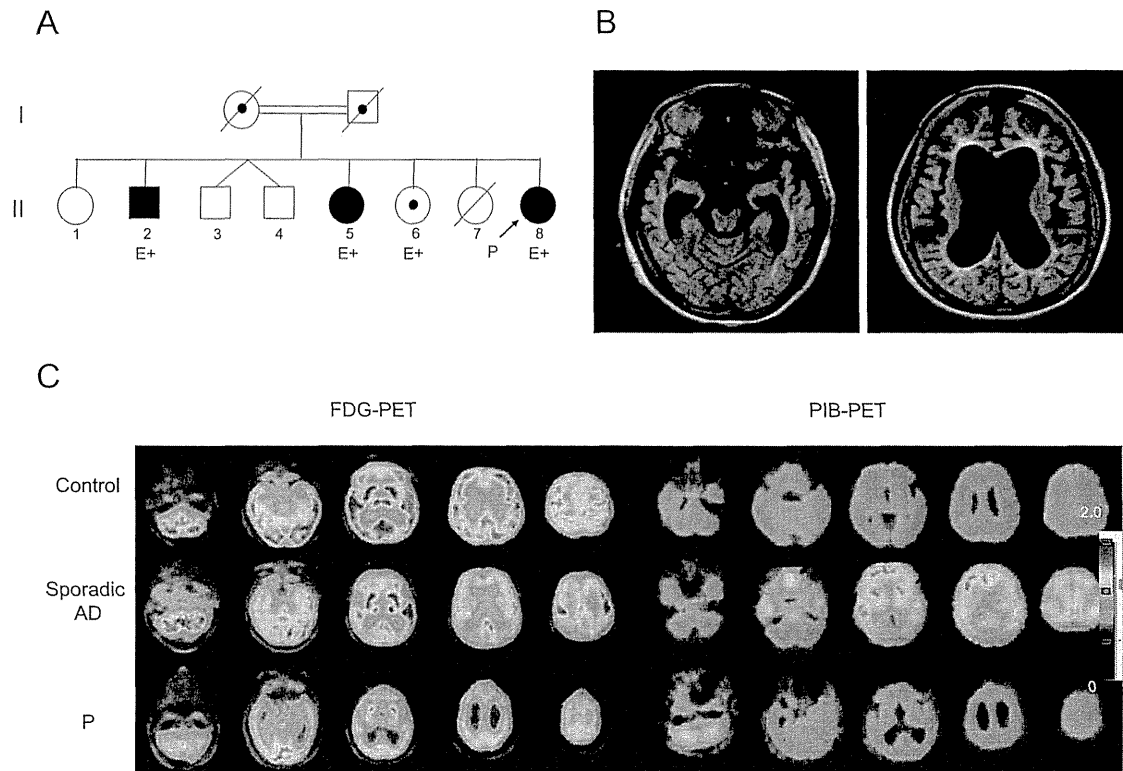
---

<sup>1</sup>Department of Neurology, Kawasaki Medical School, Japan, <sup>2</sup>Department of Molecular Genetics, Bioresource Science Branch, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University, Japan, <sup>3</sup>Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Japan, <sup>4</sup>Department of Geriatrics and Neurology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Japan and <sup>5</sup>Department of Neuroscience, Osaka City University Graduate School of Medicine, Japan

Received for publication April 7, 2014; Accepted for publication May 29, 2014

Correspondence to Dr. Yoshihide Sunada, ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp





**Figure 1.** An AD patient negative for amyloid deposition. (A) Pedigree chart. The proband is indicated by a “P.” A closed square or circle represents an affected member. A square or circle with a dot in the middle represents an obligate carrier. A genetic study of the *APP* gene was performed in members marked with “E+.” (B) MRI FLAIR images of the brain of the proband at 50 years of age. (C) PET images showing glucose uptake [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodeoxyglucose, FDG; left] and amyloid deposition [ $^{11}\text{C}$ ]-Pittsburgh compound-B, PIB; right] in the brain. Control: a 78-year-old man without dementia (upper). Sporadic AD: a 78-year-old woman with sporadic Alzheimer’s disease (middle). P: the proband at 59 years of age (lower).

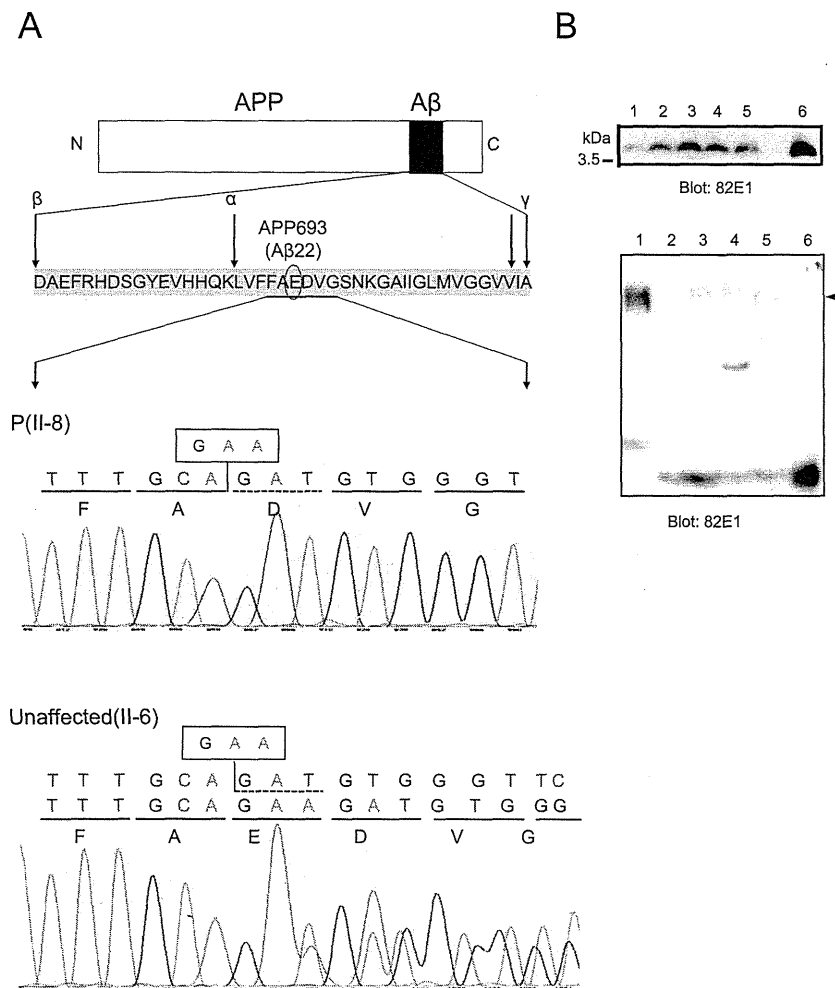
noticed short-term memory disturbances, particularly as she took her dog for a walk numerous times each day. She was diagnosed with AD at 42 years of age based on progressive cognitive impairment and prominent spatial disorientation. At 48 years of age, she first complained of difficulty walking in a straight line and consequently required a wheelchair for mobility. She became bedridden with urinary incontinence by 50 years of age. She was mute and unable to obey simple commands. She was admitted to our hospital at 56 years of age, at which time she had spastic paraparesis and mild dysphagia. The  $\text{A}\beta$  level in the serum and the total and phosphorylated tau levels in the cerebrospinal fluid (CSF) were normal. Fluid-attenuated inversion-recovery (FLAIR) magnetic resonance imaging (MRI) imaging showed remarkable brain shrinkage at 56 years of age (Fig. 1B). [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) revealed a greater reduction in the level of glucose uptake in the cerebral cortex compared to that observed in sporadic AD patients, suggesting severely impaired energy metabolism in the cerebral cortex (Fig. 1C, left). Unexpectedly, PET amyloid images using [ $^{11}\text{C}$ ]-Pittsburg compound-B (PIB) (8) were negative for amyloid deposition, comparable

to that noted in normal control subjects (Fig. 1C, right).

Patients II-2 and II-5, the 76-year-old brother and 65-year-old sister of the proband, respectively, had milder clinical signs and symptoms than the proband. The onset of memory impairment in the brother and sister at 59 and 44 years of age, respectively, was succeeded by difficulty in walking due to spasticity of the lower limbs at 66 and 58 years of age, respectively. Both patients exhibited spastic paraparesis and mutism and were being treated at other hospitals.

The local ethics committee approved the present genetic study (No. 552-1), which was performed with informed consent from an unaffected sibling (II-6) and the spouses of the affected siblings (II-8, II-2, II-5). By sequencing exons 16 and 17 of the *APP* gene, we identified a homozygous microdeletion (c.2080\_2082delGAA, p.E693del) in the affected siblings, whereas the unaffected sibling had a heterozygous deletion. Codon 693 in the *APP* gene codes for amino acid protein 22 (E22) of the  $\text{A}\beta$  peptide (Fig. 2A). The proband displayed normal sequences for all exons in two presenilin genes (*PSEN1* and *PSEN2*), with an *APOE* genotype of  $\epsilon 3/\epsilon 3$ .





**Figure 2.** DNA and protein analyses. (A) Schematic representation of the APP protein structure (upper). The amino acid E693 in the APP protein corresponds to amino acid E22 of the A $\beta$  peptide (A $\beta$ 22, middle). DNA sequences of the proband (P, II-8; lower) and an unaffected sibling (Unaffected, II-6; lower) are shown. The microdeletion of the APP gene and the deduced amino acid sequence of the APP protein are shown. (B) Increased formation of high-molecular-weight bands reactive against the anti-A $\beta$  antibody in the CSF obtained from the proband. Aliquots of CSF obtained from the proband (lane 1) or normal control subjects (lanes 2-5) were size fractionated under denaturing (upper) or non-denaturing (lower) conditions and subsequently immunoblotted with a mouse monoclonal anti-A $\beta$  antibody (82E1). This analysis showed the enhanced formation of high-molecular-weight A $\beta$  products (visible as diffuse banding) under non-denaturing conditions in the CSF obtained from the proband (arrowhead, lower), despite a reduction in the level of total A $\beta$  under denaturing conditions (upper). Synthetic A $\beta$  peptides were run on the same gel for comparison purposes (lane 6).

We then examined the level of A $\beta$  in the CSF sample obtained from the proband. An immunoblot analysis using an anti-A $\beta$  antibody was performed under both denaturing and non-denaturing conditions. Compared to the control levels, the total A $\beta$  level was decreased under the denaturing conditions (Fig. 2B, upper panel). Interestingly, however, non-denaturing electrophoresis demonstrated the levels of high-molecular-weight bands recognized by the anti-A $\beta$  antibody to be markedly elevated in the proband (Fig. 2B, lower panel), thus suggesting enhanced formation of soluble A $\beta$  oligomers.

## Discussion

In this report, we described a recessive familial AD pedigree harboring a single amino acid deletion mutation (E693 delta) within the APP gene, identical to one previously reported (5). The most remarkable phenotypic features of this mutation are the lack of amyloid deposition and increased soluble A $\beta$  oligomers in the CSF. It may be inappropriate to categorize this form of dementia without amyloid deposition as AD; however, recent findings indicate that A $\beta$  oligomers

play a critical role in synaptic dysfunction, at least in the early stage of AD (9-11). This case report further indicates that A $\beta$  oligomers induce neuronal degeneration without amyloid deposition. Because abnormal metabolism of *APP* or A $\beta$  is a molecular pathogenetic feature in the current pedigree, our subjects can be diagnosed to be within the range of the AD spectrum.

It remains unclear whether A $\beta$  oligomers accumulate in synapses or somata or how they impair synaptic transmission and induce neuronal dysfunction (12). A synthetic E693 delta A $\beta$  peptide was recently shown to facilitate A $\beta$  oligomerization, although this did not lead to A $\beta$  fibrillization (5). Additionally, *APP*-E693delta transgenic mice exhibit a brain pathology partially resembling that of AD, including the presence of intracellular A $\beta$  oligomers, although without extracellular A $\beta$  deposition (12). Indeed, the CSF obtained from the current proband showed an increased level of high-molecular-weight A $\beta$ -reactive bands, presumably corresponding to toxic A $\beta_{40/42}$  oligomers. In accordance with that observed in the first report of this condition, the homozygous E693 deletion of the *APP* gene in this pedigree may cause dementia solely via the formation of toxic A $\beta$  oligomers, not the deposition of insoluble A $\beta$  fibrils.

Kinship with the previously reported pedigree (5) is not clear in our investigation, which was limited to the identification of second- and third-degree relatives of the proband. Compared with the patient in the first report (5), our proband exhibited an earlier onset of dementia (33 vs. 55 years), more profound motor impairment (paraplegia vs. mild pyramidal tract signs) and more severe brain shrinkage (whole brain atrophy vs. parietal lobe atrophy). Other differences in genetic background may modify the severity of these phenotypes. Further studies are therefore required to clarify the pathogenetic mechanisms underlying the phenotypic differences caused by identical amino acid deletions.

**The authors state that they have no Conflict of Interest (COI).**

## Financial Support

Dr. Ohsawa received support from the Japan Society for the Promotion of Science (C-20591013, C-23591261, C-26461285), National Center of Neurology and Psychiatry (23-5, 26-8) and Kawasaki Medical School (22-A24, 23-B60). Dr. Sunada received support from the Japan Society for the Promotion of Science (C-21591101), National Center of Neurology and Psychiatry (20B-13), Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H20-018) and Kawasaki Medical School (22-T1, 23-P1).

## References

- Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet* **15** (19 R1): R4-R11, 2010.
- Alzforum Networking for a Cure. Mutations [Internet]. [cited 2014 Apr 3]. Available from: <http://www.alzforum.org>
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360**: 672-674, 1992.
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, et al. A recessive mutation in the *APP* gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* **323**: 1473-1477, 2009.
- Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, et al. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* **63**: 377-387, 2008.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**: 789-791, 2002.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639, 2004.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* **55**: 306-319, 2004.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**: 535-539, 2002.
- Larson ME, Lesné SE. Soluble A $\beta$  oligomer production and toxicity. *J Neurochem* **120** Suppl 1: 125-139, 2012.
- Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* **15**: 349-357, 2012.
- Kondo T, Asai M, Tsukita K, et al. Modulating Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**: 487-496, 2013.

## 総説

# アルツハイマー病における個別化医療の可能性

## 孤発性および家族性アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病の病態解析

浅井 将<sup>1, 2)</sup>, 城谷 圭朗<sup>1, 2)</sup>, 近藤 孝之<sup>2, 3)</sup>, 井上 治久<sup>2, 3)</sup>, 岩田 修永<sup>1, 2)</sup>

**要約:** アルツハイマー病の原因物質アミロイド $\beta$ ペプチド (amyloid- $\beta$  peptide: A $\beta$ ) はその前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) から $\beta$ および $\gamma$ セクレターゼの段階的な酵素反応によって産生される。アルツハイマー病の発症仮説である「アミロイド仮説」を補完する「オリゴマー仮説」は、オリゴマー化したA $\beta$ こそが神経毒性の本体であるとする仮説であるが、オリゴマーA $\beta$ のヒトの神経細胞への毒性機構や毒性を軽減する方法は未だ不明であった。そこで我々は、この問題点を解決すべく若年発症型家族性アルツハイマー病患者2名および高齢発症型孤発性アルツハイマー病患者2名から人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) を樹立し、疾患 iPS 細胞から神経細胞に分化誘導を行って細胞内外のA $\beta$  (オリゴマー) の動態と細胞内ストレス、神経細胞死について詳細に検討した。その結果 APP-E693 $\Delta$ 変異を有する家族性アルツハイマー病患者由来の神経細胞内にA $\beta$ オリゴマーが蓄積し、小胞体ストレスおよび酸化ストレスが誘発されていることがわかった。一方、1名の孤発性アルツハイマー病患者においても細胞内にA $\beta$ オリゴマーの蓄積と上記と同様の細胞内ストレスが観察された。これらの小胞体ストレスおよび酸化ストレスは $\beta$ セクレターゼ阻害薬によるA $\beta$ 産生阻害やドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) によって軽減された。このように孤発性アルツハイマー病においてもA $\beta$ オリゴマーが神経細胞内に蓄積するサブタイプが存在すること、およびこのサブタイプに対する個別化治療薬としてDHAが有効である可能性を示した。

## 1. はじめに

これまで生検によるヒトの神経細胞を研究に用いることは倫理的および技術的に困難であった。しかし、iPS 細胞技術の登場(1)によって、患者さんの皮膚の細胞からiPS 細胞を樹立し、神経系細胞へと分化誘導することで、培養皿の中で神経変性疾患モデルを構築し、病態の解析や創薬標的の検証を行うことが可能となった(2-5)。

従来のアルツハイマー病研究は、神経芽細胞腫または上皮系由来の株化細胞や原因物質A $\beta$ の前駆体をコードするAPP遺伝子(しばしば家族性変異が導入されている)を導入した過剰発現系、またはマウスやラットの初代培養神経細胞を用いる実験系が主流であったが、実際のアルツハイマー病患者の遺伝的背景が組み込まれていないという問題点を含んでいた。事実、多くの薬剤に対して治験が行われるものの、ことごとく開発中止に追い込まれてきた。それに対し、iPS 細胞から分化した神経細胞を用いる実験系では、上述の問題点が解決され、より現実的な薬剤応答が期待できる。2011年から2012年までのiPS 細胞を用いた先駆的研究ではアルツハイマー病の病態のモデル化に重点が置かれ、これまでに積み上げられてきたアルツハイマー病研究の成果が再現されてきた(3, 4, 6, 7)。

そこで我々は、iPS 細胞が有するアルツハイマー病患者の固有の遺伝的背景を生かすべく、若年発症型家族性アルツハイマー病患者(2症例)と高齢発症型孤発性アルツハイマー病患者(2症例)からiPS 細胞を作製し、神経系細胞へ分化誘導後、A $\beta$ の動態を中心にアルツハイマー病の病態を詳しく解析した。その結

キーワード: iPS 細胞, アルツハイマー病, A $\beta$ オリゴマー, 個別化医療

<sup>1)</sup>長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬品生物工学研究室 (〒852-8521 長崎県長崎市文教町1-14),

<sup>2)</sup>JST・CREST (〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8),

<sup>3)</sup>京都大学 iPS 細胞研究所 (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53)

E-mail: asai@nagasaki-u.ac.jp 原稿受領日: 2013年9月6日, 依頼原稿

Title: Cellular models for individualized medicine in Alzheimer's disease using patient-derived induced pluripotent stem cells

Author: Masashi Asai, Keiro Shirogami, Takayuki Kondo, Haruhisa Inoue, Nobuhisa Iwata

果, これまでアルツハイマー病の大多数を占め一括りにされていた孤発性の中にもサブタイプが存在することが明らかになった。以下に我々の最近の研究成果と共に, iPS 細胞を用いたアルツハイマー病研究の今後の課題を概説したい。

## 2. 疾患 iPS 細胞由来神経細胞における細胞内 A $\beta$ オリゴマーの蓄積

3 例の健常者, APP 遺伝子に変異を有する若年発症型家族性アルツハイマー病患者 2 症例 (Osaka 変異 [APP-E693 $\Delta$ ] と Ehime 変異 [APP-V717L]), 高齢発症型孤発性アルツハイマー病患者 2 症例の線維芽細胞から山中因子の遺伝子導入によって iPS 細胞へと初期化した (8)。樹立した iPS 細胞をネスチン陽性の神経幹細胞へ分化誘導し, さらに二次元の接着培養を継続することで, 神経細胞のマーカーである TUJ1, 大脳皮質神経のマーカーである SATB2 および TBR1 陽性の大脳皮質神経細胞へと分化させた (8)。疾患 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞を比較して, これらのマーカーの発現に有意な差は見られなかった (8)。

Osaka 変異型 APP は, 2008 年に大阪市立大の富山, 森らによって発見された A $\beta$  の 22 番目のグルタミン酸の欠失変異型であり, A $\beta$  のオリゴマー化が促進され (9, 10), 老人斑を形成せずにアルツハイマー病が発症すると考えられている。Osaka 変異型 APP を持つ患者由来の iPS 細胞から分化誘導した神経系細胞における細胞外の A $\beta$  を ELISA で定量したところ, 株化細胞を用いた報告 (9) の通り, アミノ酸 42 残基からなる A $\beta$  42 およびアミノ酸 40 残基からなる A $\beta$  40 の細胞外への分泌量が低下していた (8)。一方, Ehime 変異型 APP は 717 番目のバリンがロイシンに置換したものであり, 産生される A $\beta$  は産生量自体には変化がないものの, 凝集性および細胞毒性が高い A $\beta$  42 の産生量が増加することが知られている (11)。我々の iPS 細胞を用いた研究でも, APP-V717L 変異を持つ神経細胞において健常者由来の神経細胞と比較して細胞外の A $\beta$  42 量が約 1.5 倍に増加し, 株化細胞を用いたこれまでの報告と一致する結果となった。

APP-E693 $\Delta$  から産生される A $\beta$  は細胞内でオリゴマーとして存在することが株化細胞 (10) およびマウス (12) の実験系で知られているので, A $\beta$  オリゴマーを特異的に認識する抗体を用いて, iPS 細胞由来神経細胞の免疫細胞染色を行った。すると APP-E693 $\Delta$  変異を持つ神経細胞では報告 (10, 12) 通りに細胞内に A $\beta$  オリゴマーが蓄積していた (8)。一方, 健常者由来の神経細胞では A $\beta$  オリゴマーは検出されなかった。

$\beta$  セクレターゼ阻害薬によって A $\beta$  産生を阻害すると細胞内の A $\beta$  オリゴマーは著しく減少するため, 免疫細胞染色のシグナルは確かに A $\beta$  由来であることがわかる。さらに, 孤発性アルツハイマー病患者の iPS 細胞を用いて詳細な研究を行ったところ, 極めて興味深いことに, 2 症例中 1 名の方の神経細胞においても, 細胞内に A $\beta$  オリゴマーが蓄積していた (8)。

アミロイド仮説の最上流に位置する A $\beta$  は,  $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼによって産生された後, 細胞外に分泌されて蓄積し, アルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑を形成する (13)。それ故, 分泌された A $\beta$  が細胞の外から作用して神経細胞の機能を障害したり, タウの凝集化を促進したりすると考えられてきた。しかし, 今回の研究で孤発性アルツハイマー病の神経細胞内にも A $\beta$  オリゴマーが蓄積することがわかり, これまで一括りにされていた孤発性アルツハイマー病の中にも, 従来から考えられていた A $\beta$  を細胞外で蓄積するタイプに加えて, A $\beta$  オリゴマーを細胞内で蓄積するサブタイプの少なくとも 2 つが存在することが明らかになった (図 1)。

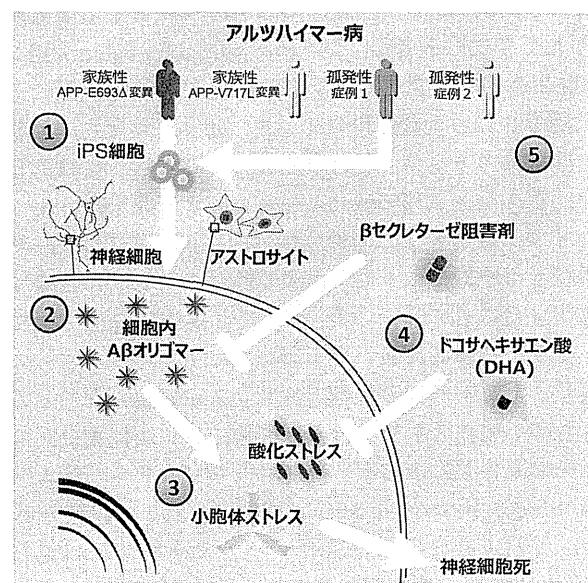


図 1 疾患 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病の病態解析～細胞内 A $\beta$  蓄積による細胞内ストレスの誘発

① APP-E693 $\Delta$  変異または APP-V717L 変異を持つ家族性, および 2 症例の孤発性アルツハイマー病患者さんから iPS 細胞を樹立し, 分化誘導した神経系細胞 (神経細胞とアストロサイト) における A $\beta$  の動態を解析した。② 家族性 (APP-E693 $\Delta$  変異) と孤発性アルツハイマー病 (症例 1) で細胞内に A $\beta$  オリゴマーが蓄積していた。③ 細胞内に蓄積した A $\beta$  オリゴマーによって細胞内ストレス (酸化ストレス・小胞体ストレス) が誘発され, 細胞の脆弱化を引き起こした。④ 誘発された細胞内ストレスや細胞の脆弱化は  $\beta$  セクレターゼ阻害薬や DHA 投与によって軽減した。⑤ iPS 細胞技術によるアルツハイマー病の病態解明および創薬研究に加え, 病態をあらかじめ予測し, 適切な治療を提供する個別化医療への道筋を示すことに成功した。

### 3. 細胞内 A $\beta$ オリゴマーによる小胞体ストレスおよび酸化ストレスの惹起

細胞内に蓄積した A $\beta$  オリゴマーが神経細胞へどのような影響を及ぼしているかを検討するために、DNA マイクロアレイチップを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、ペルオキシレドキシニン活性やオキシドレダクターゼ活性、ペルオキシダーゼ活性等酸化ストレスに応答する遺伝子群の発現が増加する一方で、糖鎖付加関連遺伝子群の発現の減少が観察された(8)。これらの結果から、細胞内に蓄積した A $\beta$  オリゴマーによって酸化ストレスが生じ小胞体やゴルジ体の機能に障害が生じる可能性が示唆された。そこで、ウエスタンブロット法を用いて解析したところ、APP-E693 $\Delta$  変異を持つ患者や A $\beta$  オリゴマーが蓄積する孤発性アルツハイマー病患者の iPS 細胞由来の神経細胞では、小胞体ストレスで誘導される分子シャペロンである BiP の発現、酸化ストレスのマーカーであるペルオキシレドキシニン 4 の発現も増加していた(8)。さらに APP-E693 $\Delta$  変異を持つ神経細胞では、株化細胞への APP-E693 $\Delta$  の過剰発現系の報告(10)と同様に、活性化されたカスパーゼ 4 が有意に上昇していた(8)。

細胞内の活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) を検出する化合物 CellROX deep red reagent もしくは 3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF) を用いた解析で、APP-E693 $\Delta$  変異型および A $\beta$  オリゴマーが蓄積する孤発性アルツハイマー病患者の iPS 細胞由来の神経細胞のみにおいて ROS 産生の増加が観察され、この酸化ストレスと共に上述の ER ストレスは  $\beta$  セクレターゼ阻害薬投与によって健常者の神経細胞と同程度まで減少した(8)。よって細胞内の活性酸素種は A $\beta$  オリゴマーが原因で生じていると考えられた。

A $\beta$  は細胞外では線維化して老人斑を形成し脳実質に蓄積する。老人斑の消去にはミクログリアの貪食作用が関与するが、大量に沈着する老人斑の消去に追いつかずに老人斑は蓄積したままである。細胞内でオリゴマー化した A $\beta$  の分解・除去にはどのようなシステムが関与するのであろうか？ この答えは十分に得られていないが、恐らくリソソームやオートファジー等の機構が関与しているものと推察できる。実際、細胞内 A $\beta$  オリゴマーは  $\beta$  セクレターゼ阻害薬処理 2 時間後から消失し、8 時間後には健常者の iPS 細胞由来の神経細胞と同程度までシグナルが減少した(8)。従って、アルツハイマー病脳内においてもリソソームやオートファジー等の機構が十分に働いていれば、 $\beta$  セクレターゼ阻害薬投与によって産生を抑制し、かつ既に

存在している A $\beta$  オリゴマーを除去することが可能である。

### 4. 細胞内 A $\beta$ オリゴマーが誘導した小胞体ストレスおよび酸化ストレスの薬剤投与による軽減および細胞生存率の回復

細胞内 A $\beta$  オリゴマーによって生じた細胞内ストレスを緩和する薬剤の評価を行い、候補化合物として DHA を見出した(8)。BiP と活性化カスパーゼ 4、ペルオキシレドキシニン 4 の発現量を指標に小胞体ストレスを評価した結果、DHA 投与によって APP-E693 $\Delta$  変異を持つ神経細胞の BiP の発現量が有意に減少し、活性化カスパーゼ 4 とペルオキシレドキシニン 4 の発現量も対照群と比較して有意に減少した。さらに、ROS の産生も抑制された。

一方、APP-E693 $\Delta$  変異を持つ神経細胞では培養日数依存的に細胞死が誘導され、健常者由来の細胞に比較して脆弱であった(8)。DHA はまたこの脆弱性に対して神経保護的に作用し、細胞生存率を改善させた。

### 5. おわりに

疾患 iPS 細胞を用いた研究では、株化細胞や遺伝子改変マウスへの過剰発現系を用いずに、患者さんの遺伝的背景を有した神経細胞を再現し、病態解析を進めることが可能になった。また、誌面の都合上詳細は割愛したが、APP-E693 $\Delta$  変異型 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞だけでなく、アストロサイトからも細胞内 A $\beta$  オリゴマーの集積が観察されており(8)、アルツハイマー病脳におけるアストロサイトの機能変化という点についても今後検討していく必要がある。このように、神経細胞だけでなく、グリア細胞にも目を向けて解析を進めることができるため、iPS 細胞技術を疾患研究に応用する意義は大きい。

アミロイド病リカスケードに従うと、A $\beta$  は細胞外に蓄積しその後の病リカスケードを誘発すると考えられてきた(14)。A $\beta$  オリゴマーもまたシナプス間隙に存在し、NMDA 受容体または  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体等に結合し、神経細胞の機能障害を引き起こすことが見出され(15)、A $\beta$  は細胞の外でアルツハイマー病の病態に深く関わりと信じられてきた。今回の研究では、家族性アルツハイマー病 (APP-E693 $\Delta$  変異)に加えて、2 名中 1 名の孤発性アルツハイマー病 iPS 細胞由来を神経細胞において細胞内 A $\beta$  オリゴマーの蓄積と共に細胞内ストレスの増加が観察された。孤発性アルツハイマー病において細胞内に A $\beta$  オリゴマーを蓄積するタイプがどの程度存在

するかは、症例数を増やし一般化していく必要がある。多数の症例に対して iPS 細胞を作製し、解析していくには時間と労力が必要となる。これには皮膚の線維芽細胞から直接神経細胞へ分化誘導する iN 細胞技術 (16) が相応しいであろう。また、細胞内に A $\beta$  オリゴマーを蓄積するタイプが、剖検脳で細胞内だけ A $\beta$  オリゴマーを蓄積するのか、細胞内 A $\beta$  オリゴマーの蓄積に加えて細胞外にアミロイドを蓄積するのか検証していくことも今後の課題として残されている。しかし、その一方で我々は DHA が有効性を示す細胞内蓄積型タイプが稀な存在ではないと考えている。その傍証となるのが、DHA による治験の結果である (17, 18)。DHA によるアルツハイマー病の治療薬としての効果は議論の余地があり、一定の見解は得られていない。つまり、治験に加わっている患者が DHA による治療が有効なアルツハイマー病の集団と有効でない集団が混ざり合っている可能性がある。各々の患者さんから iPS 細胞を樹立し、神経細胞へ分化誘導を行ってサブタイプを調べ DHA による治療が有効な群のみで治験を行えば、DHA のアルツハイマー病への有効性を示すことができる可能性がある。このことは、単に臨床治験における患者さんのリクルートに留まらない。一見同じに見える孤発性アルツハイマー病においても背景に潜む病態は多様であり、病態特性に応じた治療戦略の可能性を示している。従来の均一な疾患概念に対する画一的な治療を超えて、患者個々の病態診断に基づき適切な治療を行う「個別化医療」の開発が iPS 細胞技術によって拓けてきたと言える。

また、これまで神経細胞内 A $\beta$  (オリゴマー) の蓄積が注目されてこなかったのは剖検脳で減多に観察されなかったことが理由である。これは、単なる免疫染色で使用する抗体の感度の問題なのか、もしくは細胞内 A $\beta$  の集積が病態の最初期の状態を示しているのか

詳細は明らかでない。しかし、現在家族性および孤発性アルツハイマー病 iPS 細胞で A $\beta$  の細胞外蓄積型と細胞内蓄積型の 2 つのフェノタイプを有するクローンを手にしており、今後これらの細胞から分化誘導した神経系細胞を用いて解析を進めることにより、これらのサブタイプを見分ける、または超早期診断マーカーとなり得るようなバイオマーカーが見出される可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

謝辞：本稿で紹介した主な研究内容は、JST・CREST 戦略的創造研究推進事業、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 (22110007)、厚生労働科学研究費補助金 (難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業) (H25-実用化 (再生)-指定-019)、文部科学省 疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究、国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費 (24-9)、公益財団法人臨床薬理研究振興財団、公益財団法人持田記念医学薬学振興財団の助成を受けて実施したものである。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Takahashi K, et al. Cell. 2007;131:861-872.
- 2) Yahata N, et al. PLoS One. 2011;6:e25788.
- 3) Yagi T, et al. Hum Mol Genet. 2011;20:4530-4539.
- 4) Israel MA, et al. Nature. 2012;482:216-220.
- 5) Egawa N, et al. Sci Transl Med. 2012;4:145ra104.
- 6) Qiang L, et al. Cell. 2011;146:359-371.
- 7) Shi Y, et al. Sci Transl Med. 2012;4:124ra29.
- 8) Kondo T, et al. Cell Stem Cell. 2013;12:487-496.
- 9) Tomiyama T, et al. Ann Neurol. 2008;63:377-387.
- 10) Nishitsuji K, et al. Am J Pathol. 2009;174:957-969.
- 11) De Jonghe C, et al. Hum Mol Genet. 2001;10:1665-1671.
- 12) Tomiyama T, et al. J Neurosci. 2010;30:4845-4856.
- 13) Iwata N, et al. Pharmacol Ther. 2005;108:129-148.
- 14) Hardy JA, et al. Science. 1992;256:184-185.
- 15) Selkoe DJ. Science. 2002;298:789-791.
- 16) Qiang L, et al. Cell. 2011;146:359-371.
- 17) Freund-Levi Y, et al. Arch Neurol. 2006;63:1402-1408.
- 18) Quinn JF, et al. JAMA. 2010;304:1903-1911.

## iPS細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の病態解析

京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門  
JST CREST

えがわ 江川  
いのうえ 井上  
なおひろ 斉宏  
はるひさ 治久



筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis; 以下ALS)は、運動ニューロンが選択的に変性して細胞死をおこす結果、全身の筋萎縮とそれともなう筋力低下を生じる神経難病である。ALSの発病率は約2人/10万人と比較的まれな疾患であり、男女比は、やや男性におおく、発症のピークは70歳代である。90%以上の患者さんが、遺伝的な背景をもたない孤発性ALSであり、残りの約10%が家系内で発症する家族性ALSである。これまで、家族性ALSの原因となる遺伝子として、多くの遺伝子が同定された(表1)。ALSは1869年に初めて、著名なフランスの神経学者Charcotにより報告された後、疾患の原因を解明すべく、これまで、精力的な研究がなされてきたが、いまだその治療法は確立されておらず、その生命予後は発症後2-3年と、もっとも致命的な神経難病疾患の一つである。

### 封入体の主要構成成分TAR DNA binding protein (TARDBP; 以下TDP-43)

ALSに共通する死後組織の特徴は、運動ニューロンのみ変性・消失するという運動ニューロン障害の選択性とそれともなう封入体と呼ばれるタンパク質の凝集の形成である。封入体はその形や、染色液への染色性によって数種類に分類されていたが、その主な構成成分については、最近まで不明であった。2006年にNeumann, Araiらは、前頭葉側頭葉変性症と孤発性ALSの封入体の主要構成成分がTDP-43タンパク質であることを報告した。その後Kabashiraらが、TDP-43遺伝子に変異を持つ(変異型TDP-43)家族性ALSの家系を報告し、TDP-43遺伝子が家族性

ALSの責任遺伝子の一つであることを見出し、TDP-43が遺伝子レベルで一次的にALSの病態と関連していることを示し、孤発性ALSへの治療の期待が大いに高まった。

TDP-43は、タンパク質合成の鋳型となるリボ核酸(RNA)に結合するタンパク質であり、RNA合成、スプライシング(RNAの必要な領域を切り出すこと)、RNAの輸送など、様々なRNAの代謝にかかわっている。また、その後TDP-43遺伝子変異を持つ細胞やモデル動物の研究から、変異型TDP-43は、タンパク質として溶けにくい性質をもち、通常存在する核から細胞質に異所性に存在する性質をもつことが明らかになった。しかしながら、変異型TDP-43がこれらの性質を獲得することが、実際に、ヒト運動ニューロンの細胞死といかに関係しているかの研究は、技術的かつ倫理的観点上、ヒト運動ニューロンを入手することができないため、困難であった。

### Induced pluripotent stem cell (以下iPS細胞)の発見

2007年山中らにより、iPS細胞という画期的な発見がなされた。iPS細胞は、様々な細胞・組織を分化することができる多能性幹細胞であり、皮膚線維芽細胞に4つの転写因子を導入することによって作製される。すなわち、患者さんの皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立して、それらから体の様々な細胞・組織に分化誘導して病態解明のために利用することが可能になった。実際に2008年Dimosらは、ALS由来のiPS細胞が運動ニューロンへの分化する能力があることを初めて報告した<sup>1)</sup>。さらに2009年には、Ebertらは、ALS同様の運動ニューロン疾患である、脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy;



表1 家族性ALSの原因遺伝子

種類	遺伝子	遺伝子座	遺伝形式	蛋白の機能
ALS1	SOD1	21q22	常染色体優性	抗酸化
ALS2	ALS2	2q33	常染色体劣性	蛋白輸送
ALS3	未同定	18q21	常染色体優性	
ALS4	SETX	9q34	常染色体優性	DNA損傷応答
ALS5	SPG11	15q21	常染色体劣性	
ALS6	FUS	16p11	常染色体優性	RNA代謝
ALS7	未同定	20p13	常染色体優性	
ALS8	VAPB	20q13	常染色体優性	小胞輸送
ALS9	ANG	14q11	常染色体優性	血管新生
ALS10	TARDBP	1p36	常染色体優性	RNA代謝
ALS11	FIG4	6q21	常染色体優性	小胞輸送
ALS12	OPTN	10p13	常染色体優性	NFκB制御
ALS13	ATXN2	12q24	常染色体優性	
ALS14	VCP	9p13	常染色体優性	タンパク質分解
ALS15	UBQLN2	Xp11	伴性優性	タンパク質分解
ALS16	SIGMAR1	9p13	常染色体劣性	タンパク質折りたたみ
ALS17	CHMP2B	3p11		細胞骨格
ALS18	PFN1	17p13	常染色体優性	

以下SMA)の疾患由来iPS細胞を用いて、核内にあるGEMと呼ばれる構造体の数の減少、分化したニューロンの減少など、SMAの病態の特徴を再現することが可能であり、既存の薬剤でそれらが改善できることを示した<sup>2)</sup>。

これは、患者さん体外で、罹患した細胞を用いて、病態を再現し、治療を検討することができることを示した最初の報告である。実際その後、多くの疾患で病態の再現と薬剤の効果を検討することが可能であることを示した。ALSでは、Mitne-Netoらが、責任遺伝子の一つであるvesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB)の変異を有するiPS細胞を樹立して、それらから分化した神経細胞においてVAPBの発現が低下していることを示し、ALS由来のiPS細胞から分化した細胞でも同様に、疾患の特徴を有していることを示した。また、最近では、われわれとBilicanらのグループは、TDP-43変異を有するALS患者由来のiPS細胞を樹立して、それらから運動ニューロンを分化、作製し、その病態の一部を再現することに成功し、さらに、それらをもとに、新規薬剤のシーズを見いだす可能性について示した<sup>3,4)</sup>。

### ALS特異的iPS細胞を用いたALSの病態再現の研究

TDP-43は、構造上、2つのRNA認識部位(RNA recognition motif; RRM)をもつRNA結合タンパク質であるが、そのC末端側にGlycineが多く存在する領

域(Glycine-rich domain; GRD)をもっている。その領域は、タンパク質同士の結合に重要な領域だと考えられており、家族性ALSにおいて報告されたTDP-43遺伝子変異のほとんどがこの領域に集中している。このことは、TDP-43変異によって、TDP-43とタンパク質との結合を介した病態メカニズムが発症に関連していることを示唆している。

我々は、国内外から、GRDに存在する3種類のTDP-43変異(G298S, R343Q, M337V)を有する家族性ALS患者由来の皮膚線維芽細胞を国内外から入手して、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。樹立した細胞はいずれも胚性幹細胞(embryonic stem cells: 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、機能的な運動ニューロンまで分化させることに成功した(図1)。

ALS由来iPS細胞は、非ALSから作製したiPS細胞と比較して、運動ニューロンに分化する能力に変化は認めなかった。TDP-43変異を有するALS由来のiPS細胞から分化した神経系細胞では、TDP-43がタンパク質として溶けにくい性質(以下不溶性)を獲得して、その発現量が上昇し、細胞質におけるTDP-43の凝集体の数が増加していた。また、TDP-43の不溶性を増加する、酸化ストレスを与える薬剤を負荷すると、ALS運動ニューロンは、より脆弱性であった。さらに、運動ニューロンを緑色蛍光タンパク質で標識し、フローサイトメトリーを用いて純

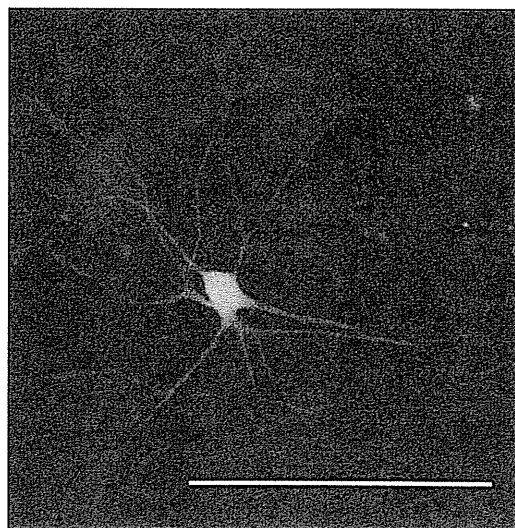


図1 ips細胞から分化した運動ニューロン(緑色蛍光タンパク質で可視化、スケール100 μm)

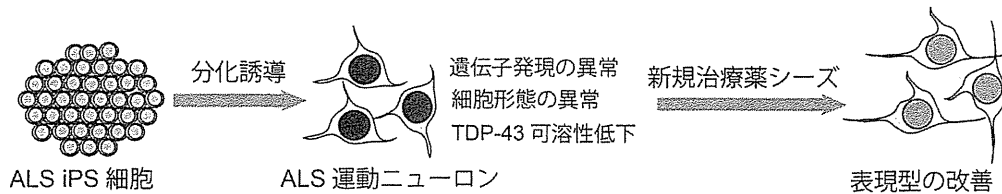


図2 ALS特異的ips細胞を用いたALSの病態再現と薬剤スクリーニング

化濃縮し、その形態と網羅的な遺伝子発現の解析を行ったところ、ALS由来の運動ニューロンは、形態的に突起伸長が短く、神経突起にかかわる遺伝子発現が低下しているとともに、RNA代謝に関連する遺伝子群の変化を認めた。さらに、低分子化合物でこれらの表現型が改善することを示し、病態再現された表現型をもとに、薬剤スクリーニングが可能であることを示した(図2)。今後、これらの病態が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、検討をすすめる必要がある。

病態再現をもとにした薬剤シリーズが期待される一方で、検討すべき課題も残されている。ひとつは、薬剤シリーズの安全性である。細胞レベルで認められる効果は、必ずしも生体への有用性を反映しないため、動物モデルなどを用いて、その投薬経路、投与量、副作用の有無など、さらに慎重な検討をつづける必要がある。

また、発症メカニズムを追及する上での課題は、同じ線維芽細胞由来でも起こりうるiPS細胞株間での表現型の差の問題であり、そのために潜在的な重要な病態や表現型が隠されてしまう可能性がある点である。この差を最小限化するためには、分化誘導に適正なiPS細胞を選択するための基準や方法、分化誘導して特定の細胞群を選別する方法など、より細分化された解析技術を開発することが重要であろう。

### ALSにおけるiPS細胞を用いた移植医療の可能性

現在のところ、運動ニューロン疾患を対象としてiPS細胞をもちいたヒト移植医療は開発されていない。しかしながら、実験動物レベルでは、幹細胞そのもの、もしくはそれらから分化した細胞を運動ニューロン疾患のモデル動物に移植し、その病状が改善するかについて、様々な形で検討されている。移植医療の大きな目的は、(1) 移植細胞から分泌される因子が、移植された側のニューロンの細胞死を抑制する、(2) 移植細胞から分泌される因子が移植された側の細胞を刺激して、神経を新生する、(3)

移植したニューロンが、移植された側のニューロンと新たな神経回路を形成すること、であり、今後iPS細胞から分化した運動ニューロンもしくはニューロン周囲でニューロンを支持するグリア細胞を用いて、新たな運動ニューロン回路を形成することを目的とした移植医療の開発が期待される。

ALSと同様に運動ニューロン疾患の1つであるSMAのモデルマウスでは、マウス神経幹細胞を脊髄腔内移植すると、生存期間が延長することが報告されている。またALSの原因遺伝子の1つであるヒト変異superoxide dismutase 1(SOD1)を過剰発現するALSのモデル動物に、ヒト神経前駆細胞を脊髄内移植することによる、発症時期の遅延と生存期間の延長が報告されている。ヒトにおいても、胎児由来ヒト神経幹細胞をALS患者の脊髄内移植する臨床試験が米国にて進行中である<sup>5)</sup>。今後、安全性に加えて、どの程度の数のどのような種類の細胞を移植するか、いかに移植した細胞が生着する環境や拒絶反応をコントロールするなど、様々な課題を克服する必要がある。

### 最後に

以上のように、様々な課題はあるものの、iPS細胞を用いて疾患の病態のすくなくとも一部を再現することができるようになった。これらをもとに、難治性疾患の新たな治療法や治療薬が開発され、早期に実際の患者さんの治療につながることを期待したい。

#### 引用文献

- 1) Dimos, J. T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221, doi:1158799 [pii]10.1126/science.1158799 (2008).
- 2) Ebert, A. D. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280, doi:nature07677 [pii]10.1038/nature07677 (2009).
- 3) Egawa, N. et al. Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4, 145ra104, doi:4/145/145ra104 [pii]10.1126/scitranslmed.3004052.
- 4) 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, doi:1202922109 [pii]10.1073/pnas.1202922109.
- 5) Glass, J. D. et al. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* 30, 1144-1151, doi: 10.1002/stem.1079.

## 5. iPS細胞を用いたアルツハイマー病モデルと小胞体ストレス

村上永尚・和泉唯信・梶 龍児・井上治久

2007年、ヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells : iPS細胞）の誕生以来、患者 iPS細胞を用いた疾患モデル化、病態解明、創薬研究が進んでいる。その中で、神経疾患 iPS細胞を用いた研究によって、いくつかの神経疾患で共通の表現型として小胞体ストレスが同定されている。われわれもアルツハイマー病 iPS細胞を用いて、患者細胞において小胞体ストレスが生じていることを見出した。本稿では、神経疾患 iPS細胞と疾患表現型、アルツハイマー病モデルにおける小胞体ストレスの研究について述べる。

### はじめに

神経変性疾患の病変の首座である神経系は再生が難しいため、生検などによる直接的な病態の解析は困難である。これまで疾患の病態解明の研究には、死後の病理組織、遺伝性疾患の遺伝学的解析、遺伝子改変動物、細胞モデルなどを中心に進められていたが、間接的にしか患者の病態を解析することはできなかった。

2007年に高橋らによりヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells : iPS細胞）の作製技術が開発された<sup>1)</sup>。iPS細胞は胚性幹細胞（embryonic stem cells : ES細胞）に匹敵する多能性を獲得した幹細胞であり、ほぼ無限に増殖し、内胚葉、中胚葉、外胚葉への分化能を有している。この技術を用いることで、患者の体細胞から iPS細胞を樹立し、患者の遺伝情報を有した神経細胞をシャーレの中で疾患モデルとして再現することが可能となった。これまで報告された患者 iPS細胞

を用いた神経疾患モデルは、小胞体ストレス応答の亢進<sup>2)</sup>、酸化ストレス応答の亢進<sup>2)</sup>、疾患原因タンパク質の量的変化・細胞内蓄積<sup>3)-6)</sup>、オートファジーの亢進<sup>5)</sup>、神経細胞の形態異常<sup>6)-7)</sup>、活性型カスパーゼ3上昇<sup>8)</sup>、神経の発火・興奮頻度異常・シナプス機能異常<sup>9)-10)</sup>などの表現型を呈している。それらの表現型の中で小胞体ストレス応答の亢進は、われわれのアルツハイマー病（Alzheimer's disease : AD）モデル<sup>2)</sup>、leucine-rich repeat kinase 2（*LRRK2*）変異を有するパーキンソン病モデル<sup>11)</sup>と、ハンチントン病モデル<sup>12)</sup>において観察されていることから、小胞体ストレスが神経変性疾患に広く関連する病態であることが改めて示された。

小胞体はカルシウムの貯蔵や、膜タンパク質・分泌タンパク質の品質管理に重要な役割を果たしている細胞内小器官である<sup>13)</sup>。リボソームで合成されたタンパク質は、小胞体膜チャネルを介して小胞体内腔へ入り、膜タンパク質・分泌タンパ

### key words

iPS細胞、アルツハイマー病、アミロイドベータ、A $\beta$ オリゴマー、APP E693delta 変異、小胞体、小胞体ストレス、酸化ストレス、ドコサヘキサエン酸（DHA）

ク質の折りたたみ、ジスルフィド結合の形成、糖鎖修飾などを行う。成熟したタンパク質についてはゴルジ装置などへ輸送し、不良品と判断されたタンパク質 (unfolded protein) については先へ送らないよう調整を行っている。この unfolded protein が小胞体に蓄積された状態を小胞体ストレスと呼び、細胞は小胞体ストレスに対してストレス応答が働き対処を行う<sup>13)</sup>。小胞体ストレスの刺激が過剰で耐えきれなくなった場合、あるいは長時間持続する場合、細胞はアポトーシスを惹起し、細胞死に至るとされる<sup>14)</sup>。

## I. iPS 細胞を用いたアルツハイマー病研究について

AD は記憶力低下、見当識障害を中心とする進行性の神経変性疾患であり、認知症の原因として最も大きな割合を占める疾患である<sup>15)</sup>。AD は加齢が大きな発症リスクであり、今後高度高齢化社会を迎えるわが国のみならず、全世界においても患者数は爆発的に増加することが予想されている<sup>16)</sup>。

AD は発症年齢により早期発症型 AD (early-onset AD : EOAD) と晩期発症型 AD (late-onset AD : LOAD) に分けられる。EOAD は全症例の 1 ~ 5% 程度であり、発症年齢は 30 歳代から 60 歳代までと幅広い。LOAD は一般的な AD の表現型であり、全症例の 90% 以上を占め 65 歳以上で発症することが多い。EOAD を呈する常染色体優性遺伝形式の家族性 AD の原因遺伝子として、amyloid precursor protein (APP), presenilin1 (PSEN1), presenilin2 (PSEN2) が同定されている<sup>17)-19)</sup>。これらの遺伝子によって引き起こされる EOAD は AD 全体からみて 1% 以下と頻度は少ないが、いずれもアミロイドベータ (amyloid beta : A $\beta$ ) タンパクの産生に関わっており、A $\beta$  が AD の神経細胞障害に重要であることを示してきた。LOAD はより複雑な遺伝的背景があるものと考えられている。1993 年 Corder らにより apolipoprotein E $\epsilon$ 4 (APOE $\epsilon$ 4) がリスク遺伝子として初めて報告された<sup>20)</sup>。APOE は脳内に幅広く存在するリポタンパク質であり、コレステ

ロール代謝に関わる<sup>21)</sup>。

AD の病理学的特徴としては、脳内に老人斑と呼ばれるタンパク質の沈着がみられ、この老人斑の主成分は APP から 2 段階の酵素切断により生成される A $\beta$  であることが知られている。APP は 1 回膜貫通型のタンパク質で、 $\beta$  セクレターゼ活性を有する  $\beta$ -site APP cleaving enzyme1 (BACE1) によって APPs  $\beta$  と C 端の C99 に分解される。 $\gamma$  セクレターゼ活性を有する PSEN, presenilin enhancer 2 (PEN-2), nicastrin (NCSTN), anterior pharynx defective 1 (APH-1) 複合体により A $\beta$  と APP intracellular domain (AICD) に分解される<sup>22)</sup>。産生される A $\beta$  の多くは A $\beta$  40 であるが、約 10% は疎水性が強くアミロイド線維を形成しやすい A $\beta$  42 であるといわれている<sup>23)</sup>。APP の過剰発現やノックアウトなど遺伝子操作を施した培養細胞や動物モデルを用いた実験結果に基づいて、A $\beta$  の脳内での異常重合、蓄積により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。一方で、この仮説に基づき A $\beta$  のワクチン療法治験が実施された。その結果、老人斑を取り去ることは成功したが、認知症状の進行を抑制することはできなかった<sup>24)</sup>。老人斑に蓄積する A $\beta$  は不溶性の線維状重合構造をとるが、不溶性線維状 A $\beta$  ではなく、可溶性 A $\beta$  凝集物 (A $\beta$  オリゴマー) のほうが強い細胞毒性をもつとされ、より重要であるという A $\beta$  オリゴマー仮説が提唱されている<sup>22)25)</sup>。

これまでの iPS 細胞を用いた AD 研究 (表①) について以下に述べる。われわれは、コントロールヒト iPS 細胞から大脳神経細胞を作製し、既存の薬剤に対する応答性を、A $\beta$  量を指標に詳細に解析した。A $\beta$  分泌量は  $\beta$  セクレターゼ阻害剤 ( $\beta$ -secretase inhibitor IV) で減少することが判明した。一方で、 $\gamma$  セクレターゼ阻害剤である  $\gamma$ -secretase inhibitor XXI / Compound E はある濃度で、予想とは逆に A $\beta$  分泌量は増加することが判明した。 $\gamma$  セクレターゼ修飾剤である sulindac sulfide は A $\beta$  分泌量を減少させるために、高濃度が必要であることが判明した<sup>26)</sup>。これら 3 種類の薬剤への応答性の結果は、実際の臨床試験

表① iPS細胞を用いたAD研究

患者	表現型	文献
—	A $\beta$ 産生 $\beta$ セクレターゼ阻害剤でA $\beta$ 産生量↓ $\gamma$ セクレターゼ阻害剤でA $\beta$ 産生量↑ NSAIDsでA $\beta$ 産生量↓ (高濃度必要)	26
<i>PSEN1</i> A246E <i>PSEN2</i> N141I	A $\beta$ 42/40 比↑	3
<i>APP</i> 重複 孤発例	A $\beta$ 40 ↑ リン酸化タウ (pT231) ↑ GSK-3 $\beta$ ↑	4
<i>APP</i> E693 $\Delta$ <i>APP</i> V717L 孤発例	細胞内A $\beta$ オリゴマー (E693 $\Delta$ , 孤発例) 細胞内A $\beta$ 42/40 比↑ (V717L) 小胞体ストレス, 酸化ストレス	2
<i>PSEN1</i> E9 $\Delta$	A $\beta$ 42/40 比↑ $\gamma$ セクレターゼ機能障害	28
<i>PSEN1</i> A79V <i>APP</i> K724N	A $\beta$ 42/40 比↑	27

の結果と相関している可能性がある。Mertens らも *APP* 遺伝子変異の家族性AD患者の線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、分化した神経を用いてNSAIDsの効果は乏しいことを示している<sup>27)</sup>。Yagi らは *PSEN1*, *PSEN2* 変異を有する患者からiPS細胞を樹立しA $\beta$  42/40 比が上昇していることを示した<sup>3)</sup>。Woodruff らはTAL effector nucleases (TALEN) によるゲノム改変技術を用い *PSEN1* 遺伝子を修復し、家族性EOADの原因である *PSEN1* 変異は、loss-of-function ではなく gain-of-function であることを示した<sup>28)</sup>。Israel らは *APP* 重複の家族性AD、孤発性ADからiPS細胞を樹立し、A $\beta$  40の上昇、リン酸化タウの上昇、GSK-3 $\beta$ の活性化を示した<sup>4)</sup>。一方、われわれは *APP* 変異を有する家族性ADおよび孤発性ADの患者からiPS細胞を樹立し、大脳神経細胞へ分化誘導し、解析を行った<sup>2)</sup>。

*APP* E693delta 変異を有する家族性AD患者由来神経細胞において、細胞外に分泌されるA $\beta$ は健常者由来の神経細胞に比べて有意に少なく、細胞質内にA $\beta$ オリゴマーの蓄積していることを見出した。細胞質内A $\beta$ オリゴマーの蓄積は78-kDa glucose-related protein (Bip/Grp78)の増加を伴う小胞体ストレス・酸化ストレス応答を惹起していた。さらに $\beta$ セクレターゼ阻害剤によって、A $\beta$ オリゴマーの蓄積が消失した。このこと

は、A $\beta$ オリゴマーというアルツハイマー病病態の中核となる物質を初めてヒト神経細胞内で捉えたとともに、それが細胞内で分解されることを示す結果であった。たいへん興味深いことに、大脳では加齢によって脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) が減少することが知られているが<sup>29)</sup>、加齢変化をシャーレの中で再現するために、培地からBDNFを含む栄養因子の除去をしたところ、*APP* E693delta 変異を有する家族性AD大脳神経細胞は細胞死を生じた。小胞体ストレスを指標とし、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) を培地に添加すると小胞体ストレスを緩和させ、細胞死を抑制することを発見した。さらに1人の孤発性AD患者由来神経細胞において、細胞質内A $\beta$ オリゴマーの蓄積および小胞体ストレス応答が生じていた。これまでAD患者の脳病理組織からBiP/Grp78といった小胞体シャペロンおよび細胞死に大きく関わる因子、CHOP (C/EBP-homologous protein) の発現上昇など、小胞体ストレスが生じている証拠がいくつも報告されている<sup>30)</sup>。また、細胞外から加えたA $\beta$ オリゴマーもN-methyl-D aspartate receptor (NMDA-R) に作用し、細胞質内のカルシウムの不均衡を生み出し小胞体ストレスを惹起するといわれている<sup>31)</sup>。さらに、小胞