

体ストレス応答はADに関連する遺伝子の発現やAPPの代謝に影響を及ぼす³²⁾³⁵⁾。以上のように、ADにおける小胞体ストレスの関与はこれまでも明らかにされてきていたが、AD患者iPS細胞の解析で見出したADにおける小胞体ストレス応答は、新たな知見をもたらした。

おわりに

患者iPS細胞を用いたADモデルにおいて、A β オリゴマーにより小胞体ストレス応答が生じ

ていること、 β セクレターゼ阻害剤によりA β オリゴマー蓄積が消失すること、DHAにより小胞体ストレス応答が抑制されることを見出した。A β オリゴマー蓄積とそれに伴う小胞体ストレス応答が可逆的であることは、生理的な条件での病態再現可能な患者iPS細胞を用いた疾患モデルならではのかもしれない。今後、患者iPS細胞を用いたADモデルのさらなる解析がAD治療法開発に寄与することを期待する。

参考文献

- 1) Takahashi K, et al : Cell 131, 861-872, 2007.
- 2) Kondo T, et al : Cell Stem Cell 12, 487-496, 2013.
- 3) Yagi T, et al : Hum Mol Genet 20, 4530-4539, 2011.
- 4) Israel MA, et al : Nature 482, 216-220, 2012.
- 5) Egawa N, et al : Sci Transl Med 4, 145ra104, 2012.
- 6) Sanchez-Danes A, et al : EMBO Mol Med 4, 380-395, 2012.
- 7) Marchetto MC, et al : Cell 143, 527-539, 2010.
- 8) HD iPSC Consortium : Cell Stem Cell 11, 264-278, 2012.
- 9) Brennand KJ, et al : Nature 473, 221-225, 2011.
- 10) Higurashi N, et al : Mol Brain 6, 19, 2013.
- 11) Liu GH, et al : Nature 491, 603-607, 2012.
- 12) An MC, et al : Cell Stem Cell 11, 253-263, 2012.
- 13) Kaufman RJ : Genes Dev 13, 1211-1233, 1999.
- 14) Kaufman RJ, et al : Nat Rev Mol Cell Biol 3, 411-421, 2002.
- 15) Alzheimer's Association : Alzheimers Dement 4, 110-133, 2008.
- 16) Ferri CP, et al : Lancet 366, 2112-2117, 2005.
- 17) Goate A, et al : Nature 349, 704-706, 1991.
- 18) Sherrington R, et al : Nature 375, 754-760, 1995.
- 19) Renbaum P, et al : Cell Mol Life Sci 54, 910-919, 1998.
- 20) Corder EH, et al : Science 261, 921-923, 1993.
- 21) Horsburgh K, et al : Neurobiol Aging 21, 245-255, 2000.
- 22) Haass C, et al : Nat Rev Mol Cell Biol 8, 101-112, 2007.
- 23) LaFerla FM, et al : Nat Rev Neurosci 8, 499-509, 2007.
- 24) Holmes C, et al : Lancet 372, 216-223, 2008.
- 25) Krafft GA, et al : Neuropharmacology 59, 230-242, 2010.
- 26) Yahata N, et al : PLoS One 6, e25788, 2011.
- 27) Mertens J, et al : Stem Cell Reports 1, 491-498, 2013.
- 28) Woodruff G, et al : Cell Rep 5, 974-985, 2013.
- 29) Katoh-Semba R, et al : Neurosci Res 31, 227-234, 1998.
- 30) Cornejo VH, Hetz C : Semin Immunopathol 35, 277-292, 2013.
- 31) Alberdi E, et al : Aging Cell 12, 292-302, 2013.
- 32) Uehara T, et al : Nature 441, 513-517, 2006.
- 33) O'Connor T, et al : Neuron 60, 988-1009, 2008.
- 34) Ohta K, et al : Biochem Biophys Res Commun 416, 362-366, 2011.
- 35) Mitsuda T, et al : Biochem Biophys Res Commun 352, 722-727, 2007.

村上永尚

2008年 徳島大学医学部医学科卒業

関西電力病院初期研修医

2010年 同神経内科後期研修医

2012年 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部感覚情報医学講座臨床神経科学分野博士課程

2013年 京都大学iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門特別研究学生

2. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

江川齊宏・井上治久

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、選択的な運動ニューロン変性の特徴とする神経疾患である。疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンを用いて研究が可能になり、ALS の病態を再現し、それらの表現型を改善する既存薬、あるいは新規の候補薬剤の効果を判定する試みが行われている。ALS を含め責任遺伝子に基づく病態が多岐で複雑である神経変性疾患に対して、これまで蓄積されている既知の病態機序を通して、あるいは疾患横断的なアプローチによって同定された新規の分子機序を通して、創薬研究の進展が期待される。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンが選択的に変性する神経変性疾患であり、全身の筋萎縮を伴う筋力低下を主徴とする。著名なフランスの神経学者 Charchot が 1869 年に初めて上記の臨床像と脊髄の側索部の変性の病理像を関連づけて ALS として報告した。しかしながら、いまだその治療法は確立されておらず、その予後は発症後 2～3 年と、最も致命的な神経難病疾患の 1 つである。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¹⁾。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。これまで、家族性 ALS の原因遺伝子として多くの遺伝子が同定され、その責任遺伝子の役割は抗酸化作用、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²⁾ (表 1)。また最近、欧米で孤発例の多くで 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、必ずしも翻訳される遺伝子領域の変異が ALS 病態の原因とは限らないことが明らかになった³⁾。以上のことから、ALS はゲノム DNA レベルでも不均一な疾患であり、個々の責任遺伝子が複雑に作用し、最終的に運動ニューロンの変性を引き起こしていると予想される。本稿では、個々の責任遺伝子の変異をもつ家族性 ALS、あるいは責任遺伝子をもたない孤発性 ALS 患者由来の iPS 細胞を用いた疾患再現の最新知見について紹介しながら、今後の iPS 細胞を用いた ALS に対する創薬の可能性と課題について述べていく。

I. ALS 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患再現の最新知見

1. Superoxide dismutase 1 (SOD1)

1993 年に SOD1 は初めて ALS の責任遺伝子として報告され⁴⁾、変異型 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。SOD1 は有害な活性酸素であるスーパーオキシドを解毒する反応系を触媒する抗

key words

ALS, iPS 細胞, 疾患再現, 創薬

表④ 家族性 ALS の原因遺伝子

種類	遺伝子	遺伝子座	遺伝形式	主なタンパクの機能	iPS 細胞を用いた表現型	文献
ALS1	<i>SOD1</i>	21q22	常染色体優性	抗酸化作用	SOD1 タンパク質発現量の増加	7, 8
ALS2	<i>ALS2</i>	2q33	常染色体劣性	タンパク輸送		
ALS3	未同定	18q21	常染色体優性			
ALS4	<i>SETX</i>	9q34	常染色体優性	DNA ダメージ応答		
ALS5	<i>SPG11</i>	15q21	常染色体劣性			
ALS6	<i>FUS</i>	16p11	常染色体優性	RNA 代謝		
ALS7	未同定	20p13	常染色体優性			
ALS8	<i>VAPB</i>	20q13	常染色体優性	小胞輸送	VAPB タンパク質発現量の低下	10
ALS9	<i>ANG</i>	14q11	常染色体優性	血管新生		
ALS10	<i>TARDBP</i>	1p36	常染色体優性	RNA 代謝	TDP-43 タンパク質発現量の増加	16, 17
ALS11	<i>FIG4</i>	6q21	常染色体優性	小胞輸送		
ALS12	<i>OPTN</i>	10p13	常染色体優性	NF κ B 制御		
ALS13	<i>ATXN2</i>	12q24	常染色体優性			
ALS14	<i>VCP</i>	9p13	常染色体優性	タンパク分解		
ALS15	<i>UBQLN2</i>	Xp11	伴性優性	タンパク分解		
ALS16	<i>SIGMAR1</i>	9p13	常染色体劣性	タンパク折りたたみ		
ALS17	<i>CHMP2B</i>	3p11		細胞骨格		
ALS18	<i>PFN1</i>	17p13	常染色体優性			
	<i>C9orf72</i>	9p21	孤発性		GGGGCC RNA foci 数の増加	20

酸化酵素である。このマウスを用いた研究によって、運動ニューロンをとりまくグリア細胞¹⁾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出され、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 (noncell-autonomous effect) が提唱された⁵⁾。さらに、マウス胚性幹細胞由来の変異型 SOD1 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ち、運動ニューロン死を引き起こすことが報告された⁶⁾。これは、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、個別に ALS の病態に寄与している可能性を示している。Yao らは、変異型 SOD1 (G93A) マウス由来の iPS 細胞を樹立し、それらから分化誘導した運動ニューロンではヒト SOD1 の発現量が増加し、神経突起が短いことを報告している⁷⁾。さらに Yang らは、低分子化合物ライブラリーから見出したケンパウロンがヒト SOD1 の発現量を低下させること、変異型 SOD1 (G93A) マウス、あるいは変異型 SOD1 (L114F) を有する ALS 患者由来の運動ニューロンの生存に寄与し、治療薬シーズの可能性のあることを報

告している⁸⁾。

2. Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB)

2004 年に南米ブラジルの家系から報告され、その後小胞体膜に存在して、小胞体における合成タンパクの折りたたみに関連していると考えられている⁹⁾。Mitne-Neto らは、変異型 VAPB (P56S) を有する ALS 患者由来の iPS 細胞を樹立し、分化誘導した運動ニューロンを含む細胞群において VAPB タンパク質量が低下していることを報告している¹⁰⁾。

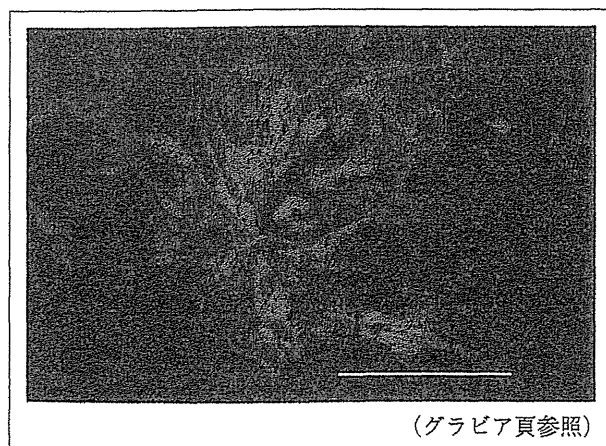
3. TAR DNA binding protein (TARDBP, TDP-43)

2006 年に Neumann ら、Arai らは、前頭側頭葉変性症と孤発性 ALS のユビキチン陽性封入体の主要構成成分が TDP-43 タンパクであることを報告した¹¹⁾¹²⁾。その後 Kabashi らが、TDP-43 遺伝子変異をもつ家族性 ALS の家系を報告し、TDP-43 が家族性 ALS の責任遺伝子の 1 つであることを見出した¹³⁾。TDP-43 は、RNA に結合するタンパクであり、RNA 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¹⁴⁾。また、その後の細胞やモデル動物の研究から、変異型 TDP-43

はタンパク質として野生型と比較して可溶性が低下し、通常存在する核から細胞質に異所性に局在する性質をもつこと、*TDP-43* 遺伝子変異を有する ALS のゼブラフィッシュモデルでは、神経突起、神経分岐の異常が指摘されている¹⁵⁾。最近、われわれと Bilican らは、変異型 *TDP-43* の家族性 ALS 由来の iPS 細胞を樹立して、分化誘導した運動ニューロンを含む細胞群において *TDP-43* タンパク質量が増加していること、運動ニューロンそのものが脆弱であることを示し、既知の病態の一部を再現した(図①)¹⁶⁾¹⁷⁾。さらにわれわれは、ALS 運動ニューロンにおいて、神経突起や RNA 代謝に関連する機能が低下していること、アナカルジン酸が *TDP-43* の発現を低下させ、神経突起の伸長とともに運動ニューロンの脆弱性を改善させることを示した。変異型 *TDP-43* を有する ALS 患者 iPS 細胞由来のアストロサイトに着目した研究もなされている。変異型 *TDP-43* を有するアストロサイトを、コントロール由来の運動ニューロンと共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* を有するアストロサイトは運動ニューロンに対しては毒性をもたないことが報告された¹⁸⁾。興味深いことに、この報告では変異型 *TDP-43* を有するアストロサイト自体の細胞死を観察している。これは、すなわち *SOD1* と *TDP-43* の異なる原因遺伝子間では、アストロサイトが運動ニューロンへ与える毒性の機序が異なることを示しており、ALS の発症メカニズムは家族性 ALS の原因遺伝子間においても不均一である可能性を示唆している。

4. *C9orf72*

2011 年に家族性・孤発性の ALS と前頭側頭葉変性症において、*C9orf72* 遺伝子のプロモーター領域の 6 塩基の反復配列 GGGGCC (以下 C9) がヘテロに高頻度に同定された³⁾。*C9orf72* の機能についてはわかっておらず、その後の研究から、非翻訳領域の GGGGCC 領域からの RNA 合成、non-ATG のタンパクが翻訳され、細胞内に蓄積することから、それらが細胞毒性を獲得する可能性が指摘されている¹⁹⁾。Sareen らは、C9 を有する ALS 患者由来の iPS 細胞を樹立して、分化誘



図① GFP 発現レンチウイルスベクターで標識された運動ニューロン

スケールバー 100 μ m

導した運動ニューロンの核内において GGGGCC RNA foci (点状構造物) の数が多く存在することを示した²⁰⁾。さらに、膜興奮性に関わる遺伝子発現の変化とともに脱分極時の興奮性の低下を認めた。*C9orf72* 遺伝子をターゲットにしたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いると、運動ニューロン核内の GGGGCC RNA foci の数を減少させ、膜興奮性関連の遺伝子発現異常を改善させることを報告している。本邦における孤発性 ALS では *C9orf72* の症例が少ないことから、人種間で ALS の遺伝的背景が異なると考えられる²¹⁾。

5. 孤発性 ALS

責任遺伝子の変異を有さない約 90% の孤発性 ALS に対する創薬応用の試みも行われている。Barkhardt らは、10 名の健常者、8 例の家族性 ALS (変異型 *SOD1*, *TDP-43* と *FUS* を含む) と 16 例の孤発性 ALS 患者から合計 92 ラインの iPS 細胞を樹立して、その解析を行っている²²⁾。彼らは、そのうちの 3 例の孤発性 ALS 由来の複数の iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンの核内に *TDP-43* 陽性の凝集体が数多く存在することを確認した。さらに FDA 承認の低分子化合物の中から、ジゴキシンを含む複数の化合物が細胞死を起こさずに、*TDP-43* 陽性の凝集体の数を減少させることを報告している。

Ⅱ. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた ALS への創薬応用の可能性と課題

以上のように、原因遺伝子の変異をもつ ALS 由来の iPS 細胞を樹立し、それらから運動ニューロンへ分化誘導することによって、各々の変異遺伝子に関連した既知の病態の一部を再現すること、それらに基づいて創薬スクリーニングが可能であることが示された。すなわち、責任遺伝子に関連する変異型タンパク質、RNA の量や細胞死の程度を定量化して、創薬スクリーニングの系を構築し、定量化された指標を制御することができる治療薬のシーズを低分子化合物ライブラリーから見出すことができると期待される。しかしながら、ある特定の責任遺伝子変異をもつ家族性 ALS 由来の iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングの系を他の家族性 ALS や約 90% を占める孤発例へ汎用できるか、かつ有用であるかについては

十分な検討が必要である。以下、疾患特異的 iPS 細胞を用いて ALS の創薬研究を考えるうえで、今後克服すべき課題とそれに対するアプローチについて述べる。

1. iPS 細胞株 (クローン) の選択

同じヒト由来から樹立された iPS 細胞のクローン間においても、分化誘導効率など表現型のばらつきが認められる。このクローン間のばらつき (ノイズ) のため、重要な表現型が隠されてしまう可能性が生じる。今後は、TALEN (transcription activator-like effector nucleases) や CRISPR/Cas (casclustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) システムなどを用いて²³⁾、isogenic control を作製し解析に用いることで、ノイズの軽減が可能になるかもしれない。

2. 分化誘導するサブタイプを選択

治療標的に合わせて、例えばアストロサイトやニューロンなど神経幹細胞から分化する細胞の種

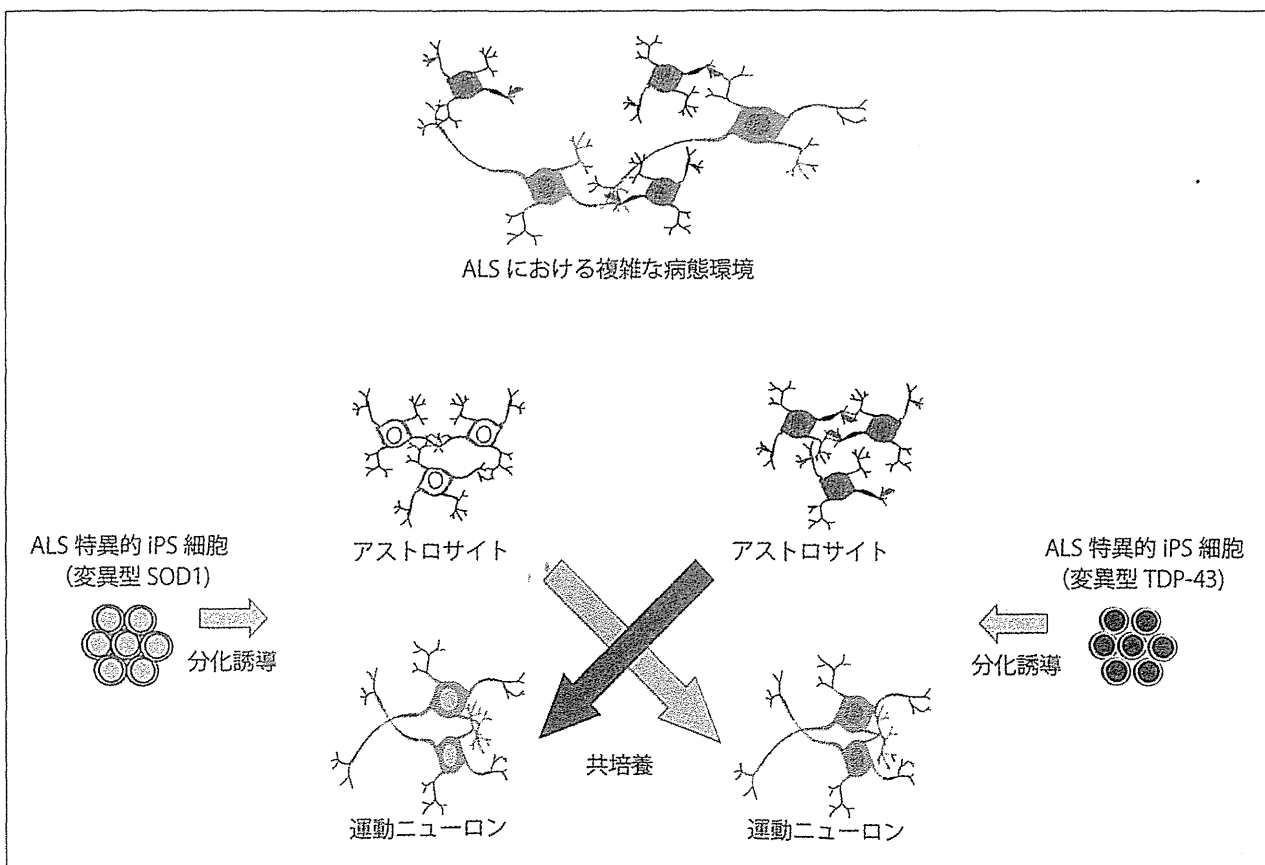


図2 iPS 細胞を用いた異なる原因遺伝子をもつニューロン-グリア間の相互作用の検討

類（サブタイプ）の選択が必要である。他の細胞の混在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、サブタイプの特徴を異なる遺伝子間での比較や、前述のように変異型タンパク質をもつアストロサイトと正常ニューロンとの共培養など、異なる遺伝子をもつ異なるサブタイプの細胞間の相互作用の検討などによって、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（図②）。

3. 病態再現（既知の表現型抽出）

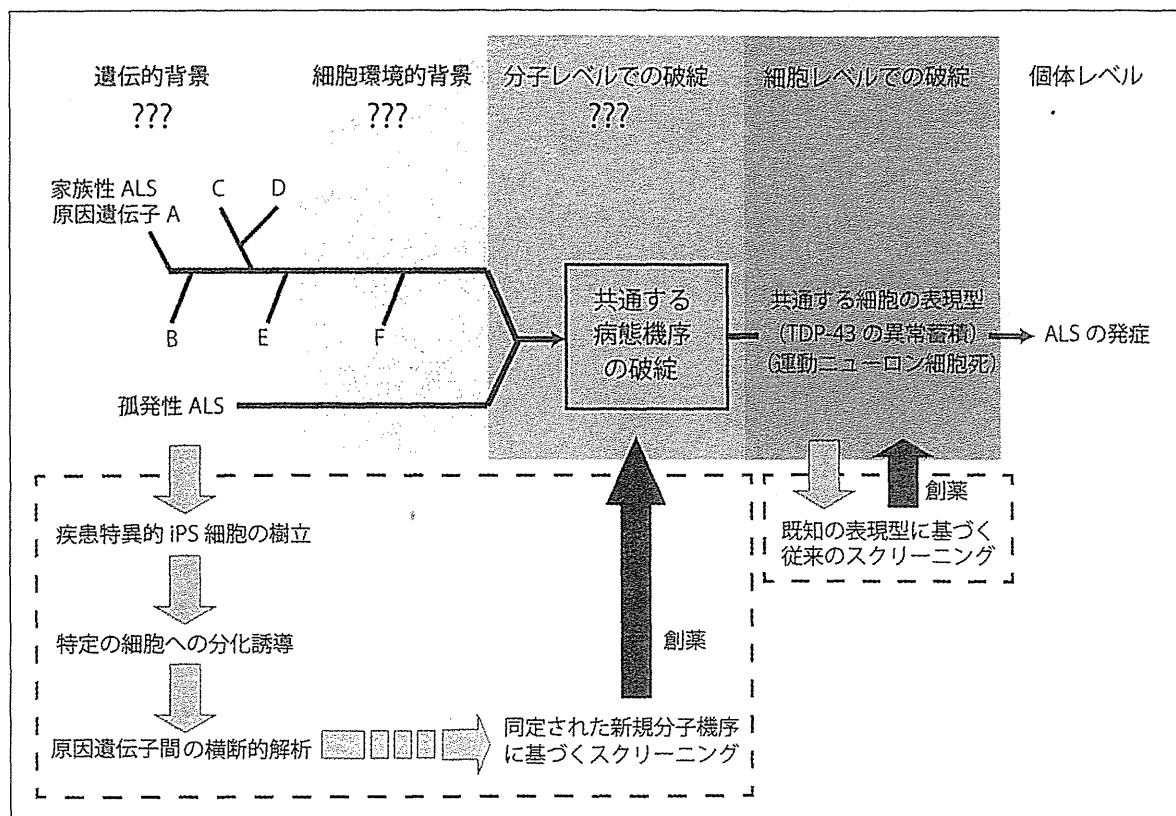
すべての家族性 ALS、孤発性 ALS で共通する病態であることが望ましい。ALS の大部分、前頭側頭葉変性症の約半数に観察される TDP-43 のタンパク質蓄積や運動ニューロンの選択的細胞死がその対象になると考えられる。

4. 創薬スクリーニング系の構築

ある薬剤候補が、ある特定の変異をもつ 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、分子レベルや個体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、他の遺伝子変異をもつ家族性 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。また、細胞レベル・個体レベルの変化より早い分子レベルでの病態機序をとらえて改善することが、根本的な早期治療において重要であることは言うまでもない。

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。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



図③ 疾患特異的 iPS 細胞由来の運動ニューロンを用いた創薬スクリーニング系の構築

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に解析することによって、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③)。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。

おわりに

発症機序が多岐・複雑である神経変性疾患に対して特異的 iPS 細胞を用いた新たな病態解明へのアプローチが期待される。それは、ニューロングリア細胞間の病態機序を明確にすること、あるいは孤発例を含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。

第2章

神経・筋疾患

用語解説

1. グリア細胞 (神経膠細胞) : 神経系を構成する細胞の中で神経細胞 (ニューロン) 以外の細胞を示し、中枢神経においては、主にアストロサイト (星状膠細胞)、オリゴデンドロサイト (乏突起膠細胞)、ミクログリ

ア (小膠細胞) によって構成されている。神経細胞を物理的に支持する細胞であると同時に、中枢神経における免疫機能、シグナル伝達の機能制御、ニューロンへの栄養因子の提供など重要な役割を果たしている。

参考文献

- 1) Logroscino G, et al : J Neurol Neurosurg Psychiatry 79, 6-11, 2008.
- 2) Turner MR, et al : Lancet Neurol 12, 310-322, 2013.
- 3) Renton AE, et al : Neuron 72, 257-268, 2011.
- 4) Rosen DR, et al : Nature 362, 59-62, 1993.
- 5) Yamanaka K, et al : Nat Neurosci 11, 251-253, 2008.
- 6) Haidet-Phillips AM, et al : Nat Biotechnol 29, 824-828, 2011.
- 7) Yao XL, et al : PLoS One 8, e64720, 2013.
- 8) Yang YM, et al : Cell Stem Cell 12, 713-726, 2013.
- 9) Nishimura AL, et al : Am J Hum Genet 75, 822-831, 2004.
- 10) Mitne-Neto M, et al : Hum Mol Genet 20, 3642-3652, 2011.
- 11) Arai T, et al : Biochem Biophys Res Commun 351, 602-611, 2006.
- 12) Neumann M, et al : Science 314, 130-133, 2006.
- 13) Kabashi E, et al : Nat Genet 40, 572-574, 2008.
- 14) Lagier-Tourenne C, et al : Hum Mol Genet 19, R46-64, 2010.
- 15) Kabashi E, et al : Hum Mol Genet 19, 671-683, 2010.
- 16) Egawa N, et al : Sci Transl Med 4, 145ra104, 2012.
- 17) Bilican B, et al : Proc Natl Acad Sci USA 109, 5803-5808, 2012.
- 18) Serio A, et al : Proc Natl Acad Sci USA 110, 4697-4702, 2013.
- 19) Lee YB, et al : Cell Rep 5, 1178-1186, 2013.
- 20) Sareen D, et al : Sci Transl Med 5, 208ra149, 2013.
- 21) Konno T, et al : J Neurol Neurosurg Psychiatry 84, 398-401, 2013.
- 22) Burkhardt MF, et al : Mol Cell Neurosci 56, 355-364, 2013.
- 23) Sandoe J, Eggan K : Nat Neurosci 16, 780-789, 2013.

江川 齊宏

2001 年 京都大学医学部医学研究科卒業

2010 年 同大学院医学研究科博士課程修了

京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門

幹細胞研究と神経変性

大原 亮^{a)} 水野敏樹^{b)} 中川正法^{c)} 井上治久^{d)}

a) OHARA Ryo/京都大学 iPS 細胞研究所, 京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学

b) MIZUNO Toshiki/京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学

c) NAKAGAWA Masanori/京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学, 京都府立医科大学附属北部医療センター

d) INOUE Haruhisa/京都大学 iPS 細胞研究所, JST CREST

2006年, ES細胞と同様に多分化能を持つ人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells:iPS細胞)とその作製技術が発見されて以来, 患者自身の iPS 細胞による, 神経変性疾患病態モデル研究が多数報告されている。これまで困難であった患者自身の中枢神経などの疾患細胞を得ることが可能となり, 神経変性疾患の病態解明, 創薬研究において非常に有用なツールとして期待される。

はじめに

1 iPS細胞技術の歴史

2006年にマウス¹⁾, 2007年にヒト²⁾

で, 胚性幹細胞(embryonic stem cells:ES細胞)に発現する遺伝子 *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の皮膚線維芽細胞への導入によって, ES細胞と同様に, 無限に増殖し, 多分化能を有する人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells:iPS細胞)が誕生した。iPS細胞を経ることにより, 患者自身の中枢神経系の細胞を得ることが可能となり, 患者 iPS細胞は神経変性疾患の病態解明, 創薬研究において新たな疾患解析ツールとして期待されている。本稿では, 現在までの iPS細胞とその作製技術を用いた神経変性疾患研究を紹介し, 今後の展望, 可能性について述べる。

1998年にヒト胚盤胞の内部細胞塊より, 多分化能を有し, かつ無限に増殖するヒト ES細胞が初めて樹立された³⁾。ES細胞はさまざまな細胞, 組織に分化誘導させることができ, 神経細胞など, これまでヒトの生体から得ることが困難であった試料を得ることが可能となった。これにより, 従来治療困難であった難治性疾患が将来的に治療可能になることが期待された。しかし, ES細胞は受精卵から作製すること, 移植においては拒絶反応を生じ得る, という課題を有していた。山中伸弥博士らは, 2006年にマウス¹⁾, 2007年にヒトで²⁾, ES細胞に発現している4つの遺伝子 *Oct3/4* (POU domain, class5, transcription factor 1: Pou5f1), *Sox2* (SRY-related HMG box 2), *c-Myc*, *Klf4* (Krüppel-like

words

細胞
変性疾患
解明
研究

family of transcription factor 4) を体細胞に導入することで、ES 細胞のように無限に増殖し、多分化能を有する iPS 細胞を樹立した。また、ES 細胞研究で確立されていた神経細胞、心筋細胞などさまざまな細胞への分化誘導方法が、iPS 細胞にも適用できることが判明した²⁾。脳、脊髄などの中枢神経は一般に再生が困難であり、剖検例のサンプル以外に患者自身の神経系細胞は入手困難で、神経変性疾患研究において疾患に罹患する細胞の入手は大きな障壁であった。そのため、神経変性疾患の生化学的研究においては、従来、細胞株・動物モデルを用いた病態解析が行われてきたが、必ずしも神経変性疾患の病態を反映していない場合があることが知られている⁴⁾。神経変性疾患の患者自身の体細胞から作製した iPS 細胞由来の神経系細胞を用いることで、患者の遺伝情報を有した神経

細胞を用いた病態解析が可能となった。このように、iPS 細胞とその作製技術は、神経変性疾患の病態解明、創薬研究、再生医療への重要なツールとして期待されている(図 1)。

神経分化誘導

神経変性疾患病態を培養皿の中で再現するには、各疾患における病変部位となる標的細胞への iPS 細胞からの分化誘導法の確立が重要である。以前から PA6 細胞などのストローマ細胞(骨髄支持細胞)との共培養⁵⁾や、胚様体(embryoid body: EB)と呼ばれる凝集体から、ES 細胞を用いたさまざまな種類の神経細胞への分化誘導法がある^{6,7)}。さらに、フィーダーを用いない feeder-free 培養で、骨形成蛋白質(bone morphogenetic protein: BMP)

シグナルの抑制因子である Noggin や SB431542 を用いることにより、ES 細胞や iPS 細胞からより効率的に神経前駆細胞へ分化誘導できる⁸⁾。現在、より簡便で高効率な神経分化誘導法の開発が進んでいる。また、各疾患の標的細胞への分化については、レチノイン酸や sonic hedgehog (Shh) の添加により、神経前駆細胞から脊髄運動神経細胞⁹⁾、Shh や Wnt8 の添加により中脳ドパミン神経細胞¹⁰⁾へ、そのほか、前脳型コリン作動性神経細胞¹¹⁾、神経堤細胞¹²⁾、アストロサイト¹³⁾、オリゴデンドロサイト¹⁴⁾などへの分化が報告されている。このように、さまざまな種類の神経系細胞への分化誘導法が確立され、培養皿の中で神経変性疾患病態を再現する疾患モデルが構築されるようになった。

患者 iPS 細胞を用いた神経変性疾患病態モデル

2007 年にヒト iPS 細胞樹立の報告がされた後、2008 年に Dimos らによって、初めて患者由来 iPS 細胞が樹立された。彼らは、*SOD1* (Cu/Zn superoxide dismutase) 変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の患者の皮膚線維芽細胞から、患者自身の遺伝情報を保持した iPS 細胞を樹立し、運動神経細胞へ分化誘導した¹⁵⁾。また同年、Park らは孤発性パーキンソン病、Duchenne 型・Becker 型筋ジストロフィー、ハンチントン病などの多種の患者由来 iPS 細胞を樹立した¹⁶⁾。

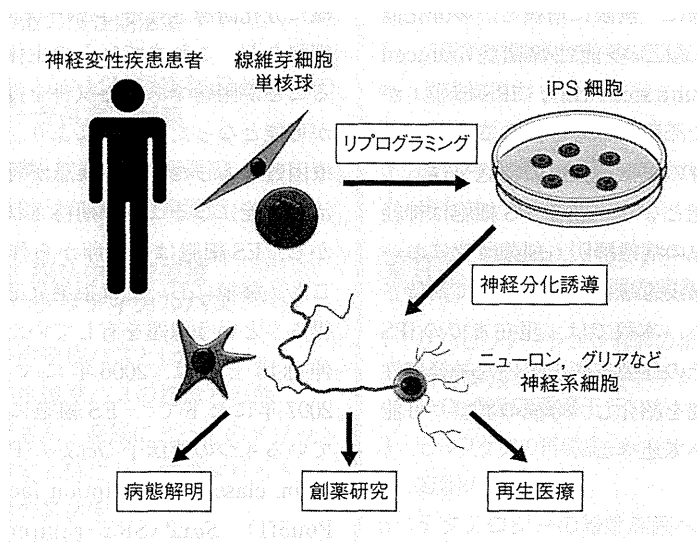


図 1 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究

その後、2009年にEbertらは、遺伝性神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy:SMA)の患者からiPS細胞を作製し、運動神経細胞に分化し、その表現型を解析し、iPS細胞を用いた初めての薬剤効果評価系を示した¹⁷⁾。彼らは、*SMN1*遺伝子異常が原因であるSMA患者由来のiPS細胞ではSMN(survival motor neuron)蛋白質の低下を、また分化誘導した運動神経細胞では、運動神経細胞の数が減少し、その細胞体サイズが小さいこと、バルプロ酸の投与により回復することを示した。この結果から、患者由来iPS細胞がこれまで採取困難であった難治性神経疾患患者自身の生体試料として、難治性疾患の病態解明、薬効評価に有用なツールになり得ることが初めて示された。

その後、さまざまな神経変性疾患で患者由来iPS細胞を用いた研究結果が報告されている。これまで、アルツハイマー病、ALS、パーキンソン病、SMA、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、Rett症候群、ダウン症候群、統合失調症、Dravet症候群、Cockayne症候群、脆弱X症候群、家族性自律神経失調症、Machado-Joseph病、副腎白質ジストロフィーなどが報告されている(表1)。これらのうち代表的なALS、アルツハイマー病、パーキンソン病に関する研究について述べる。

1. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)

2011年にNetoらが、*VAPB*(vesicle-associated membrane protein-associated protein B)遺伝子変異の家族

性ALSの患者由来のiPS細胞を樹立し、運動神経細胞に分化誘導し、運動神経細胞を含む細胞群で*VAPB*の発現低下を確認した¹⁸⁾。2012年、われわれやBilicanらが*TDP-43*(transactive response DNA binding protein 43kDa)遺伝子変異のALS患者由来のiPS細胞を樹立し、運動神経細胞を分化誘導し、培養皿の中で病態再現を行った¹⁹⁾²⁰⁾。われわれは、異なる3種類の*TDP-43*変異を有する3名のALS患者からiPS細胞を作製したところ、ALS iPS細胞の運動神経細胞への分化能力の低下は認めなかったが、フローサイトメトリーを用いて純化したALS iPS細胞由来運動神経細胞(ALS運動神経細胞)は、形態学的に神経突起が短縮することを示した。また、ALS運動神経細胞では細胞骨格に関する遺伝子群の発現低下、RNA代謝に関する遺伝子群の発現上昇を認めた。さらにアナカルジン酸の投与により、いくつかの表現型が改善した。生化学的にはALSでは不溶性*TDP-43*量が増加し、ハイコンテントアナリシスで細胞質内での*TDP-43*の凝集体の数の増加を見出した。

AlamiらはALS運動神経細胞を用い、*TDP-43*がmRNP(messenger ribonucleoprotein)顆粒を形成し、微小管依存性の軸索輸送により特定のmRNAを軸索遠位部に運搬することを示した。また、異なる3種類の*TDP-43*変異を有する3名のALS患者からiPS細胞を樹立し、運動神経細胞へ分化誘導を行い、健常者運動神経細胞と比べ、mRNAの順行性軸索輸

送が障害されることを示した。この結果から*TDP-43*によるmRNAの軸索輸送障害がALS発症の一因である可能性が考えられた²¹⁾。

また、Kiskinisらは、遺伝子修復技術やRNAシーケンスなどの新たな技術を用い、*SOD1*変異を有する家族性ALS運動神経細胞の詳細な解析を行った²²⁾。この実験においては、コントロールと比較し、*SOD1*変異を有するALS運動神経細胞は細胞死を生じやすいこと、細胞体サイズが小さいこと、プロテアソーム阻害薬であるMG132投与下で不溶性*SOD1*を認めること、免疫染色で*SOD1*の凝集物が観察されることが示された。

さらに、RNAシーケンス解析で、細胞骨格、転写調節、モーター蛋白に関連する遺伝子群の発現上昇、またミトコンドリア機能および形態、蛋白翻訳に関連する遺伝子群の発現低下が認められた。小胞体ストレス応答(unfolded protein response:UPR)の経路であるpEIF2 α (phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2 subunit α)やXBP1(X-box binding protein 1)の発現が*SOD1*変異運動神経細胞では有意に上昇しており、小胞体ストレスが*SOD1*変異ALSの病態の一因である可能性が示された。また、Waingerらは、*SOD1*変異を有するALS運動神経細胞では電気生理学的な興奮性が亢進している²³⁾ことを明らかにした。これらの結果から、*SOD1*変異ALSの病態として、小胞体ストレスによりUPRが活性化し、細胞死が生じ、また小胞体ストレ

表1 患者 iPS 細胞を用いた神経変性疾患関連モデル研究

疾患	原因遺伝子	表現型	文献
アルツハイマー病	<i>APP</i> 孤発例	細胞内 A β オリゴマー蓄積 $\uparrow$, 細胞外 A β 42/40 $\uparrow$ 小胞体ストレス $\uparrow$ ・酸化ストレス $\uparrow$ 神経細胞死	Kondo T et al : Cell Stem Cell 12 : 487-496, 2013
アルツハイマー病	<i>APP</i> 孤発例	細胞外 A β 40 $\uparrow$ タウリン酸化 $\uparrow$ GSK-3 β 活性化	Israeal MA et al : Nature 482 : 216-220, 2012
アルツハイマー病	<i>PS1 PS2</i>	細胞外 A β 42/40 $\uparrow$	Yagi T et al : Hum Mol Genet 20 : 4530-4539, 2011
ダウン症候群	<i>Trisomy 21</i>	細胞外 A β 42/40 $\uparrow$ 線維状 A β 沈着 タウリン酸化 $\uparrow$	Shi Y et al : Sci Transl Med 4 : 124ra29, 2012
ダウン症候群	<i>Trisomy 21</i>	大脳皮質神経細胞でシナプス活動性 $\downarrow$	Weick JP et al : Proc Natl Acad Sci U S A 110 : 9962-9967, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>SOD1 C9orf72</i>	運動神経細胞細胞体の小型化 細胞死 $\uparrow$ SOD1 凝集 $\uparrow$ 細胞骨格, 転写調節, モーター蛋白関連遺伝子発現 $\uparrow$, ミトコンドリア形態・機能, 蛋白翻訳関連遺伝子発現 $\downarrow$ 小胞体ストレス $\uparrow$ UPR 活性化(リン酸化 ELF2 α $\uparrow$, XBP1 $\uparrow$)	Kiskinis E et al : Cell Stem Cell 14 : 781-795, 2014
筋萎縮性側索硬化症	<i>TDP-43</i>	TDP-43 による mRNA 軸索輸送障害	Alami NH et al : Neuron 81 : 536-543, 2014
筋萎縮性側索硬化症	<i>SOD1</i>	運動神経細胞での電気生理学的興奮性 $\uparrow$	Wainger BJ et al : Cell Rep 7 : 1-11, 2014
筋萎縮性側索硬化症	<i>TDP-43</i>	TDP-43 凝集体数 $\uparrow$, TDP-43 不溶性 $\uparrow$ 運動神経細胞神経突起の短縮, 運動神経細胞脆弱性 $\uparrow$	Egawa N et al : Sci Transl Med 4 : 145ra104, 2012
筋萎縮性側索硬化症	<i>TDP-43</i>	TDP-43 不溶性 $\uparrow$ 神経細胞死	Bilican B et al : Proc Natl Acad Sci U S A 109 : 5803-5808, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>TDP-43</i>	TDP-43 不溶性 $\uparrow$ アストロサイト細胞死	Serio A et al : Proc Natl Acad Sci U S A 110 : 4697-4702, 2013
筋萎縮性側索硬化症	孤発性	運動神経細胞・大脳皮質神経細胞で TDP-43 核内凝集体	Burkhardt MF et al : Mol Cell Neurosci 56 : 355-364, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>SOD1</i>	樹立のみ	Dimos JT et al : Science 321 : 1218-1221, 2008
筋萎縮性側索硬化症	<i>C9orf72</i>	運動神経細胞細胞質内に GGGGCC の反復配列を持つ RNA 凝集物 細胞質内に repeat-associated non-ATG initiated translation (RAN) 翻訳産物 p62 の活性 $\uparrow$, オートファジー阻害薬による細胞ストレス過敏性の亢進	Almeida S et al : Acta Neuropathol 126 : 385-399, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>C9orf72</i>	運動神経細胞細胞質内に GGGGCC の反復配列を持つ RNA 凝集物 細胞質内に RAN 翻訳産物 ADARB2 が RNA 凝集物に結合 反復配列に対するアンチセンスオリゴにより運動神経細胞のグルタミン脆弱性 $\downarrow$	Donnelly CJ et al : Neuron 80 : 415-428, 2013
筋萎縮性側索硬化症	<i>C9orf72</i>	運動神経細胞細胞質内に GGGGCC の反復配列を持つ RNA 凝集物 DPP6 など膜興奮性に関する遺伝子群の発現が変化 持続性 spike 発火 $\downarrow$ 反復配列に対するアンチセンスオリゴにより表現型が改善	Sareen D et al : Sci Transl Med 5 : 208ra149, 2013
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i>	運動神経細胞誘導効率低下 神経細胞体の小型化	Ebert AD et al : Nature 457 : 277-280, 2009
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i>	運動神経細胞細胞体の小型化 神経突起の短縮, 細胞数の減少 神経細胞死 $\uparrow$	Sareen D et al : PLoS One 7 : e39113, 2012

疾患	原因遺伝子	表現型	文献
球脊髄性筋萎縮症	<i>androgen receptor</i> <i>CAG repeat</i>	アンドロゲン受容体凝集亢進 (dihydrotestosterone 負荷時)	Nihei Y et al : J Biol Chem 288 : 8043-8052, 2013
パーキンソン病	<i>LRRK2</i> 孤発例	α -シヌクレインの蓄積 $\uparrow$, 神経突起の短縮, 活性型カスパーゼ3 $\uparrow$, オートファジークリアランスの障害	Sánchez-Danés A et al : EMBO Mol Med 4 : 380-395, 2012
パーキンソン病	<i>PINK1</i> <i>Parkin</i>	プロジェリン強制発現により細胞死 $\uparrow$, 神経突起の短縮化, リン酸化 Akt $\downarrow$	Miller JD et al : Cell Stem Cell 13 : 691-705, 2013
パーキンソン病	<i>SNCA</i>	細胞内・外で α -シヌクレイン $\uparrow$	Devine MJ et al : Nat Commun 2 : 440, 2011
パーキンソン病	<i>SNCA</i>	α -シヌクレイン $\uparrow$ H ₂ O ₂ 負荷時 活性型カスパーゼ3 $\uparrow$	Byers B et al : PLoS One 6 : e26159, 2011
パーキンソン病	<i>Parkin</i>	酸化ストレス $\uparrow$ ドパミン放出 $\uparrow$ 取り込み $\downarrow$	Jiang H et al : Nat Commun 3 : 668, 2012
パーキンソン病	<i>Parkin</i>	α -シヌクレインの蓄積 酸化ストレス $\uparrow$ ミトコンドリア形態異常 ミトコンドリア恒常性の障害	Imaizumi Y et al : Mol Brain 5 : 35, 2012
パーキンソン病	<i>PINK1</i>	<i>Parkin</i> のミトコンドリア局在変化 ミトコンドリアコピー数 $\uparrow$ PGC1- α の発現 $\uparrow$	Seibler P et al : J Neurosci 31 : 5970-5976, 2011
パーキンソン病	<i>PINK1</i>	バリノマイシン誘発性 マイトファジー障害	Rakovic A et al : J Biol Chem 288 : 2223-2237, 2013
パーキンソン病	<i>PINK1</i> <i>LRRK2</i>	ROS $\uparrow$ (バリノマイシン投与時) ミトコンドリア呼吸機能異常 ミトコンドリアプロトンリーク $\uparrow$ (<i>PINK1</i> 変異) ミトコンドリア軸索輸送障害 (<i>LRRK2</i> 変異)	Cooper O et al : Sci Transl Med 4 : 141ra90, 2012
パーキンソン病	<i>LRRK2</i>	神経突起の短縮 α -シヌクレイン $\uparrow$ タウ $\uparrow$ リン酸化 ERK $\uparrow$ 活性型カスパーゼ3 $\uparrow$ (6-OHDA, ロテノン負荷時)	Reinhardt P et al : Cell Stem Cell 12 : 354-367, 2013
副腎白質ジストロフィー	<i>ABCD1</i>	オリゴデンドロサイトで極長鎖脂肪酸 $\uparrow$	Jang J et al : Ann Neurol 70 : 402-409, 2011
家族性自律神経失調症	<i>IKBKAP</i>	神経堤細胞でスプライシング変化 遊走能低下	Lee G et al : Nature 461 : 402-406, 2009
家族性自律神経失調症	<i>IKBKAP</i>	<i>IKBKAP</i> 発現低下	Lee G et al : Nat Biotechnol 30 : 1244-1248, 2012
ハンチントン病	<i>Huntingtin</i> <i>CAG repeat</i>	細胞死 $\uparrow$	Zhang N et al : PLoS Curr 2 : RRN1193, 2010
ハンチントン病	<i>Huntingtin</i> <i>CAG repeat</i>	ライソソーム活性 $\uparrow$	Camnasio S et al : Neurobiol Dis 46 : 41-51, 2012
ハンチントン病	<i>Huntingtin</i> <i>CAG repeat</i>	活性型カスパーゼ3 $\uparrow$ ミトコンドリア最大呼吸 $\uparrow$ 細胞死 $\uparrow$ (神経栄養因子除去)	An MC et al : Cell Stem Cell 11 : 253-263, 2012
ハンチントン病	<i>Huntingtin</i> <i>CAG repeat</i>	リピート数の増加で細胞死 $\uparrow$ 活性型カスパーゼ3 $\uparrow$ (神経栄養因子除去)	The HD iPSC Consortium : Cell Stem Cell 11 : 264-278, 2012
マジャド・ジョセフ病	<i>ATXN3</i> <i>CAG repeat</i>	<i>ATXN3</i> 不溶性凝集 (グルタミン酸刺激過剰興奮時)	Koch P et al : Nature 480 : 543-546, 2011
コケイン症候群	<i>ERCC6</i>	iPS 細胞で ROS 産生 $\uparrow$, 細胞死 $\uparrow$	Andrade LN et al : Hum Mol Genet 21 : 3825-3834, 2012
ドラベ症候群	<i>SCN1A</i>	GABA 神経発火頻度低下	Higurashi N et al : Mol Brain 6 : 19, 2013
脆弱 X 症候群	<i>FMR1</i> <i>CGG repeat</i>	<i>FMR1</i> 遺伝子座メチル化 <i>FMR1</i> 発現 $\downarrow$ 神経突起の短縮	Sheridan SD et al : PLoS One 6 : e26203, 2011

スにより運動神経の電気生理学的な興奮性が亢進することを示した。さらに *C9orf72* (chromosome 9 open reading frame 72) リピート伸長を有する家族性 ALS 運動神経細胞においても、*SOD1* 変異 ALS 運動神経細胞と、部分的に同様の遺伝子群の発現変化が共通して認められ、ALS 全般に共通する病態メカニズムがある可能性を示した。

2. アルツハイマー病

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) の病理学的特徴である老人斑の主成分であるアミロイド前駆蛋白 (amyloid precursor protein : APP) から 2 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 : A β) の沈着が、神経細胞死を引き起こすと考えられる「アミロイドカスケード仮説」が AD の病態メカニズムとして知られている。また、AD のバイオマーカーの研究により、A β が認知症を発症する数十年前から髄液中で、15 年前から脳内で蓄積し始めていることが明らかにされている²⁴⁾。それゆえ、発症前の神経細胞を解析できる患者 iPS 細胞を用いた研究は非常に有用と考えられる。

2012 年に Yagi らは、プレセニリン 1 (presenilin 1 : *PS1*)、プレセニリン 2 (presenilin 2 : *PS2*) 遺伝子変異²⁵⁾ を有する家族性 AD 患者由来の iPS 細胞から大脳皮質神経細胞へ分化誘導を行い、A β 42/40 の比率の上昇を示した。また Israel らは、2 名の *APP* 遺伝子重複を有する家族性 AD 患者および 1

名の孤発性 AD 患者の iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞を作製し、細胞内 A β 40 の産生亢進、リン酸化タウ、活性型 glycogen synthase kinase-3 β の上昇を示した²⁶⁾。

その後われわれは、森啓博士らが発見した²⁷⁾ *APP* E693delta 変異を有する家族性 AD の患者から iPS 細胞を樹立、大脳皮質神経細胞 (AD 大脳皮質神経細胞) およびアストロサイトに分化誘導し、その細胞内に A β が蓄積することを証明した²⁸⁾。E693delta 変異を有する家族性 AD 大脳皮質神経細胞およびアストロサイトでは、細胞外に分泌される A β 量が著しく少なく、細胞内に A β がオリゴマーとして蓄積することを認めた。また、A β オリゴマーの蓄積が小胞体ストレスや酸化ストレスを生じ、ある培養条件下では、細胞死が生じることを示した。さらに複数の化合物の薬剤評価にて、ドコサヘキサエン酸投与にて小胞体ストレスが改善、細胞死が抑制された。また、1 名の孤発性 AD 大脳皮質神経細胞においても、細胞質内に A β オリゴマーの蓄積を認めた。

この結果から、臨床症状で規定された孤発性 AD の病態は単一ではなく、個々の患者の病態を正確に理解する必要性が示唆された。

3. パーキンソン病

パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD) は α -シヌクレインが中脳黒質に異常蓄積し、ドパミン神経細胞が変性・脱落することにより発症する。過去の研究から、PD 患者では、運動

障害を発症する以前から α -シヌクレインが蓄積することが明らかとなっており、AD と同じく患者自身の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の解析は、発症前の病態解明に有用と考えられる。現在まで、家族性 PD 患者の iPS 細胞を樹立し、ドパミン神経細胞を分化誘導し、解析を行った多数の報告を認める。2011 年、Nguyen らが *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) 遺伝子変異の家族性 PD 患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞 (PD ドパミン神経細胞) を解析し、 α -シヌクレインの細胞内蓄積や、酸化ストレス関連遺伝子の発現上昇を示した²⁹⁾。さらに過酸化水素、MG-132、6-ヒドロキシドパミンの投与によって、カスパーゼ 3 の活性化や細胞死が増加することを示した。同年、Devine らは α -シヌクレイン (α -synuclein : *SNCA*) 遺伝子重複を有する家族性 PD ドパミン神経細胞を解析し、 α -シヌクレインの細胞内外での上昇や、神経突起の短縮化を示した³⁰⁾。2012 年に Cooper らは、*PINK1* (PTEN-induced putative kinase 1) 遺伝子変異 1 名、*LRRK2* 遺伝子変異 2 名、計 3 名の家族性 PD ドパミン神経細胞を用いて、個々の変異タイプでの酸化ストレスとミトコンドリア機能の解析を行い比較検討している³¹⁾。この結果、*PINK1* 変異でバリノマイシン投与時にミトコンドリア活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) の産生が上昇し、ミトコンドリア呼吸機能では *PINK1* 変異で基礎呼吸およびプロトンリークが上昇した。*LRRK2* 変異では基礎呼吸が低下し、ミトコンド

リアの軸索輸送障害を認めた。さらにいずれのPD患者由来神経細胞においても、コントロールと比べ、バリノマイシンやコンカナマイシン投与時の細胞脆弱性が上昇したが、コエンザイムQ10、ラパマイシン、GW5074(LRRK2阻害薬)の薬剤投与により、その脆弱性が回復することを示した。このように、患者iPS細胞を用いることで神経変性疾患のさらなる病態理解、新たな治療薬候補の発見をもたらしている。

4 孤発性神経変性疾患への応用

iPS細胞を用いた神経変性疾患病態再現モデルは、従来原因遺伝子が明確な家族性疾患が中心であったが、近年iPS細胞を用いた孤発性神経変性疾患研究の報告が散見される。2012年にSánchez-Danésらは孤発性PD患者7名とLRRK2遺伝子変異を有する家族性PD患者4名からiPS細胞を樹立し、ドパミン神経細胞に分化誘導を行い解析検討している³²⁾。この研究では、LRRK2遺伝子変異PDのみならず、孤発性PDドパミン神経細胞においても、コントロールと比べ神経突起の数、長さが有意に低下し、さらにオートファジーのクリアランスも障害されていることを示した。

また、ADに関する研究でも、前述したように、われわれは1名の孤発性AD患者由来神経細胞において、家族性と同様に神経細胞・アストロサイト内にAβオリゴマーが蓄積することを示した²⁸⁾。従来の細胞、動物モデルで

は孤発性神経変性疾患の病態モデルの再現が不可能であったが、このように患者由来iPS細胞を用いることで孤発性神経変性疾患の病態再現が徐々に示されつつある。また、孤発性神経変性疾患は遺伝的要素だけでなく、外的環境因子や加齢が影響する可能性も考えられている。

iPS細胞における加齢性変化の短縮化に関しては、以下の研究がある。2013年にMillerらは、遺伝性早老症であるハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(Hutchinson-Gilford progeria syndrome: HGPS)の原因蛋白であるプロジェリンをiPS細胞由来神経細胞に強制発現させ、老化を促進させる加齢モデルを構築した³³⁾。この研究では、PINK1やParkin遺伝子変異を有する家族性PDドパミン神経細胞にプロジェリンを強制発現させると、細胞死の増強、神経突起の短縮化、リン酸化AKT (serine/threonine-specific protein kinase: protein kinase B) 活性化の低下などのPD特異的な表現型を呈することを示した。

さらに、レンチウイルスを用い、神経特異的プロモーター制御下にプロジェリンを発現させたPDドパミン神経細胞のPDモデルマウスの基底核への移植実験において、TH (tyrosine hydroxylase: チロシン水酸化酵素)陽性細胞の減少、細胞質内ニューロメラニンの凝集、ミトコンドリアの巨大化、Lewy小体の前駆体である細胞質内多重層封入体などのPD患者に特異的な病理学的変化を確認した。この結果、プロジェリンの強制発現により、iPS

細胞から分化誘導した細胞の加齢を促進させることが可能であると示された。

今後、社会の高齢化は益々促進し、神経変性疾患患者の増加が予想される。孤発性神経変性疾患の病態解明は社会的に非常に重要な問題であり、患者iPS細胞は、孤発性神経変性疾患の病態解明、創薬研究に有用なツールとして期待される。

5 iPS細胞研究の課題と展望

患者iPS細胞を用いた研究において、いくつかの課題が残されている。そのひとつがiPS細胞間でのクローナルバリエーションである。従来の研究では、複数のコントロール群と疾患群のクローンを解析することで、この課題に取り組んできた。近年、患者の性、年齢が相応する健常者由来のiPS細胞をコントロールとして選択されてきたが、ある遺伝子に関連した病態を解析するうえで、より精密なコントロールが新たな技術によって作製可能になった。すなわち、人工ヌクレアーゼを用いたzinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9 system)などのゲノム編集技術³⁴⁾の進歩により、単一の配列レベルで遺伝子修復が可能となった。これらの技術により、患者iPS細胞の遺伝子変異の修復、あるいは健常者iPS細胞に遺伝子変異を挿入することで、より精度の高いコントロ

ールが作製されている²²⁾⁽²³⁾⁽³⁵⁾。

また、疾患 iPS 細胞を用いた創薬研究のための大規模な薬剤スクリーニングには、患者自身の iPS 細胞由来神経細胞が大量に必要であり、多大な労力と時間を必要とする。従来の分化誘導法では体細胞から iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化させるまでに数ヵ月を要する。しかし、転写因子を線維芽細胞などの体細胞に導入することで、iPS 細胞を経ることなく、直接神経細胞(induced neuronal cells: iN 細胞)を誘導できるダイレクトリプログラミング法の開発³⁶⁾により、作業の短期間化が期待される。このような新たな技術の開発により、患者由来の神経細胞をさらに短期間で作製し、分化効率を改善することで大規模な薬剤スクリーニングが可能となり、難治性神経変性疾患の創薬研究の進展が期待される。

おわりに

マウス iPS 細胞の登場からわずか 8 年で、さまざまな患者由来 iPS 細胞を用いた研究が報告されている。神経変性疾患領域では、これまで困難であった患者自身の神経系細胞を得ることができる点で非常に画期的である。今後、iPS 細胞技術を用いることにより、難治性神経変性疾患の病態解明・治療法開発のさらなる進展が期待される。

●文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S : Cell 126 : 663-676, 2006
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al : Cell 131 : 861-872, 2007
- 3) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al : Science 282 : 1145-1147, 1998
- 4) Jucker M : Nat Med 16 : 1210-1214, 2010
- 5) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S et al : Neuron 28 : 31-40, 2000
- 6) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H : Dev Biol 275 : 124-142, 2004
- 7) Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A et al : Nat Neurosci 8 : 288-296, 2005
- 8) Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP et al : Nat Biotechnol 27 : 275-280, 2009
- 9) Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED et al : Nat Biotechnol 23 : 215-221, 2005
- 10) Kriks S, Shim JW, Piao J et al : Nature 480 : 547-551, 2011
- 11) Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ et al : Stem Cells 29 : 802-811, 2011
- 12) Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, Studer L : Nat Protoc 5 : 688-701, 2010
- 13) Krencik R, Weick JP, Liu Y et al : Nat Biotechnol 29 : 528-534, 2011
- 14) Kang SM, Cho MS, Seo H et al : Stem Cells 25 : 419-424, 2007
- 15) Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK et al : Science 321 : 1218-1221, 2008
- 16) Park IH, Arora N, Huo H et al : Cell 134 : 877-886, 2008
- 17) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr et al : Nature 457 : 277-280, 2009
- 18) Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC et al : Hum Mol Genet 20 : 3642-3652, 2011
- 19) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K et al : Sci Transl Med 4 : 145ra104, 2012
- 20) Bilican B, Serio A, Barmada SJ et al : Proc Natl Acad Sci U S A 109 : 5803-5808, 2012
- 21) Alami NH, Smith RB, Carrasco MA et al : Neuron 81 : 536-543, 2014
- 22) Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA et al : Cell Stem Cell 14 : 781-795, 2014
- 23) Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C et al : Cell Rep 7 : 1-11, 2014
- 24) Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL et al : Dominantly Inherited Alzheimer Network : N Engl J Med 367 : 795-804, 2012
- 25) Yagi T, Kosakai A, Ito D et al : PLoS One 7 : e41572, 2012
- 26) Israel MA, Yuan SH, Bardy C et al : Nature 482 : 216-220, 2012
- 27) Tomiyama T, Nagata T, Shimada H et al : Ann Neurol 63 : 377-387, 2008
- 28) Kondo T, Asai M, Tsukita K et al : Cell Stem Cell 12 : 487-496, 2013
- 29) Nguyen HN, Byers B, Cord B et al : Cell Stem Cell 8 : 267-280, 2011
- 30) Devine MJ, Ryten M, Vodicka P et al : Nat Commun 2 : 440, 2011
- 31) Cooper O, Hallett P, Isacson O : Parkinsonism Relat Disord 18 Suppl 1 : S14-S16, 2012
- 32) Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I et al : EMBO Mol Med 4 : 380-395, 2012
- 33) Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S et al : Cell Stem Cell 13 : 691-705, 2013
- 34) Wei C, Liu J, Yu Z et al : J Genet Genomics 40 : 281-289, 2013
- 35) Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF et al : Cell Stem Cell 12 : 354-367, 2013
- 36) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al : Nature 463 : 1035-1041, 2010

iPS 細胞を用いた神経疾患研究への応用と課題

佐藤 裕 井上 治久

要 約 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) は胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) と同等の多分化能と増殖能を有する。これらの細胞は再生医療に限らず、患者 iPS 細胞を用いた疾患の病態解明、治療薬シーズの探索等、様々な分野での研究に利用されている。本稿では iPS 細胞を用いた神経疾患研究、その中でも老年期疾患としての認知症、あるいは老化に関する研究を中心に概説し、課題と展望についても述べる。

Key words : iPS 細胞, 疾患モデリング, 認知症, 老化

(日老医誌 2014 : 51 : 502-509)

iPS 細胞の特性と疾患研究活用における利点

2006 年, 山中伸弥博士はマウス線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) を世界で初めて作製した¹⁾。2007 年にはヒト iPS 細胞が作製された²⁾。iPS 細胞は分化した皮膚線維芽細胞, リンパ球などの体細胞にいくつかの細胞初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc など) を導入することで作製できる。すべてのヒトから iPS 細胞を作ることは可能であり, iPS 細胞はその性質 (多分化能) を維持しつつほぼ無限に増殖することができる³⁾。さらに必要に応じて目的の細胞に分化させることで病態研究や細胞移植, 薬剤探索, 組織発生研究等, 基礎から臨床までの様々な研究リソースとして用いることが可能である⁴⁾⁵⁾。特に血液から iPS 細胞を作製する場合は, 高い侵襲を伴うことなく疾患臓器の細胞を入手することができる。胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) が有していた倫理的課題を iPS 細胞では回避可能である。

本稿では特に iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究, さらにその中でも老年期疾患である認知症, あるいは老化研究における iPS 細胞の利用について論じる。

神経疾患研究

神経疾患は中枢神経, 末梢神経系の異常によって生じる疾患の総称である。その研究は臨床的診断, 死後剖検

組織の病理学的解析ではじまった。ポジショナルクローニングやシーケンス技術の発展に伴うゲノム情報の集積により, 疾患原因・関連遺伝子が同定され⁶⁾, それに続き, 該遺伝子の機能解析やモデル動物の作製・解析などがおこなわれてきた。しかし, これまでにモデル動物において同定された治療薬候補は必ずしもヒトに有効であるわけではないことから, ヒト細胞である iPS 細胞の利用が期待されている。2009 年, Ebert らは脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) 患者由来 iPS 細胞を用いて, SMN (survival motor neuron) タンパク質量をバルプロ酸処置によって増加させることが可能であることを明らかにし, 患者 iPS 細胞を薬効評価に利用できることを初めて示した⁷⁾。患者 iPS 細胞を用いた疾患解析は, ヒトの細胞内情報伝達系・薬剤反応性を反映するモデルとして, 疾患解析・創薬研究へ利用されつつある (図 1)。

認知症研究

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は, 進行性の記憶障害などの臨床像を示す神経変性疾患である。病理学的には A β (β -amyloid) を主成分とする老人斑とリン酸化された微小管結合タンパク質 Tau による神経原線維変化を脳内に呈する。AD の一部は家族性であるが, 家族性 AD の原因遺伝子である APP (β -amyloid precursor protein), PS1 (presenilin-1), PS2 (presenilin-2) の発見以降, 株化細胞やモデルマウス等の解析により, 脳内における A β の異常蓄積が神経細胞死を引き起こす (アミロイド仮説) という発症機序が支持されている。遺伝子産物 APP は一回膜貫通型のタンパク質で,

Application of iPS cells for studying neurological disorders

Yutaka Sato, Haruhisa Inoue : 京都大学 iPS 細胞研究所
増殖分化機構研究部門幹細胞医学分野

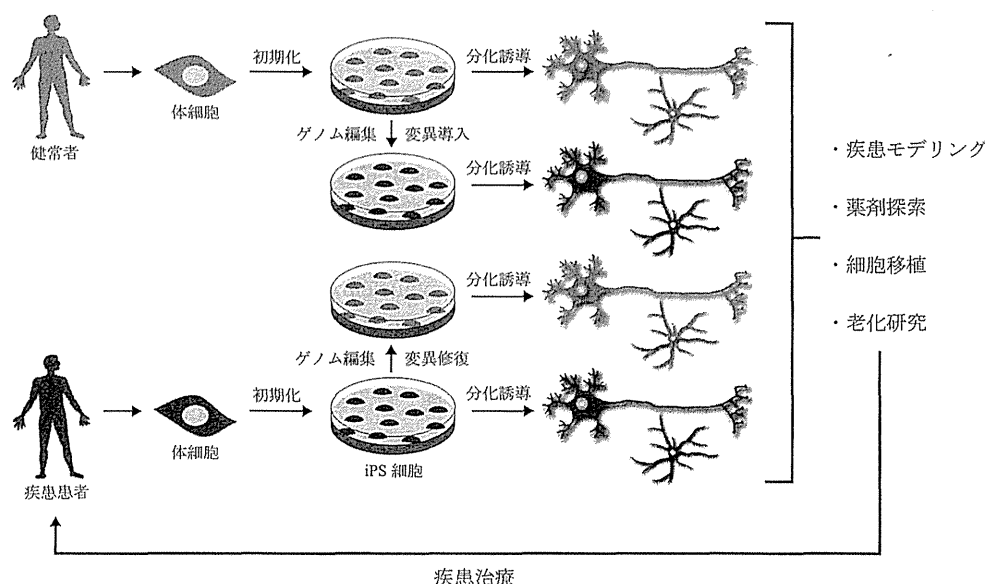


図1 神経疾患研究における iPS 細胞技術の活用

ヒト検体から皮膚細胞や血液細胞などの体細胞を採取し、細胞初期化因子を導入することで iPS 細胞を樹立する。ZFN (Zinc finger nuclease), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease), CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced, short palindromic repeats/CRISPR-associated) 等の遺伝子編集技術により変異を導入または修復することで疾患細胞または isogenic control を作製し、神経細胞やグリア細胞などの標的細胞に分化させる。得られたヒト由来神経系細胞は疾患モデリング、薬剤探索、細胞移植、老化研究を含めた様々な研究分野で活用されている。

細胞質膜、エンドソーム、ゴルジ体上において β セクレターゼ (BACE1) と γ セクレターゼ (PS1 または PS2 複合体) と呼ばれる二つの酵素によって段階的な切断を受け $A\beta$ を産生する⁸⁾。これまでの解析から AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞は $A\beta$ の蓄積を含めた AD 患者剖検脳と類似した病態を示すことが明らかにされている。我々は遺伝性 AD (APP^{V717L}) 患者 iPS 細胞由来神経細胞が細胞外 $A\beta_{42}$ の増加を示す一方、ほかの遺伝性 AD (APP^{E693A}) と一部の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞・アストロサイト内に $A\beta$ がオリゴマーとして蓄積し、小胞体ストレス・酸化ストレスを誘発していること、神経栄養因子枯渇状態において神経細胞死を生じることを報告した⁹⁾。またドコサヘキサエン酸処置でそれらストレスと神経細胞死が抑制されることを見出した。Israel らは、APP 遺伝子座の重複患者や一部の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞では細胞外の $A\beta_{40}$ 量とリン酸化 Tau の亢進、Tau のリン酸化酵素である GSK3 β の活性化が見られ、 β -secretase 阻害剤がそれらを抑制することを示した¹⁰⁾。iPS 細胞を用いた研究により、アルツハイマー病において重要な役割をはたす $A\beta$ の代謝がヒトとマウスで異なることも明らかになりつつある。我々は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の薬剤応答性がこれまで

マウス等の実験系で想定されていた薬剤濃度と異なっていること、 γ -secretase 阻害剤では予想とは逆に $A\beta$ 量を増加させる濃度領域があることを示した¹¹⁾。Martens らも、AD モデルマウスにおいて $A\beta$ 量や記憶障害の改善が認められている様々な NSAID (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) 型 γ -secretase 調節剤を AD 患者 iPS 由来神経細胞に添加し、高濃度 NSAID 型 γ -secretase 調節剤は確かに $A\beta_{42}$ 量を減少させる一方、薬剤のヒト生体内動態と同程度の低濃度 NSAID 型 γ -secretase 調節剤は全く効果を示さないことを明らかにした¹²⁾。低濃度 NSAID 型 γ -secretase 調節剤はマウスモデルや他の細胞モデルでは有意な $A\beta_{42}$ 量の減少を示すことから、ヒト神経細胞は他のモデル細胞と比べ代謝プロセスを含めた薬剤に対する感受性が大きく異なることを示唆している。GWAS (Genome-wide association study) による網羅的な SNPs (Single nucleotide polymorphisms, 一塩基多型) 解析により APOE の他、BIN1, CD2AP, CLU, CR1, PICALM 等の感受性遺伝子が新たに次々と報告されている。これらの遺伝子変異 iPS 細胞やさらに多数の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞を比較・解析することで、今後 AD 病態に関する知見が集積される可能性がある。

前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia: FTD) は前頭葉・側頭葉での脳萎縮と、多くの場合に病変部位で特徴的な封入体を呈する神経変性を伴う非アルツハイマー型認知症の疾患群である。臨床症状として初期には人格障害と行動異常、後期には記憶障害を主症状とする。現在では分子病理に従って封入体に蓄積しているタンパク質に基づき分類することができる¹³⁾。それぞれ FTD-Tau (Tau 陽性封入体)、FTD-TDP (TDP-43 陽性封入体)、FTD-Fus (Fus 陽性封入体) に大別される。FTD-Tau では AD 同様に過剰にリン酸化された Tau が細胞内に蓄積し、神経細胞の脱落が引き起こされる。iPS 細胞由来神経細胞においても変異 Tau は断片化と高リン酸化を受け、軸索の退縮を伴う神経変性を示すことが報告されている¹⁴⁾。筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) においても FTD-TDP と同様の TDP-43 (TAR DNA-binding protein of 43 kDa) 陽性封入体が高頻度で観察され、臨床上でも FTD と ALS は共通する症状を示すことから、両者は発症部位の重複した同様の遺伝子疾患と考えられる。FTD-TDP の原因遺伝子産物として TDP-43, Progranulin, VAPB/C, C9orf72 が報告されている。TDP-43 は RNA の代謝制御や輸送に関わることが知られている。我々は、変異 TDP-43 患者 iPS 由来神経細胞において TDP-43 が生化学的に不溶性を示すこと、免疫組織学的に細胞質に増加していることを見だしている¹⁵⁾。また積荷である mRNA の輸送障害が観察されている¹⁶⁾。異常伸長した GGGGCC 反復配列を有する変異 C9orf72 患者 iPS 由来神経細胞では、核内 RNA foci やユビキチン/TDP-43 陽性の細胞内ジペプチド反復タンパク質封入体と、オートファジー依存的なタンパク質分解機構の減衰が観察される¹⁷⁾¹⁸⁾。またハーバード大学のグループは ALS 患者で同定された遺伝子変異 (SOD1, C9orf72, FUS) iPS 細胞由来運動神経細胞において、膜興奮の異常亢進と神経細胞死が誘引されていることを示した。また彼らはミトコンドリア機能、酸化ストレス、小胞体ストレス、タンパク質輸送等に関わる遺伝子群の発現が変異 SOD1 (A4V) と異常伸長型 C9orf72 患者 iPS 由来運動神経細胞において同様に変化していることを明らかにしている^{19)~21)}。

Lewy 小体型認知症 (Dementia with Lewy bodies: DLB) は進行性の認知機能障害とドパミン神経細胞の変性を伴う認知症で、老年期の変性性認知症疾患では AD に次いで 2 番目に多い。パーキンソニズム (安静時振戦、筋固縮、無動) と呼ばれるパーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) 様の運動障害を認める頻度が高く、PD と臨床、病理、分類上重複することから、現在では

DLB と PD は連続性をもった一つの疾患群と見なされることが多い²²⁾。病理学的には、大脳と脳幹の神経細胞脱落とレビー小体 (Lewy body) の出現を特徴とし、病変部位の分布に従って臨床・病理的分類が微妙に異なり、それに伴い症状も多様である。Lewy 小体は主要構成成分である α -synuclein 陽性の線維性凝集体で、細胞核周辺部や神経突起内で観察される。DLB では SNCA (α -synuclein)、Chr2p13 領域、Chr2q35-36 領域、GBA (Acid β -glucosidase) が原因もしくは関連遺伝子として報告されている²³⁾。変異 α -synuclein 患者 iPS 由来神経細胞では α -synuclein の蓄積や Acid β -glucosidase の小胞体での異常滞留、小胞体ストレスが観察される²⁴⁾。一方ゴーシェ病の原因遺伝子としても知られる GBA に変異をもつ患者由来ドパミン神経細胞においては Acid β -glucosidase の活性低下と α -synuclein の蓄積がみられる²⁵⁾。孤発性 PD 患者由来 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞においては α -synuclein の蓄積は確認できないもののオートファゴソームのリソソームへの成熟が減衰している²⁶⁾。これまでの細胞・動物モデルや剖検脳での知見とともに、iPS 細胞技術は孤発性と家族性 DLB/PD におけるリソソームの機能不全を含む共通の分子メカニズムを明らかにしつつある。未だに発症機序には不明な点も多いものの今後さらなる研究の発展が期待される。

他にも多くの神経疾患において、疾患特異的 iPS 細胞から標的細胞が作製・解析されている^{27)~60)} (表 1)。さらにマウスモデルとの類似点、相違点の解明が進み、薬剤シーク、治療法開発へと進むことが期待される。

老化研究

これまで哺乳類における老化モデルとして、本邦発の Klotho 遺伝子変異マウス⁶⁷⁾や SAM (Senescence-accelerated mouse)⁶⁸⁾を含め、多数の変異マウスが報告されている。神経変性疾患の最大リスクは老化であるが、人工的に老化を促進する iPS 細胞モデルが提案されている。

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) は早老症の一つで、LMNA における単一遺伝子変異により生じ、平均寿命は 14 歳前後と非常に短い。LMNA は核膜の裏打ちタンパク質である Lamin A/C をコードしており、HSPG 患者にみられる遺伝子変異は切断型の Lamin A (progerin) の過剰産生を引き起こす。その結果、核の形態やクロマチン構造の異常、DNA ダメージや細胞分裂の不全が生じ、全身性のラミノパチーを呈する⁶⁹⁾。これまで患者剖検脳と同様に、ユビキチン化された異常タンパク質の蓄積した病理像を神経変性疾患患者

表1 疾患特異的 iPS 由来神経系細胞を用いた神経疾患モデリングの例

疾患	原因遺伝子	疾患特異的 iPS 由来神経系細胞の主な表現型	参考文献
脊髄性筋萎縮症	SMN1 (Survival of motor neuron 1)	SMN1 発現低下, 細胞サイズ減少, 運動神経細胞への分化効率低下, Caspase 活性化	7)27)
アルツハイマー病	APP (β-amyloid precursor protein), PS1 (Presenilin-1), PS2 (Presenilin-2)	Aβ 蓄積, Tau 高リン酸化, エンドソーム肥大化 小胞体ストレス, 酸化ストレス, 神経細胞の脆弱性	9)~13)
前頭側頭葉型変性症 (筋萎縮性側索硬化症含む)	C9ORF72, MAPT (Microtubule-associated protein tau), PGRN (Progranulin), SOD1 (Superoxide dismutase 1), TARDBP (TAR DNA binding protein-43, TDP-43) VAPB (VAMP-associated protein B),	RNA foci・細胞内封入体形成 Tau 高リン酸化 不溶性 TDP-43 蓄積, 小胞体ストレス 膜興奮異常, 神経細胞の脆弱性	15)~21)28)
Lewy 小体型認知症 (ゴーシェ病, パーキンソン病含む)	SNCA (α-synuclein), GBA (β-glucocerebrosidase) LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1 (PTEN induced putative kinase 1), PARK2 (Parkin)	α-synuclein 蓄積, オートファジー/リソソーム不全 酸化ストレス, ミトコンドリア機能異常 小胞体ストレス, 神経細胞の脆弱性	24)~26) 29)~38)
遺伝性痙性対麻痺	SPAST (Spastin)	Spastin 発現量低下, 軸索形成とミトコンドリア輸送の異常	39)40)
家族性自律神経失調症	IKBKAP (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein)	IKBKAP 転写低下 末梢神経分化能低下	41)42)
球脊髄性筋萎縮症	AR (Androgen receptor)	dihydrotestosterone 存在下で Androgen receptor 凝集	43)
脆弱 X 症候群	FMR1 (Fragile X mental retardation 1)	FMR1 のエピゲノム修飾変化とタンパク量減少 神経突起長とシナプス活動の異常	44)45)
脊髄小脳変性症 II 型	ATXN2 (Ataxin 2)	Ataxin 2 の発現量低下, 神経細胞の脆弱性	46)
脊髄小脳変性症 III 型	ATXN3 (Ataxin 3)	グルタミン酸刺激下で Ataxin 3 の部分分解促進 と不溶性凝集体形成	47)
ダウン症候群	21 番染色体トリソミー	Aβ 蓄積, Tau 高リン酸化, シナプス活動低下, 神経細胞の脆弱性	48)59)
ティモシー症候群	CACNA1C (Calcium channel, L type, α-1)	Tyrosine hydroxylase 増加, ノルエピネフリン・ドパミン分泌量増加 活動電位依存的な樹状突起の退縮	50)51)
ドラベ症候群	SCN1A (Sodium channel voltage gated type 1, α subunit)	γ-aminobutyric acid 作動性神経細胞の活動低下, Na 電流の増加	52)53)
ニーマンピック病	NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1)	コレステロール蓄積	54)
ハンチントン病	HTT (Huntingtin)	Huntingtin 凝集, Caspase 活性化, オートファジー不全, 神経細胞死	55)~60)
副腎白質ジストロフィー	ABCD1 (ATP-binding cassette, sub-family D, member 1)	オリゴデンドロサイトにおける very long chain fatty acid の蓄積	61)
フリードライヒ失調症	FXN (Frxatin)	Fraxatin 低発現, ミトコンドリア機能異常	62)63)
ベリツェウス・ メルツバッハー病	PLP1 (Proteolipid protein 1)	オリゴデンドロサイトにおける 小胞体ストレス, ミエリン形成異常	64)
レット症候群	MECP2 (Methyl CpG binding protein 2)	MECP2 発現低下, 成熟神経細胞への分化効率低下 vesicular glutamate transporter 1 陽性小胞減少, シナプス活動減少 細胞体・核サイズ減少	65)~67)

由来 iPS 細胞を用いて再現することは容易ではなかった。しかし Sloan-Kettering 研究所のグループは、PD 患者 iPS 細胞由来のドパミン神経細胞に外来性の progerin を過剰発現することで人工的に老化を促進させることを試みた⁷⁰⁾。その結果、Lewy 小体の蓄積や神経細胞死を含む様々な PD 病理像を短い培養期間で再現することに成功した。また progerin の発現により iPS 細胞から分化させた PD 変異をもたない線維芽細胞、ドパミン神経細胞において、細胞老化の特徴である細胞核の形態・機能維持、mTOR の活性、ミトコンドリア機

能の異常が亢進していた。一方で、HSPG 患者において PD など神経変性疾患を生じることは知られておらず、また HSPG 患者 iPS 由来神経細胞も PD 様の表現型は示さない。加えて通常の老化細胞で観察される全ての特徴が progerin の過剰発現によって引き起こされる訳ではない。今後、様々な老化因子と孤発性を含めた他の PD 患者や神経変性疾患 iPS 細胞を組み合わせ解析することで、老化と病態促進の具体的な関係性が何なのかについて検討が可能かもしれない。

新技術による課題への取り組み

疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究において課題となるのが対照群の設定である。得られた結果が iPS 細胞間のクローナルバリエーションや、ゲノム配列中の SNPs や突然変異など遺伝子情報の偶発的な違いによるものではなく、実際に着目している変異に起因していることを精密に証明するための技術が誕生している。すなわち、ZFN (Zinc finger nuclease)⁷¹⁾、TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)⁷²⁾、CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced, short palindromic repeats/CRISPR-associated)⁷³⁾等の遺伝子編集技術により疾患特異的細胞の遺伝子変異を修復した“isogenic control”の作製が可能になり、標的の遺伝子変異以外の他の遺伝子情報は相同な理想的な対照群が得られるようになった。この手法により遺伝子変異と疾患をより直接的に関連付けることが可能になっている。

ヒト組織細胞から iPS 細胞を経ず、直接目的細胞に分化させる技術も発展しつつある。皮膚細胞から直接神経細胞へと分化させる方法 (induced Neuron: iN) も多数報告されているが、その分化効率の低さが課題となっていた⁷⁴⁾。ワシントン大学のグループは、これまでの転写因子の発現を主とした iN 作製法とは異なり、細胞老化関連因子である p16-INK4a や p19-ARF の発現を阻害することで、最大 80% の電気生理学的に機能的な iN を作製することに成功した⁷⁵⁾。この系において p53 の過剰発現は p16/p19 量依存的な神経分化をほぼ完全に抑制する。一方で telomerase の触媒サブユニットの発現もまた神経分化を誘発する。これらの結果は、細胞老化関連因子が細胞の再プログラミング化や標的細胞への分化に関わる細胞内情報伝達系の重要な制御因子として機能していることを意味する。今後さらに高効率かつ短期間で目的細胞を調整、利用できるような技術が発展すると期待される。

これまで、ES 細胞・iPS 細胞から分化誘導した神経細胞は 2 次元 (平面) で培養を行われていたが、理化学研究所の研究グループは無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法, Serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation) とその改良法を元に 3 次元 (立体) 培養を行うことにより、ヒト ES 細胞から直径数 mm の自己組織化した大脳新皮質に類似した構造を再現することに成功している。この人工大脳新皮質は各層 (大脳辺縁層、皮質板、サブプレート、中間層、脳室下帯、脳室帯) が明瞭に隔てられ、生体脳によく似た層構造を呈する⁷⁶⁾⁷⁷⁾。一方でオーストリア科学ア

カデミーの研究グループは従来の三次元的培養法に加え、ユニークな方法 (細胞塊が培養液に浸かった状態で攪拌し続ける等) で最長 10 カ月間培養可能な“Cerebral organoid”を作製した⁷⁸⁾。Cerebral organoid は大脳皮質だけではなく、脈絡叢、網膜、髄膜に似た構造を形成する。さらに彼らは CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit-associated protein 2) 遺伝子変異を有する小頭症患者の iPS 細胞由来 Cerebral organoid では幹細胞や神経細胞の増殖、分化が抑制されており、構造体の形成不全を示すことを見出した。in vitro における組織形成研究の発展は将来的にはこれまでよりも生体に近い細胞環境条件での病態解明、創薬研究を実現するかもしれない。

終わりに

iPS 細胞技術は、これまでヒトの神経疾患研究の律速であった多くの課題を解決し、様々な疾患の病態解明や創薬開発へとその利用が進んでいる。さらに新しいアイデアや技術の開発により老化研究や三次元での立体培養へと発展しつつある。今後 iPS 細胞技術は神経疾患研究のみならず、発生、成熟、老化といった人のライフサイクル全般を理解するための研究リソースとしてさらに重要性を増すと考えられる。

参考文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.
- 3) Yamanaka S, Blau HM: Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465: 704-712.
- 4) Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S: iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J* 2014; 33: 409-417.
- 5) Hargus G, Ehrlich M, Hallmann AL, Kuhlmann T: Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 151-173.
- 6) Foo JN, Liu JJ, Tan EK: Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 508-517.
- 7) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, et al.: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457: 277-280.
- 8) Haass C, Selkoe DJ: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101-112.