

201442032A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

疾患特異的iPS細胞を用いた球脊髄性筋萎縮症の病態解析と  
新規治療法の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 岡田 洋平

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患克服研究事業による委託業務として、学校法人愛知医科大学が実施した平成26年度「疾患特異的iPS細胞を用いた球脊髄性筋萎縮症の病態解析と新規治療法の開発」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
疾患特異的iPS細胞を用いた	
球脊髄性筋萎縮症の病態解析と新規治療法の開発 -----	1
愛知医科大学 医学部 内科学講座（神経内科）岡田洋平	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 疾患特異的iPS細胞を用いた神経疾患解析基盤の構築 -----	9
愛知医科大学 医学部 内科学講座（神経内科）道勇 学	
2. 動物モデルおよび患者検体を用いた	
球脊髄性筋萎縮症の病態解析と新規治療法の開発 -----	13
名古屋大学大学院 医学系研究科 神経内科 祖父江元、勝野雅央	
3. 疾患特異的iPS細胞由来分化細胞を用いた遺伝子発現解析 -----	17
慶應義塾大学 医学部 生理学教室 矢野真人	
4. SBMAと筋萎縮性側索硬化症における	
ヒトの病理組織学的変化の比較検討に関する研究 -----	20
愛知医科大学 加齢医科学研究所 吉田眞理	
III. 学会等発表実績 -----	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	30

# 委託業務成果報告（総括）

## 疾患特異的 iPS 細胞を用いた 球脊髄性筋萎縮症の病態解析と新規治療法の開発

業務主任者 岡田 洋平 愛知医科大学医学部内科学講座（神経内科） 准教授

**研究要旨** 球脊髄性筋萎縮症（SBMA）患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、品質評価により解析に適したクローンの選択を行った。樹立した iPS 細胞を用いた解析により、アンドロゲン受容体（AR）の CAG リピート数は、リプログラミングにより変化しないことを示した。さらに、ヒト iPS 細胞から運動ニューロンを迅速・高効率に誘導する培養法を開発した。この培養法により誘導した iPS 細胞由来運動ニューロンを用いた解析により、SBMA の初期病態における TGFβシグナル低下の関与が示唆された。さらに、骨格筋の関与する病態を明らかにするために、ヒト iPS 細胞から骨格筋を誘導する培養法を構築している。一方、SBMA マウスモデルを用いた解析では、運動ニューロンと骨格筋の双方において PPARγの発現低下、NFκB シグナルの活性化が認められ、NFκB シグナルが新たな治療標的となり得ると考えられた。また、SBMA 患者剖検病理標本を用いた組織病理学的検討では、同じ運動ニューロン病である筋萎縮性側索硬化症（ALS）の場合とは異なり、脊髄前角細胞の脱落に比して、骨格筋はむしろ神経再支配や代償性肥大により保たれる傾向が示された。今後は、iPS 細胞由来運動ニューロンと骨格筋における病態解析を進めるとともに、疾患特異的 iPS 細胞で観察された病態をマウスモデルや患者検体で検証していく予定である。

### 業務項目担当責任者

祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科  
神経内科 教授  
勝野 雅央 名古屋大学大学院医学系研究科  
神経内科 准教授  
矢野 真人 慶應義塾大学医学部生理学教室  
講師  
道勇 学 愛知医科大学医学部内科学講座  
（神経内科） 教授  
吉田 眞理 愛知医科大学加齢医科学研究所  
教授

### A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症（Spinal bulbar muscular atrophy: SBMA）は、成人男性に発症する緩徐進行性の下位運動ニューロン変性疾患である。これまでのモデルマウスや培養細胞株を用いた解析により、ポリグルタミン鎖（CAG リピート）

の伸長した変異アンドロゲン受容体（AR）が、リガンドであるテストステロン依存的に凝集体を形成し、神経変性を誘導することが示されている。しかし、SBMA モデルマウスの表現型は、患者でみられる病態とは異なる部分や、複数の異なる病態、骨格筋による非細胞自律的な病態も示唆されており、患者における運動ニューロン変性の分子機構には依然として不明な点が多い。

そこで、本研究では SBMA 患者由来 iPS 細胞を運動ニューロンや骨格筋へと分化誘導することで、患者の病態により即した新たな疾患モデルを構築し、神経変性の病態解明、早期の病態進行や治療効果の指標となり得る確かな分子マーカーの開発、治療の標的となり得る新たな病態分子の探索とより効果的で安全性の高い新規治療法の開発を目的として行う。

## B. 研究方法

ヒト iPS 細胞は、マイトマイシン処理した SNL フィーダー細胞上で、20% KSR、4ng/ml bFGF 含有ヒト ES 細胞培地を用いて維持培養を行った。樹立した iPS 細胞は、定量的 RT-PCR および免疫染色による未分化マーカーの発現解析 (*NANOG*, *OCT4*)、ゲノム DNA の PCR によるエピゾーマルベクター (EBNA) の残存確認、染色体解析 (G-banding) などにより品質評価を行った。また AR の CAG リピートの両端に Primer を設計して PCR を行い、ダイレクトシークエンス、およびキャピラリー電気泳動 (フラグメント解析) により CAG リピート数を解析した。

運動ニューロンへの分化誘導は、セミコンフルエントに達したヒト iPS 細胞を用いて行い、定量的 RT-PCR や免疫染色により分化状態を評価した。また誘導した運動ニューロンは、筋芽細胞株 (Hu5/E18) から誘導した Myotube との共培養により、神経筋接合部 (NMJ) の形成を解析した。SBMA 患者、および健常者由来 iPS 細胞を用いた解析では、運動ニューロンの接着分化誘導開始後 1 週目、2 週目、4 週目にサンプリングし、定量的 RT-PCR、ウェスタンブロッティング、免疫染色などにより経時的病態変化を解析した。

トランスクリプトーム解析は、Affymetrix 社の Exon アレイを用いて行い、ヒト iPS 細胞由来分化細胞において転写産物レベルで有意な発現変動を示す遺伝子を解析した。

SBMA モデルマウスを用いた解析は、CAG リピートが 97 に延長したヒトの全長変異 AR を有するトランスジェニックマウス (AR-97Q) を用いた。

患者剖検病理標本を用いた組織病理学的検討は、SBMA 患者 (死亡時 62 歳、66 歳、74 歳男性)、ALS 患者 (死亡時年齢 65 歳女性、73 歳男性、68 歳男性) を対象とした。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞から樹立した iPS 細胞を用いた研究は、機関内倫理委員会 (愛知医科大学医学部倫理委員会、慶應義塾大学医学部生命倫理委員会、名古屋大学医学部生命倫理委員会) において、「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを

用いた疾患解析に関する研究」として承認されており、それに基づいて研究計画を立案・遂行している。組換え DNA を用いた実験は、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」(カタルヘナ法) 等を遵守し、組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けた上で実施した。動物実験にあたっては、機関内動物実験委員会の承諾を得たうえで実施した。また、剖検例はすべて遺族の同意が文書で得られている。

## C. 研究結果

### 1. SBMA 特異的 iPS 細胞の品質評価

4 例の SBMA 患者と 3 例の男性健常者 (表 1) から線維芽細胞を採取し、エピゾーマルベクターを用いて *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *shP53* を導入してヒト iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は、未分化マーカー (*NANOG*, *OCT4*) の発現、エピゾーマルベクターの残存、運動ニューロンへの分化誘導効率などによりスクリーニングを行い、さらに G-banding により染色体異常のない株を各患者 2 クローン以上樹立した。

#### SBMA 疾患特異的 iPS 細胞 (リユプロレリン未治療)

	Race	Gender	Age	CAG repeat	iPSCs
SBMA1	Japanese	male	42	52	1E-12,18,25
SBMA2	Japanese	male	46	48	2E-16,39,44
SBMA3	Japanese	male	33	54	3E-10,11
SBMA4	Japanese	male	38	57	4E-5,21

#### コントロール iPS 細胞 (健常男性)

	Race	Gender	Age	CAG repeat	iPSCs
TIG114	Japanese	male	36	nd	TIGE-9,22
YF	Japanese	male	24	nd	YFE-16,19
KA	Japanese	male	39	nd	EKA

表 1. iPS 細胞の樹立を行った 4 名の SBMA 患者と 3 名の健常男性のプロファイル

### 2. 樹立した iPS 細胞における CAG リピート数の解析

SBMA 患者から採取した線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する過程において、リプログラミングが AR の CAG リピート数に与える影響を解析した。まず、フラグメント解析を行ったところ、どの株も、線維芽細胞と樹立した iPS 細胞で CAG リピート数に変化は見られなかった。

さらに、ダイレクトシーケンスにより、線維芽細胞と樹立した iPS 細胞における AR の CAG リピート数を同定し、どの場合も、CAG リピート数はリプログラミングの影響を受けないことを明らかにした。

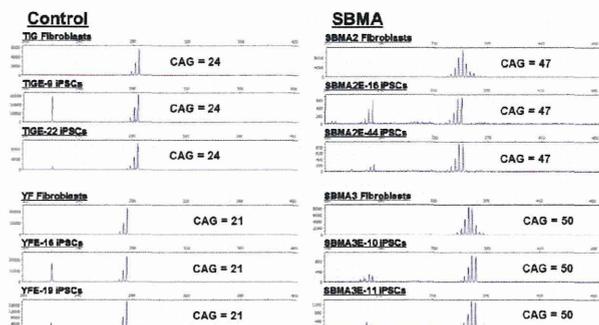


図 1. 線維芽細胞と樹立した iPS 細胞における CAG リピート解析

### 3. ヒト iPS 細胞の迅速・高効率運動ニューロン分化誘導法の構築

SBMA 患者由来運動ニューロンを用いた解析を行うため、ヒト iPS 細胞から運動ニューロンを迅速・高効率に誘導する培養法を構築した。従来の神経分化誘導法では、神経幹細胞の誘導まで 1-2 か月を要したことから、いわゆる Dual Smad inhibition に GSK3 $\beta$ 阻害剤を併用することで、遺伝子導入することなく、迅速・高効率に神経幹細胞を分化誘導する独自の培養法を構築した。すなわち、神経分化に対して抑制的に働く Nodal シグナル・BMP シグナルの下流の Smad シグナルを、それぞれ BMP 阻害剤である Dorsomorphine と ALK 阻害剤である SB431542 を用いて阻害し (Dual Smad inhibition, Chambers et al., *Nat Biotech* 2009)、さらに神経分化に促進的に働くと考えられる GSK3 $\beta$ 阻害剤 (BIO) を分化誘導の初期に添加することで、神経幹細胞の誘導期間を従来よりも大幅に短縮した (Numasawa-Kuroiwa et al., *Stem Cell Reports* 2014)。さらに運動ニューロンの発生に必要なレチノイン酸 (RA) を添加し、Purmorphamine により Sonic hedgehog (Shh) シグナルを活性化することで Hb9 陽性細胞を  $25.5 \pm 8.8\%$ 、Isl-1 陽性細胞を  $31.1 \pm 10.9\%$  と高効率に運動ニューロンを誘導する培養法を構築した。またヒト筋芽細胞株 (ある Hu5/E18) 由来 myotube と共培養することで、 $\alpha$ BTX で標識される神経筋接合

部 (NMJ) が形成され、機能的な運動ニューロンが誘導されていると考えられた (図 2)。

また、分担研究者の道勇らは、この培養法では阻害剤の細胞毒性が強く、分化誘導が不安定であったことから、GSK3 $\beta$ 阻害剤、BMP 阻害剤をそれぞれ CHIR99021、LDN193189 へ変更し、その効果を検討した。その結果、細胞毒性の軽減と、培養バッチ間の分化誘導の不安定性の改善に成功し、約 40% の誘導効率で、HB9 陽性運動ニューロンを安定的に誘導できるようになった。

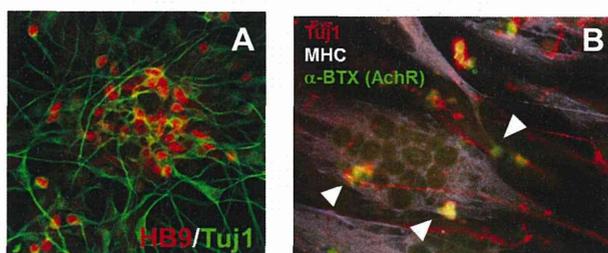


図 2. ヒト多能性幹細胞から誘導した運動ニューロンと神経筋接合部 (NMJ) の形成

### 4. ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの可視化

運動ニューロンを生きのまま標識・可視化することで、イメージングをはじめとした、生細胞を用いた細胞生物学的解析を行うことができる。さらにフローサイトメトリー (FACS) を用いて運動ニューロンを濃縮・純化できれば、運動ニューロン特異的な病態解析 (トランスクリプトーム解析など) が可能となる。そこで、運動ニューロンに特異的に発現する HB9 エンハンサー制御下に蛍光タンパクである Venus を発現するレポーターレンチウイルス (pSIN2-HB9<sup>438</sup>-Venus) を作成した。このレポーターレンチウイルスをヒト iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンに導入したところ、Venus 陽性細胞の  $79.7 \pm 2.5\%$  において運動ニューロンのマーカーである Hb9 の発現が観察され、運動ニューロンを適切に標識できていると考えられた。今後、iPS 細胞由来運動ニューロンのライブセルイメージングや、FACS を用いた運動ニューロンの濃縮・純化に応用可能であると考えられる。

## 5. SBMA 患者由来運動ニューロンの経時的病態変化

次に、患者 iPS 細胞から運動ニューロンを誘導したところ、健常者と同様に高効率に Hb9 陽性運動ニューロンが分化誘導された。そこで、患者および健常者 iPS 細胞から運動ニューロンを誘導し、接着分化培養開始後に AR のリガンドである dyhydrotestosterone (DHT) を添加して、1, 2, 4 週目にサンプリングして経時的な病態変化を解析した。定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析では、運動ニューロンマーカーである *HB9* の発現は、患者と健常者、あるいは DHT 添加群、非添加群において有意な差は観察されず、運動ニューロンの分化誘導効率に差はないと考えられた。*AR mRNA* の発現は患者、健常者の両者において時間とともに発現が上昇し、4 週目には高発現していた。一方、3 週目のサンプルを用いて行ったウェスタンブロッティングでは、リガンドである DHT 依存的な AR タンパクの発現上昇が観察され、接着分化 3-4 週目にはテストステロン依存性を獲得した機能的な運動ニューロンへと分化、成熟していると考えられた。患者と健常者で、AR の発現量は転写産物レベルでもタンパクレベルでも差がみられなかった。

次に、運動ニューロンの生存に促進的に働き、SBMA においてその活性低下が報告されている TGF $\beta$  シグナルに着目した解析を行った。定量的 RT-PCR により、患者 iPS 細胞由来運動ニューロンにおいて、TGF $\beta$  受容体の一つである *TBR2* の発現解析を行ったところ、患者においても健常者においても、分化成熟が進むにつれてその発現が上昇し、4 週目には、DHT 依存的な発現上昇が観察された。一方で、患者由来運動ニューロンでは健常者に比べて *TBR2* の発現の低下傾向がみられ、また、その下流である *KLF10* の発現も低下傾向を示した。これらの結果から、患者由来運動ニューロンにおいても、TGF $\beta$  シグナルを介した病態が早期から運動ニューロン変性に寄与している可能性が示唆された。

## 6. 骨格筋の誘導と運動ニューロン・骨格筋の相互作用の解析

SBMA は、変性する運動ニューロンそのものに病態の首座があると考えられてきたが、患者において血清クレアチンキナーゼ (CK) の上昇がみられること、筋原性筋病理像が観察されること、マウスモデルにおいて、骨格筋への介入（骨格筋特異的な IGF 発現や変異 AR ノックダウンなど）により運動ニューロンの病態が改善することなどが報告されており、骨格筋そのものや骨格筋による非細胞自律的な病態が、SBMA の病態に関与する可能性が示唆されている。そこで、iPS 細胞から骨格筋へと分化誘導し、骨格筋での病態解析や、運動ニューロンとの共培養による病態解析を進めている。まず、未分化ヒト iPS 細胞に、薬剤（テトラサイクリン）誘導性 *PiggyBac* vector を用いて、骨格筋分化に重要な役割を果たす *MyoD1* を強制発現したところ、DOX 存在下において MHC (Myosin heavy chain) 陽性の myotube への分化が確認された。現在、誘導効率の改善のための検討を進めている。今後、SBMA 患者 iPS 細胞から骨格筋への分化誘導を行い、その病態解析を進める予定である。

## 7. 疾患特異的 iPS 細胞由来分化細胞を用いたトランスクリプトーム解析

成人発症の神経変性疾患では、ごく僅かな遺伝子発現異常の蓄積が病態に関与する可能性が示唆されており、これらの難病の病態解明には iPS 細胞由来分化細胞における遺伝子発現異常の高解像度解析技術の開発が求められている。

分担研究者の矢野らは、家族性 ALS の原因遺伝子 *FUS* に変異をもつ 2 名の患者線維芽細胞から樹立した疾患特異的 iPS 細胞を運動ニューロン前駆細胞を豊富に含むニューロスフェアへと分化誘導し、Affymetrix 社の Exon アレイ解析を行い、転写産物レベルで有意な発現変動を示す 159 遺伝子を同定した。また、Gene Yeo らのグループで発表されている *FUS* の CLIP-seq データの再解析をあわせて行うことで、*FUS* による直接制御をうける RNA プロセッシング異常を示すいくつかの選択的エクソンを同定した。

このような網羅的トランスクリプトーム解析の技術を応用することで、今後、SBMA 特異

的 iPS 細胞から誘導した運動ニューロンを用いてトランスクリプトーム解析を行い、新規病態関連遺伝子の同定を行う予定である。

## 8. 動物モデルおよび患者検体を用いた解析

SBMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンや骨格筋を用いた解析では、iPS 細胞を用いた解析と動物モデルや患者検体を用いた解析を組み合わせることで、観察された病態変化や分子変化の妥当性を深めることができる。

分担研究者の祖父江、勝野らは、SBMA モデルマウスにおいて、運動ニューロンと骨格筋の双方において PPAR $\gamma$  の発現が低下しており、そのアゴニストである Pioglitazone の投与により、運動ニューロン・骨格筋の変性を抑止することを示した。また、SBMA モデルマウスにおいて、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスの上昇、NF $\kappa$ B シグナルの活性化などの変化を確認し、Pioglitazone の投与により改善することを見出した。これらの結果は、SBMA モデルマウスにおいても運動ニューロン、骨格筋の双方がその病態に重要な役割を果たしており、NF $\kappa$ B シグナルが新たな治療標的となり得ることを示唆している。また、分担研究者の吉田らは、SBMA 患者と ALS 患者の剖検病理標本を用いた下位運動ニューロンおよび骨格筋の組織病理学的検討を行い、ALS では前角細胞の脱落に比した骨格筋の神経原性変化がみられるのに対し、SBMA では脊髄前角細胞の脱落に比して、骨格筋はむしろ神経再支配、あるいは代償性肥大により保たれる傾向を示すことを示した。今後、モデルマウスや患者検体を用いて、SBMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンや骨格筋で観察される病態変化や分子変化を検証していくことが重要であると考えられる。

## 9. プロジェクトの総合的推進

愛知医科大学を中心として、名古屋大学、慶應義塾大学の間でミーティング等を通して情報交換、意見交換、技術的交流を行った。

iPS 細胞の培養や分化誘導、分化細胞を用いた解析は主に愛知医科大学で行い、名古屋大学の大学院生一名が、愛知医科大学に派遣され、iPS 細胞を用いた研究における基礎的な技術習

得と共同研究による緊密な交流を行った。また慶應義塾大学の「疾患特異的 iPS 細胞を用いた難病研究」の研究拠点である慶應義塾大学医学部（岡野栄之教授）とは共同研究体制を構築しており、解析技術やコントロール iPS 細胞を含めたマテリアルの供与や、トランスクリプトーム解析などの共同研究を進めている。また、慶應義塾大学で開催される拠点会議に参加し、拠点や他の研究機関の研究者と交流を深め、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態研究に関する情報交換を行った。

また、SBMA モデル動物を用いた解析は主に名古屋大学で行っており、iPS 細胞を用いた解析で得られた知見を、動物モデルや患者サンプルを用いて共同で検証していく予定である。また、SBMA 患者剖検病理標本を用いた解析を含む神経病理学的検討については、愛知医科大学加齢医科学研究所との共同研究により行っており、解析手法などのディスカッションを行っている。今後、組織病理学的解析を共同で進めていく予定である。

## D. 考察

SBMA 患者 4 名と健常者 3 名から iPS 細胞を樹立し、解析に適したクローンを選択した。一部のポリグルタミン病では、世代間の CAG リピート数の変化が報告されているが、SBMA 患者 iPS 細胞では、リプログラミング後も CAG リピート数の変化は観察されず、患者由来 iPS 細胞が患者の遺伝的特性を継承していると考えられた。

iPS 細胞の神経分化誘導には、従来約一か月以上かかっていたが、Dual Smad inhibition に GSK3 $\beta$  阻害剤を併用することで、従来よりも大幅に培養期間を短縮し、短期間で高効率に運動ニューロンを誘導可能な培養法を構築した。さらに、レンチウイルスレポーターの構築により、運動ニューロンの可視化と、運動ニューロン特異的な病態変化の解析が可能になった。確立した分化誘導法を用いて行った SBMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの経時的病態解析では、運動ニューロンへの分化に明らかな差は認められないものの、TGF $\beta$  シグナル関連分子の発現変化が観察され、TGF $\beta$  シグナル変容が SBMA

の早期病態に寄与する可能性が示唆された。

モデルマウスを用いた解析では、運動ニューロンと骨格筋の両方でみられる病態変化、NFκB シグナルの病態への関与が明らかとなり、また、患者剖検病理標本では、運動ニューロンの変性に比して骨格筋はむしろ保たれる病理像が観察された。今後、iPS 細胞由来運動ニューロンや骨格筋、SBMA モデルマウス、患者検体といった異なる解析系で観察される病態を相互に検証することで、より確かな病態の解明と新規治療標的の開発につながると考えられる。また、ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンを用いたエクソンアレイ解析では、発現変化を示す遺伝子群の検出に成功しており、これらの技術を用いて、今後 SBMA 患者 iPS 細胞由来分化細胞におけるトランスクリプトーム解析を進めていく予定である。

## E. 結論

SBMA 患者から樹立した iPS 細胞の品質評価を行い、解析に使用可能な iPS 細胞を選定した。SBMA における AR の CAG リピート数はリプログラミングの影響を受けないことが示された。またヒト iPS 細胞から迅速・高効率に運動ニューロンを誘導する培養法を確立し、SBMA 患者由来運動ニューロンにおいて、病態初期における TGFβシグナルが初期の病態に関与する可能性が示唆された。今後、iPS 細胞由来運動ニューロン、骨格筋を用いた病態解析を進めるとともに、iPS 細胞由来分化細胞におけるトランスクリプトーム解析、マウスモデルや患者検体を用いた検討などを進めていく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. **Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H.** Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher

Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes *Stem Cell Reports* 2(5) 648-661 2014

2. **Lee H, Lee JK, Park. MH, Hong YR, Marti H, Kim H, Okada Y, Otsu M, Seo E, Park J, Bae JH, Okino N, He X, Schuchman E, Bae J, Jin HK,** Pathological roles of the VEGF/SphK pathway in Niemann-Pick Type C neurons *Nat. Commun.* 5:5514. 2014
3. **Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Norio Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T,** Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses *Biological Psychiatry in press*
4. **Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudo J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.** Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cell Reports* 4(3) 360-373 2015
5. **岡田洋平、小野寺一成、**iPS 細胞創薬への期待と課題、*Frontiers in Parkinson Disease* 7(4) 204-208, 2014 年 11 月
6. **沼澤 佑子、岡田洋平、岡野栄之、**小児神経疾患克服へ向けた疾患 iPS 細胞研究の進歩と課題、*実験医学増刊号* 33(2) 286-291, 2015 年 1 月

### 2. 学会発表

1. **Okada Y** Incompletely reprogrammed human iPSCs form glioma-like tumors through genomic instability during differentiation, Kyoto University/Keio University/MD Anderson Cancer Center (MDACC) Joint Conference, iPS and Stem Cells in Cancer Research, Kyoto, Japan, 2014 年 4 月

2. **Okada Y** Application of pluripotent stem cells to the research on neurological disorders, 2014 KALAS international symposium, Yeosu, Korea, 2014年8月
3. **Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kawabata S, Nakamura M, Kishi N, Akamatsu W, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H**, Dysmyelination and Enhanced ER Stress Response in Pelizaeus-Merzbacher Disease Patients iPSCs-Derived Oligodendrocytes with PLP1 Gene Missense Mutations. Neuroscience 2014, Washington DC, USA, 2014年11月
4. **沼澤佑子、岡田洋平、芝田晋介、川端走野、中村雅也、岸憲幸、赤松和土、大山学、小坂仁、井上健、高橋和利、山中伸弥、小崎健次郎、高橋孝雄、岡野栄之**、白質ジストロフィーの病態研究と問題点、第56回小児神経学会学術集会、浜松、2014年5月
5. **岡田洋平**、多能性幹細胞(ES細胞・iPS細胞)を用いた神経再生とその問題点、第3回長久手脊椎脊髄セミナー、長久手、2014年7月
6. **岡田洋平**、iPS細胞を用いた神経疾患研究、新潟パーキンソン病治療研究会、新潟、2014年11月
7. **岡田洋平**、iPS細胞を用いた神経疾患研究、日本神経学会中国四国地方会 ランチョンセミナー、広島、2014年12月
8. **岡田洋平**、Pluripotent Stem Cells and Neurological disorders、Distinctive educational program 2014 Neuroscience Course, 名古屋 2014年12月
9. **岡田洋平**、疾患特異的 iPS細胞を用いた神経疾患研究、第17回ヒューマンサイエス総合研究ワークショップ「再生医療をビジネスへー細胞治療と周辺事業の新展開ー」東京、2015年2月
10. **小野寺一成、下門大祐、鳥居由紀子、石原康晴、勝野雅央、道勇学、祖父江元、岡野栄之、岡田洋平**、疾患特異的 iPS細胞を用いた球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の病態解析、第14回日本再生医療学会総会、横浜、2015年3月
11. **下門大祐、小野寺一成、石原康晴、勝野雅央、祖父江元、岡野栄之、岡田洋平**、疾患特異的 iPS細胞を用いたニューロマスキュラーパソロジーの解析、第14回日本再生医療学会総会、横浜、2015年3月

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(1) 発明の名称：ヒト分化細胞由来多能性幹細胞由来の胚様体及び神経幹細胞培養方法

発明者：岡野栄之、岡田洋平、中村雅也

PCT出願：PCT/JP2010/000640

申請日：2010.2.3

(2) 発明の名称：iPS細胞のクローンの選択方法、及びその選択方法に用いる遺伝子の選択方法

発明者：岡田洋平、岡野栄之、角田達彦、宮冬樹

PCT出願：PCT/JP2012/054800

出願日：2012.2.27

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 委託業務成果報告（業務項目）

## 疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経疾患解析基盤の構築

担当責任者 道勇 学 愛知医科大学医学部内科学講座（神経内科） 教授

**研究要旨** 球脊髄性筋萎縮症（SBMA）などの運動ニューロン病の、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態モデルを作成するために、ヒト多能性幹細胞から、遺伝子導入を行わずに迅速・高効率に運動ニューロンを誘導する培養法を確立した。分化誘導中に加える低分子化合物を検討し、安定的に高効率に運動ニューロンを誘導することが可能となった。また運動ニューロン特異的なレポーターレンチウイルスを作成し、iPS 細胞由来運動ニューロンを可視化する技術を開発した。今後これらの技術を組み合わせて用いることで、疾患特異的 iPS 細胞を用いた運動ニューロン変性メカニズムの解明を進める予定である。

### A. 研究目的

神経変性疾患の病態解析では、従来はモデルマウスなどが用いられてきたが、近年開発された iPS 細胞の技術を用いて患者の体細胞から多能性幹細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導することで、患者自身の神経系細胞を用いた病態解析や薬剤開発が可能になった。

本研究では、下位運動ニューロンの変性疾患である球脊髄性筋萎縮症（SBMA）を標的として、患者由来 iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンを用いて新しい疾患モデルを作成することで、本疾患における運動神経変性の、より真に迫った病態解析および新規治療法の開発へ応用するための技術基盤構築を推進した。

### B. 研究方法

ヒト iPS 細胞は、SNL フィーダー細胞上でヒト ES 細胞培地（20% KSR、4ng/ml bFGF 含有）で維持培養し、分化誘導に用いた。分化誘導開始後、経時的に RNA を採取し、定量的 RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。その際、各種阻害剤を添加して、分化誘導に与える影響を検討した。また、細胞種特異的マーカーの免疫染色による解析を行った。

レンチウイルスは、レンチウイルスベクタープラスミドを、パッケージングプラスミドとともに 293T 細胞へ導入して作成し、培養上清を

回収して使用した。レポーター遺伝子の発現は、抗 GFP 抗体による免疫染色で評価した。

（倫理面への配慮）

ヒト iPS 細胞を用いた研究は、愛知医科大学医学部倫理委員会において、「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」として承認されており、それに基づいて研究計画を立案・遂行している。レンチウイルスを用いた実験は、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」（カタルヘナ法）等を遵守し、愛知医科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けた上で実施した。

### C. 研究結果

#### 1. ヒト iPS 細胞の運動ニューロンへの迅速・高効率分化誘導法の開発

我々は、これまでに胚様体 (Embryoid body: EB) を介した神経幹細胞の分化誘導法を開発してきているが (Okada et al., *Stem Cells* 2008, Nori and Okada, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011)、この方法では目的のニューロンを得るまでに 1~2 ヶ月と、長期間の培養を要する。そこで、BMP の阻害剤である Dorsomorphin と、TGF $\beta$  の阻害剤である SB431542 を添加する Dual Smad inhibition (Chambers et al., *Nat Biotech* 2009) を併用し、さらに神経分化を促進する GSK3 $\beta$  阻害剤

の BIO を分化誘導の初期に添加することで神経分化誘導の効率化と培養期間の短縮化を行った（この培養法を以下 DSB）。この培養法を用いることで、従来より大幅に短い培養期間で神経幹細胞のマーカである *SOX1* の発現上昇が得られ、高効率に神経幹細胞を誘導できるようになった。また、この分化誘導過程で、後分化因子であるレチノイン酸と腹側化を促す Sonic Hedgehog シグナルを活性化する Purmorphamine を添加することで、分化誘導後すぐに神経幹細胞マーカである *SOX1* や *PAX6* の発現上昇が、その後速やかに運動ニューロンの前駆細胞で発現する *OLIG2* や *NGN2* の顕著な発現上昇が観察された。さらに、この条件下で培養した EB を接着培養で分化させると、約 1 週間後には約 30% 程度の HB9 陽性、Isl-1 陽性運動ニューロンが誘導された。このようにして誘導した運動ニューロンは、成熟運動ニューロンのマーカである ChAT を発現し、筋芽細胞株 (Hu5/E18) 由来骨格筋との共培養により、 $\alpha$ BTX で標識される神経筋接合部 (NMJ) が形成され、その機能性が示された。この DSB の培養法は、誘導過程において複数の阻害剤を加えることで誘導期間を短縮でき、簡便になったが、添加する阻害剤の細胞毒性により、得られる細胞数の減少や分化誘導のばらつきを生んでいた。そこで、これらの欠点を改善するために、分化誘導の初期に加える低分子化合物の変更を検討した。まず、GSK3 $\beta$  阻害剤の BIO を、現在最も選択性の高い CHIR99021 (CHIR) へ変更することで運動ニューロンへの分化誘導を評価した（この培養法を以下 DSC）。その結果、CHIR を用いた場合には (DSC)、EB における細胞死が顕著に減少し、DSB と比較して細胞総数は  $1.8 \pm 0.68$  倍に増加した。定量的 RT-PCR による解析では、運動ニューロンマ

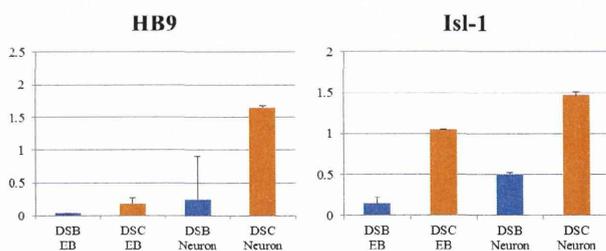


図 1 DSB, DSC における HB9, Isl-1 発現比較

カの発現は、DSB と比較して飛躍的に増加しており (図 1)、有意に高効率に運動ニューロンを誘導できたと考えられた。

次に、BMP 阻害剤の Dorsomorphin を、その誘导体である LDN193189 (LDN) に変更して、その効果を検討した（この培養法を以下 LSC）。DSC と LSC で培養した EB、および接着分化させた細胞では、運動ニューロンマーカの発現に有意差は認めなかったが、LSC で培養した場合には、DSC で培養した場合に比べて EB 中の細胞の生存率が改善し、接着培養開始時に得られる細胞数は更に  $1.55 \pm 0.43$  倍に増加した。また、DSC の場合と同等に高効率に Hb9 陽性運動ニューロンが誘導された。さらに、EB を数日早く接着分化させても運動ニューロンへの分化を示したことから、LSC を用いることでより短期間で運動ニューロンを分化誘導できる可能性が示された。

これらの小分子化合物変更の結果、LSC による分化誘導では、運動ニューロンへの誘導効率の改善と、DSB と比較して平均 2.84 倍の細胞数を得ることが可能となった。

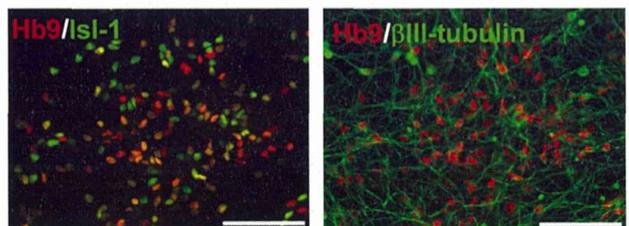


図 2 LSC で誘導した運動ニューロン

## 2. ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの可視化

iPS 細胞由来運動ニューロンを生きたまま標識・可視化することができれば、ライブセルイメージングへの応用や、フローサイトメトリー (FACS) を用いた運動ニューロンの濃縮・純化へ応用することができる。特に iPS 細胞由来運動ニューロンを濃縮・純化することで運動ニューロン特異的な病態解析が可能となる。そこで、マウス *HB9* エンハンサー制御下に蛍光タンパクである Venus を発現するレポーターレンチウイルスベクターを作成した (pSIN2-Hb9<sup>438</sup>-Venus)。このベクターを用いて作成したレンチウイルスをヒト多能性幹細胞から分化誘導した運動ニューロンに導入した

ところ、Venus 陽性細胞が数多く観察され、その約 80%の細胞が実際に Hb9 を発現していた (図 3)。今後、このレポーターを用いたライブセルイメージングや、FACS を用いた運動ニューロンの濃縮、純化を予定している。

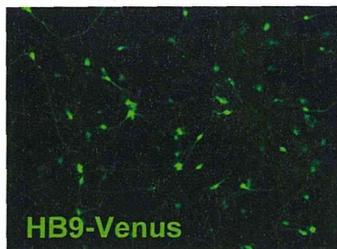


図 3 Hb9<sup>438</sup>-Venus 陽性運動ニューロン

#### D. 考察

ヒト多能性幹細胞の神経分化誘導は数多く報告されてきたが、遺伝子導入を行わない場合、どの培養法も、長期間の培養を要するものが多く、疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析の課題であった。本研究では、従来行われてきた Dual Smad inhibition に加え、GSK3βの阻害剤である BIO を用いることで、遺伝子導入することなく、従来よりも短時間で 30-40%の運動ニューロンを誘導できる培養法を構築した。この方法では、加える小分子化合物の毒性などが問題となってきたが、BIO をより選択性の高い CHIR99021 へ、Dorsomorphin を LDN193189 に変更したことで、更に高効率で安定的な分化誘導が可能となり、DSB と比較して 3 倍程度の運動ニューロンを誘導することが可能になった。このように、短期間に安定的に大量の運動ニューロンを分化誘導することが可能になったことによって、今後の運動ニューロン疾患の病態解析や薬剤スクリーニングなどを効率的に行うことができるものと考えられる。

さらに、この培養法と運動ニューロンを可視化するレポーターを合わせて、ライブセルイメージングや濃縮・純化した運動ニューロンにおけるトランスクリプトーム解析などの病態解析を行うことで、運動ニューロン特異的病態変化の解析が可能になると考えられる。

#### E. 結論

ヒト iPS 細胞から、迅速・簡便・高効率・安定的に運動ニューロンを分化誘導する培養法

を確立・改善した。また HB9 エンハンサーを用いたレポーターレンチウイルスを作成し、運動ニューロンを可視化する方法を構築した。今後、これらの手法を組み合わせ、SBMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンを用いて神経変性メカニズムの解析を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, Hamada C, Kondo K, Yoneoka T, Akimoto M, Yoshino H. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone(MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 15(7-8):610-7, 2014

##### 2. 学会発表

1. 比嘉智子、中島康自、桑原千秋、安藤宏明、湯浅知子、安本明弘、田口宗太郎、田邊奈千、角田由華、藤掛彰史、徳井啓介、丹羽淳一、泉雅之、中尾直樹、道勇学、脳卒中急性期における自律神経機能-電子瞳孔計による対光反応と CVRR の関連 第 55 回日本神経学会学術大会、福岡、2014 年 5 月
2. 家田一文、林博教、橋詰玉枝子、木村伸也、河尻博幸、柳瀬敦志、泉雅之、丹羽淳一、道勇学、脳卒中に対する急性期リハビリテーションの効果、第 51 回日本リハビリテーション医学学会学術集会、名古屋、2014 年 6 月
3. 小野寺一成、下門大祐、鳥居由紀子、石原康晴、勝野雅央、道勇学、祖父江元、岡野栄之、岡田洋平、疾患特異的 iPS 細胞を用いた球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の病態解析、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月

#### H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得・出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 動物モデルおよび患者検体を用いた 球脊髄性筋萎縮症の病態解析と新規治療法の開発

担当責任者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科 教授  
勝野 雅央 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科 准教授

**研究要旨** 球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の運動ニューロンと骨格筋の双方において、PPAR $\gamma$ の発現が低下しており、そのアゴニストである pioglitazone を投与することで脊髄・骨格筋の変性を抑止することが示された。また、SBMA の運動ニューロン・骨格筋では NF $\kappa$ B シグナルの活性化がみとめられたことから、今後 NF $\kappa$ B シグナルが治療の標的分子となる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、アンドロゲン受容体（AR）の CAG リピートの異常伸長により運動ニューロン変性を呈する神経筋疾患である。その病態の根幹は、伸長ポリグルタミン鎖を含む異常 AR がアンドロゲン依存性に核内に移行することと考えられており、異常 AR が運動ニューロン・骨格筋の各々において毒性を発揮すると考えられている。Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は転写因子である PPAR family の一つであり、脂質代謝、糖質代謝、炎症反応、NF $\kappa$ B シグナル、ミトコンドリア機能等における幅広い役割が知られている。本研究の目的は、多彩な生理活性を有する PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazone (PG) を SBMA モデル細胞・モデルマウスに投与し、その効果を明らかにすることで、SBMA における運動ニューロンと骨格筋の変性に共通する分子病態を解明することである。

### B. 研究方法

神経系の培養細胞（NSC34 細胞）と骨格筋系の培養細胞（C2C12 細胞）に対して、伸長した（AR-97Q）もしくは正常（AR-24Q）の CAG リピートを有する N 末 AR 断片を一過性強制発現させ、SBMA 細胞モデルとそのコントロールを作成した。ウエスタンブロット、定量 RT-PCR を用いて蛋白質・mRNA の定量を行うとともに、

WST アッセイ、LDH アッセイ、Anexin V アッセイなどで細胞活性・細胞死の解析を行った。また、CAG リピートが 97 に延長したヒトの全長変異 AR を有する SBMA モデルマウス（AR-97Q）（n=20）に、生後 6 週齢から PG を粉末飼料に混和して ad libitum に経口投与し、対照群（n=21）と運動機能や寿命などの表現型を比較し、ウエスタンブロット、定量 RT-PCR を用いて各種蛋白質・mRNA の定量を行った。また、免疫組織化学を用いて病理学的解析を行い、染色強度を定量的に解析した。

（倫理面への配慮）

患者検体（病理組織・蛋白質・mRNA など）を用いた実験および患者遺伝子解析については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を受けた上で実施した。マウスを用いた実験は、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」（カルタヘナ法）等を遵守し、組換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の承認を受けた上で実施した。動物実験にあたっては、名古屋大学動物実験委員会の承諾を得た上で実施した。

### C. 研究結果

神経細胞（NSC34 細胞）と筋細胞（C2C12 細

胞) のいずれにおいても、AR-97Q 断片を発現する SBMA 細胞モデルではコントロールに比べ PPAR $\gamma$  の発現量が減少していた。また PPAR $\gamma$  のプロモーター活性も SBMA 細胞モデルで低下しており、全長の変異 AR を発現する安定細胞株でも同様の結果で、dihydrotestosterone 添加による AR の核内移行により PPAR $\gamma$  のプロモーター活性はさらに低下した。PPAR $\gamma$  を一過性強制発現させることにより細胞の viability が改善し、PPAR $\gamma$  のノックダウンでは viability が低下した。これらの結果は PPAR $\gamma$  の SBMA 細胞モデルに対する保護的な役割を示唆した。さらに SBMA 細胞モデルに PG を投与したところ、PPAR $\gamma$  のプロモーター活性ならびに PPAR $\gamma$  の発現量が増加し、細胞の viability やミトコンドリア機能の改善、および細胞死の減少がみとめられた。

次に SBMA モデルマウス (AR-97Q) に PG を経口投与したところ、AR-97Q マウスの病態進行は、体重、Rotarod、握力、生存率の全てのパラメーターにおいて PG 投与により有意に改善した (図 1)。

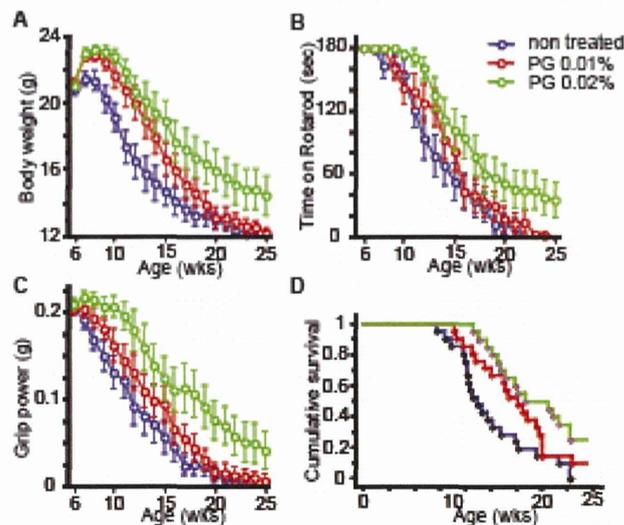


図 1. SBMA マウスモデルの表現型に対する PG の効果

SBMA マウスモデルの脊髄・骨格筋の双方において、コントロール (野生型) と比較して PPAR $\gamma$  の発現量は低下し、PG 投与により上昇した。病理学的には、脊髄と骨格筋における変異 AR の核内集積は治療前後で変化がなかったものの、運動ニューロンと骨格筋の萎縮改善、ア

ストログリア増生の抑制をみとめた。さらにウエスタンブロット・免疫組織化学等の手法を用いて解析したところ、SBMA モデルマウスでは野生型マウスと比較して、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスの上昇、運動ニューロンや骨格筋における NF $\kappa$ B シグナルの活性化、グリア細胞機能の変化などがみとめられたが、これらの分子変化は PG 投与により改善した (図 2)。

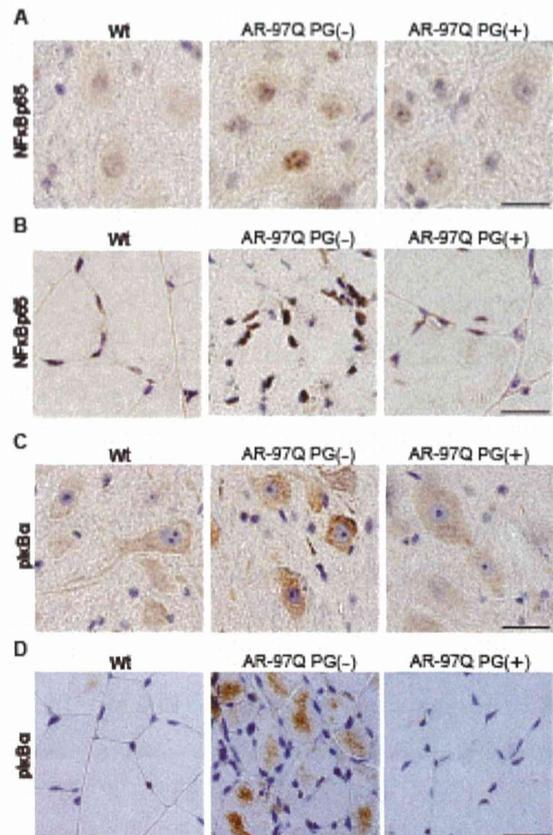


図 2. SBMA マウスモデルの脊髄・骨格筋における NF $\kappa$ B シグナルに対する PG の効果

これらの結果は培養細胞を用いた検討でも同様に示され、神経系・骨格筋系の双方の SBMA 細胞モデルにおいて、酸化ストレスと NF $\kappa$ B 活性化が認められ、PG はそれらを抑制した (図 3)。

マイクロアレイ解析を用いてマウス脊髄と骨格筋における遺伝子発現を治療群と無治療群を比較したところと、免疫機能に関与する遺伝子の変化を多くみとめ、細胞モデル・動物モデルにおいて PG が NF $\kappa$ B シグナルを抑制したことと矛盾しない結果であった (Iida et al., *Hum Mol Genet* 2014)。

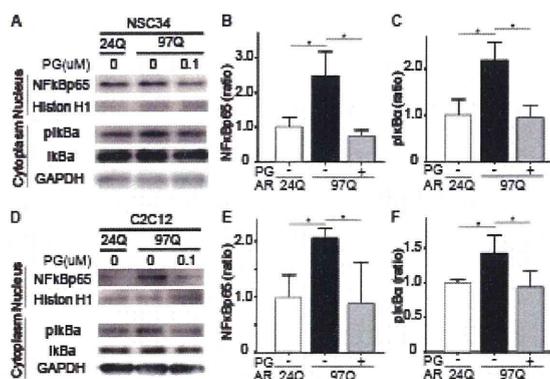


図3. SBMA 培養細胞モデルにおけるPGの効果

#### D. 考察

PPAR $\gamma$ アゴニストはミトコンドリア機能の増強などを介して抗炎症作用を発揮することが知られており、先行研究においても神経変性、外傷、脳梗塞などの疾患モデルへの効果が示唆されている (Quintanilla et al., *J. Biol. Chem.* 2008; Kiaei et al. *Exp. Neurol.* 2005)。本研究でも、PPAR $\gamma$ アゴニストがSBMA マウスモデルにおける神経・筋変性を抑制することが示され、その分子機序としてミトコンドリア機能の改善に伴う酸化ストレスの抑制や NF $\kappa$ B シグナルの活性化阻害が示唆された。これらの知見は神経系培養細胞と骨格筋性培養細胞を用いた細胞実験でも裏付けられた。こうしたことから、SBMA では運動ニューロンと骨格筋に共通した病態が存在し、神経のみならず骨格筋も重要な治療の対象であることが示された。また今回の研究により、NF $\kappa$ B シグナルがSBMA の病態に深く関与していることが示された。NF $\kappa$ B 活性化は筋萎縮性側索硬化症側索硬化症など様々な神経変性疾患と関連していることが報告されており、NF $\kappa$ B シグナルは神経疾患に共通した治療の標的である可能性がある (Swarup et al, *J Exp Med.* 2011)。

PG は現在糖尿病薬として使用されており、SBMA を含め神経変性疾患の安全かつ効果的な治療薬の候補であると考えられる。ただし、マウスレベルで効果が示されている ALS については臨床試験では有効性が示されておらず、SBMA 患者に対する本治療法の有効性については更なる解析が必要と思われる。

#### E. 結論

SBMA ではミトコンドリア機能調節に関わる転写因子である PPAR $\gamma$ の発現が脊髄・骨格筋の両方で低下しており、そのアゴニストである PG は脊髄および骨格筋の双方において SBMA の病態を抑止することが示された。この結果はSBMA における運動ニューロン・骨格筋のクロストーク異常を支持するものであり、今後このマウスモデルを用いて、患者 iPS 細胞由来運動ニューロンや骨格筋でみられる分子変化の検証を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

- 論文発表
- Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Hum Mol Genet.* 24(2) 314-329 2015.
- Katsuno M, Watanabe H, Yamamoto M, Sobue G. Potential therapeutic targets in polyglutamine-mediated diseases. *Expert Rev Neurother.* 14(10) 1215-1228, 2014.
- Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology.* 82(20) 1813-1821, 2014.
- Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy. *Endocrinology.* 155(7) 2624-2634, 2014.
- Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H,

**Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G.** Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 23(13) 3552-3565, 2014.

## 2. 学会発表

1. **Haliievski K, Xu Y, Henley CL, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL.** Androgen-dependent deficits in muscle-derived BDNF correlate with motor dysfunction in two mouse models of spinal bulbar muscular atrophy. Neuroscience 2014, Washington DC, USA. 2014年11月.
2. **Xu, Atchison W, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL.** SBMA motor dysfunction may be due to failed neuromuscular transmission. Neuroscience 2014, Washington DC, USA. 2014年11月.
3. **Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Sahashi K, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Ishigaki S, Fujioka Y, Tanaka F, Sobue G.** Muscle-specific Control Of Hsp70 In Polyglutamine Induced Motor Neuron Disease. 25th International symposium on ALS/MND. Brussel, Belgium, 2014年12月.
4. **勝又 竜, 勝野雅央, 足立弘明, 近藤直英, 飯田 円, 中辻 秀朗, 宮崎 雄, 藤内玄規, 祖父江 元.** TGF- $\beta$  シグナル阻害による運動ニューロン変性の病態. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月.
5. **近藤直英, 勝野雅央, 足立弘明, 佐橋健太郎, 宮崎雄, 飯田円, 藤内玄規, 石垣診祐, 藤岡祐介, 田中章景, 祖父江元.** DNA メチル化阻害剤が球脊髄性筋萎縮症の病態に与える影響の解析. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月.
6. **佐橋健太郎, 勝野雅央, Hung Gene, 足立弘明, 近藤直英, 飯田円, 中辻秀朗, 宮崎雄, 藤内玄規, C. Frank Bennett, 祖父江元.** アンチセンス核酸を用いた球脊髄性筋萎縮症の病態、治療研究. 第55回日本神経学会学

術大会, 福岡, 2014年5月.

7. **荒木周, 中辻秀朗, 勝野雅央, 鈴木啓介, 坂野晴彦, 須賀徳明, 橋詰淳, 土方靖浩, 祖父江元.** 運動ニューロン疾患における耐糖能異常の解析. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月.

## H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得・出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし