

iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた運動失調症の治療開発研究

業務担当責任者：岡澤 均 東京医科歯科大学難治疾患研究所
研究協力者：田川一彦 東京医科歯科大学

研究要旨

岡澤グループはこれまでの研究事業を通じて、極めて高いレベルの網羅的質量解析技術を保持している。本研究では、ヒト SCA1 患者 iPS 細胞由来の神経細胞を対象として質量解析を行う。これにより、SCA1 の重症度・進行度を反映するバイオマーカーの探索を目指し、現在、条件検討など予備的な検討を行っている。

A. 研究目的

神経変性疾患の一部、特にアルツハイマー病などではバイオマーカー探索型研究が進んでおり、臨床的に有用なものもすでに存在している。一方、脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) は比較的希な疾患であり、研究は殆ど進んでいない。岡澤グループは、これまでポリグルタミン病あるいはアルツハイマー病を対象に、種々のモデル動物およびヒト脳サンプルを対象として、世界に先駆けて、プロテオーム、トランスクリプトーム、インタラクトームなど各種の網羅的解析(オミックス)を行い、病態関連分子を同定してきた(文献 1-4)。さらに、岡澤グループは、他の研究事業を通じて世界最高水準の網羅的質量解析技術を現在保有している。

本研究では、これらの経験を踏まえつつ、ヒト SCA1 患者患者 iPS 細胞由来の神経細胞を対象として、同様のオミックス解析を行い、SCA1 の重症度・進行度に直結するバイオマーカー候補分子を捉えることを目的とする。

B. 研究方法

北海道大学・佐々木教授グループより SCA1 患者の血液・皮膚の提供を受ける。慶応大学・岡野栄之教授グループとの共同研究を基に、これらの細胞から iPS 細胞を樹立する。これらのサンプルを LC-MS で解析し、健常者とリン酸化状態が異なる分子を探索する。また、得られた候補分子は臨床サンプルを用いて確認する。

(倫理面への配慮)

北大・慶応大および医科歯科において、血液・皮膚サンプルの採取と使用・iPS 細胞作成に関する申請がすでに受理されている。これらの倫理申請は、人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意の項目について、国の基準を完全に満たしている。また、実験動物は使用せず、動物愛護上の配慮には該当しない。これらのことから、本研究は倫理面において問題がないと判断した。

C. 研究結果

SCA1 特異的な iPS 細胞を二人の患者さんよりそれぞれ 3 系統ずつ、合計 6 系統作出した。樹立した iPS 細胞で見られる CAG リ

ピート数と患者で見られるリピート数の関係を、佐々木教授グループとの協働のもとに調べた。DNA は常法に従って抽出し、ダイレクトシーケンスおよびフラグメント解析法を用いて CAG リピート数を検討した。その結果、樹立した iPS 細胞の CAG リピート数が患者とほぼ同一であることが確認された。

D. 考察

これらの疾患特異的 iPS 細胞を用いて、神経細胞へ分化誘導することで、解析が開始できる。

E. 結論

サンプルの準備と条件設定が進行しており、解析が進めばバイオマーカーを捉えることができると考えられる。

[参考文献]

1. Qi M-L, Tagawa K, Enokido Y, Yoshimura N, Wada Y, Watase K, Ishiura S, Kanazawa I, Botas J, Saitoe M, Wanker EE, Okazawa H Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. **Nature Cell Biol.** 2007;9:402-414
2. Tagawa K1, Marubuchi S, Qi ML, Enokido Y, Tamura T, Inagaki R, Murata M, Kanazawa I, Wanker EE, Okazawa H. The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. **J Neurosci.** 2007; 27(4):868-80.
3. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N,

Tagawa K, Wanker EE, Okazawa H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. **J Cell Biol.** 2010;189(3):425-43.

4. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. **Hum Mol Genet.** 2015 : 24(2);540-58.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

1. Mizuguchi, M., Obita, T., Serita, T., Kojima, R., Nabeshima, Y., Okazawa, H. Mutations in the *PQBP1* gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15kD. **Nature Commun.** 2014;5:3822
2. Ito, H., Shiwaku, H., Yoshida, C., Homma, H., Luo, H., Chen, X., Fujita, K., Musante, L., Fischer, U., Frint, S. G., Romano, C., Ikeuchi, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S., Muramatsu, S. I., Kawachi, T., Hoshino, M., Sudol, M., Arumughan, A., Wanker, E. E., Rich, T., Schwartz, C., Matsuzaki, F., Bonni, A., Kalscheuer, V. M., Okazawa, H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by *Pqbp1*-hypofunction in neural stem progenitor cells. **Mol Psychiatry.** 2014;doi: 10.1038/mp.2014.69.

3. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. ***Hum Mol Genet.*** 2015 : 24(2);540-58.
4. Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Chen, X., Homma, H., Sasabe, T., Shimizu, J., Shimizu, S., Tamura, T., Muramatsu, SI., Okazawa, H. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. ***EMBO Mol Med.*** 2014;7(1);78-101.
5. Shiraishi, R., Tamura, T., Sone, M., Okazawa, H. Systematic Analysis of Fly Models with Multiple Drivers Reveals Different Effects of Ataxin-1 and Huntingtin in Neuron Subtype-Specific Expression. ***PLoS One.*** 2014: 9(12);e116567.

2. 学会発表

1. Okazawa, H. "Comprehensive Phosphoproteome Analysis Unravels the Core Signaling Network that Initiates the Earliest Synapse Pathology in Preclinical Alzheimer's Disease Brain", ISP Symposium 2014 - Ageing and Metabolis, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 2014.8.28 (Oral)
2. Tamura, T., Barclay, S, S., Fujita, K., Ito, H., Motoki, K., Shimamura, T., Tagawa, K., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Tagawa, K., Imoto, S., Miyano,

- S., Okazawa, H. "Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1" Neuroscience2014, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2014.9. 13 (Poster and short talk)
3. Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Yoshida, C., Sone, M., Okazawa, H. "A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. Neuroscience2014, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2014.9.12 (Poster)
4. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第55回日本神経学会学術大会「脊髄小脳失調症1型におけるDNA損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演) 福岡国際会議場、2014.5.23
5. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第55回日本神経学会学術大会「TERA/VCP/p97のDNA修復機能不全は複数の神経変性疾患に関与する」(ポスター)、福岡国際会議場、2014.5.23
6. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第55回日本神経病理学会総会学術研究会「脊髄小脳失調症1型におけるDNA損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演) 学術総合センター(東京) 2014.6.6
7. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊

藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(口演)、学術総合センター(東京)、2014.6.6

8. 田村拓也、岡澤均 第 7 回分子高次機能研究会「昆虫モデルから見る神経疾患の特異性と普遍性」(口演) KKR 沼津はまゆう(静岡) 2014.8.25

9. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 37 回日本神経科学大会「情報科学を用いた神経変性疾患の病態解明」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.13

10. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第 37 回日本神経科学大会「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.12

11. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会「脊髄小脳失調症 1 型の分子病態コアネットワークの解明」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.26

12. 伊藤日加瑠、塩飽裕紀、吉田千里、本間秀典、陳西貴、藤田慶大、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会「神経幹細胞の Pqbp1 機能不全による小頭症は in utero 遺伝子治療によって改善できる」(ポスター)

パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.27

13. 矢島 隆明、田村 拓也、岡澤 均、曾根 雅紀 第 37 回日本分子生物学会年会「ショウジョウバエアルツハイマー病モデルにおける yata 遺伝子による APP 輸送制御」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25

14. 岡澤 均、大谷 彰子 運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班平成 26 年度 研究報告会「iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた SCA1 のバイオマーカー探索」(口演)、JA 共済ビル カンファレンスホール(東京) 2015.1.15

15. 岡澤 均「神経変性疾患と知的障害・小頭症をつなぐ RNA 関連分子 P Q B P 1」(招待講演)第 1 回 T M D U 「知の創造」若手コアセミナー、2014.8.20、東京医科歯科大学

16. 岡澤 均「ゲノム安定性と脳機能」(招待講演)第 37 回日本分子生物学会年会シンポジウム・ゲノム再生、パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25-27(発表日 11/25)

17. 岡澤 均「シナプス病態から脳疾患治療へ、網羅的質量分析の示唆するアルツハイマー病のシナプス超早期病態の分子機構」(岡澤班)(招待講演)『包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「精神神経疾患研究の現状と展望：新学術 5 領域の相互理解・連携を目指して」2014.12.11、東京医科歯科大学

18. 岡澤 均「「シナプス病態」領域の紹介」(招待講演)『包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「「大脳新皮質構築」「シナプス病態」「メゾ神経回路」3 領域合同公開シンポジウム」2014.12.13、ホテル東京ガーデンパレス

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：脊髄小脳変性症を予防又は治療するための薬剤

出願人：国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

出願番号：PCT/JP2014/077258（基礎出

願：特願 2013-214155）

2. 実用新案登録

3. その他

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。

3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。