

＜シンポジウム (1)-4-5＞ iPS 細胞研究の現状と展望

iPS 細胞をもちいた ALS の病態解析

江川 斉宏¹⁾²⁾ 井上 治久¹⁾²⁾

要旨：われわれは、*transactive response DNA binding protein 43 kDa* (*TDP-43*) 遺伝子変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; FALS) 患者由来の人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; 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をもちいて ALS の病態解析をおこなった。FALS 由来 iPS 細胞の運動ニューロン分化能は正常であり、神経細胞へ分化後、*TDP-43* タンパク質は生化学的に不溶性を獲得していた。純化した FALS 運動ニューロンでは、神経細胞骨格関連の遺伝子が低下し、神経突起が短縮していた。さらに、酸化ストレスに対する脆弱性をみとめ、アナカルジン酸投与によりこれらの表現型は改善した。iPS 細胞由来の運動ニューロンをもちいて、ALS の新規治療薬シーズの発見が期待できる。

(臨床神経 2013;53:1020-1022)

Key words：人工多能性幹細胞, 筋萎縮性側索硬化症, 薬剤スクリーニング

ALS は進行性の運動ニューロン疾患であり、その病態、治療法は確立されていない。2006 年、山中らにより iPS 細胞が発見され¹⁾、2008 年には、ALS 患者由来の iPS 細胞を運動ニューロンへ分化誘導できることが報告された²⁾。また、翌年、ALS と同様、運動ニューロン疾患である脊髄性筋萎縮症患者由来の iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンが、疾患の特徴を再現し、既知の薬剤によって、その表現型が改善することが報告された³⁾。それ以後、疾患由来の iPS 細胞をもちいた研究が盛んになる中で、われわれは ALS の病態解明と新規治療薬シーズをみいだすことを目的に、ALS 患者由来の iPS 細胞から分化した運動ニューロンをもちいて ALS の病態解析をおこなった。

われわれは、FALS の責任遺伝子の 1 つである *TDP-43* 遺伝子について着目した。*TDP-43* タンパク質は、2 つの RNA 認識モチーフと 1 つの glycine-rich ドメインを有し、後者に変異部位が集積している。*TDP-43* 変異を有する FALS 患者由来のリンパ球において、*TDP-43* タンパク質の不溶性が増加し、細胞質内に *TDP-43* タンパク質の凝集体が観察されることが報告されている⁴⁾。また、*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⁵⁾。

まず、われわれは、コントロール 5 名の皮膚線維芽細胞から 7 ライン、*TDP-43* 変異を有する (G298S, M337V, Q343R) FALS 患者 3 名の皮膚線維芽細胞から 9 ラインの iPS 細胞を樹立し、それらを無血清凝集浮遊培養法 (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate with quick reaggregation; SFEBq) をもちいて、運動ニューロンへ分化誘導した⁶⁾。分化誘導した細胞は、運動ニューロンのマーカーである HB9, Islet1, ChAT や SMI-32 を発現した。また、分化過程に

において、HB9 のプロモーター下に蛍光タンパク質を発現するレンチウイルスベクターをもちいて運動ニューロンを標識した。その後、運動ニューロンへの分化誘導能、生化学解析、形態や遺伝子発現について、コントロールと FALS での比較解析をおこなった (Fig. 1)。

樹立したすべての iPS 細胞は胚性幹細胞のマーカーである NANOG, SSEA-4 を発現し、三胚葉への分化能を有していた。*TDP-43* 変異は運動ニューロン分化後にも保たれていた。パッチクランプ法では、分化誘導した運動ニューロンは、活動電位を有し、筋芽細胞株とシナプスを形成、また興奮性・抑制性シナプス後電位を有し、電気生理学的に機能的であることを確認した。FALS iPS 細胞の運動ニューロン分化能はコントロール iPS 細胞と同様、正常であった。FALS では *TDP-43* タンパク質は生化学的に不溶性を獲得し、免疫化学染色では、FALS 運動ニューロンで *TDP-43* 陽性の凝集体が増加した。フローサイトメトリーで純化した運動ニューロンの遺伝子解析では、FALS において、RNA 輸送や、スプライソソームなど RNA 代謝関連の遺伝子群の増加と神経細胞骨格関連の遺伝子群の低下をみとめた。ニューロンフィラメントに関連する *Neurofilament medium polypeptide*, *Neurofilament light polypeptide* 遺伝子の mRNA 発現レベルが低下しており、神経突起が短縮していた。

次にわれわれは、運動ニューロンの脆弱性について検討した。ヒ素による酸化ストレスを与えると、とくに FALS の運動ニューロンにおいて *TDP-43* の発現が上昇し、細胞死が観察された。この細胞死アッセイをもちいて、RNA 代謝制御に関係する複数の化合物の効果を解析したところ、アナカルジン酸が酸化ストレスに対する細胞死を抑制した。さらに、アナカルジン酸は *TDP-43* の発現を低下させるとともに、神

¹⁾ 京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門 [〒 606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 53]

²⁾ JST, CREST

(受付日：2013 年 5 月 29 日)

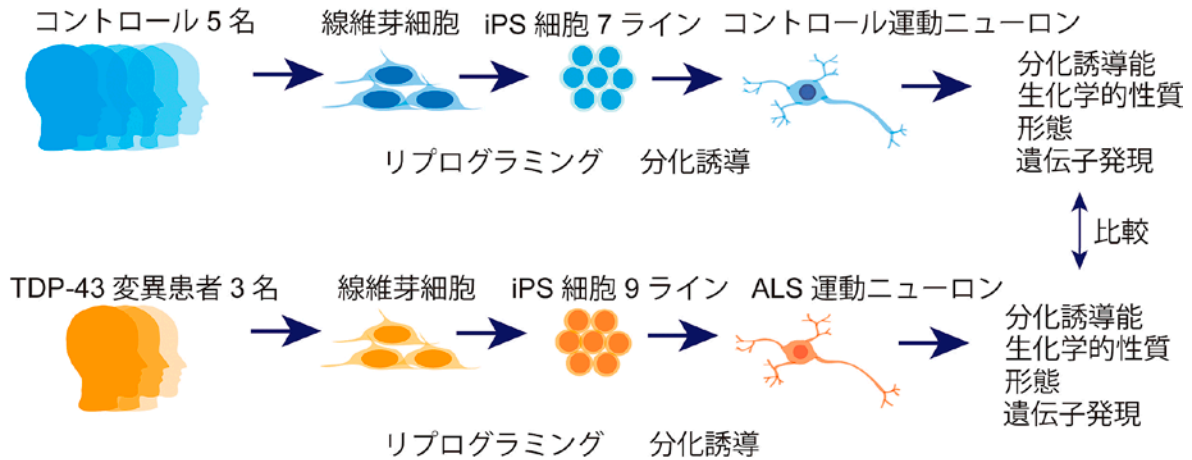


Fig. 1 TDP-43 変異をもつ iPS 細胞をもちいた疾患解析.

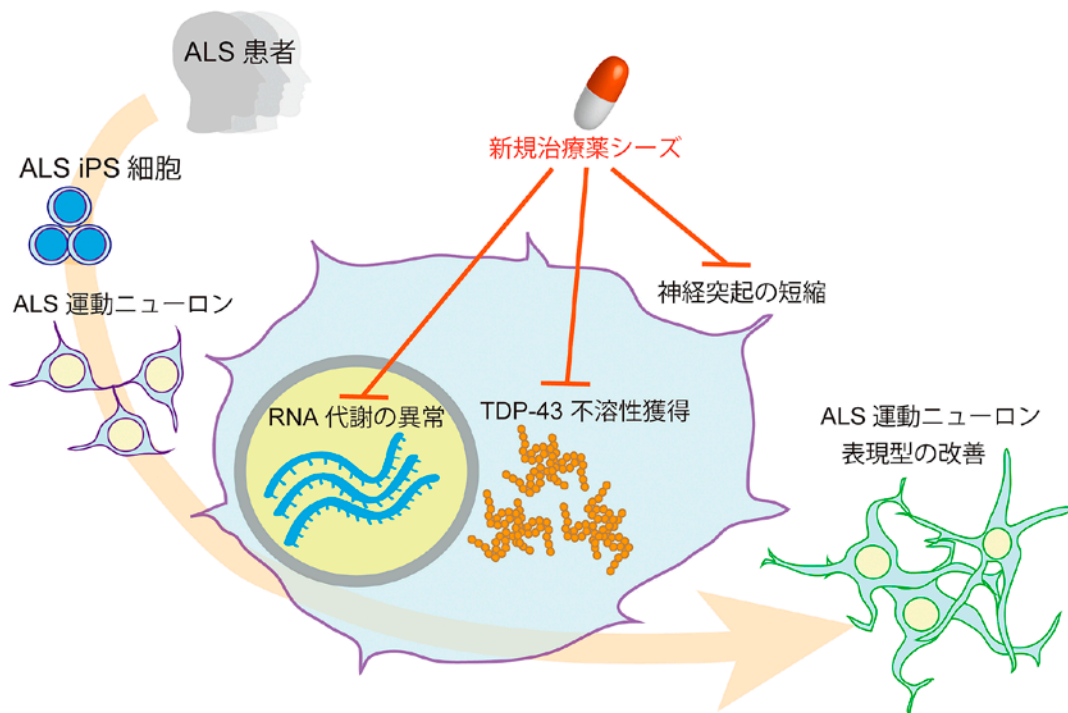


Fig. 2 TDP-43 変異由来の細胞表現型をもちいた ALS 新規薬剤候補の探索.

経突起を伸長させた。以上のことから、われわれは、iPS 細胞由来の運動ニューロンをもちいて、ALS 新規治療薬シーズをみいだすことができる可能性を示した (Fig. 2)。

われわれの報告と同じ時期に、Bilican らは、M337V の TDP-43 遺伝子変異をもつ iPS 細胞を樹立し、疾患由来の運動ニューロンの解析をおこなっている。かれらは、われわれと同様、M337V 変異を有する iPS 細胞の運動ニューロン分化能は正常であること、コントロールとくらべて生化学的に

不溶性 TDP-43 が増加し、薬剤によるストレスに脆弱であることを示している⁷⁾。

以上のことから、FALS 由来の iPS 細胞から分化した運動ニューロンは、動物モデルやヒト組織で観察される ALS の病態の一部を再現した。これらの細胞表現型をベースに ALS の新規治療薬シーズの発見が期待できる。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

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) Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218-1221.
- 3) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-280.
- 4) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008;40:572-574.
- 5) Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 2010;19:671-683.
- 6) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, et al. Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 2012;4:145ra104.
- 7) Bilican B, Serio A, Barmadac SJ, 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* 2012;109:5803-5808.

Abstract

ALS disease modeling and drug screening using patient-specific iPSCs

Naohiro Egawa, M.D., Ph.D.¹⁾²⁾ and Haruhisa Inoue, M.D., Ph.D.¹⁾²⁾

¹⁾Department of Clinical Application, Center for iPSC Cell Research and Application, Kyoto University

²⁾JST, CREST

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder in which motor neuron (MN) loss in the spinal cord leads to progressive paralysis and death. Cytosolic aggregations in ALS MNs are composed of Tar DNA-binding protein-43 (TDP-43). Genetic analysis has identified more than twenty mutations of TDP-43 in ALS cases. Although accumulating evidence provides several hypotheses of disease mechanism, it is still needed to discover effective cure for ALS. We aimed to reveal cellular phenotypes in ALS MNs for identifying a drug-screening target for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs). To generate patient-specific iPSCs, dermal fibroblasts were obtained by biopsy from ALS patients carrying mutant TDP-43. The fibroblasts were reprogrammed by retrovirus or episomal vectors. Disease-specific iPSCs were differentiated into MNs expressing HB9 and SMI-32. Despite short culture period, ALS MNs recapitulated several disease phenotypes including detergent-insoluble TDP-43, shortened neurites and cellular vulnerability that observed in patient and animal models. Anacardic acid treatment reverted those phenotypes. Disease-specific iPSCs might provide a first step for drug-screening platform for ALS using patient-specific iPSCs.

(*Clin Neurol* 2013;53:1020-1022)

Key words: iPSCs, ALS, drug screening