

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14962

研究課題名(和文)アルツハイマー病治療薬探索に資するヒトiPS由来細胞を用いた新規薬効評価系の構築

研究課題名(英文)Construction of hiPS-based drug evaluation system for Alzheimer's disease

研究代表者

赤池 昭紀(Akaike, Akinori)

京都大学・薬学研究科・客員教授

研究者番号：80135558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット培養ニューロンで蓄積したA $\beta$ による神経毒性発現機序がヒトニューロンにおいても重要であるかを検証し、ヒトニューロンを用いた薬効評価系の構築を目指した。最初にiPS細胞から神経幹細胞への分化を行い、フィーダー細胞を必要としない神経幹細胞を得た。また、ニューロン-アストロサイトの相互作用による細胞毒性への影響については、ラット培養ニューロン単独培養およびラット培養ニューロン-アストロサイトの混合培養を用いて検討を行ったところ、ニューロンとアストロサイトの相互作用によって、ニューロンへのA $\beta$ への感受性が変化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the mechanism of A $\beta$ -induced neurotoxicity accumulated in rat cultured neurons applied to human neurons and aimed to construct human iPS-based drug evaluation system for Alzheimer's disease. First, iPS cells were differentiated into neural stem cells (NSCs), and we obtained hiPS-differentiated NSCs which were not requiring feeder cells. Next, we examined that effect of neuron-astrocyte interaction on cytotoxicity using rat neuron monoculture and rat neuron-astrocyte mixed culture. It is suggested that the interaction between neuron and astrocyte reduce the susceptibility to A $\beta$ -induced neurotoxicity.

研究分野：薬理学

キーワード：ヒトiPS由来細胞 アルツハイマー病 薬効評価

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 由来ニューロンを用いたアルツハイマー病 (AD) 治療薬開発に向けた薬効評価系としては、Xu らによりアミロイド B タンパク質 (A $\beta$ ) がニューロン死を誘発することを報告した (Stem Cell Research, 2013) が、ニューロン死誘発には高濃度の A $\beta$  が必要であった。また、シナプス毒性を評価する実験系としてはげっ歯類の脳スライスを用いた評価系が頻用されているが、ヒトニューロンにおける評価系は開発されていない。本研究の遂行により新規実験系を開発することで、ヒトニューロンに対する細胞毒性ならびにシナプス毒性に対する有用な薬物の開発に貢献すると期待できる。

AD 治療薬開発に用いられているモデル動物は主にマウスである。また *in vitro* 薬効評価系としては、我々も含めラット・マウスといったげっ歯類が多用されてきた。しかしながら、これら動物細胞を用いた創薬研究では AD の新規治療薬の開発は成功していないのが現状である。そこで、モデル動物では再現出来ていないヒトニューロンに特有な現象を検証する必要があると考え、本研究ではヒト iPS 細胞由来ニューロンおよびアストロサイトをj用いて、げっ歯類を用いた培養ニューロンで蓄積してきた成果を検証するという着想に至った。

これまでに我々は、ラット培養大脳皮質ニューロンを用いて A $\beta$  誘発神経細胞死に際して、特異的な立体構造である毒性コンホマーの重要性を報告し、さらにその毒性発現機序には A $\beta$  の凝集と酸化ストレスの増大が重要な役割を果たすことを報告した (ACS Neurosci, 2012)。本研究において、これらの研究成果がヒトニューロンにおいても適用できるのかについて明らかにする。さらに、これまでに A $\beta$  によるシナプス毒性についてもマウスの急性スライスにより電気生理学的手法を用いることにより報告してきた (Eur J Pharmacol, 2008)。したがって、本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンおよびアストロサイトを共培養することにより形成したシナプス機能を測定することにより、A $\beta$  によるシナプス毒性について検討することを目指した。

## 2. 研究の目的

AD は進行性の神経変性疾患であり、広範な神経脱落が観察されるが、ニューロン保護に基づく治療薬の開発には成功していない。その一因にはヒト細胞を用いた適切な薬効

評価系の開発が遅れていることが挙げられる。そこで、本研究ではヒト iPS 由来中枢神経系細胞を用いて、画期的な AD 治療薬開発に有用な以下の 2 つの薬効評価系を構築することである。

ヒト iPS 由来ニューロンに対する A $\beta$  変異体を用いたニューロン保護の評価系の構築

ヒト iPS 由来ニューロンおよびアストロサイトの混合培養によるシナプス毒性の評価系の構築

本研究の遂行により、従来のげっ歯類であるラット、マウスの培養ニューロンで蓄積した神経脱落機序がヒトニューロンにおいても重要であるかを検証するとともに、ヒトニューロンを用いた薬効評価が可能になり、新たな AD 治療薬開発に貢献することが期待される。

## 3. 研究の方法

新規実験系の構築ならびに有用性を明らかにするため、以下の 2 つの項目について研究を進める。

A) ヒト iPS 由来ニューロンに対する A $\beta$  変異体を用いたニューロン保護の評価系の構築

A-1. ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける A $\beta$  毒性の検出: ヒト iPS 由来ニューロンに野生型および変異体 A $\beta$  を投与しニューロン死を評価する。

A-2. ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける A $\beta$  毒性メカニズムの解析: A-1 で得られた A $\beta$  毒性のメカニズムをラット初代培養ニューロンで得られた結果と比較しながら解析する。

B) ヒト iPS 由来ニューロンおよびアストロサイトの混合培養によるシナプス毒性の評価系の構築: ヒト iPS 由来ニューロンおよびアストロサイトを共培養し、形態的および機能的にシナプスを評価し、A $\beta$  によるシナプス毒性の評価系を確立する。

## 4. 研究成果

これまでラット培養大脳皮質ニューロンを用いた検討により、A $\beta$  処置により神経細胞死が誘発されることを示してきた。本研究においては、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いて、A $\beta$  毒性の発現ならびに薬効評価系を構築することを目的としている。その基礎的データとしてまず PC12 細胞を用いて、用いる実験資材ならびに試薬の妥当性について評価を行った。PC12 細胞を 96 well plate

ならびに 384 well plate に播種し、WST-1 などのいくつかの細胞毒性検出試薬を用いて、その細胞生存率の測定を行ったところ、96 well plate を用いて、CellTiter-Glo Luminescent Cell viability Assay を用いた際に再現性良く毒性の検出ができ、薬効評価系としての利用に向いていることが明らかとなった。

さらにニューロン - アストロサイトの相互作用による細胞死の変化については、ラット培養ニューロン単独培養およびラット培養ニューロン - アストロサイトの混合培養を用いて検討を行った。ニューロン単独培養においては、A $\beta$  毒性は観察されたが、混合培養系においてはその毒性の発現が顕著に減弱した。したがって、ニューロンとアストロサイトの相互作用によって、ニューロンへの A $\beta$  への感受性が変化することが示唆された。

続いて、ヒト由来 iPS 細胞からのニューロンへの分化誘導について検討を行った。まず iPS 細胞から神経幹細胞への分化を行い、フィーダー細胞を必要としない神経幹細胞へと分化させた。これらをストックし、増殖させることで継代可能な iPS 細胞由来神経幹細胞を得た。次に、この細胞に A $\beta$  や酸化ストレスをはじめとする各種細胞毒を添加することにより細胞死を誘導した。しかし、ラット初代培養大脳皮質ニューロンと比較して各種神経毒に対する感受性は低く、より高濃度の神経毒を投与しなければ細胞死は誘発できなかった。続いて、これらの神経毒によって惹起されるヒト iPS 由来神経幹細胞におけるタンパク発現量の変化を 2 次元電気泳動に基づいたプロファイリングによって検出を試みた。まず、代表的な酸化ストレスとして過酸化水素を処置した後、細胞を回収し、そのタンパク発現量の変化を検討した。過酸化水素処置により 2 次元電気泳動像は変化を起こし、そのパターンは酸化ストレスの代表例としてストックした。A $\beta$  を含めた他の神経毒によるタンパク発現量の変化についても今後蓄積を行う予定である。

次に、ニューロンとアストロサイトの相互作用により発現変化するタンパク性の機能分子の同定を進めた。ラット由来アストロサイトをニューロンと混合培養した後、アストロサイトのみを分離したものとアストロサイトのみで培養したものの両者からタンパク質を回収しその発現量の差異をマイクロアレイ解析により行った。その結果ケモカイン類の発現量が変化していた。さらにこれら

のケモカイン類をニューロンのみの培養に添加することによりニューロンのグルタミン酸毒性に対する感受性を低下させた。以上の結果より、アストロサイトはニューロンとの接触によりケモカイン類の産生を増加させ、ニューロンに対して保護作用を有することが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Izumi, Y., Kanbara, C., Nakai, T., Akaike, A., and Kume, T.: Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Sci Rep.*, 査読有, 7, 42111 (2017). doi: 10.1038/srep42111.
2. Zhou, Z., Yano, I., Odaka, S., Morita, Y., Shizuta, S., Hayano, M., Kimura, T., Akaike, A., Inui, K. and Matsubara, K.: Effect of vitamin K<sub>2</sub> on the anticoagulant activity of warfarin during the perioperative period of catheter ablation: Population analysis of retrospective clinical data. *J Pharm Health Care Sci.*, 査読有, 2, 17(2016)doi: 10.1186/s40780-016-0053-8.
3. Izumi, Y., Kondo, N., Takahashi, R., Akaike, A. and Kume, T.: Reduction of immunoreactivity against the c-terminal region of the intracellular  $\alpha$ -synuclein by exogenous  $\alpha$ -synuclein aggregates: possibility of conformational changes. *J Parkinson's Dis.*, 査読有, 6, 569-579 (2016) doi: 10.3233/JPD-160835
4. Kume, T., Suenaga, A., Izumi, Y. and Akaike, A.: Protective effect of dimethyl fumarate on an oxidative stress model induced by sodium nitroprusside in mice. *Biol Pharm Bull.*, 査読有, 39, 1055-1059(2016) doi: 10.1248/bpb.b16-00134
5. Izumi, Y., Yamamoto, N., Matsushima, S., Yamamoto, T., Takada-Takatori, Y., Akaike, A. and Kume, T.: Compensatory role of the Nrf2-ARE pathway against paraquat toxicity: Relevance of 26S proteasome activity. *J Pharmacol Sci.*, 査読有, 129, 150-159 (2015) doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.003.

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, パーキンソン病における移植治療効果向上を目指したドパミン神経突起伸長の試み, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台国際センター(仙台)
2. 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, 食品からの Nrf-2ARE 経路活性化物質の探索およびその神経保護作用, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 17 日 長崎ブリックホール(長崎)
3. 久米利明, 泉安彦, 赤池昭紀, ゼブラフィッシュを用いた脳疾患発症機構の解析, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 17 日 長崎ブリックホール(長崎)
4. 正木雄太, 泉安彦, 松村敦子, 赤池昭紀, 久米利明, 6-Hydroxydopamine 毒性に対するシソ由来カルコンの中脳ドパミン神経保護作用における heme oxygenase-1 の関与, 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 11 月 19 日, 京都大学百周年時計台記念館(京都)
5. 澤幡雅仁, 小田果奈, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, ゼブラフィッシュ脳梗塞モデルにおける中枢神経系細胞の薬効評価系の構築, 第 2 回ゼブラフィッシュ創薬研究会, 2016 年 11 月 4 日, みんなの森 ぎふメディアコスモス(岐阜)
6. 赤池昭紀, 神経変性疾患の予防・治療に向けたニューロン生存の制御, 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年 10 月 15 日, 大阪薬科大学(大阪)
7. 赤池昭紀, 薬剤師国家試験制度の改善に向けた制度の検討, 第 1 回日本薬学教育学会大会, 2016 年 8 月 27 日, 京都薬科大学(京都)
8. 赤池昭紀, 薬剤師教育の将来-薬学教育 6 年制導入後の現状と課題, 平成 28 年度国公立薬理学関連教科担当教員会議, 2016 年 8 月 25 日, 東北大学(宮城)
9. 中川翔太, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, 培養大脳皮質アストロサイト由来 CCL6 によるニューロン保護作用, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016, 2016 年 8 月 24 日, 東北大学(仙台)
10. 久米利明, 澤幡雅仁, 宮本萌里, 川本雄士, 泉安彦, 赤池昭紀, Zebrafish brain ischemia-reperfusion model induces neuronal death and glial activation., 第 22 回小型魚類研究会, 2016 年 8 月 20 日, 岡崎カンファレンスセンター(愛知)
11. 泉安彦, 丹羽健太, 赤池昭紀, 久米利明, Positive allosteric modulators of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor suppress microglial activation. 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 21 日, パシフィコ横浜(横浜)
12. 泉安彦, 片岡春恵, 猪瀬由莉, 赤池昭紀, 久米利明, 化合物ライブラリーから見出した Nrf2-ARE 経路活性化物質の細胞保護作用機序の解明, 第 129 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 6 月 24 日, 広島県医師会館(広島)
13. 赤池昭紀, 特別講演: 内在性因子および天然物によるニューロン生存・機能の制御, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 11 日, パシフィコ横浜(横浜)
14. 高鳥悠記, 牧谷洗希, 南奈央子, 河本啓, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, 土田勝晴, ドネベジルの神経保護作用における GSK-3 の活性制御の役割, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 10 日, パシフィコ横浜(横浜)
15. 牧谷洗希, 中川翔太, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, プラジキニンによって惹起されるアストロサイト内カルシウム濃度上昇のドネベジルによる抑制, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9 日, パシフィコ横浜(横浜)
16. 赤池昭紀, ニューロン保護・新生におけるニコチン受容体シグナルの役割の解明, 特定研究「ニコチン受容体とニューロン生存・再生の制御」総括検討会, 2016 年 2 月 23 日, スクワール麹町(東京)
17. 赤池昭紀, アルツハイマー病治療薬と神経保護・再生, 第 4 回ニューロカンファレンス和歌山, 2016 年 1 月 9 日, (和歌山)
18. 正木雄太, 泉安彦, 松村敦子, 赤池昭紀, 久米利明, 6-Hydroxydopamine 毒性に対するシソ由来カルコン DDC の中脳ドパミン神経保護作用, 第 128 回日本薬理学会近畿部会, 2015 年 11 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪)
19. 赤池昭紀, 薬と現代社会, NHK 大河講座「ひとの大学」, 2015 年 11 月 11 日, 名古屋大学(名古屋)
20. 澤幡雅仁, 宮本萌里, 武政翔大, 川本雄士, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, Hypoxia-reoxygenation Induces Brain Ischemia-reperfusion, Resulting in Neuronal Damage in Zebrafish Larva., 第 21 回小型魚類研究会, 2015 年 9 月

- 20日, 大阪大学銀杏会館, (大阪)
21. 牧谷洗希, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, アストロサイトにおけるブラジキニン誘発細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に対するドネペジルの抑制作用, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2015, 2015年8月29日, 東京大学(東京)
  22. 泉安彦, ドバミンニューロンによる線条体神経支配の in vitro 評価系構築と細胞接着分子の関与, 生体機能と創薬シンポジウム2015, 2015年8月28日, 日本大学(千葉)
  23. 高鳥悠記, 牧谷洗希, 南奈央子, 河本啓, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, 土田勝晴, Glycogen synthase kinase-3 を介したドネペジルの保護作用機序, 生体機能と創薬シンポジウム2015, 2015年8月27日, 日本大学(千葉)
  24. 泉安彦, 近藤直人, 竹内啓喜, 赤池昭紀, 久米利明, 高橋良輔, Conformational changes of endogenous  $\alpha$ -synuclein by exogenous  $\alpha$ -synuclein fibrils, 第38回日本神経科学大会, 2015年7月30日, 神戸国際会議場(神戸)
  25. 高橋良輔, 竹内啓喜, 泉安彦, パーキンソン病とニコチン受容体, 公益財団法人喫煙科学研究財団 第30回平成26年度助成研究発表会, 2015年7月23日, 京王プラザホテル(東京)
  26. 赤池昭紀, 久米利明, 高鳥悠記, ニューロン保護・新生におけるニコチン受容体シグナルの役割の解明, 公益財団法人喫煙科学研究財団 第30回平成26年度助成研究発表会, 2015年7月23日, 京王プラザホテル(東京)
  27. 赤池昭紀, モデル・コアカリキュラム改訂と薬学教育への期待, 医療薬学フォーラム2015, 2015年7月5日, 名古屋国際会議場(名古屋)
  28. 門脇麻友, 加藤久美子, 白木孝憲, 保母暁史, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, 青じそ亜臨界抽出物による Nrf2-ARE 経路活性化作用, 第127回日本薬理学会近畿部会, 2015年6月26日, 長良川国際会議場(岐阜)
  29. 門脇麻友, 加藤久美子, 白木孝憲, 保母暁史, 泉安彦, 赤池昭紀, 久米利明, 青じそ亜臨界抽出物による Nrf2-ARE 経路活性化作用, 日本ケミカルバイオロジー第10回年会, 2015年6月11日, 東北大学(仙台)

[図書](計2件)

1. 乾賢一, 赤池昭紀, 長船健二, 直江知樹, 濱田哲暢, 他42名, 中山書店, バイオ医薬品と再生医療(2016) 283p.
2. 赤池昭紀, 日本薬剤師会, 日本薬剤師会雑誌, 視点: 薬剤師国家試験と薬学教育(6年制)(2016) 第68巻 3号 p1

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤池 昭紀 (AKAIKE, Akinori)  
京都大学大学院薬学研究科・客員教授  
研究者番号: 80135558

### (2) 研究分担者

泉 安彦 (IZUMI, Yasuhiko)  
京都大学大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 60456837