

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500446

研究課題名(和文) ヒト胚性幹細胞から作製した筋萎縮性側索硬化症モデル細胞を用いた疾患発症機序の研究

研究課題名(英文) Disease mechanism research using cellular amyotrophic lateral sclerosis models derived from hES cells

研究代表者

饗庭 一博 (AIBA, Kazuhiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：30564752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子SOD1を過剰発現するヒト胚性幹細胞を用いてALSモデル細胞を作製した。正常型、変異遺伝子に関わらずSOD1の過剰発現は、運動神経細胞やアストロサイトへの分化効率に影響しない。しかし、ある変異型SOD1遺伝子を発現している神経細胞の神経突起の長さを調べたところ、野生型や他の変異型遺伝子発現神経細胞と比べ有意に短くなっていることが分かった。この形態変化がALS発症・進行にどのように関与しているのかは、今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of SOD1, a responsible gene of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) did not affect differentiation of motor neuron and astrocyte from human embryonic stem cells. But we found that one mutant type of SOD1 affected the length of neuritis. In future, we will investigate whether this change is involved in the onset or progress of ALS.

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 脳神経疾患 ヒトES細胞 ヒト多能性幹細胞 疾患モデル細胞

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は、運動神経細胞が選択的に影響を受け、機能を喪失していく神経変性疾患の一つであり、治療法のない難病である。現在使用されている既存薬の治療効果は決して満足のいくものではなく、根本的な治療法、予防薬がないのが現状である。これは、最適な疾患モデルの欠如による疾患発症メカニズムの解明や新薬開発が遅れていることを示唆している。

モデル細胞作製において、変異遺伝子を強制発現させる方法は、発現自体は自然に近いとは言えないが、疾患発症や症状を早めることが可能である。これまでに我々はランダム遺伝子導入法で ALS 原因遺伝子をヒト胚性幹細胞 (ヒト ES 細胞) に導入し、運動神経細胞への分化誘導法 (Wada et al., 2009, *PLoS ONE* 4(8): e6722) によって運動神経細胞へ分化させたところ、ALS の特徴的な症状 (運動神経細胞死) を確認していた (Wada et al., 2012, *Stem Cells Translational Medicine* 1:396-402)。しかし、ランダムなゲノムへの遺伝子導入では、導入遺伝子の挿入位置を決めることができないため、挿入突然変異が起きている可能性を排除することができない。そこで、この挿入突然変異の問題を解決するために、我々は、ヒト ES 細胞ゲノムの特定部位に遺伝子を導入する方法を開発した (Sakurai et al., 2010 *Nucleic Acids Research* 38(7):e96, and Sakurai et al., 2010 *In Embryonic Stem Cells: Basic Biology to Bioengineering*, Ed. Kallos MS & Eng P, INTEC, p105-122)。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、最近家族性 ALS の原因遺伝子が同定されてきており研究の進展が期待されている。我々は、これまでに ALS で影響を受ける運動神経細胞をヒト ES 細胞から分化させる方法を、またヒト ES 細胞を用いてゲノム特定部位への遺伝子導入法を確立してきた。本研究では、これらの成果をヒト ES 細胞からの ALS モデル細胞作製に適用し、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子 SOD1 の変異型を発現するヒト胚性幹細胞 (ヒト ES 細胞) を作製し、これらを運動神経細胞やアストロサイトへ分化させることで ALS モデル細胞とし、原因遺伝子の異なった変異型を発現している ALS モデル細胞間の比較研究を通して、ALS 発症・進行機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

申請者が開発したヒト ES 細胞ゲノムの特定部位に遺伝子を導入する方法 (Sakurai, et al., 2010) に用いる発現ベクター用いて、ALS 原因遺伝子であるスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) の発現ベクターを構築した。その際、各遺伝子で複数の変異型を選

択した。導入遺伝子を発現させるためのプロモーターとしては恒常的に発現するプロモーター (CAG プロモーター) を使用した。エレクトロポレーションによって上記で構築した発現ベクターを部位特異的遺伝子導入法で用いるヒト ES 細胞株 (親株) に導入すると、Cre/LoxP による遺伝子置換反応によって HPRT 遺伝子座に遺伝子が挿入される。

その後、SOD1 過剰発現ヒト ES 細胞の未分化性維持の確認と核型解析 (外注) SOD1 過剰発現を転写産物レベル、酵素活性レベルで確認した。SOD1 変異型遺伝子が発現するヒト ES 細胞を、運動神経細胞、もしくはアストロサイトへ分化させた。その後、分化誘導効率や、神経突起の長さを測定した。

4. 研究成果

ALS 原因遺伝子 SOD1 を過剰発現するヒト ES 細胞株の作製する際には、我々が開発したヒト ES 細胞のゲノム特定部位 (ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 遺伝子: HPRT1) に遺伝子を導入できる方法を用いた。構築した発現ベクターをヒト ES 細胞へ導入したところ、変異型 SOD1 の過剰発現によるヒト ES 細胞の増殖、生体に影響は見受けられなかった。発現ベクター由来の SOD1 の発現は RT-PCR 法によって、その発現を確認した。SOD1 発現ヒト ES 細胞での未分化マーカーの発現を RT-PCR 法と免疫染色法によって確認し、また核型解析によって、SOD1 発現ヒト ES 細胞の核型が正常であることを確認した。このことは、SOD1 の過剰発現は、ヒト ES 細胞の未分化性や染色体の安定性に影響しないことを示している。

樹立した SOD1 発現 ES 細胞株は、同一なゲノム部位 (HPRT1) に外来遺伝子が挿入されているため、理論上はクローン間で違いが見られないはずであるが、ALS 原因遺伝子の SOD1 を発現するヒト ES 細胞株のクローン間に導入遺伝子の発現量などが同じレベルであるか確認した。遺伝子発現量、タンパク質発現量、SOD 酵素活性を調べたところ、同じ変異遺伝子が発現しているクローン間では、それらの発現レベルや酵素活性に有意な差は見られなかった。しかし、異なる変異遺伝子間では、遺伝子やタンパク質発現量、および酵素活性に明らかな違いが見られ、SOD1 遺伝子の変異型による転写産物レベル、タンパク質レベル、酵素活性に相違があることを明らかできた。

次にヒト ES 細胞を運動神経細胞へ分化誘導させ、変異型 SOD1 を発現しているヒト ES 細胞が運動神経細胞への分化能を保持していること確かめた。神経分化誘導過程で神経幹細胞が分化してくるが、SOD1 発現の有無によって、神経幹細胞マーカー分子の発現レベルに違いは見られなかった。また、その後運動神経細胞へも分化可能であり、SOD1 が過剰に発現していることを確認した。また、アストロサイトへの分化能は、数継代したニュー

ロスフェアを播種した後、アストロサイトマーカー分子の陽性細胞の検出によって確認し、遺伝子変異型による分化効率に差がないことが分かった。これらの結果は、正常型、変異遺伝子型に関わらず SOD1 過剰発現は、運動神経細胞やアストロサイトへの分化誘導に影響しないことを示している。しかし、ある変異型遺伝子を発現している神経細胞の神経突起の長さを調べたところ、野生型や他の変異型遺伝子発現神経細胞と比べ有意に短くなっていることが分かった。この形態変化が ALS 発症・進行にどのように関与しているのかは、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Nakatsuji N, Kawase E, Miyazaki T, Minami I, Aiba K, Multidisciplinary research of human pluripotent stem cells for application to cell therapy and drug discovery, 2013, 10, p160-163, 査読無、DOI: 10.1007/s13770-013-0019-y

2. Wada T, Goparaju SK, Tooi N, Inoue H, Takahashi R, Nakatsuji N, Aiba K, Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Derived from Human Embryonic Stem Cells Overexpressing Mutant Superoxide Dismutase 1, Stem Cells Trans Med, 2012, 1, p396-402, 査読有、DOI: 10.5966/sctm.2011-0061

3. Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R, Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis, 2011, 11, p405-414, 査読有、DOI: 10.1177/1087057110397888

[学会発表](計15件)

1. 磯部武久、遠井紀江、中辻憲夫、饗庭一博、遺伝子改変ヒト ES 細胞由来 ALS-SOD1 モデル細胞の作製および解析、日本薬学会第 134 回年会、2014/3/30、熊本県熊本市

2. 磯部武久、遠井紀江、饗庭一博、中辻憲夫、遺伝子改変ヒト ES 細胞由来 ALS モデル細胞の作製および病態解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013/12/4、兵庫県神戸市

3. Isobe T, Tooi N, Aiba K, Nakatsuji N, Amyotrophic lateral sclerosis model cells derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant SOD1 or TDP-43、

ISSCR 11th Annual meeting, 2013/6/13、アメリカ合衆国ボストン

4. Aiba K, Honda M, Goparaju SK, Tooi N, Minami I, Nakatsuji N, Cellular neurodegenerative disease models derived from genetically manipulated human pluripotent stem cells, ISSCR 10th Annual Meeting, 2012/6/13-6/16、神奈川県横浜市

5. Goparaju SK, Wada T, Tooi N, Aiba K, Nakatsuji N, Development of a human embryonic stem cell-based disease model for amyotrophic lateral sclerosis, ISSCR 10th Annual Meeting, 2012/6/13-6/16、神奈川県横浜市

6. Murakami G, Inoue H, Asai Y, Aiba K, Itoh H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R, Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis, 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, 2012/6/3-6/8、オーストラリアメルボルン

7. Aiba K, Site-directed integration of transgenes and human pluripotent stem cell-derived neurodegenerative disease models, Using Stem Cells for Biological and Therapeutical Discovery in Mental Illness, 2012/4/25、アメリカ合衆国ベセスダ

8. 饗庭一博、ヒト多能性幹細胞から作製されるモデル細胞 - 神経変性疾患モデルと心筋モデル -、日本農芸化学会、2012/3/23、京都府京都市

[図書](計3件)

1. Tahimic CGT, Sakurai K, Aiba K, and Nakatsuji N, Springer, Cre/loxP, Flp/FRT systems and pluripotent stem cell lines. In Site-directed insertion of transgenes, 2012, 189-209

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pp1/grp/nakatsuji.html>

報道

ヒト ES 細胞から ALS 疾患モデルを作製し、病状再現に成功(2012年5月、<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pr/2012/05/09-nr.html>)

NHK(5月9日、10日)、京都新聞(5月9日 1

面) 産経新聞(5月9日2面) 読売新聞(5月9日33面) 朝日新聞(5月9日夕刊8面) 日本経済新聞(5月9日34面) 日刊工業新聞(5月9日19面) Wall Street Journal 日本版(2012年5月9日web) その他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗庭 一博 (AIBA, Kazuhiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号: 30564752

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし