

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591242

研究課題名(和文) 紀伊半島のALSとパーキンソン認知症複合患者由来iPS細胞の作成と神経細胞誘導

研究課題名(英文) Establishment of iPS cells derived from the patients with Kii ALS/PDC and proliferation from iPS cells to neuronal cells

研究代表者

小久保 康昌 (KOKUBO, YASUMASA)

三重大学・地域イノベーション学研究科・招へい教授

研究者番号：60263000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Kii ALS/PDC患者5名の血液検体を用いて、疾患特異的iPS細胞を樹立した。各症例間でT細胞やiPSCの樹立効率・増殖速度は異なっていた。今後、神経系解析に用いるiPSCクローンの選抜を進め、各種神経細胞やグリア細胞といった神経系細胞への分化誘導を行い、病態の解明や新たな治療に迫る検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：Disease-specific iPS cells have been established from T cells derived from the five patients with Kii ALS/PDC. The efficiency of establishment and speed of proliferation were different among cases. We are going to select iPSC clones for differentiation to neuronal cells and glia cells, and analyze them to reveal pathology and create a new treatment for Kii ALS/PDC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：紀伊半島 ALS/PDC iPS細胞 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紀伊 ALS/PDC は、地域集積性のある稀少神経難病であるが、これまでに原因遺伝子は同定されておらず、モデル動物は存在しない。

2. 研究の目的

患者由来 iPS 細胞を樹立し、分化誘導した神経細胞やグリア細胞を用いて、病態解明や創薬を目指す。

3. 研究の方法

末梢血単核球又は T 細胞を調製。エピソーマルベクターを用いて、SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, ドミナントネガティブ p53, LIN28, EBNA1 といった初期化因子を導入し、STO フィーダー細胞上で 3~5 週間培養を行った。各々の患者由来 iPSC について、解析に用いることの可能なクローンの選抜を試行した (エピソーマルベクターの残存およびゲノム挿入が起きていないこと、未分化マーカー発現、テラトーマ形成能の確認、神経系分化能の確認)。

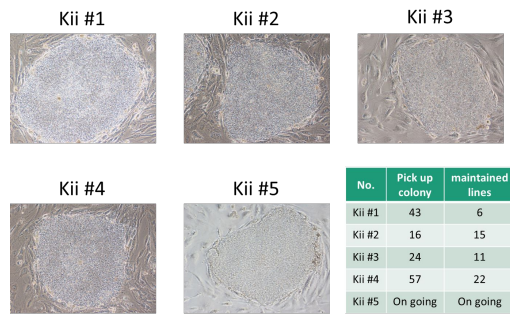
図 1: 対象患者プロフィール

Cases	Gender	Age	Onset	Birth	FH	Clinical phenotype		
						Parkinsonism	Dementia	MND
Kii #1	Male	66	59	Hohara	+	+	-	-
Kii #2	Female	74	60	Hohara	+	+	+	+
Kii #3	Female	83	72	Hohara	+	+	+	+
Kii #4	Female	74	58	Hohara	+	+	+	+
Kii #5	Male	79	74	Hohara	+	-	+	-

4. 研究成果

紀伊 ALS/PDC 患者 5 名の血液検体を用いて、疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。各症例間で T 細胞や iPSC の樹立効率・増殖速度は異なっていた。

図 2: 樹立した 疾患特異的 iPS 細胞



現在疾患特異的 iPSC の樹立、選別を行っている段階であり、今後、) アルカリフォスファターゼ活性の確認、) RT-PCR・免疫染色を用いた未分化マーカーの発現確認を行った後に、) SCID マウスへの iPSC 移植を用いたテラトーマ形成能 (多分化能) の確認、) 核型解析を行い、異常の認められないクローンを解析用として最終的に選別する。本疾患 iPSC 作成時の問題点としては、疾患の Heterogeneity が挙げられる。Kii ALS/PDC は家族性に発症するものの、遺伝子が同定されておらず、作製した iPSC を扱う上では、依然として孤発性疾患の要素が色濃く残る。可能であれば autopsy による確認が必要である。しかしながら、本疾患における iPSC 作製及び表現型の再現や病態解析が成功すれば、他の孤発性疾患解明の糸口ともなる。今後の展望として、疾患特異的ヒト iPSC から各種神経系細胞への分化誘導と病態解析 (樹立したヒト iPSC を用いて、運動神経、ドパミン作動性神経、興奮性神経、抑制性神経、グリア細胞へと分化誘導後、生化学的、遺伝学的並びに電気生理学的手法により、異常タンパク質蓄積をはじめとした in vivo で確認されている病態の再現、神経細胞の活動性や代謝能の解析) 及び創薬スクリーニング (細胞内活性酸素種の軽減、グルタミン酸による興奮毒性の抑制、異常構造物の抑止などを指標に、リルゾール、フリラジカルスカベンジャー、抗酸化ビタミン群といった既存の薬剤に加え、神経保護作用や異常凝集

物除去能を有する新たな治療薬を探索)を行
っていく予定である。

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 12 件)

1. Yui Nakayama, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Shigeki Kuzuhara, and Yasumasa Kokubo. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Kii Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-Dementia Complex. Journal of Neurodegenerative Diseases. 査読有, Article ID 679089, 4 pages 2013.

2. Kotaro Ogaki, Yanzhe Li, Masashi Takanashi, Kei-Ichi Ishikawa, Tomonori Kobayashi, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Masahiko Kishi, Hiroyo Yoshino, Manabu Funayama, Tetsuro Tsukamoto, Keiichi Shioya, Masayuki Yokochi, Hisamasa Imai, Ryogen Sasaki, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara, Hiroyuki Tomiyama, Nobutaka Hattori. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. 査読有, Parkinsonism Relat Disord. 2013 Jan;19(1):15-20.

3. Tameko Kihira, Kazushi Okamoto, Sohei Yoshida, Tetuya Kondo, Keiko Iwai, Sachiko Wada, Yoshinori Kajimoto, Tomoyoshi Kondo, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara. Environmental Characteristics and oxidative stress of inhabitants and patients with amyotrophic lateral sclerosis in a high-incidence area on the Kii peninsula, Japan. 査読有, Internal Medicine 2013;52;1479-1486

4. Ken-ichiro Kobayashi, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Takeshi Nishiguchi, Kenichi Isoda, Yasumasa Kokubo, Katsuhiko Ando, Masaki Katurahara, Yasuhiro Sako, Tetsuya Yanagida, Akira Ito, Sentaro Iwabuchi, and Kenji Ohnishi. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveller after returning from India. 査読有, Am J Trop Med Hyg. 2013 Jul;89(1):58-62.

5. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S.

-Synuclein Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. 査読有, J Neuropathol Exp Neurol. 2012;71:625-630.

6. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. 査読有, Parkinsonism and Related Disorders 18 (2012) 306-308

7. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshid S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. 査読有, Amyotroph Lateral Scler. 13:562-566, 2012

8. Tameko Kihira, S Yoshida, T Kondo, K Iwai, S Wada, S Morinaga, Y Kazimoto, T Kondo, K Okamoto, Y Kokubo, S Kuzuhara. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: A possible link to change in drinking water source. 査読有, Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2012; 13: 347-350

9. Kuzuhara S, Kokubo Y. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan (Muro disease): a review on recent research and new concept. Amyotrophic Lateral Sclerosis and the frontotemporal dementias. 査読有, Oxford University Press, Ed. By Michael J. Strong 2012, pp39-54.

10. Kokubo Y, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kuzuhara S. ほか. -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. 査読有, J Neuropathol Exp Neurol. 2012 Jul;71(7):625-630.

11. Kokubo Y, Morimoto S, Shindo A, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S. Cardiac 123I-Meta-Iodobenzylguanidine Scintigraphy and Lewy Body Pathology in a Patient with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinsonism-Dementia Complex of Kii, Japan. 査読有, Mov Disord. 26:401-403, 2011.

12. Hiroyuki Tomiyama, Hiroyo Yoshino, Kotaro Ogaki, Lin Li, Chikara Yamashita, Yanzhe Li, Manabu Funayama, Ryogen Sasaki, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara, and Nobutaka Hattori. PLA2G6 variant in Parkinson's disease. 査読有, J Hum Genet. 2011 May;56(5):401-403.

[学会発表](計 34 件)

1. Y. Kokubo, S. Morimoto, T. Nakagawa, K. Miyazaki, S. Kuzuhara. Clinical trial of Edaravone in amyotrophic lateral

- sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan. 24th International Symposium on ALS/MND. 6 - 8 December 2013 Milan, Italy
2. Tameko Kihira, Iori Sakurai, Sohei Yoshida, Ikuro Wakayama, Koichi Takamiya, Yukihiro Nakano, Ryo Okumura, Inuma Yuhto, Keiko Iwai, Junko Kohmoto, Yoshinori Kajimoto, Yasuhiro Hiwatani, Kazushi Okamoto, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara. Transitional metal contents in scalp hair and lifestyle of ALS patients and residents in the Kii Peninsula, Japan -the second report-. 24th International Symposium on ALS/MND. 6 - 8 December 2013 Milan, Italy
3. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo, Hiroyuki Hatsuta, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunohistochemical study of the cerebellum in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ parkinson-dementia complex (PDC) in Kii peninsula (ALS/PDC- Kii, Muro disease). Alzheimer's Association International Conference, 2013. July 13-17 Boston, USA
4. Yasumasa Kokubo. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula of Japan (Muro disease). - Recent Advances of Reserch -. 9th international congress on mental disorders & other non-motor features in Parkinson's disease and related disorders. MDPD 2013. in Seoul. South Korea. April 18-21, 2013.
5. Yasumasa Kokubo, Akira Taniguchi, Masato Hasegawa, Yuma Hayakawa, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Yoshihumi Hirokawa, Taizo Shiraishi, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Shigeki Kuzuhara. Alfa-Synuclein pathology of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. The 8th International Conference on Frontotemporal dementias, 2012.9.5-7, Manchester, UK.
6. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo, Masato Hasegawa, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunochemical Study Western blotting of tauopathy in ALS/ Parkinson Dementia Complex (PDC), Kii, Japan. AANP.2012.6.21-24.Chicago, USA
7. Shigeki Kuzuhara, Yasumasa Kokubo. Changing patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula in Japan. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology.2012.6.4-8. Melbourne, Australia
8. SHINDO A, KUZUHARA S, KOKUBO Y. NEUROPSYCHOLOGICAL STUDY OF PATIENTS WITH

AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX OF THE KII PENINSULA OF JAPAN. 22th International Symposium on ALS/MND. Sydney, Australia 30November-2December, 2011

〔図書〕(計 1 件)

1. Shigeki Kuzuhara, Yasumasa Kokubo.et. Oxford University Press, Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex in the Kii peninsula of Japan(Muro disease):a review on recent research and new concept. 2012. P39-54

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
紀伊半島の筋萎縮性総索硬化症/パーキンソン
認知症複合 -Kii ALS/PDC-
<http://kii-als-pdc-project.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保 康昌 (KOKUBO Yasumasa)
三重大学・大学院地域イノベーション学研
究科・招へい教授
研究者番号: 60263000

(2) 研究分担者

葛原 茂樹 (KUZUHARA Sigeki)
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授
研究者番号: 70111383
広川 佳史 (HIROKAWA Yoshifumi)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30322738

(3) 連携研究者

江良拓実 (ERA Takumi)

熊本大学 発生医学研究所・教授

研究者番号：00273706