

機関番号：72801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659530

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞由来神経細胞を用いたウイルスベクターによる脊髄性筋萎縮症の治療

研究課題名(英文)Therapeutical strategy of Spinal muscular atrophy by RNA virus vector delivery to human iPS-derived neural cells

研究代表者

荒川 正行 (ARAKAWA, Masayuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：90398868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。原因遺伝子はSurvival of motor neuron 1(SMN1)であり、現在まで根本治療はない。一方、ポリオウイルス(PV)はRNAウイルスであり、脊髄前角の運動神経細胞や中枢神経系に感染して重篤な病変を生じさせる。本研究では、ヒトiPS細胞を神経細胞へ分化誘導し、PVゲノム内に外来遺伝子を導入したPVベクターを作製した。このベクターをヒトiPS細胞由来神経細胞やSMA患者由来細胞に外来遺伝子としてGFP及びGFP-SMN融合蛋白質として発現させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA), a genetic neuromuscular disorder, leads to motor neuron degeneration. SMA is caused by reduced production of the survival of motor neuron (SMN) protein resulting from the homozygous deletion or mutation of the SMN1 gene. To date, however, it remains unclear how SMN protein deficiency causes the selective spinal motor neuron death seen in SMA because of a lack of a method to express SMN proteins by the appropriate delivery to the spinal cord. Therefore, an effective treatment of SMA does not presently exist. This study was focused on the potential of a neurotropic RNA virus, poliovirus (PV)-based vector as a novel therapeutic delivery system of exogenous protein in human iPS-derived neural cells and SMA-derived cells. In this study, PV-based expression vector delivery method exhibited an insight into the GFP or GFP-SMN protein expression during an early stage of human iPS-derived neural cells and SMA patient-derived cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 ポリオウイルス 運動神経細胞 人工多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。本疾患の原因遺伝子は第 5 染色体長腕 5q13 に存在する Survival of motor neuron 1 (*SMN1*) であり、現在まで根本治療法はない。

一方、ポリオウイルス (PV) は急性灰白髄炎 (小児まひ) の病因 RNA ウイルスであり、SMA と同病変部位である脊髄前角の運動神経細胞や中枢神経系に感染して重篤な病変を生じさせる。これまでに当研究室では PV の感染・複製機構や外来遺伝子導入 PV ベクターについて多くの知見を得てきている (Igarashi et al., 2010, Ohka et al., 2009, Yanagiya et al., 2005, Shiroki et al., Jia et al., 2002)。

ヒトを含めた霊長類においてのみ、PV は脊髄前角の運動神経細胞特異的に感染・複製することに対して、培養細胞では、宿主の種類や組織によらず感染・複製する。PV の感染機構については PV レセプターである CD155 が同定され、当研究室ではヒト型レセプターを発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製した (Koike, 1991)。この Tg マウスは PV に感染することが証明され、病態を示すモデルとして世界中で用いられている。霊長類や Tg マウス *in vivo* において PV の感染・複製モデルを用いた研究が行われているが、運動神経分化過程における PV の感染・複製機構の解明には至っておらず、新たな運動神経分化過程 *in vitro* の解析ツールが必要である。

近年、人工的多能性を有するヒト iPS 細胞が作製され (Takahashi et al., 2007)、iPS 細胞を運動神経細胞へ分化誘導するという報告が多数ある。さらに、SMA 患者由来組織から iPS 細胞が作製され、運動神経細胞に分化誘導させた SMA 病態モデルの解析及び薬物を用いた治療研究が報告された (Ebert et al., 2009)。

本研究では、未だ解明されていない胎児期から小児期と想定される運動神経分化過程の PV の感染・複製機構を解析し、PV が特異的に標的とする脊髄前角の運動神経細胞を主病変とする SMA の根本治療法を目指した外来遺伝子発現 PV ベクターの開発研究を行う。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト iPS 細胞を用いることにより PV の標的である脊髄前角運動神経細胞を想定した運動神経分化過程における PV の感染・複製機構を解析し、これらの結果から PV の標的と同じ脊髄前角運動神経細胞の変性を伴う SMA の根本治療を目指して安全性の高い外来遺伝子発現 PV ベクターの開発を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、SMA の根本治療を目指した PV ベクターを開発するために、宿主に対する PV

の感染・複製機構の解析が必須である。

### 1) 細胞培養

HeLa 細胞、293T 細胞、胚性腫瘍由来細胞株 NTERA-2 に対しては 10%FBS-DMEM の培地で維持した。正常ヒト皮膚線維芽細胞及び SMA I 型患者由来皮膚線維芽細胞に対しては 20%FBS-DMEM (1g/L glucose) の培地で維持した。ヒト iPS 細胞に対しては、基礎培地 (ReproFF2, リプロセル) とし、SNL 細胞をフィーダーとした条件下で細胞コロニーを維持した。

### 2) ポリオウイルス感染・複製に関する宿主因子の発現解析

PV のエントリーに重要なポリオウイルスレセプター (PVR) の神経分化誘導における発現様式、PV の複製に重要な PV ゲノムの 5' -noncoding region に存在する internal ribosome entry site (IRES) が知られている。この IRES の高次構造が PV の複製に重要とされており、その調節には、宿主蛋白質である IRES 結合蛋白質として、poly(pyrimidine) tract binding protein (PTBP1 or 2), La autoantigen, poly(rC) binding protein-2 (PCBP-2) などが関与していることが知られている。これらの宿主因子をリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法で調べた。

### 3) ヒト培養細胞の神経分化誘導

NTERA-2 細胞に対して 10%FBS-DMEM の培地の下、レチノイン酸 (10  $\mu$ M) を用いて 5 日間処理して神経分化誘導を行った。さらにヒト iPS 細胞を専用培地で培養後、回収した細胞コロニーを 12 well プレートに播種し、浮遊のコロニーに Noggin を添加し、7 日間培養後、レチノイン酸 + Sonic hedgehog (Shh) を添加した。10 日間の培養後、Accutase 処理を行い、コロニーをマトリゲル 24 well プレート (BD) に播種し、分化誘導因子 (BDNF, GDNF, NT-3) を添加し、培養開始時から 30 日目まで運動神経細胞への分化誘導を行った。これら神経分化誘導能を神経特異的抗体 (anti-Neurofilament H antibody, anti-III-tubulin antibody, anti-HB9 antibody) を用いた免疫組織化学染色法及びウエスタンブロット法で解析した。

### 4) ポリオウイルスベクターの作製

PV ベクターの作製では、ウイルスとして複製可能なまま全長の増殖型 PV に外来遺伝子を導入する場合、400 塩基程度までの外来遺伝子しか安定的に発現できないことがわかっている。一方、非増殖型 PV ベクターは PV ゲノム内の構造蛋白質をコードする領域を欠失した領域に外来遺伝子を導入できることが知られている。このベクターに構造蛋白質を補うことによりパッケージされた PV ゲノムの一部を欠失した非増殖型の欠陥干渉



った。蛍光顕微鏡下で細胞を観察すると細胞核内でドット状に存在することから SMN 複合体である gem の形成を生じ、GFP-SMN 蛋白質は機能を有することが示唆された。またこれらの蛋白質は、内在の SMN 蛋白質と一部共局在していた。これらの結果を第 61 回日本ウイルス学会学術集会にて発表した。今後、これらのデータを基に論文発表準備を進めていく。

これらの結果から総括すると、

- 1) 細胞培養系においては、非神経系の細胞では PV の感染・複製の顕著な違いは見られなかった。また宿主因子の発現においても PVR のように細胞種による発現の違いがあるが、他の宿主因子は変化が少ないことがわかった。しかし、ヒト iPS 細胞では、HeLa 細胞とは異なり感染性はあるもののウイルス複製能は異なった。これらの結果から幹細胞と分化後の細胞では感染・複製能が異なることが示唆された。
- 2) ヒト iPS 細胞において、神経分化誘導法を検討したが、III-tubulin 陽性の神経様細胞までは高効率で分化誘導できることが明らかとなったが、運動神経細胞のマーカーである Hb9 の発現誘導は約 10%と低率であった。今後、運動神経細胞の分化効率の向上が課題となった。
- 3) SMA の根本治療法を目指した外来遺伝子発現 PV ベクターの作製では、外来遺伝子として細胞内を可視化できる GFP 及び GFP をタグとした SMN 蛋白質の発現に成功した。これら GFP 及び GFP-SMN 蛋白質は HeLa 細胞では PV ベクターにより早期に発現し、SMN 蛋白質の機能一部を維持していることが判明した。また、ヒト iPS 細胞から神経細胞に誘導後、PV ベクターにより GFP 蛋白質を発現させることに成功した。さらに *SMN1* 遺伝子の欠失した SMA 患者由来皮膚線維芽細胞に導入したところ GFP-SMN 蛋白質は SMN 蛋白質の機能を維持することが明らかとなった。これらの結果は外来遺伝子発現 PV ベクターによる SMN 蛋白質の補充の可能性を強く示唆する結果であった。今後は安全性を高めるための PV ゲノムの改変が望まれる。

#### 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)

[学会発表](計 1 件)

荒川正行、滝沢直己、藤原俊伸、斎藤加代子、野本明男 神経変性疾患の治療を目指した外来遺伝子発現ポリオウイルスベクターの開発研究 第 61 回日本ウイルス学会学術

集会 2013 年 11 月 10 日 神戸国際  
展示場(神戸市)

[その他]

ホームページ等

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所

<http://www.bikaken.or.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

荒川 正行 (ARAKAWA, Masayuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：90398868

##### (3) 連携研究者

斎藤 加代子 (SAITO, Kayoko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：90138834