

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860722

研究課題名(和文) 球脊髄性筋萎縮症患者由来iPS細胞の樹立とポリグルタミン病の病態研究

研究課題名(英文) Establishment of iPS cells from spinal and bulbar muscular atrophy and the research of polyglutamine diseases

研究代表者

二瓶 義廣 (Nihei, Yoshihiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60468501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグルタミン病の一つである球脊髄性筋萎縮症(SBMA)患者由来iPS細胞の樹立と運動ニューロンへの分化誘導に成功した。分化誘導された神経細胞が、テストステロンによる凝集アンドロゲン受容体(AR)の増加を有意に強く引き起こすことを確認した。更に、治療薬の候補である17-AAGがARの代謝を促すことも確認できた。これらの結果は、疾患特異的iPS細胞が病態・創薬研究の新たなツールとなり得ることを示すものと考えられた。我々は更にその他のポリグルタミン病(マシャドジョゼフ病、DRPLA)や神経変性疾患患者由来iPS細胞を樹立している。これらを用いて今後ポリグルタミン病の病態研究を展開していく。

研究成果の概要(英文)：We established spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)-derived iPS cells (iPSCs) and confirmed motor neuron differentiation. Aggregation of androgen receptor in SBMA-iPSC-derived neurons is enhanced by dihydrotestosterone. And one of the candidate drugs, 17-AAG promoted to degrade AR aggregation. These findings show iPSCs technology makes us be able to recapitulate disease-specific biochemical features and demonstrate the potential for identification and validation of candidate drugs. We also established iPSCs from other polyglutamine diseases (Machado-Joseph disease, Dentatorubral-pallidoluysian atrophy) and neurodegenerative diseases (amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease). We are going to advance the polyglutamine disease researches by using the established iPSC lines.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：ポリグルタミン病 球脊髄性筋萎縮症 神経変性疾患 運動ニューロン疾患 アンドロゲン受容体 17-AAG iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体(AR)遺伝子のCAGリピート数の異常延長を原因とする緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患である。男性のみに発症し、典型的には20~50歳において神経症状を発症する。症状発症より10~20年で大半の患者が階段昇降に困難を覚え、1/3の患者において発症後15~20年で車椅子による移動を余儀なくされる。AR遺伝子におけるCAGリピート数は正常では9~36であるが、SBMA患者では38~62に延長している。SBMA患者の剖検組織では、脊髄前角や脳幹の運動ニューロンの核内に変異ARがびまん性に蓄積しており、本疾患の主要な病態機序と考えられている。SBMAと同様にCAGリピート数の延長を原因とする疾患としてハンチントン病や脊髄小脳変性症などがあり、これらはポリグルタミン病と総称されている。ポリグルタミン病において変異蛋白質の核内への蓄積は、共通の病態基盤と考えられている。ARは通常熱ショック蛋白(Hsp)などの蛋白質と複合体を形成して細胞質に存在するが、リガンドであるテストステロンの存在下ではこれらの蛋白質から離れて核内へと移行する。また、SBMAマウスにおいては軸索内の逆行性輸送障害が生じており、dynactin1の発現が低下していることが明らかとなっている。筋萎縮性側索硬化症(ALS)やspinal muscular atrophy(SMA)の病態にも軸索輸送障害が大きく寄与していることが知られており、SBMAと共通の病態機序が存在することを示唆している。現在SBMAの治療として、黄体形成ホルモン刺激ホルモンアナログである酢酸リュープロレリンの治療が行われているが、緩徐進行性の疾患であることから調査期間は長期に亘り、エンドポイントとしてのバイオマーカーの探索が行われている。

一方、induced pluripotent stem cell (iPS細胞)は、体細胞へ数種類の遺伝子を導入す

ることにより、ES細胞のように非常に多くの細胞に分化できる分化万能性(pluripotency)と自己複製能を持たせた細胞であり、Takahashi, Yamanakaらによって、2006年に報告された。受精卵由来であるES細胞と異なり、皮膚線維芽細胞を初めとする体細胞由来であることから倫理的問題が少ない。神経疾患の研究における障壁のひとつは、侵襲性の高い脳・脊髄生検は施行するのが難しく、死後変性に脆弱な神経系は剖検から生化学に適した組織を得ることが困難な点である。患者由来のiPS細胞を神経細胞へ分化させることで、病気の診断や病態研究へ利用できる可能性があると考えられている。さらに、患者由来のiPS細胞であれば患者自身に移植しても拒絶反応を示さないと考えられており、再生医療への利用が強く期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の病態解析と治療法の研究として、患者由来のinduced pluripotent stem cell (iPS)細胞を用いて行う。iPS細胞を運動ニューロンに分化させ、アンドロゲン受容体(AR)の遺伝子、蛋白質について生化学的、免疫組織化学的解析を行う。テストステロンに対するAR凝集異常を確認後は病態研究や新規治療薬のスクリーニングとして用いる。さらに本細胞を用いて移植を含めた再生医療への展開についても検討する。

## 3. 研究の方法

(1) SBMA患者由来iPS細胞(SBMA-iPSC)を用いてAR遺伝子と蛋白質について研究を行う。まず患者から生体組織試料(皮膚生検)または、剖検検体より組織試料を採取し、線維芽細胞を培養・増殖する。Takahashiらの方法に基づき、線維芽細胞にレトロウイルスを用いて4遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入してiPS細胞を樹立する。樹立したiPS

細胞は、SDIA 法または neurosphere 法を用いて運動ニューロンへ分化誘導を行う。運動ニューロンの生化学的、免疫組織化学的解析を行い、テストステロンによる AR の異常発現、核内凝集など SBMA で観察される異常の有無を確認する。

(2)SBMA-iPSC についての研究に並行して、その他の変性疾患であるパーキンソン病や ALS、他のポリグルタミン病である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、マシャドジョゼフ病(MJD)についても iPS 細胞の樹立とニューロンへの分化誘導を行い、それぞれの疾患に特異的な生化学的異常について検証を行うことで神経変性疾患由来 iPS 細胞の疾患モデルとしての妥当性を確認する。その後病態研究や創薬スクリーニングの手法の確立へ向けて研究を進める。

#### 4. 研究成果

(1) 1 例の SBMA 患者からの iPS 細胞を 1 例樹立し、neurosphere 法を用いて神経細胞のマーカーである Tuj1 陽性細胞及び運動ニューロンのマーカーである Hb9, islet1 陽性細胞への分化に成功した(図 1,2)。樹立した iPS 細胞および分化誘導した神経細胞の AR 遺伝子に

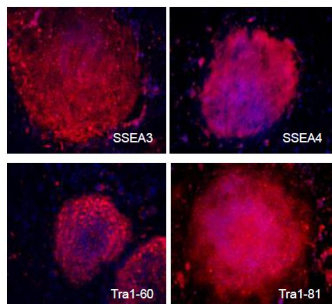


図1. SBMA患者由来iPS細胞樹立したiPS細胞がヒト幹細胞のマーカーである SSEA3, SSEA4, Tra1-60, Tra1-81陽性であることを確認した。

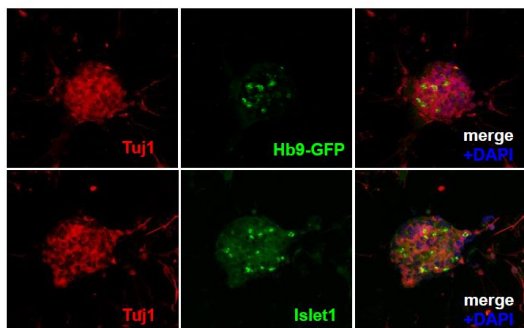


図2. SBMA-iPSCより分化誘導した運動ニューロン neurosphere法を用いて神経前駆細胞を樹立し、更にソニックヘッジホッグ、レチノイン酸などを添加して分化誘導を行った。運動ニューロンのマーカーである Hb9, islet1陽性細胞を得られた。

おける CAG リピート数に変化はなかった(図 3)。

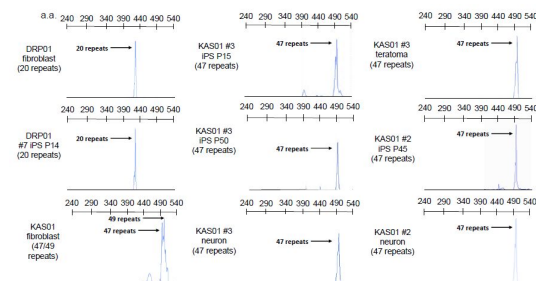


図3. 各分化段階におけるAR遺伝子のCAGリピート数の検討

GeneScan Analysis™ を用いて各分化段階におけるAR遺伝子のCAGリピート数を検討した。SBMA-iPSC (KAS01 #2, #3) 及び分化ニューロンのCAGリピート数は47で安定していた。

DRP01: DRPLA患者由来, KAS01: SBMA患者由来, P: 継代数

さらに、SBMA 由来線維芽細胞、iPSC、分化誘導したニューロンにおける AR の発現についてウェスタンブロットにて生化学的解析を行ったところ、AR は iPSC では発現していなかったが、neuron に分化させると再び発現していた(図 4)。DHT の添加により、AR の発現量は上昇した。更にフィルターリターデーションアッセイを用いた解析では、コントロール (PD) と比較して dihydrotestosterone(DHT) への反応性が有意に高いこと(図 5)が確認され、ウェスタンブロットにて 17-AAG により凝集 AR が分解されること(図 6)も確認した。また、DHT による AR の凝集反応は、皮膚線維芽細胞よりもニューロンにおいてより強く認められた(図 7)。しかし、免疫染色では核内凝集体は確認できなかった。

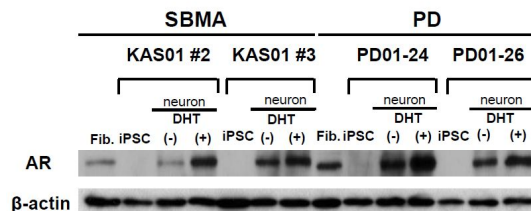


図4. SBMA-iPSC由来神経細胞のDHTによるAR蛋白の発現上昇

ウェスタンブロットアッセイにて線維芽細胞、iPSC、神経細胞のARの発現量を検討した。ARはiPSCでは発現していないが、neuronに分化させると再び発現していた。更にDHTの添加により、ARの発現量は上昇した。孤発性パーキンソン病 (PD) 由来iPSC及びneuronでも同様の所見を認めた。

DRP01: DRPLA患者由来, KAS01: SBMA患者由来, Fib.: 線維芽細胞, DHT: ジヒドロテストステロン

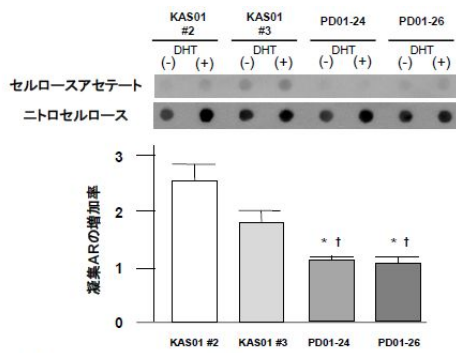


図5. SBMA-iPSC由来神経細胞のDHTへの反応性  
 フィルターリターデーションアッセイを用いたDHTに対する凝集ARの増加率の比較。SBMA-iPSC由来神経細胞はPD-iPSC由来神経細胞と比較して、凝集ARに対する凝集ARの増加率が高かった。(\* KAS01 #2との比較, † KAS01 #3との比較。いずれも  $p < 0.05$ )

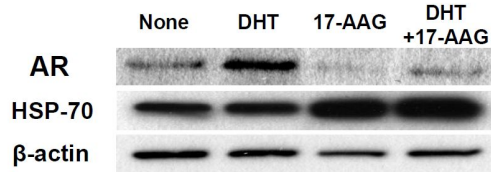


図6. HSP-90 阻害薬 (17-AAG) によるARの発現抑制

HSP-90阻害薬である17-AAGをKAS01 #2 ニューロンに添加し、ARの発現量をウェスタンブロットアッセイで確認した。17-AAGはDHTの有無に関わらず17-AAGの発現量を減少させた。

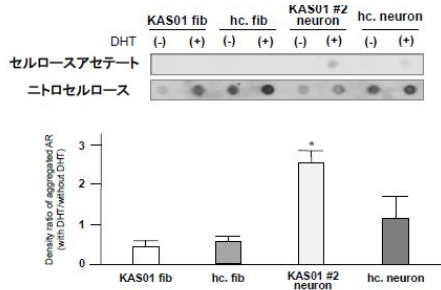


図7. SBMA由来線維芽細胞とiPSC由来神経細胞のDHTへの反応性  
 フィルターリターデーションアッセイを用いたDHTに対する線維芽細胞、iPSC由来神経細胞の凝集ARの増加率の比較。SBMA由来線維芽細胞では神経細胞と異なり、凝集ARはほとんど認められなかった。(\* hc neuron との比較。  $p < 0.05$ )

(2)孤発性 ALS 患者より iPSC 細胞を樹立し、SDIA 法を用いて運動ニューロンへ分化誘導を行った(図8)。

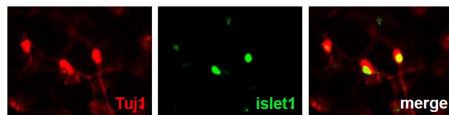


図8. SDIA (Stromal cell Derived Inducing Activity) 法によるiPSC細胞 (ALS01) の神経細胞への分化誘導  
 SDIA法を用いて神経前駆細胞を樹立し、更にソニックヘッジホッグ、レチノイン酸などを添加して分化誘導を行った。運動ニューロンのマーカーであるislet1陽性細胞を得られた。

樹立したニューロンでは、TDP-43 蛋白の細胞内局在および発現量に異常が見られないことを免疫染色とウェスタンブロット法を用いて確認した(図9, 10)。

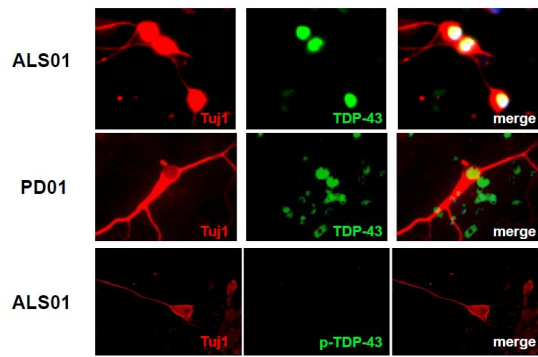


図9. ALS-01由来神経細胞のTDP-43蛋白の局在  
 神経細胞におけるTDP-43蛋白の細胞内局在を免疫染色を用いて検討した。ALS01由来神経細胞およびParkinson病患者由来神経細胞(PD01)のいずれにおいてもTDP-43蛋白は核内に局在していた。また、リン酸化TDP-43蛋白は認められなかった。

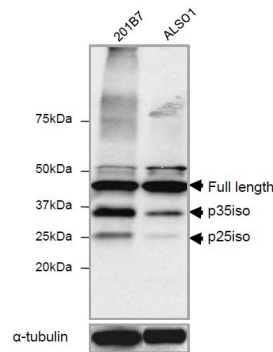


図10. ALS01由来神経細胞におけるTDP-43蛋白C末端断片のWestern blot 解析  
 TDP-43蛋白のFull lengthおよびC末端断片の発現量は正常コントロール(201B7: 京都大学山中伸弥研より供与)と比較して発現量の異常を認めなかった。

また、孤発性 PD 患者(PD24)および家族性 PD 患者(PARK4)より iPSC 細胞を樹立し(PD-iPSC)、ドパミンニューロンおよびアストロサイトへ分化誘導を行った(図11)。この培養系に酸化ストレスである  $H_2O_2$  を添加するとニューロン数に変化は見られなかったが、アストロサイト数が有意に減少していることが観察された(図12)。この結果は、近年注目されている神経変性疾患におけるneurovascular unitの機能減弱を示唆する所見と考えられた。

その他 SBMA と同じポリグルタミン病であるDRPLAとMJDについてもiPSC細胞を樹立した。今後SBMAと同様にCAGリピート数の変化や核内凝集体の有無などを検討する予定である。

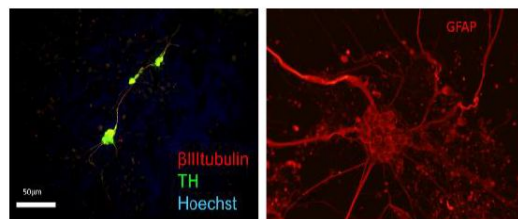


図11 ヒトiPSC細胞から作製されたドパミンニューロン分化とアストロサイト

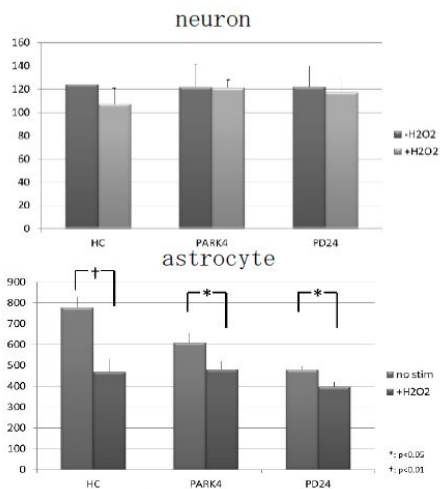


図12 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によりニューロン数は変化しないものの、アストロサイト数が有意に減少

(3) SBMA-iPSC の研究結果から、SBMA-iPSC は疾患特異的な生化学的特徴を示し、薬剤スクリーニングとしても用いることができると考えられた。また、PD-iPSC の結果から、神経細胞単独のみならず neurovascular unit のような神経細胞環境を含めて病態を研究、評価できることが示唆された。

しかし、SBMA-iPSC 由来神経細胞ではポリグルタミン病の重要な病理所見である核内凝集体は、DHT 処理後も免疫組織学上は確認できなかった。同様に、同じ運動ニューロン疾患に属する ALS でも重要な病理、生化学的所見である TDP-43 蛋白の細胞質内局在は確認されなかった。これらの結果は、SBMA-iPSC 由来神経細胞においても ALS-iPSC においても、神経変性、神経細胞死に至るまでには長期間を要する可能性があると考えられ、今後の検討課題であると考えられた。DRPLA-iPS 及び MJD-iPS についても同様の所見が得られるか、今後確認していく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. J Biol Chem.

Vol.288、査読有、2013、pp.8043-52.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

二瓶義廣、伊東大介、メディカルドゥ、『iPS 細胞を用いた難病研究 - 臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見』第 2 章 神経・筋疾患 1. 球脊髄性筋萎縮症、2015 年、6 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

二瓶 義廣 (Nihei Yoshihiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60468501

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし