

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860673

研究課題名(和文) iPSマクロファージを利用したアミロイドポリニューロパチーのアミロイド除去療法

研究課題名(英文) iPS cell derived macrophage therapy against familial amyloid polyneuropathy

## 研究代表者

高松 孝太郎 (Takamatsu, Koutaro)

熊本大学・その他の研究科・助教

研究者番号：50706447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：FAP患者心臓の剖検組織ではコントロールと比較して、マクロファージの減少を認めており、特に抗炎症作用が強いと考えられているM2マクロファージの減少を認めた。一方でFAP患者の血清では、炎症性サイトカインIL-6の増加を認めており、FAPにおいて慢性的な炎症が生じ、様々な臓器障害を引き起こしている可能性がある。今回の研究では、iPS細胞からマクロファージを分化誘導、野生型および変異型のトランスサイレチン(TTR)と共培養するとTTRに対して強い貪食作用を示した。iPS細胞由来のM2マクロファージを分化誘導、FAP患者体内で増加させることが治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cardiac autopsy tissue from FAP patients has a reduction in M2 macrophages which is considered to have strong anti-inflammatory effect. In contrast with the FAP patient serum, which recognizes the increase of inflammatory cytokines IL-6, chronic inflammation occurs in FAP, may be causing a variety of organ damage. In this research, iPS cells derived macrophages showed a strong phagocytosis against the wild type and mutant forms of transthyretin (TTR). Inducing the differentiation M2 phenotype macrophages from iPS cells, maybe a new therapeutic strategy treating FAP patient.

研究分野：neuroscience

キーワード：iPS cell FAP macrophage neurology

### 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、可溶性のタンパク質が重合することで不溶性の構造物であるアミロイドを形成、臓器に蓄積することで種々の症状を呈する疾患群である。なかでも家族性アミロイドポリニューロパチーは、異型トランスサイレチン(TTR)の蓄積により末梢神経障害、自律神経障害、臓器障害を呈する。熊本県荒尾市は、同疾患の世界的な集積地であり、当研究室では病態の解明、治療法の開発を試みている。TTR の主な産生組織は、肝臓であり、正常 TTR は健常人の血液にも存在する。近年、肝臓移植により異型 TTR の産生抑制、各種臓器における TTR の蓄積も抑制が可能となった。しかしながら、高額な医療費、ドナー不足、進行した患者での治療効果に乏しい、網膜への蓄積は抑制できないなどの問題点がある。

アミロイド タンパク質が脳内に蓄積するアミロイドーシスであるアルツハイマー病は、脳組織のアミロイド プラーク(老人斑)周囲に中枢神経系における貪食細胞であるミクログリアが集簇している。これまでの知見からミクログリアには、アミロイド を貪食する作用があることが示唆されている。上記をふまえ、我々は iPS 細胞から末梢血液中の貪食細胞であるマクロファージに遺伝子改変を加え、アミロイド を効率的に分解、神経毒性を抑制することを *in vitro* およびアルツハイマー病モデルマウスで証明した。

### 2. 研究の目的

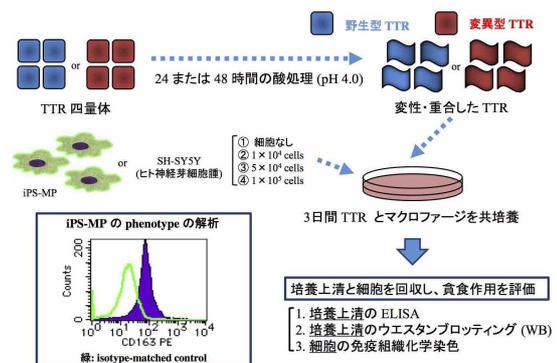
熊本大学医学部免疫識別学教室では、マウスおよびヒト iPS 細胞から機能的な貪食細胞であるマクロファージを分化誘導、遺伝的改変を加える技術を確立している。本研究では、上記技術を応用し、家族性アミロイドポリニューロパチーの原因タンパク質である異型 TTR に対する iPS マクロファージによる治療法開発を目指すものである。

### 3. 研究の方法

(1) FAP患者の病態におけるマクロファージの関与をFAP患者、コントロール患者間の剖検心臓組織を用いて比較検討する。

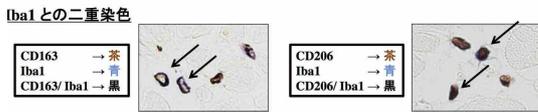
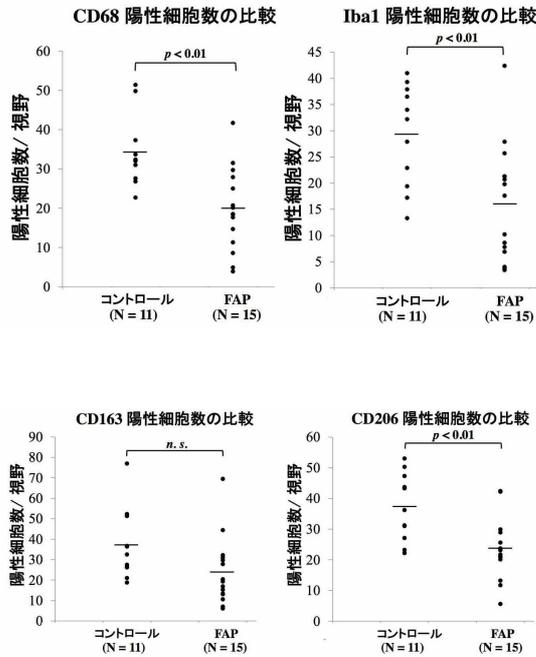
(2) FAP患者のマクロファージに、異型あるいは正常 TTR を加えて共培養、培養上清を回収した後に炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6)をELISAで測定。FAP患者血清中のIL-1、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-15、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  を Bioplex assayで測定した。IL-6に関して、High sensitivity ELISAで測定した。

(3) iPS細胞から分化誘導したマクロファージと正常および異型 TTR を共培養、コントロールとしてヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y細胞を用いて培養上清中の TTR 量をELISAおよびウエスタンブロッティングで比較した。貪食能に関してiPSから分化誘導したマクロファージ細胞を免疫組織染色で用いて検討した。

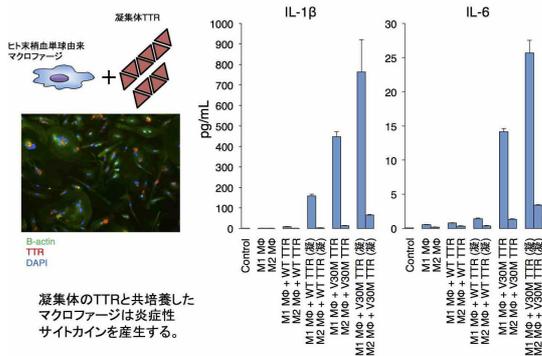


### 4. 研究成果

(1) FAP 患者剖検組織を用いて FAP がマクロファージに及ぼす影響を検討したところ FAP 患者心臓の剖検組織ではマクロファージ(CD68 陽性、Iba1 陽性)の減少を認めており、減少したマクロファージは M2 マクロファージ(CD206 陽性)がほとんどであった。



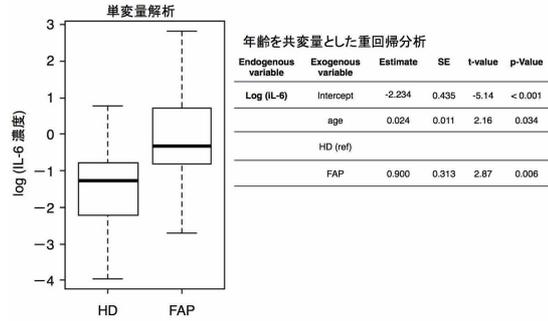
(2) FAP 患者末梢血液中のマクロファージを TTR と共培養したところ、培養上清中で炎症性サイトカイン IL-1 および IL-6 は増加していた。



Bioplex assay で IL-1、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-15、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  を FAP 患者血清で検討したが、ほとんどのサイトカインは検出感度以下であったが、IL-6 は FAP 患者で蛍光強度が高い傾向にあったため High sensitivity ELISA をもちいて再測定したところ、IL-6 は FAP 患者血清で高値を示した。FAP 患者では慢性的に炎症が生じている可能性が考えられた。

### FAP 患者血清を用いた解析

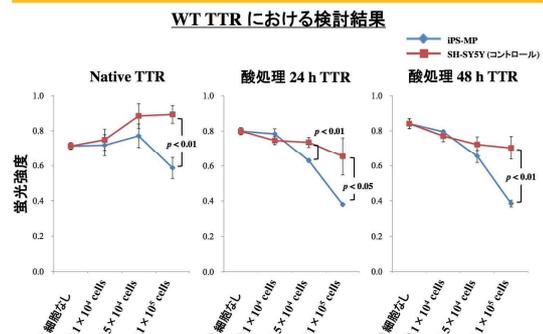
High sensitivity ELISA による血清中の IL-6 濃度測定



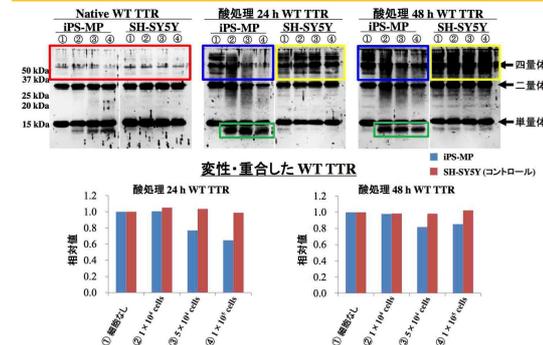
(3) iPS 細胞から分化誘導したマクロファージ細胞は、共培養した正常 TTR および異型 TTR を減少させることを ELISA 法で確認した。同様に酸処理を 24 時間、48 時間おこない変性させた TTR でも同様に iPS 細胞由来マクロファージは培養上清中の TTR を減少させた。

ウエスタンブロッティング法でも同様に培養上清中の TTR の量を比較したところ、ELISA 法の結果と同様に iPS 細胞由来マクロファージは、コントロールと比較して培養上清中 TTR を減少させることを確認した。

### 培養上清中の野生型 (WT) TTR 濃度の減少

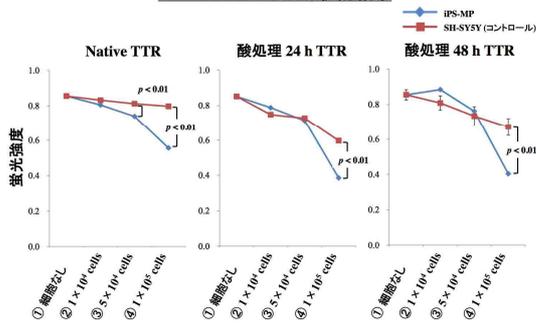


### 培養上清中の変性・重合した WT TTR の減少

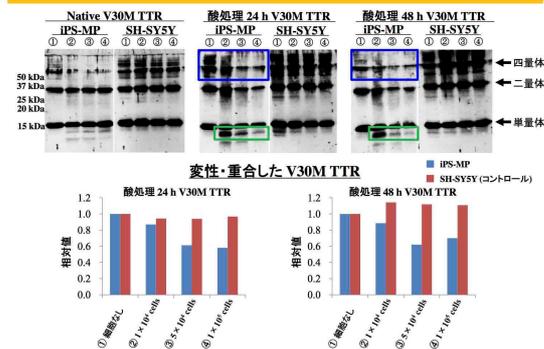


## 培養上清中の変異型 (V30M) TTR 濃度の減少

V30M TTR における検討結果

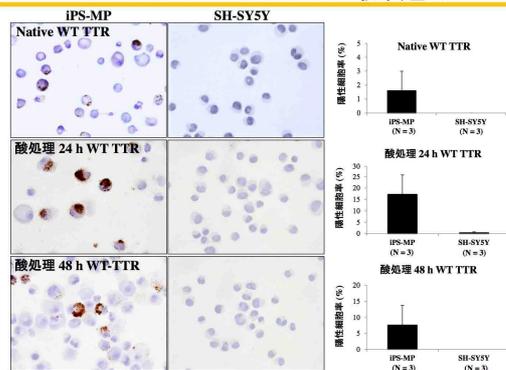


## 培養上清中の変性・重合した V30M TTR の減少

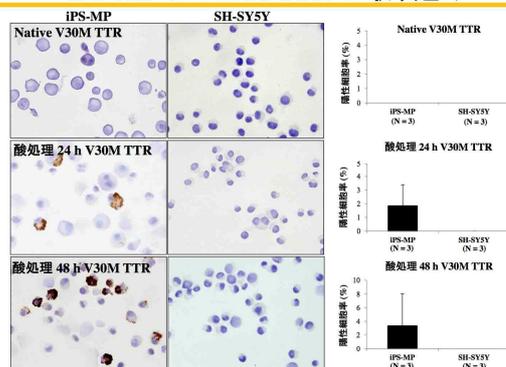


iPS 細胞由来のマクロファージはコントロールと比較して正常 TTR、異型 TTR いずれにも貪食能を示した。特に酸で変性、重合した TTR により強い貪食能を示した。

## iPS-MP の WT TTR の取り込み



## iPS-MP の V30M TTR の取り込み



これらの検討より iPS 細胞から分化誘導したマクロファージが TTR を貪食、減少させる効果があることが確認できた。FAP 患者組織では抗炎症性作用が強いとされる M2 マクロファージが減少、血液中の炎症性サイトカイン IL-6 が増加している。抗炎症作用がより強い M2 マクロファージを iPS 細胞より分化誘導、FAP 患者体内で増加させることが治療法となる可能性がある。

## 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1件)

Koutaro Takamatsu, Tokunori Ikeda, Miwa Haruta, Keiko Matsumura, Yasuhiro Ogi, Naomi Nakagata, Makoto Uchino, Yukio Ando, Yasuharu Nishimura, and Satoru Senju: Degradation of amyloid beta by human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing neprilysin-2. Stem Cell Res. 13: 442-453, 2014

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)  
[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 孝太郎 (TAKAMATSU, Koutaro)  
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・  
特任助教

研究者番号: 50706447