

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590664

研究課題名(和文) 神経変性疾患患者の歯髄由来 iPS細胞とメタロチオネインを活用した薬物治療薬開発

研究課題名(英文) Drug development using iPS cells derived from the dental pulp of the patients with neurodegenerative diseases, and metallothionein

研究代表者

保住 功 (Hozumi, Isao)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20242430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患患者の不要となった智歯の歯髄や血液の血球細胞からiPS細胞の作製を行った。筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデル犬に犬歯髄細胞の移植を検討中である。亜鉛の調節タンパク質であるメタロチオネイン(MT)はALSの病態に重要な分子である。今回、MTと同じ亜鉛トランスポーターのZnTファミリーについて検索したところ、ZnT3とZnT6がALS群の脊髄において有意に低下しており、ALSの病態に深く関与していることが判明した。ALS患者のiPS細胞を活用して、ALSにおける亜鉛の病態を明らかにしている。

研究成果の概要(英文)：We have been producing iPS cells from dentate pulp in the wisdom teeth and blood cells. We have been planning to treat amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-model dogs with dental pulp stem cells. Metallothionein (MT) is a zinc-modulating protein and play important roles in the progression of ALS. In this study we have investigated also a zinc-modulating transporters ZnT families and found the decrease of ZnT-3 and ZnT-6, in particular in the spinal cords of the patients with ALS. This indicates that MT, ZnT-3 and ZnT-6 play pivotal roles in ALS. We have been revealing the roles of these proteins in ALS using iPS cells derived from ALS patients.

研究分野：薬物治療学

キーワード：神経変性疾患 iPS細胞 メタロチオネイン 筋萎縮性側索硬化症 分化誘導 創薬

1. 研究開始当初の背景

(1) MT と神経変性疾患 (神経難病) とのかかわり

ヒトのアルツハイマー病 (AD) 脳で著減しているタンパク質として、神経成長抑制因子 (Growth Inhibitory Factor (GIF)) がわが国で最初に発見されたのは 1991 年のことである (Uchida et al. Neuron. 1991)。GIF はアミノ酸配列の相同性から、従来のメタロチオネイン (MT) すなわち MT- / と区別して、MT- と呼ばれる (Palmiter et al, Proc Natl Acad Sci. USA 1993)。我々はヒトの筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄において、MT- / のみならず GIF (=MT-) の免疫活性が著減していることを報告した (Hozumi et al, ALS 2008)。また神経変性疾患の発症機構における MT の重要性を提唱してきた (Hozumi et al, Neurochem Res. 1998, Hozumi, Biomed Res Trace Elements, 2000, Hozumi et al, J Health Sci. 2004, Hozumi, Curr Pharm Biotechnol. 2013)。

(2) MT の神経保護作用

我々はマウスを運動させ、脊髄の MT- / 、MT- が増えることを見出し、ALS などにおける運動効果の一つの分子メカニズムを証明した (Hashimoto et al. Neurosci. 2009)。また我々は、今年、ALS のモデルマウスである G93ASOD1Tg マウスにおいて、MT- cDNA を組み込んだアデノウイルスを用いて治療を行い、Hepatic Growth Factor (HGF) の効果を凌駕する生存延長効果を明らかにした (Hashimoto et al, Neurosci. 2011)。また、近年 MT が ALS など神経疾患の治療に極めて有望な所見が蓄積し、デンマークなど欧米、また中国は MT による創薬を国家戦略の大きな柱として取り組んでいる。海外との MT に関する創薬の競争は今後かなり激しくなることが予測され、この分野において早急な研究の推進が望まれる。創薬への遅れは大きな国家的損失となる。

1. 研究の目的

(1) ヒト歯髄由来 iPS 細胞の樹立と保存システムの確立

iPS 細胞の作成はわが国で開発された新しい革新的な医療技術である。我々は不要となった歯髄から、効率的に iPS 細胞を樹立する。

(2) iPS 細胞の各種神経細胞への分化誘導

iPS 細胞から、ニューロン、運動ニューロン細胞、ドーパミン産生細胞等に分化誘導する。

(3) 分化させた各種神経細胞への各種環境因子の負荷

各種神経細胞に酸化ストレス、小胞体ストレス、重金属等の負荷を加え、比較検討する。

(4) 治療薬の開発

MT、MT 誘導剤、既成薬剤等を投与し、神経保護作用を検索する。MT の低分子ミメティックス、MT 結合低分子化合物を投与し、治療薬を開発する。

3. 研究の方法

(1) 神経変性疾患患者の iPS 細胞の樹立

倫理委員会、患者の承諾のもと、神経変性疾患患者の歯髄あるいは歯槽部骨膜の細胞から、あるいは血液細胞から iPS 細胞を樹立する。岐阜大学医学部付属病院神経内科入院および外来通院中の神経変性疾患の患者から、文書による同意を得て、iPS 細胞を樹立する。

(2) iPS 細胞から各神経細胞への分化誘導

iPS 細胞から、運動ニューロン、ドーパミン産生細胞など目的とする細胞に分化誘導する最も効率的、安定した系を完成させる。

(3) 負荷実験

最も効果的で安定した培養系を使い、各種神経細胞に下記の負荷をかける。

単独負荷実験 1) 酸化ストレス負荷 2) 小胞体ストレス負荷 3) 銅、亜鉛の負荷 4) 毒物負荷
複合負荷

(4) Rescue (救済)実験

単独投与実験

1) 抗酸化剤 2) MT- 誘導剤 3) MT- 誘導剤 4) 既存の抗糖尿病薬 5) 低分子ミメティックス、結合低分子化合物の投与：効果によって低分子化合物の立体構造の最適化を計り、より効果的な創薬の構築を行なう。

複合(コンビネーション)投与実験：結果を踏まえて、複合投与実験を行なう。

4. 研究成果

(1) 再生医療関連

神経変疾患患者の不要となった歯髄から iPS 細胞を作製している。特発性基底核石灰化症 (IBGC) などの疾患によっては初期化抵抗性を示し、iPS 細胞ができていくものもあった。幸い、京都大学 iPS 細胞研究所の技術支援も受け、血液の血球細胞からも iPS 細胞の作製も行っている。ALS 4 例の、ハンチントン病 3 例の各歯髄、IBGC 7 例の血液細胞から iPS 細胞の樹立を行った。さらに運動ニューロン細胞や血管内皮細胞への分化させ、現在最も安定した、効率の良い誘導法を検討中である。

当初、歯髄細胞から iPS 細胞から各種神経細胞に分化させ、治療薬として活用することを想定したが、採取した歯髄細胞に歯髄幹細胞が存在し、各種神経細胞に分化することが、細胞マーカーによって証明された。マウスの脊髄損傷の治療にヒト歯髄細胞が有効であることが報告されている。幸い我々の施設に筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデル犬があり、脊損モデル犬、ALS モデル犬に犬歯髄細胞の移植を考え、動物実験の申請中である。

また、中国産プロポリスで刺激したイヌの歯髄細胞の培養上清 (DCM) が神経細胞保護作用と神経突起伸展を著しく増強させることを見出し、その研究成果を今年 2015 年、英文誌に掲載した。

(2) メタロチオネイン関連

メタロチオネイン(MT)のアイソフォーム(I/II, III)

について、ALS 患者のヒト脊髄とコントロール患者の脊髄における量をドットプロット法によって検査したが、検出方法の問題、検体数の不足もあって、有意差が出るまでには至っていない。一方、MT と同じ亜鉛トランスポーターの ZnT ファミリーについて検索したところ、ZnT3 と ZnT6 が ALS 群の脊髄において有意に低下していた。また、ZnT の脊髄における局在を解析すると、運動神経を含む神経細胞に選択的に発現していることが明らかとなった。さらに、ALS モデルマウスの脊髄において、ZnT3 と ZnT6 のタンパク質量に変化は認められず、ALS における ZnT3 と ZnT6 の減少は、単に神経脱落によるものではなく、ALS の発症・病態の進行に関与している可能性が示唆された。この研究成果は英文誌 *J. Neurological Res* (2015) に発表した。MT-III 結合タンパク質についても 3 つが同定され、その解析も終わり、英文誌に論文投稿を準備中である。

<引用文献>

Kudo D, Inden M, Sekine S, Tamaoki N, Iida K, Naito E, Watanabe K, Kamishina H, Shibata T, Hozumi I. Conditioned medium of dental pulp cells stimulated by Chinese propolis show neuroprotection and neurite extension in vitro. *Neurosci Lett*. 2015 Mar 4;589:92-7. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.035. Epub 2015 Jan 15. PubMed PMID: 25597290.

Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kambe T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, Hozumi I. Zinc transporters ZnT3 and ZnT6 are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2015 Feb;93(2):370-9. doi: 10.1002/jnr.23491. Epub 2014 Oct 3. PubMed PMID: 25284286.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計5件）

Kudo D, Inden M, Sekine S, Tamaoki N, Iida K, Naito E, Watanabe K, Kamishina H, Shibata T, Hozumi I. Conditioned medium of dental pulp cells stimulated by Chinese propolis show neuroprotection and neurite extension in vitro. *Neurosci Lett*. 2015 Mar 4;589:92-7. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.035. Epub 2015 Jan 15. PubMed PMID: 25597290.

Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kambe T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, Hozumi I. Zinc transporters ZnT3 and ZnT6 are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2015 Feb;93(2):370-9. doi: 10.1002/jnr.23491. Epub 2014 Oct 3. PubMed PMID: 25284286.

Ono Y, Tanaka H, Takata M, Nagahara Y, Noda Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, Hara H. SA4503, a sigma-1 receptor agonist, suppresses motor neuron damage in in vitro and in vivo amyotrophic lateral sclerosis models. *Neurosci Lett*. 2014 Jan 24;559:174-8. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.005. Epub 2013 Dec 12. PubMed PMID: 24334165.

Tanaka Y, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Kimura A, Hozumi I, Inuzuka T. Cardiac sympathetic function in the patients with amyotrophic lateral sclerosis: analysis using cardiac [123I] MIBG scintigraphy. *J Neurol*. 2013 Sep;260(9):2380-6. doi: 10.1007/s00415-013-7005-0. Epub 2013 Jun 20. PubMed PMID:23784610.

Hozumi I. Roles and therapeutic potential of metallothioneins in neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(4):408-13. Review. PubMed PMID: 23590138.

〔学会発表〕（計5件）

岩下わかな、位田雅俊、入山真先、保住 功 特発性基底核石灰化症に関連するリン酸トランスポーターの脳内局在と機能解析 第135回日本薬学会年会 2015年03月27日~2014年03月30日 兵庫医療大学

金子雅幸、野口貴生、池上沙織、櫻井丈之、位田雅俊、神戸大朋、柿田明美、豊島 靖子、山田光則、原英彰、高橋 均、保住 功 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄における亜鉛トランスポーターZnTの発現量低下 第134回日本薬学会年会 2014年03月27日~2014年03月30日 熊本大学

小野博与志、金子雅幸、位田雅俊、夏目 徹、堀川幸男、保住 功 メタロチオネイン-結合タンパク質の同定 メタルバイオサイエンス研究会 2013 2013年09月26日~2013年09月27日 静岡県立大学

池上沙織、金子雅幸、野口貴生、位田雅俊、柿田明美、豊島靖子、山田光則、高橋 均、保住 功 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄における亜鉛トランスポーターZnTの発現量低下 メタルバイオサイエンス研究会 2013 2013年09月26日~2013年09月27日 静岡県立大学

野口貴生、金子雅幸、池上沙織、位田雅俊、柿田明美、豊島靖子、山田光則、高橋 均、保住 功 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄における亜鉛トランスポーターZnT3の発現量低下 第59回日本薬学会東海支部総会・大会 2013年07月06日 名城大学

〔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

http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/yakuchi/Med_Mol_Therp/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保住 功 (HOZUMI, Isao)

岐阜薬科大学・大学院薬物治療学・教授

研究者番号：20242430

(2) 研究分担者

犬塚 貴 (INUZUKA Takashi)

岐阜大学・大学院医学系研究科神経内科老年学分野・教授

研究者番号：50184734

國貞隆弘 (KUNISADA, Takahiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科組織・器官形成分野・教授

研究者番号：30255108

(3) 連携研究者

阿久津英憲 (AKUTSU, Hidenori)

独立行政法人国立成育医療研究センター・室長

研究者番号：50347225

(4) 研究協力者

金子雅幸 (KANEKO, Masayuki)

位田雅俊 (INDEN Masatoshi)

野口貴生 (NOGUCHI Takao)

小野博与志 (ONO Hiroshi)

池上沙織 (IKEGAMI Saori)

入山真先 (IRIYAMA Masaki)

工藤大地 (KUDO Daichi)

岩下わかな (IWASHITA Wakana)