

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860705

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症治療薬のスクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Screening of therapy of amyotrophic lateral sclerosis using iPS cell

研究代表者

山田 恵 (Yamada, Megumi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50452157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンが選択的に徐々に変性する疾患である。近年、ALS患者からinduced pluripotent stem(iPS)細胞を分化し、患者由来の運動ニューロンを誘導する取り組みが行われている。ALS患者由来のiPS細胞から運動ニューロンの分化誘導系の構築を検討し、治療薬スクリーニング系の確立を目指した。

正常例、孤発性ALS例の歯髄から歯髄細胞を樹立した。1例のALS患者から歯髄組織幹細胞由来iPS細胞を作成し、3胚葉への分化を確認した。さらにiPS細胞から運動ニューロンへの分化誘導系を構築したが、安定した手技を目指し、現在も検討中である。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis(ALS) is a disease in which motor neurons in the entire body selectively and gradually degenerate and are displaced. Recently, efforts have been made to generate induced pluripotent stem(iPS) cells from ALS patients and to induce differentiation of iPS cells into patient-derived motor neurons. In this study, we aimed to develop a system for inducing differentiation of iPS cells derived from ALS patients into motor neurons and to establish a screening system for therapeutic agents.

Dental pulp cells were obtained from dental pulps of healthy volunteers and patients with sporadic ALS. From the stem cells in the dental pulp tissue of an ALS patient, iPS cells were generated and confirmed to have differentiated into 3 germ layers. Furthermore, a system for inducing differentiation of iPS cells into motor neurons was developed. We are still exploring strategies to stabilize the system.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 iPS細胞 歯髄細胞

1. 研究開始当初の背景

ALS は全身の運動ニューロンが選択的に徐々に変性・脱落する疾患である。遺伝性の症例もあるが、多くは孤発例で有効な治療がないため、原因の究明、治療薬の開発が急務である。

近年、ALS 患者から induced pluripotent stem (iPS) 細胞を分化し、患者由来の運動ニューロンを誘導する取り組みが行われている。誘導された ALS 患者由来の運動ニューロンは、正常例とほとんど差異がないとする報告もみられるが、2012 年井上らにより、誘導された運動ニューロンは突起が短く、変異のある TDP43 により細胞質内凝集体が産生され、死滅しやすいなどの性質を報告された (N Egawa et al. Sci Transl. 2012)。誘導された運動ニューロンの性質につき詳細に検討した研究はまだ少なく、様々な面から性質を検討することが必要と考えられる。私たちは ALS 患者由来の iPS 細胞から運動ニューロンの分化誘導系の構築を目指した。

また、これまで ALS モデルマウスを用い各種の治療薬スクリーニングがなされてきたが、モデルマウスで報告された多数の有効な薬剤も、ヒトでの治験において有効性が認められたものはリルゾールのみとなっている。このような現状から、再生医療を視野に全く新しい治療法の開発が必要であり、より簡便・適切に使用可能な細胞として、歯髄細胞に着目しこれらの性質の検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 正常および ALS 患者の iPS 細胞を樹立し、運動ニューロンの分化誘導系の構築を行う

(2) 再生治療における歯髄細胞の有用性につき検討する

3. 研究の方法

(1) 正常および ALS 患者の iPS 細胞の樹

立

岐阜大学医各部倫理審査委員会の承認のもと、本学口腔病態学分野と連携し、正常例、ALS 患者の歯髄あるいは歯槽部骨膜の細胞から iPS 細胞を樹立した。ヒト歯髄組織幹細胞由来の iPS 細胞の作成については、約 200 名の患者から歯髄組織幹細胞由来株が樹立されている。岐阜大学医学部付属病院神経内科入院中および外来通院中の ALS 患者より、文書により同意を得て、ALS 患者由来の iPS 細胞を樹立した。

(2) 正常および ALS 患者由来 iPS 細胞から、運動ニューロンへ分化誘導

iPS 細胞から運動ニューロンへの分化については、Okano ら (Nature Neurosci. 2008) や Dimos ら (Science. 2008) が報告している。ソニックヘッジホック作動薬とレチノイン酸を添加すると、神経細胞のマーカーである Tuj1 陽性細胞が突起を伴って出現し、うち約 20% に運動ニューロンに特異的な転写因子である HB9 の発現がみとめられる。

既報のプロトコール (Bao-Yang Hu et al. nature protocols. 2009) に従い、iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導系を構築する。運動ニューロンへの分化はマーカー (Tuj1、HB9 など) を用いて確認を行った。

(3) 歯髄細胞移植

私たちは SOD1 に変異をもつ自然発症コーギー犬を入手した。この犬 ALS モデルは、ヒトの病理とほぼ同じ ALS 所見を呈し、後ろ足から前足に向かって症状が進行し、3 年の罹患期間を経て、死亡する。本研究では、犬脊髄損傷モデルを作成し、歯髄細胞移植を実施することで、大動物における歯髄細胞移植療法の有効性や安全性を検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄幹細胞由来 iPS 細胞の樹立

iPS 細胞の作成は日本で開発された、比較的新しい医療技術である。本学口腔病態学分

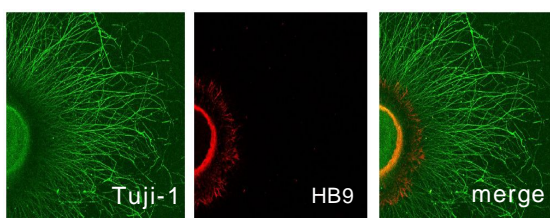
野の柴田は京都大学山中研究室との共同実験で、不要となった歯髄幹細胞から効率的に iPS 細胞を樹立する方法を確立している。現在すでに 200 ラインの正常コントロールを有している。最近では、非侵襲的に歯槽部骨膜細胞からも iPS 細胞の作成が可能となっており、そのため当科入院・外来通院中の ALS 患者から、比較的容易に iPS 細胞を作りうる環境にある。

正常および ALS 患者の iPS 細胞の樹立

正常例・ALS 患者の歯髄あるいは歯槽部骨膜の細胞から iPS 細胞を樹立した。ALS 患者は 50 歳男性、59 歳男性の 2 例で施行し、いずれも孤発例であった。1 例の ALS 患者から歯髄組織幹細胞由来 iPS 細胞を作成し、nude mice の精巢内に注入し、3 胚葉への分化を確認した。さらに現在、3 例の ALS 患者の歯髄組織由来幹細胞から樹立をすすめている。

正常および ALS 患者由来 iPS 細胞から、運動ニューロンへ分化誘導

iPS 細胞から運動ニューロンへの分化については、ソニックヘッジホック作動薬とレチノイン酸を添加すると、神経細胞のマーカである Tuj1 陽性細胞が突起を伴って出現し、うち約 20% に運動ニューロンに特異的な転写因子である HB9 の発現がみとめられる。既報のプロトコール (Bao-Yang Hu et al. nature protocols. 2009) に従い、iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導系を構築した。安定した手技を目指し現在も検討中である。



(2) 再生治療における歯髄細胞の有用性

健常犬の犬歯から歯髄組織を採取し、歯髄細胞を樹立した。リアルタイム PCR 法を用いて歯髄細胞における神経栄養因子の mRNA の発現を測定し、BDNF、NT-3、NGF といった多種の神経栄養因子が多量に発現していることを確認した。また、免疫組織学的検討では、神経系の前駆細胞にみられるマーカーが発現していた。また、歯髄細胞自体が神経系の細胞へ誘導可能なことも確認した。

次に、イヌにおける歯髄細胞移植法の安全性につき検討を行った。健常ビーグル犬の L1 レベルで脊髄を完全切断し、脊髄損傷モデルを作成した。モデル作成 1 週間後、イヌ犬歯より樹立した歯髄細胞をレトロウイルスを用いて GFP ラベルし、損傷部位周辺へ移植し、移植 8 週後に組織学的検討を実施した。移植自体は安全に施行可能で、副作用はみとめなかった。観察期間中、症状に変化はみとめなかった。組織学的検討では、移植細胞のトレースに課題が残る結果となった。

今後は蛍光ベクターや移植法の改良によりトレーシングの課題を克服し、歯髄細胞移植を現実化し、有効性・安全性を検証する予定である。

< 引用文献 >

N Egawa et al. Sci Transl. 2012

Bao-Yang Hu et al. nature protocols. 2009

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)

Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa

N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I.
Evaluation of SLC20A2 mutations that
cause idiopathic basal ganglia
calcification in Japan. Neurology
2014;82:705-12.
DOI: 10.1212 査読有

[学会発表] (計 1 件)

第 54 回日本神経学会総会 (2014 年 5 月 24
日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)): 本邦
における特発性大脳基底核石灰化症の臨床
的・遺伝学的検討. 山田 恵、田中真生、高
木麻里、小林清樹、田口芳治、高嶋修太郎、
田中耕太郎、峠 哲男、初田裕幸、村山繁雄、
林 祐一、金子雅幸、石浦浩之、三井 純、
熱田直樹、祖父江元、下澤伸行、犬塚 貴、
辻 省次、保住 功

[雑誌論文] (計 1 件)

[学会発表] (計 1 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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 恵 (YAMADA, Megumi)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 50452157