

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591079

研究課題名（和文） 患者由来誘導多能性幹細胞を用いた家族性筋萎縮性側索硬化症治療法の開発

研究課題名（英文） Drug development for ALS using astrocytes derived from patient-specific iPSCs

研究代表者

井上 治久（INOUE HARUHISA）

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：70332327

研究成果の概要（和文）：

変異 SOD1 を有する家族性 ALS 患者皮膚より iPS 細胞を樹立した。分化誘導した ALS アストロサイトを用いて、変異 SOD1 転写を抑制する既存薬の効果を検証した。同定した既存薬は ALS モデルマウスにおいて臨床症状改善した。マイクロアレイ解析により、ALS 患者アストロサイトで活性化している特定の遺伝子パスウェイを同定した。

研究成果の概要（英文）：

We have generated ALS astrocytes using patient-specific iPS cells with mutant SOD1, and identified an existing drug that down-regulated SOD1 level in ALS astrocytes. The drug treatment also attenuated the clinical phenotypes of mutant SOD1 transgenic mice. Furthermore we found that specific molecular pathways were activated in ALS astrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

| 年度 | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経内科学、神経科学、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ALS様の症状を呈する変異 SOD1 トランスジェニックマウス（ALS マウス）の研究から、変異 SOD1 発現量が症状・病勢を規定していることが明らかになった。そのことを示す研究報告を以下に述べる。脊髄運動ニューロン内の変異 SOD1 の発現量を下げると、発症までの経過が延長する。一方、脳内免疫担当細胞であるミクログリア内の変異 SOD1 の発現量を下げると、発症後の症状の進展を遅延させる（Boillée et al. Science 312: 1389-1392,

2006）。変異 SOD1 が高発現する ALS マウス（high copy マウス）の copy 数が偶然に落ちたことによりできた変異 SOD1 低発現の ALS マウス（low copy マウス）は、生存期間が延長する（Dal Canto et al. Brain Res. 676: 25-40, 1995）。RNAi により SOD1 の発現量をさげることにより ALS マウスの生存期間が延長する（Saito et al. J. Biol. Chem. 280:42826-42830, 2005）。変異 SOD1 トランスジェニックラットは高発現ラインのみ発症する（Nagai et al.

J. Neurosci. 21: 9246-9254, 1995)。以上から、変異 SOD1 の発現レベル自体を抑えることが治療効果を有すると考えられる。

国外ではすでに、家族性 ALS において、SOD1 変異を世界で初めて同定し、世界の ALS 研究をリードしているハーバード大学のグループが、ラット褐色細胞腫細胞株である PC12 を用いて、SOD1 の転写を抑制する低分子化合物を同定している (Broom et al. J. Biomol. Screen. 11: 729-735, 2006)。私達もこれまでの研究で、ヒトアストロサイト細胞株である H4 を用いて、12,000 個の低分子化合物の中から、SOD1 の転写を抑制する化合物をすでに約 90 種類 (ヒット化合物)、またいくつかの既存薬を同定している (一部の内容について、厚生労働省『筋萎縮性側索硬化症画期的診断・治療法に関する研究斑班会議 (祖父江元班長)、2008 年 1 月 18 日於東京』において発表)。

一方で、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) に変異 SOD1 を導入し、作成されたモデル細胞系では運動ニューロン変性が生じる (Di Giorgio et al. Nat Neurosci, 10: 608-614, 2007; Nagai et al. Nat Neurosci, 10: 615-622, 2007)。私達は、変異 SOD1 を有する患者 iPS 細胞を作成しつつあり、それらの細胞を運動ニューロン・グリア細胞に分化後、Di Giorgio, Nagai らの方法により運動ニューロン変性が生じるモデル細胞を構築する。その後、すでに同定したヒット化合物・既存薬を用いて、運動ニューロン変性を抑制する化合物 (リード化合物)・既存薬を同定する。

2. 研究の目的

SOD1 変異を有する家族性 ALS 患者由来 induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) を用いて、変異 SOD1 転写を抑制する FALS 治療薬を開発することを目的としている。

変異 SOD1 転写を抑制する低分子化合物 (ヒット化合物) もしくは既存薬を 1 次スクリーニングにより同定する。さらに、SOD1 変異を有する FALS 患者由来 iPS 細胞を用いて、運動ニューロン変性が生じるモデル細胞系を構築し、1 次スクリーニングにより同定したヒット化合物・既存薬の効果を検証し、治療効果を有するリード化合物・既存薬を同定する。最終的に ALS モデルマウスの症状改善に有効な既存薬を同定する。

3. 研究の方法

iPS 細胞を発見した京都大学 iPS 細胞研究センター山中伸弥センター長研究室の高橋和利助教らとの共同研究として本研究をすすめる。変異 SOD1 を有する FALS 患者由来 iPS 細胞を樹立後、運動ニューロン等に分化誘導し、運動ニューロン変性を生じるモデル細胞系を構築する。これまでの研究ですでに同定

している変異 SOD1 転写を抑制する低分子化合物・既存薬の運動ニューロン変性抑制効果を、そのモデル細胞系で検証する。

京都大学医学部附属病院神経内科通院中の変異 SOD1 を有する ALS 患者数名、あるいは SOD1 変異を有さない他疾患患者から皮膚線維芽細胞を樹立し、その後、それらの細胞から、iPS 細胞を樹立する。また、確立された方法 (Li et al. Nat Biotech 23: 215-221, 2005; Okada et al. Stem Cells Epub 2008) を用いて運動ニューロン、アストロサイトを樹立し、これまでの ES 細胞モデル系 (Di Giorgio et al. Nat Neurosci 10: 608-614, 2007; Nagai et al. Nat Neurosci 10: 615-622, 2007) と同様に、SOD1 変異を有さない運動ニューロンと SOD1 変異を有するアストロサイトの組み合わせによる共培養を行い、運動ニューロン変性を生じうるモデル細胞系を構築を試みる。その後、すでに同定している低分子化合物 (ヒット化合物)・既存薬剤が、構築したモデル細胞系において治療効果を有するかどうかを検証する。計画通りモデル細胞系ができなかった場合であっても、すでに、他疾患で使用されている既存薬が、SOD1 変異を有する患者アストロサイトにおいて、変異 SOD1 タンパク量を減少させるリード化合物・既存薬を同定する。最終的に、同定した既存薬の効果を ALS マウスにおいて検討する。

また、変異 SOD1 を有する患者由来アストロサイトのマイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析により、非自律性運動ニューロン変性の原因メカニズムについて明らかにする。

4. 研究成果

1) 変異 SOD1 を有する 2 名の ALS 患者より、iPS 細胞を樹立し、非自律性運動ニューロン変性に寄与していることが知られている患者アストロサイトへの分化誘導手法を確立した。

2) 患者アストロサイトで病態の重症度を規定する SOD1 タンパク質量を低下させる 2 種類の既存薬を同定した。そのうち 1 種類の既存薬の変異 SOD1 マウス投与により、クリニカルスコア、生存期間の改善を認めた。

3) ALS 患者およびコントロールアストロサイトマーカーのマイクロアレイ解析を行い、ALS 新規分子パスウェイを同定した。さらに ALS モデルマウスおよびコントロールマウス由来初代培養アストロサイトマイクロアレイ解析を行い、ヒト ALS・マウス ALS 両者の解析において共通に変動する遺伝子を同定した。それら分子パスウェイ、遺伝子産物が ALS 治療標的となる可能性がある。

4) 変異 SOD1 を有する ALS 患者アストロサイトとヒト iPS 細胞由来運動ニューロンとの共培養による運動ニューロン死モデル系の構築は今後の課題として残された。

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 12 件)

- (1) Imamura K, Inoue H. Research on neurodegenerative diseases using induced pluripotent cells. *Psychogeriatrics*. [Inpress] 査読有
- (2) 八幡直樹, 井上治久. iPS 細胞作製技術を応用した神経疾患病因機構の解明と創薬開発への取り組み. 遺伝子医学 MOOK、22. [Inpress] 査読無
- (3) 江川斉宏, 井上治久. RNA 結合タンパク質の機能と神経変性疾患 iPS 細胞を用いた疾患病態の再現と RNA プロセッシング治療の可能性. *Dementia Japan*, 25(2), 137-144, 2011. 査読無
- (4) 近藤孝之, 高橋良輔, 井上治久. 再生医療と iPS 細胞. *Clinical Neuroscience*, 29(9), 1055-105-, 2011. 査読無
- (5) 北岡志保, 井上治久. iPS 細胞技術の神経疾患研究での有用性および今後の課題. *脳* 21, 14(3), 20-24, 2011. 査読無
- (6) 井上治久. iPS 細胞作製技術を用いた ALS 治療法開発. *日本 ALS 協会会報 JALSA*, 82, 7-9, 2011. 査読無
- (7) 井上治久. 天からの蜘蛛の糸を生かすには. *日経サイエンス*, 41(6), 72, 2011. 査読無
- (8) Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat ALS.

The Journal of Biomolecular Screening, 16(4), 405-414, 2011. 査読有

- (9) Inoue H, Yamanaka S. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(5), 655-661, 2011. 査読有
- (10) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. *Experimental Cell Research*, 316(16), 2560-2564, 2010. 査読有
- (11) 井上治久. iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第 1 回 ALS フォーラム～ALS 最前線～記録集, 13-15, 2010. 査読無
- (12) 村上 学, 井上治久, 高橋良輔. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療戦略. *ファルマシア*, 45, 1009-1112, 2009. 査読無

[学会発表] (計 47 件)

- (1) Kitaoka S, Tsukita K, Takahashi K, Okita K, Kondo T, Yoshikawa K, Yamawaki S, Naitoh M, Suzuki S, Izumi Y, Kaji R, Takuma H, Tamaoka A, Morita M, Nakano I, Kawata A, Nakahata T, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. Induction of astrocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells carrying mutant SOD1. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society -Neuroscience of the Mind-, 2011. 9. 16. Yokohama, Japan.
- (2) 井上治久. iPS細胞技術を用いた神経変性疾患の研究. 日本ALS協会徳島支部 第12回定例会, 2011. 10. 30. 徳島. (招待)
- (3) 井上治久. 難治性神経変性疾患特異的 iPS細胞を用いた研究. 第38回ヒューマン

- サイエンス総合研究セミナー，
2011.10.3. 東京。(招待)
- (4) Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society -Neuroscience of the Mind-, 2011.9.15. Yokohama, Japan.
- (5) 井上治久. iPS細胞技術を用いた神経難病の研究. 熊本県難病相談・支援センター6周年記念医療講演会, 2011.7.15. 熊本。(招待)
- (6) 井上治久. 患者由来iPS細胞を用いた神経変性疾患バイオマーカー同定と病態解明. 第53回日本老年医学会学術集会 ノバルティス老化および老年医学研究基金2009年度受賞講演, 2011.6.17. 東京。(招待)
- (7) 井上治久. iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 日本老年精神医学会, 2011.6.16. 東京 (招待)
- (8) 井上治久. iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第52回日本神経学会学術大会, 2011.5.20. 名古屋。(招待)
- (9) 村上学, 井上治久, 月田香代子, 淺井康行, 饗庭一博, 天貝裕地, 下川浩輝, 上杉志成, 中辻憲夫, 高橋良輔. 転写を標的とした家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発. 第52回日本神経学会学術大会, 2011.5.19. 名古屋.
- (10) 北岡志保, 井上治久, 月田香代子, 高橋和利, 近藤孝之, 吉川勝宇, 山脇聖子, 内藤素子, 鈴木茂彦, 伊東秀文, 和泉唯信, 梶龍兒, 宅間浩, 玉岡晃, 森田光哉, 中野今治, 川田明広, 中畑龍俊, 高橋良輔, 山中伸弥. 変異SOD1を有するALS患者由来iPS細胞の樹立とアストロサイトへの分化. 第52回日本神経学会学術大会, 2011.5.19. 名古屋.
- (11) 井上治久. 疾患モデルと創薬スクリーニング. バイオフィナンスギルド第9期第10回セミナー, 2011.5.13. 東京。(招待)
- (12) 井上治久. Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. 日本薬理学会, 2011.3.22. 横浜。(招待)
- (13) 井上治久. 神経疾患とiPS細胞研究. 第2回iPS細胞研究講演会, 2011.3.15. 長野。(招待)
- (14) Inoue H. iPS Cell Technology and Motor Neuron Disease. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyo, 2011.2.22. Tokyo, Japan. (招待)
- (15) 井上治久. iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 札幌神経再生医療研究会, 2011.2.8. 札幌。(招待)
- (16) 井上治久. iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第2回関西北陸神経免疫研究会, 2011.1.22. 京都。(招待)
- (17) 井上治久. iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 鳥取医療センター, 2010.12.8. 鳥取。(招待)
- (18) 井上治久. 疾患特異的iPS細胞を用いた神経変性疾患の研究. 第26回Wakoワークショップ, 2010.11.26. 東京。(招待)
- (19) Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. Transcription-targeted drug discovery

- for SOD1-mediated ALS using high-throughput screening technique. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010. 11. 17. San Diego, USA.
- (20) Inoue H. iPSC Cell Banking facilitating Disease-specific iPSC research. CIRM iPSC Cell Banking Workshop, 2010. 11. 17. San Francisco, USA. (招待)
- (21) Kitaoka S, Inoue H., Tsukita K, Kawada M, Naitoh M, Takahashi K., Yoshikawa K, Kondo T, Yamawaki S, Watanabe D, Suzuki S, Takahashi R., Yamanaka S. Analysis of motor neurons derived from induced pluripotent stem cells from ALS patients. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010. 11. 17. San Diego, USA.
- (22) 井上治久. 変性疾患モデルとしての iPSC 細胞. 第 29 回日本認知症学会学術集会, シンポジウム 3「神経変性症としての前頭側頭葉変性症: 症候から分子病態解明の最新展開まで」, 2011. 11. 5. 愛知. (招待)
- (23) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Kick off symposium Science Research on Innovative Area ” Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology.” , 2010. 10. 27. Tokyo, Japan. (招待)
- (24) 井上治久. 疾患特異的 iPSC 細胞を用いた神経変性疾患の研究. 第 32 回日本生物学的精神医学会, 2010. 10. 8. 福岡. (招待)
- (25) Kitaoka S, Inoue H., Tsukita K, Kawada M, Naitoh M, Takahashi K., Yoshikawa K, Kondo T, Yamawaki S, Watanabe D, Suzuki S, Nakahata T, Takahashi R., Yamanaka S. Differentiation of induced pluripotent stem cells from ALS patients generates motor neurons. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2010. 9. 2. Kobe, Japan.
- (26) 井上治久. iPSC 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第 1 回 ALS フォーラム, 2010. 8. 28. 東京. (招待)
- (27) 北岡志保, 井上治久., 月田香代子, 川田三代, 高橋和利., 近藤孝之, 吉川勝宇, 山脇聖子, 内藤素子, 鈴木茂彦, 伊東秀文, 和泉唯信, 森田光哉, 中野今治, 川田明広, 中畑龍俊, 高橋良輔., 山中伸弥. 変異 SOD1 を有する ALS 患者由来 iPSC 細胞の樹立と脊髄運動ニューロンへの分化. 第 51 回日本神経学会総会, 2010. 5. 21. 東京
- (28) 井上治久. 運動ニューロン疾患における iPSC 細胞の可能性. SMA 家族の会, 2009. 5. 16. 京都 (招待)
- (29) 井上治久. 疾患特異的 iPSC 細胞を用いた神経変性疾患の研究. 梅田神経懇話会, 2010. 4. 28. 大阪. (招待)
- (30) 井上治久. iPSC 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究. 第 3 回 iPSC 細胞産学合同研究会, 2010. 4. 12 京都. (招待)
- (31) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Joint iPSC Meeting, 2009. 10. 28. Toronto, CANADA. (招待)
- (32) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Gladstone Institute of Cardiovascular Disease: Seminar, 2009. 10. 26. San Francisco, USA. (招待)
- (33) 井上治久. 疾患特異的 iPSC 細胞を用いた神経変性疾患研究. 倉敷神経内科疾患フォーラム, 2009. 10. 2. 倉敷 (招待)

- (34) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. 5th Symposium sur la SLA, 2009.9.25. Quebec, CANADA. (招待)
- (35) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009.9.16. Nagoya, Japan. (招待)
- (36) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. Sweden-Japan Joint Colloquium: Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology, 2009.9.5. Stockholm, Sweden. (招待)
- (37) 井上治久. 疾患 iPS 細胞の樹立から臨床応用へ. 第 2 回 iPS 細胞樹立・維持培養の講習会, 2009.8.26. 京都 (招待)
- (38) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. International Symposium: New Approach for Molecular Neuropathology, 2009.8.13. Tokyo, Japan. (招待)
- (39) 井上治久. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた ALS 研究. 放射線分子疫学セミナー, 2009.7.2. 広島 (招待)
- (40) Inoue H. Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research. The Workshop, 2009.6.8. San Francisco, USA. (招待)
- [図書] (計 5 件)
- (1) Kondo T, Takahashi R, Inoue H. Springer. Stem Cells and Cancer Stem Cells. 2011.241-248.
- (2) Kitaoka S, Kondoh H, Inoue H. Nova

Science Publishers Inc. Induced Stem Cells. 2011. 129-142.

- (3) 近藤孝之, 井上治久, 高橋良輔. 朝倉書店. 再生医療叢書第 7 巻. [印刷中]
- (4) 今村恵子, 井上治久. 中外医学社. Annual Review 神経 2012. 2011.92-96.
- (5) 八幡直樹, 井上治久. 日本臨牀社. 認知症学 (上) . 2011. 282-285.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

○ホームページ

<http://www.cira.kyoto-u.ac/j/index.html>

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/inoue/>

○報道

iPS で薬の効き方評価 創薬に活用へ. 日本経済新聞 (2011.12.26 朝刊)

京大研、ALS 患者から iPS 細胞作製 神経細胞誘導に成功. 京都新聞 (2012.2.24 朝刊)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 治久 (INOUE HARUHISA)

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号: 70332327

(2) 研究分担者

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90216771

高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)

京都大学・iPS 細胞研究所・講師

研究者番号: 80432326

(3) 連携研究者

なし