

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659158
 研究課題名（和文）iPS 細胞由来のマクロファージによるアルツハイマー病の治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of therapy of Alzheimers disease with iPS cell-derived macrophages
 研究代表者
 千住 覚（SENJU SATORU）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
 研究者番号：50274709

研究成果の概要（和文）：本研究は、アルツハイマー病の原因物質である脳内の β アミロイドタンパクを分解あるいは除去する能力の高いマクロファージを作製する方法を開発し、これを用いてアルツハイマー病の治療法を開発することを目的とする。

申請者は、これまでの研究において、マウスおよびヒトの iPS 細胞から機能的な貪食細胞（マクロファージ）を作製する分化誘導技術とその遺伝的改変技術を確立している。これらの技術を応用して、iPS 細胞由来のマクロファージの表面に、 β アミロイドに対する抗体を発現させ、さらに、 β アミロイドを分解するプロテアーゼであるネプリライジンを高発現させた。そして、ヒト iPS 細胞由来の貪食細胞を scid(免疫不全)-アルツハイマー病モデルマウスに投与し、 β アミロイドの蓄積量を低下させられるかどうか検討した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to generate macrophages with a capacity to degrade or remove amyloid- β protein, which is known to be the causative agent of Alzheimer's disease.

Before this project, we had established a technology to generate functional phagocytes (macrophages) from mouse and human iPS cells. In the current study, we generated macrophages expressing Fc-receptor-fused form of single chain antibody specific to amyloid- β . In addition, we made macrophages expressing neprilysin, a protease reported to be highly potent in degradation of amyloid- β . We administered the genetically modified iPS cell-derived macrophages into model mice of Alzheimer's disease, and evaluate whether they could reduce the level of amyloid- β in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：アルツハイマー病、iPS 細胞、マクロファージ、アミロイド β

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、認知症の主要な原因疾

患であり、脳内神経細胞に進行性の機能的障害と脱落が生じる疾患である。また、加齢に伴って発症リスクが上昇する疾患であり、急速に高齢化が進む日本の社会において、社会的・経済的にも、非常に深刻な問題である。アルツハイマー病の剖検例において認められる脳組織中の老人斑は、アミロイド前駆タンパク (APP) の限定分解によって生じた β アミロイドタンパク ($A\beta$ 1-42) の重合物を主な成分としている。これまでに得られている知見から、 β アミロイドタンパクが蓄積し、局所的に β アミロイドの濃度が上昇することが、疾患発症の最初の引き金であると考えられる。加齢に伴って疾患発症のリスクが上昇する理由としては、加齢と共に β アミロイドの分解を担っている Neprilysin 等のプロテアーゼの発現量が低下し、産生と分解のバランスが崩れた結果、 β アミロイドが蓄積することが考えられる。このような疾患発症の機序を考えると、何らかの方法により局所に蓄積した β アミロイドタンパクを分解あるいは除去できれば、有力な治療法になるものと期待される。

β アミロイドタンパクを分解する薬剤の開発を目指し、製薬企業などを中心に全世界的に多くの試みがなされているものの、現時点では効果が明らかな薬剤はない。また、免疫学的な手法により β アミロイドタンパクを除去する治療法として、 β アミロイドタンパクをワクチンとして投与することにより特異的抗体の産生を誘導する、あるいは、 β アミロイドタンパクに対するモノクローナル抗体を投与することが検討された。これらの方法は、マウスモデルを用いた実験で有効性が報告されたが、これまでのところ、臨床試験で有効性が示されるにはいたっていない。

この疾患のマウスモデルである変異型ヒト

アミロイド前駆タンパク (APP) のトランスジェニックマウスを用いた研究により、神経組織に存在する食細胞であるミクログリア、あるいは血液中の単球に由来するマクロファージが β アミロイドの蓄積を抑制し疾患の進行を遅延させる働きをすることが示されている。一方で、ミクログリアは局所の炎症を惹起し、この疾患を悪化させている、とする報告もある。マクロファージなどの貪食細胞は、一般には、生体内各所において異物あるいは不要物を炎症を起こすことなく処理し、組織の恒常性を保つという役割を有している。

研究代表者は、これまでの研究において、マウスおよびヒトの iPS 細胞から機能的な貪食細胞 (マクロファージ) を作製する分化誘導技術とその遺伝的改変技術を確立していた。この技術を応用して、 β アミロイドを特異的に貪食し炎症を起こすことなく処理するマクロファージを人工的に作製し、局所で働かせるという治療法を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、アルツハイマー病の原因物質である β アミロイドを特異的に分解する貪食細胞 (マクロファージ) を作成することを目的とした。本研究の特色は、治療効果を有するマクロファージを iPS 細胞から作製する点にある。患者本人由来の iPS 細胞をソースとすれば、患者の負担なくマクロファージを大量に作製できる。

ヒトのマクロファージは、末梢血中の単球 (モノサイト) から作製することも可能である。しかしながら、単球は、体外では増殖させることができないため、細胞治療を行うのに必要な数のマクロファージを患者末梢血中の単球から作製することは不可能である。また、遺伝的改変も困難である。

本研究では、アミロイド β を処理する能力の高いマクロファージを作成し、まず、*in vitro* の検討によりその能力を検討することを目的とした。さらに、ヒトのアミロイド β を脳内に蓄積するアルツハイマー病モデルマウスの脳内にこのマクロファージを投与し、マウス脳内においてアミロイド β を減少させられるかどうか検討し、アルツハイマー病治療のための細胞医薬として有用であるかどうか評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アミロイド β タンパクに対する単鎖抗体発現ベクターの作製

本研究では、 β アミロイドタンパクに対する抗体を iPS-MP の細胞表面に発現させることにより、 β アミロイドを特異的に貪食する活性の高いマクロファージを作製した。抗 β アミロイド抗体は、単鎖抗体 (scFv)、すなわち、抗体 (イムノグロブリン) の重鎖と軽鎖をリンカー配列を介して結合させた。ベクター作製に際しては、公開されている β アミロイドタンパクに対するモノクローナル抗体の可変領域の塩基配列の情報に基づいて単鎖抗体の可変領域をコードする DNA 配列 (約 900 塩基) を設計し、人工的に合成した。さらに、これを Fc レセプター (Fc γ RI) に連結したキメラ分子 (scFv-FcRI) として発現するベクターを作製し、iPS 細胞に導入した。

(2) iPS 細胞からのマクロファージ作成

ヒトの iPS 細胞から、OP9 共培養法により血液細胞への分化を誘導した。さらに、培養系へ M-CSF と GM-CSF を加えて培養することによりマクロファージを作成した。そして、レ

ンチウイルスベクターを用いて、抗 β アミロイド scFv、および、ネプリライジンを発現するマクロファージを作成した。

(3) iPS 細胞由来のマクロファージによる β アミロイドタンパク処理能力の *in vitro* における検討

マクロファージによる β アミロイドタンパク処理能力を *in vitro* の実験により比較検討した。 β アミロイドタンパクの貪食能力については、蛍光色素で標識されたマイクロビーズに β アミロイドをコートし、これを培養系へ添加する実験を行った。貪食の経過を蛍光顕微鏡観察でリアルタイムに観察する、さらに、フローサイトメトリーを用いて定量的に解析することにより評価した。

また、iPS 細胞由来のマクロファージ培養系へ β アミロイドを添加し、一定時間培養の培養液中の β アミロイド濃度を定量することにより、マクロファージによる β アミロイドの分解あるいは取り込みの能力を評価した。

(4) SCID/アルツハイマー病モデルマウス (scid-5XFAD) マウスの作成

若年性にアルツハイマー病を発症する家系の遺伝子解析から、この疾患の発症を促進する遺伝的因子として、 β アミロイドタンパクの前駆タンパク質 (APP) のアミノ酸置換変異、および、前駆タンパク質をプロセスし β アミロイドを産生するプロテアーゼである Presenilin の変異が同定されている。変異型ヒト APP と Presenilin 遺伝子の合わせて 5 箇所の変異を同時に有するトランスジェニックマウス (5X-FAD マウス) では、生後 3 か月目から脳内の β アミロイドタンパクの

蓄積が認められる。

scid(severe combined immunodeficiency: 重症複合免疫不全)マウスは、Tリンパ球、Bリンパ球ともに欠損しており、ヒト由来の細胞を移植して機能解析を行うことが可能である。前述した5XFADマウスをscidマウスと交配させ、scid-5XFADマウスを作製した。このマウスにヒトマクロファージを移植することにより、in vivoにおけるヒトマクロファージによる β アミロイド蓄積抑制効果の検討を行うことが可能となった。

(5) モデルマウス脳内へのマクロファージ注入による脳間質液中のアミロイド β 減少効果の検討

マクロファージを、上記のように作成したトランスジェニックマウスの脳内に留置したカテーテルから注入することにより、 β アミロイドタンパクの蓄積を抑制することができるかどうか、検討した。脳内に留置した微小透析カテーテルにより、脳間質液を連続的に採取した。細胞治療の効果は、ELISAあるいはWestern blotによる脳間質中の β アミロイドタンパクの定量により評価した。

4. 研究成果

本研究により、以下のような結果を得た。

(1) 蛍光色素標識マイクロビーズに β アミロイドをコートし他ものを用いた実験では、抗 β アミロイド scFv の発現によりマクロファージによるアミロイド β 貪食能力を増強できるという結果が得られた。

(2) iPS細胞由来のマクロファージ培養系へ可溶性に β アミロイドを添加する実験にお

いては、抗 β アミロイド scFv の発現には効果が無かった。ネプリライジンを高発現させることにより、マクロファージによる β アミロイド処理能力が向上した。

(3) モデルマウス脳内へネプリライジンを高発現するマクロファージを注入することにより、脳間質液中のアミロイド β を減少させることができた。

以上のように、ヒトのiPS細胞から、アミロイド β を処理する能力を有するマクロファージを作成することができた。今後、このマクロファージを用いたアルツハイマー病の治療を実現するための課題として、静脈内投与などにより、マクロファージを脳内へ効率よく移行させる方法を開発する必要がある。そのためには、マクロファージの組織移行に関与する分子の同定解析等の研究を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy *Gene Therapy* 18: 874-883, 2011 doi: 10.1038/gt.2011.22 (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千住 覚 (SENJU SATORU)

熊本大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号：50274709

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高松 孝太郎 (TAKAMATSU KOUTARO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生、
医員