

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700367

研究課題名(和文)アルツハイマー病患者 iPS 細胞由来コリン作動性神経の解析

研究課題名(英文) Analysis of cholinergic neurons derived from Alzheimer's disease patient-specific iPSCs

研究代表者

八幡 直樹 (Yahata, Naoki)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：60450607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：プレセニン1変異を有する家族性アルツハイマー病患者由来皮膚線維芽細胞から疾患特異的iPS細胞を作製した(AD-iPS細胞)。AD-iPS細胞と非疾患iPS細胞をそれぞれ、グルタミン酸作動性神経を主とする大脳皮質神経細胞へと分化誘導を行い、比較したところ、アルツハイマー病に関連の深いアミロイドペプチドの産生能に違いが見られた。また、フローサイトメーターを用いて回収した純化神経細胞の遺伝子発現解析を行い、AD-iPS細胞由来神経細胞で変動している遺伝子(群)を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have generated disease-specific iPSC cells from familial Alzheimer's disease patients with Presenilin 1 mutations (AD-iPSCs). AD or control iPSCs were differentiated into cortical neurons mainly containing glutamatergic neurons. The production ratio of the pathogenic amyloid beta species was increased in AD-neurons. Microarray analysis of purified neurons revealed distinct gene expression profiles between AD and control neurons.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が研究対象としているアルツハイマー病は、記憶障害を中核とする進行性の認知機能障害を生じる神経変性疾患である。高齢化社会を迎えつつある現在、アルツハイマー病患者はさらに増加すると考えられ、その発症機構の解明、治療法の確立が急務となっている。アルツハイマー病を研究するに当たり、様々なモデル動物やモデル細胞が使用されているが、過剰発現系や株化細胞、げっ歯類の神経細胞とヒト神経細胞の細胞内環境は厳密には異なる可能性がある。

2006年にマウス線維芽細胞にレトロウイルスを用いて胚性幹細胞(ES細胞)で発現する4つの遺伝子を導入することにより、ES細胞に匹敵する多分化能を有する細胞を樹立できることが報告された(*Cell* **126**, 663-676, 2006)。この細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)と命名され、翌年、ヒト線維芽細胞からiPS細胞が樹立された(*Cell* **131**, 861-872, 2007)。このiPS細胞作製技術によって、体細胞を初期化することにより疾患を有する患者自身の体細胞から、疾患特異的iPS細胞を経て、疾患の標的細胞を入手することが可能になった。

申請者らはこれまで、ヒトiPS細胞を、グルタミン酸作動性神経を主とする大脳皮質神経細胞へ分化誘導を行い、アルツハイマー病で重要な分子の一つであるアミロイドβペプチド(Aβ)の検出が可能であることを示した(*PLoS ONE* **6**, e25788, 2011)。さらに、近年プレセニン(PSEN)変異iPS細胞由来神経細胞において、疾患と関連が深いと考えられるAβ種の産生量の比(Aβ42/Aβ40)が非疾患のものに比べ高い値を示すことが報告され(*Hum. Mol. Genet.* **20**, 4530-4539, 2011)、ヒトiPS細胞を使用した実験系が、アルツハイマー病解析に有用であることが示されつつある。

また、アルツハイマー病において、特にアセチルコリン系の障害が報告されており、病態との関連が示唆されてきた。まず、アルツハイマー病患者の大脳皮質でコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性が有意に低下していることが示された(*Lancet* **2**,

1403, 1976)。さらに、マイネルト基底核から大脳皮質へ広範に投射しているコリン作動性神経の脱落がみられることが報告された(*Science* **215**, 1237-1239, 1982)。しかし、現在もマイネルト基底核のコリン作動性神経の選択的な脱落が生じる原因は分かっていない。

近年、ヒト多能性幹細胞から大脳基底核コリン作動性神経への積極的な分化誘導法についても、いくつかの報告がなされ(*Stem cells* **29**, 802-811, 2011; *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1476-1484, 2010)、アルツハイマー病を含む神経変性疾患において大脳基底核コリン作動性神経細胞解析への道が開かれつつある。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、アルツハイマー病の原因遺伝子として知られ、Aβの産生に直接関わるPSEN1に変異を有した患者由来のiPS細胞を作製し、樹立したiPS細胞をグルタミン酸作動性神経を主とする大脳皮質神経細胞へ分化誘導し、疾患、非疾患での遺伝子発現の違いを解析することで、疾患関連遺伝子(群)を同定することを目指した。また、ヒトiPS細胞の大脳基底核コリン作動性神経への分化誘導系の確立および、コリン作動性神経に特異的な疾患関連遺伝子(群)を同定することを目指していたが、純化神経細胞の収量の少なさ、および、神経細胞の解析において見いだされた疾患関連遺伝子(群)の細胞特異性の検証の必要性を考え、認知機能低下に関連があると考えられている血管細胞(血管内皮細胞、血管壁細胞)を神経細胞と同様に得て、遺伝子発現解析を行うことを目指した。

## 3. 研究の方法

(1)アルツハイマー病の原因遺伝子として知られ、Aβの産生に直接関わるプレセニン1に変異を有した2名の患者由来のiPS細胞の樹立を行う。プラスミドベクターを用い、初期化因子Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53 shRNAを皮膚線維芽細胞に導入し(*Nature Methods* **8**, 409-412, 2011)、数週間

後に出現したコロニーを選択し、iPS 細胞を得る。胚様体を介した *in vitro* での分化誘導とテラトーマアッセイから、三胚葉への分化能を評価し、樹立した iPS 細胞に多能性があること、ES 細胞に特異的なマーカーである SSEA-4、Nanog の発現等を確認する。

(2) 樹立した AD-iPS 細胞および、非疾患 iPS 細胞について、グルタミン酸作動性神経を主とする大脳皮質神経細胞への分化誘導を行う。SFEBq法(*Cell Stem Cell* **12**, 487-496, 2013)を用いて胚様体を作製した後、8 日目に接着培養に移行する。神経分化誘導開始から 2 か月後に、Tuj1, MAP2 等神経細胞マーカー遺伝子の発現、vGult1 等、グルタミン酸作動性神経細胞のマーカーの発現を検証する。得られた細胞について、それぞれ、2 日間の培養上清を回収し、培養上清中の A $\beta$  の測定を行う(*PLoS ONE* **6**, e25788, 2011)。

(3) 神経分化開始からおよそ 5 週間後に、Synapsin I 発現下において GFP を発現するレンチウイルス(*Gene Therapy* **14**, 872-882, 2007)を感染させる。その後、数週間培養した後、フローサイトメーターにより、GFP の蛍光を発した細胞を、神経細胞として回収する。回収した細胞を再培養後、サンプリングを行い、マイクロアレイを用いて、AD 群と非疾患群とで遺伝子発現の比較解析を行う。

(4) AD-iPS 細胞および、非疾患 iPS 細胞について、血管細胞への分化誘導を行う。GSK3 $\beta$  阻害剤等を加えることで、フィーダーを用いることなく分化誘導を行う。誘導後 10 日目前後に、Flk-1(VEGF-R2) 陽性、Tra-1-60 陰性であり、かつ、血管内皮細胞のマーカーである VE-Cadherin 陽性 / 陰性細胞をそれぞれフローサイトメーターにより回収する。VE-Cadherin 陽性分画を VEGF 添加下で培養することにより、CD31 陽性、eNOS 陽性の細胞を得る。また、Flk-1 陽性、

Tra-1-60 陰性、VE-Cadherin 陰性分画の細胞を血清および PDGF-BB 添加培地により培養を続けることで、 $\alpha$ -SMA、Calponin、SM22 $\alpha$  陽性の血管壁細胞を得る (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29**, 1100-1103, 2009)。

#### 4 . 研究成果

(1) アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニリン 1 に変異を有した 2 名の患者由来の iPS 細胞を樹立した。これらの iPS 細胞のうち、核型に異常がなく、初期化因子等のゲノムへの挿入が見られない、2 クローンをそれぞれ選別した。

(2) 樹立した AD-iPS 細胞および、非疾患 iPS 細胞について、SFEBq 法によりグルタミン酸作動性神経を主とする神経細胞への分化誘導を行った。また、培養上清中の A $\beta$  を測定し、A $\beta$  産生能を検証した。AD-iPS 細胞由来の神経細胞の A $\beta$  産生については、より凝集性の高いとされる、A $\beta$ 42 の割合 (A $\beta$ 42/A $\beta$ 40)が上昇していた。これは、PS1 変異により、APP の切断が影響を受けたためであると考えられる。

(3) AD-iPS 細胞および、非疾患 iPS 細胞由来神経細胞について、フローサイトメーターにより純化を行い、マイクロアレイ解析を行った。AD 群と非疾患群とで遺伝子発現の比較解析を行ったところ、AD 群において、発現上昇あるいは減少が見られる遺伝子(群)が見出された。

(4) AD-iPS 細胞および、非疾患 iPS 細胞について、血管細胞への分化誘導を行い、免疫染色で CD31 陽性、eNOS 陽性の血管内皮細胞、および  $\alpha$ -SMA、Calponin、SM22 $\alpha$  陽性の血管壁細胞を得た。今後、神経細胞のマイクロアレイで得られた遺伝子発現データと合わせて比較解析を目指す。今回、神経細胞において AD/非疾患で変動が見られた遺伝子(群)について、異なる細胞種においても同

様の変化が観察されるかを評価することが、細胞特異的な表現型の理解に繋がると考えられる。コリン作動性神経細胞での解析等、神経サブタイプの違いに焦点をあてた、より緻密な解析は今後の課題として残ったが、今回の研究で得られた知見がその解析基盤になると考えられる。

#### 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)

1. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N et al. (43名 9番目) Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A $\beta$  and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell* 査読有 12, 2013年 487-496  
DOI: [10.1016/j.stem.2013.01.009](https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.009)

[学会発表](計 6件)

1. 浅井将、中野梨絵、荒木希、渡邊かおり、八幡直樹、関恒慶、小林千浩、戸田達史、城谷圭朗、井上治久、岩田修永. 神経分化過程における A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の産生比の変化とその責任遺伝子の解析. 第86回日本生化学会大会 2013年9月13日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 近藤孝之、八幡直樹、舟山美里、月田香代子、浅井将、岩田修永、川勝忍、和泉唯信、梶龍兒、朝田隆、高橋良輔、井上治久. 家族性アルツハイマー病患者由来 iPSC 細胞の樹立と解析. 第54回日本神経学会総会 2013年5月30日 東京国際フォーラム (東京)
3. Asai M, Yahata N, Iwata N, and Inoue H. Anti-Amyloid  $\beta$  drug validation using human iPSC cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. The 11<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Disease. 2013年3月7日 Firenze Fiera (Florence, Italy)
4. Yahata N, Asai M, Iwata N, and Inoue H. Anti-Amyloid  $\beta$  drug validation using human iPSC cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. The 42th Annual meeting of the Society for

Neuroscience. 2012年10月17日 the Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, LA)

5. Yahata N, Asai M, Iwata N, and Inoue H. Anti-A $\beta$  drug screening platform using human iPSC cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日 名古屋国際会議場 (愛知)
6. 八幡直樹、浅井 将、岩田修永、井上治久. ヒト iPSC 細胞を用いたアルツハイマー病治療薬探索基盤の開発. 第53回日本神経学会総会 2012年5月22日 東京国際フォーラム (東京)

[図書](計 1件)

1. 八幡直樹、井上治久. iPSC 細胞作製技術を利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, 2012年 98-102

[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

八幡 直樹 (Yahata Naoki)

藤田保健衛生大学 医学部・助教

研究者番号: 60450607

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし