神経系細胞の iPS 細胞からの誘導と 神経疾患研究・創薬への応用

赤松 和土

要約：ヒト iPS 細胞は 2007 年に線維芽細胞から 4 つの転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を用いて初めて樹立され、患者の体細胞から iPS 細胞から誘導された神経系の細胞を用いることによって神経変性疾患の病態を生体外で再現できることが期待された。これまでに、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄性筋萎縮症 (SMA)、パーキンソン病などを中心に多くの疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析が報告され、iPS 細胞由来の神経系細胞を用いることによって、患者脳内で起きていた病理学的変化を正確に再現することができることが示されている。近年では患者からの iPS 細胞の樹立は末梢血からも可能であることが示されたが、血球由来 iPS 細胞は神経分化しにくいという問題点があった。我々はこの問題を解決するため血球由来 iPS 細胞を高効率に神経幹細胞へ分化誘導する方法を開発し、血球由来 iPS 細胞が神経疾患モデルに使用できることを示した。さらに、この分化誘導法の途中で Wnt シグナルを制御する因子、レチノイン酸、Shh といった物質をニューロスフェア形成中に添加することにより、誘導される神経幹細胞の位置情報を任意に制御する方法を確立した。この方法とアルツハイマー病・ALS 患者からの iPS 細胞を用いて、誘導される神経幹細胞の領域特異性が正確な疾患表現型の検出のために重要であることを示した。今後は単一遺伝子疾患だけでなく環境要因の寄与が強い疾患や孤発性症例の解析を可能にするため、iPS 樹立、分化誘導、解析のステップを従来以上に効率化していくことが次世代の疾患モデルの発展につながると期待される。

1. はじめに

ヒト iPS 細胞は 2007 年に線維芽細胞から 4 つの転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を用いて初めて樹立された(1)。この方法を用いて、患者体細胞から多能性を有する細胞を容易に樹立することが可能になった。それまで中枢神経系に病変を有する神経変性疾患では患者自身の病変細胞を採取して解析することは不可能に近かったが、iPS 細胞から誘導された神経系の細胞を用いることによって病態を生体外で再現できることが期待された。iPS 細胞を用いた疾患モデルは、動物モデルや培養細胞株など従来用いられてきたモデルで再現することができなかった病態を再現しうるモデルであることが期待され、神経変性疾患の病態解明および創薬において有用なツールであると考えられる。

患者からの疾患特異的 iPS 細胞は、皮膚生検によって得られた線維芽細胞を用いて、レトロウイルスベクターを用いて Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を導入することにより樹立することができる。再生医療に用いる細胞とは異なり、細胞自体の厳格な安全性は要求されないため、線維芽細胞由来の iPS 細胞は疾患モデルとして現在も比較的良好に使用されている。しかしながら 2010 年にセンダイウイルスベクターを用いて少量の末梢血から iPS 細胞を効率よく樹立する方法が確立され(2)、より患者負担の少ない末梢血が疾患モデル細胞の元細胞として使用できることが示され、iPS 細胞樹立のための患者の負担は以前の皮膚生検と比べると大きく軽減された。おおよそ 5~10 ml の末梢血を患者から得ることができれば、iPS 細胞の樹立が十分に可能である。

キーワード：iPS 細胞, 神経幹細胞, 疾患モデル

順天堂大学大学院 医学研究科 ゲノム・再生医療センター (〒113-8421 東京都文京区本郷 2 丁目 1 番 1 号)

E-mail: awado@juntendo.ac.jp 原稿受領日：2017 年 8 月 21 日, 依頼原稿

Title: Neural differentiation from induced pluripotent stem cells for disease modelling and drug discovery

Author: Wado Akamatsu

2. iPS細胞を用いた神経変性疾患の解析

最初の神経疾患モデル iPS 細胞の文献的な報告は、2008 年の Park らによるパーキンソン病、ハンチントン病を含むいくつかの神経疾患を含む iPS 細胞を樹立したという論文である(3)。iPS 細胞を用いた最初の神経変性疾患モデルは家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS) (SOD1 変異) 症例からの疾患 iPS 細胞に関する報告である(4)。この論文では患者から樹立した疾患 iPS 細胞が疾患感受性細胞である運動ニューロンに誘導可能であることを示している。疾患モデルとして表現型を検出した最初の報告は脊髄性筋萎縮症(SMA)患者から樹立した iPS 細胞由来の運動ニューロンにおいて、細胞死が正常対照と比べて増加していることを示した報告である(5)。この論文は、疾患特異的 iPS 細胞を用いて患者の表現型を生体外で再現し、iPS 細胞が神経疾患の病態解析のツールとして使用できることを明らかにした最初の報告であると思われる。一方、日本国内では慶應義塾大学神経内科によって家族性アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞の樹立が最初に報告された。iPS 細胞から分化誘導した患者由来のニューロンにおいて毒性の高い A β 42 の産生が増加していることを明らかにして、アルツハイマー病の発症メカニズムであるアミロイド仮説を実証した。さらに、これらの表現型を回復させる薬剤(ガンマセクレターゼ阻害薬)を同定した(6)。一方、京都大学 iPS 細胞研究所のグループは、小胞体ストレスと酸化ストレスの亢進がアルツハイマー病 iPS 細胞ニューロンにおける細胞死を惹起していることを示し、ドコサヘキサエン酸(DHA)によって、これらの細胞内ストレスが軽減され神経細胞死が抑制されることを示した(7)。

アルツハイマー病の次に患者数が多い神経変性疾患であるパーキンソン病においては、筆者らのグループは順天堂大学神経内科との共同研究で、遺伝性のパーキンソン病(PARK2)患者2名の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製しニューロンに分化誘導することにより、これまで PARKIN 遺伝子機能異常で起きると考えられてきたミトコンドリアの品質管理機構(マイトファジー)異常を患者由来の細胞で再現することに成功している(8)。正常な状態では ATP 産生などによって発生する活性酸素など日々蓄積されるダメージによってミトコンドリアの品質が低下すると、PARK2 の原因遺伝子産物でありユビキチンリガーゼである Parkin によってミトコンドリアの異常タンパク質がユビキチン化されミトコンドリアの分解を誘導する。この機構が PARK2 患者由来細胞では働かないために、

異常なミトコンドリアの残存と機能不全からドパミンニューロンが脆弱になり細胞死が誘導されるという病態メカニズムが示唆された。iPS 細胞を樹立した2症例のうち1例では、当該患者の剖検が行われたが、典型的な PARK2 患者の脳には蓄積しないと考えられていた Lewy 小体が確認された。患者から樹立された iPS 細胞においても、当該患者の iPS 細胞由来のニューロンでは、もう一方の症例では確認できなかった Lewy 小体の原因となる α シヌクレインの蓄積が観察された。この結果から iPS 細胞由来の神経幹細胞を用いることによって、患者脳内で起きていた病理学的変化を正確に再現することができることを示した。

3. ヒト ES/iPS 細胞からの高効率な神経分化誘導法の開発

ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)からの神経系細胞への分化誘導は、接着・浮遊など様々な培養方法と成長因子・化合物を駆使して多くの方法が報告されているが、接着培養である Lt-NES 法(9)と浮遊培養であるニューロスフェア法(10)がよく用いられる。前述したように、少量の末梢血から iPS 細胞を効率よく樹立する方法が2010年に確立され、体細胞を供与する患者の負担が小さくなった(2, 11)。しかしながら iPS 細胞は樹立元の細胞の性質を残すことが知られており、このような末梢血(T細胞)から樹立した iPS 細胞(TiPS 細胞)は神経系への分化誘導効率が低いことが示唆されていた。筆者らはそれまでヒト iPS 細胞からの神経幹細胞の誘導に胚様体と呼ばれる3胚葉が混在する構造体を経由させて誘導する方法を用いていた(12)。TiPS 細胞を用いた神経変性疾患モデルを確立するため、同一の患者の線維芽細胞および末梢血から iPS 細胞を樹立して比較したところ、実際に TiPS 細胞は線維芽細胞由来 iPS 細胞に比べて神経分化能が低いクローンの割合が多かった(13)。これはおそらく iPS 細胞から自発的に3胚葉が混在する胚様体へ分化させる際に、神経分化誘導効率の低い TiPS 細胞では外胚葉の細胞が少ないことに起因すると考えられた。筆者らはその問題を解決するため、ヒト ES/iPS 細胞から神経幹細胞へ胚様体を経由せずに直接高効率に誘導することを試みた。筆者らはマウスの ES 細胞においては単細胞に分離したヒト多能性幹細胞を低密度・低酸素で培養することによって、外胚葉への分化を抑制する BMP シグナルを排除することにより効率の良い神経分化に成功していた(14)。この方法をヒト細胞に応用し、低酸素培養を併用することにより胚様体を経由せずにヒト多能性幹細胞から神経幹細胞を直接高効率

に誘導する方法を開発した(13). この方法を用いると、従来の方法では神経分化誘導効率の低い TiPS 細胞も高効率に神経分化誘導することが可能であり、前項で記した筆者らが線維芽細胞由来細胞で明らかにしていた遺伝性パーキンソン病 PARK2 患者 iPS 細胞から誘導した神経細胞におけるミトファジー異常(8) も同様に再現することができた。

4. ヒト ES/iPS 細胞からの領域特異的な神経幹細胞の分化誘導

例えばアルツハイマー病では大脳皮質のコリン作動性ニューロン、パーキンソン病では中脳のドパミンニューロン、筋萎縮性側索硬化症では脊髄の運動ニューロンなど、一般的に神経変性疾患では疾患ごとに神経系の特定の領域が障害されるため、それぞれの疾患において正確な疾患の表現型を検出するためには、iPS 細胞をそれぞれの疾患特異的な疾患感受性細胞に分化する能力を持つ神経幹細胞への分化誘導が重要であると考えられた。それぞれの部位へは様々な神経分化誘導方法が報告されており、分化誘導そのものは可能であったが、複数の領域にまたがる表現型を示す神経変性疾患や、その病変部位が明らかになっていない未知の神経疾患などの研究において複数の領域の細胞を比較することは、効率や分化誘導期間の異なる分化

誘導プロトコルを用いて行うことが難しいという問題点があった。筆者らは次に、前項で示した方法で誘導した神経幹細胞(13) に神経系の任意の領域特異性を持たせることを試みた。哺乳類の神経発生時における神経系の原器である神経管の前後軸・背腹軸の領域特異性を決定する因子をニューロスフェアの形成時に作用させることにより、誘導される神経幹細胞の領域が決定されることが考えた。まず、神経管を後方化する作用がある Wnt シグナルを IWP-2 で抑制すると、誘導される神経幹細胞が前方化して将来の大脳皮質を形成する領域特異性を持つことが明らかになった(15)。IWP-2 は膜結合型 α -アシルトランスフェラーゼ (MBOAT) である Porcupine の不活化を介して Wnt タンパク質のパルミチル化を抑制し、結果として Wnt/ β -カテニン経路を抑制する。一方、Wnt シグナルを抑制せずに誘導したニューロスフェアに含まれる神経幹細胞は中脳領域の特異性を有していた。そこで Wnt シグナルを活性化し、さらに領域を後方化するために GSK3 阻害薬である CHIR99021 を添加したところ、濃度依存的に領域特異性が後方化した。さらに後方化因子として知られるレチノイン酸を併用することにより、脊髄領域に相当する領域特異性を得ることができた。次に背腹軸の制御を試みた。哺乳類の神経管の背腹軸は脊索から分泌されたソニックヘッジホッグ (Shh) の濃度に

図1 ヒト iPS 細胞から誘導される神経幹細胞の領域特異性の制御

未分化 iPS 細胞を神経幹細胞を多く含むニューロスフェアに分化誘導する際に、IWP-2 で Wnt シグナルを抑制すると領域特異性が前方化し、CHIR99021 で Wnt シグナルを活性化すると領域特異性が後方化する。RA (レチノイン酸) 添加でさらに後方化する。さらに Shh を作用させることにより、前後軸を保ったまま腹側化する。

よって決定する。脊索（神経管の腹側）から分泌された Shh の濃度が高ければ神経管は腹側化し背腹軸が決定する。この知見に基づき、ニューロスフェア形成の培養液中に Shh を添加すると、前後軸の位置情報を保ったまま誘導される神経幹細胞が腹側化することが明らかになった。すなわち、Wnt シグナルを制御する因子、レチノイン酸、Shh といった物質をニューロスフェア形成中に添加することにより、ニューロスフェアに含まれる神経幹細胞の位置情報を任意の物にすることができた。

このような神経幹細胞の領域制御の疾患モデルにおける有用性を示すために、アルツハイマー病患者 iPS 細胞由来細胞（PS1 または PS2 変異）(6) から各領域に誘導した神経細胞の疾患特異的表現型を比較した。表現型の一つであるリン酸化 tau タンパク質の蓄積は誘導される細胞を前方化し大脳皮質ニューロンにした場合に正常対照との差が最も顕著になった。一方で、ALS 患者由来の iPS 細胞(16) では、脊髄腹側の領域特異性を持つニューロスフェアから誘導した神経細胞においてのみ、正常対照と比して軸索障害が有意に増加していた(15)。これらの結果から、患者 iPS 細胞を用いた神経疾患モデルにおいて誘導される神経幹細胞の領域特異性が、正確な疾患表現型の検出のために重要であることが示された。前述したように、神経変性疾患においては、同一の疾患と考えられても複数の部位で運動症状・認知機能障害など症例ごとに様々な症状を示す疾患も存在する。このような疾患では、実際の患者における部位特異的な表現型を比較し解析する必要がある、分化誘導した神経系細胞の領域特異性の制御が有用であると思われる。

5. ヒト ES/iPS 細胞を用いた創薬スクリーニング

神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた有効な創薬スクリーニングの結果はこれまでいくつか報告されている。米国のバイオベンチャー企業 iPierian 社は孤発性 ALS 患者由来 iPS 細胞から誘導したニューロンにおいて、遺伝性 ALS の原因遺伝子産物の一つである TDP-43 の凝集が起きていることを示した。この凝集を指標に大規模な創薬スクリーニングを行い、ジゴキシンをはじめとするいくつかの既承認薬が凝集を抑制することを明らかにした(17)。スイス Roche 社と米国 PTC Therapeutics 社は、脊髄性筋萎縮症 (SMN) 患者由来 iPS 細胞から誘導した運動ニューロンを用いて、HEK293 細胞でスクリーニングされた候補化合物の効

果を確認し、マウスモデルを用いた *in vivo* での検証に向けての有効性確認ツールとしての iPS 細胞の有用性を示した(18)。

6. 現在の神経疾患特異的 iPS 細胞の問題点と今後の展望

これまで述べたように、単一遺伝子を原因とする神経疾患においては、数症例の iPS 細胞によって表現型が確実に再現されることが明らかにされてきたが、適切な解析の時期 (*in vitro* での神経分化誘導日数) と誘導細胞の領域特異性に関して条件を最適化することが、より高精度な解析結果を得るために必須な技術と思われる。50 歳~60 歳代で発症する遅発性の神経変性疾患を iPS 細胞を用いて解析する際に、長くて数週間という現在の培養期間で本来の疾患の細胞レベルでの病態変化をどの程度再現できているかどうかは議論する余地がある。人為的な方法で iPS 由来細胞のエイジングを加速することができるという報告もあるが(19, 20)、生理的な変化を再現する方法の開発が望まれる。一方で、これまで解析の中心となっていた単一遺伝子疾患だけでなく、近年では神経変性疾患における孤発性症例も iPS 細胞を用いた解析の対象となってきた。環境要因の寄与が強い疾患や孤発性症例では解析する症例数を大幅に増加させる必要があり、iPS 樹立、分化誘導、解析のステップを従来以上に効率化していくことが次世代の疾患モデルの発展につながると期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Takahashi K, et al. Cell. 2007;131:861-872.
- 2) Seki T, et al. Cell Stem Cell. 2010;7:11-14.
- 3) Park I-H, et al. Cell. 2008;134:877-886.
- 4) Dimos JT, et al. Science. 2008;321:1218-1221.
- 5) Ebert AD, et al. Nature. 2009;457:277-280.
- 6) Yagi T, et al. Hum Mol Genet. 2011;20:4530-4539.
- 7) Kondo T, et al. Cell Stem Cell. 2013;12:487-496.
- 8) Imaizumi Y, et al. Mol Brain. 2012;5:35.
- 9) Koch P, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:3225-3230.
- 10) Reynolds BA, et al. Science. 1992;255:1707-1710.
- 11) Seki T, et al. Nat Protoc. 2012;7:718-728.
- 12) Nori S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:16825-16830.
- 13) Matsumoto T, et al. Stem Cell Reports. 2016;6:422-435.
- 14) Akamatsu W, et al. J Neurosci. 2009;29:2113-2124.
- 15) Imaizumi K, et al. Stem Cell Reports. 2015;5:1010-1022.
- 16) Egawa N, et al. Sci Transl Med. 2012;4:145ra104.
- 17) Burkhardt MF, et al. Mol Cell Neurosci. 2013;56:355-364.
- 18) Naryshkin NA, et al. Science. 2014;345:688-693.
- 19) Miller JD, et al. Cell Stem Cell. 2013;13:691-705.
- 20) Vera E, et al. Cell Rep. 2016;17:1184-1192.