

## 平成 25 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	神経難病の iPS モデルの確立と治療法開発研究	
研究者所属・氏名	研究代表者：堺病院 神経内科 准教授 平野 牧人 共同研究者：高度先端総合医療センター再生医療部 教授 福田 寛二 高度先端総合医療センター再生医療部 助手 小野寺 勇太	

### 1. 研究目的・内容

様々な難病患者の人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を神経・グリア細胞へ分化させ、これらを用いて、ヒト細胞を用いた疾患モデルを構築することが、本研究の主眼である。これまで報告されている他疾患の研究から、患者 iPS の神経分化時には、神経突起の進展不良や維持困難が予想される。これに対して、ALS の原因蛋白である ubiquilin2 および最近 ALS の原因として同定された SQSTM1/p62 に注目して、種々の薬剤などにより神経突起伸展を回復・維持、細胞内凝集体の形成あるいはその逆が生じるかを検討する。

### 2. 研究経過及び成果

筋萎縮性側索硬化症(ALS) 4 症例、パーキンソン病 1 症例、バルデー・ビードル病 1 症例、および正常対照の iPS 細胞を確立した。また、iPS 細胞樹立目的で提供された皮膚線維芽細胞については、ALS 7 例、多系統萎縮症患者 3 例分も確立された。こうして確立された iPS 細胞には、ALS 原因遺伝子 SQSTM1/p62 遺伝子変異を有する患者 iPS 細胞も含まれている。p62 は ubiquilin2 と類似した機能ドメインを有し、不要な蛋白を分解するユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系の両者に関連する蛋白である。また、患者の運動ニューロンには p62 陽性である Skein-like inclusion といわれる凝集体がしばしば観察される。これらから、p62 は ALS 病態生理の中心的な役割を果たすと考えられている。本研究によって、患者・対照由来の線維芽細胞における、p62 や ubiquiline2 の細胞内分布は、定常状態では細胞質に散在することが判明したが、ストレス下では、患者細胞でのみ細胞質で凝集することが分かった。このことは、既報告における患者運動ニューロンにおいて、p62 陽性凝集体が形成されることに類似していた。また、本研究では、患者由来 iPS 細胞から神経細胞を誘導することに成功した。ALS と同じ運動ニューロン病である脊髄性筋萎縮症の患者由来神経細胞では、神経細胞の突起進展の障害が観察されているが、ALS 患者細胞由来神経細胞では、神経突起進展障害は明らかでなかった。P62 の免疫染色を行ったところ、iPS 細胞由来神経細胞において、対照では、p62 は細胞質に均一に存在していた。一方、p62 遺伝子に変異のある細胞においては、細胞質に凝集していることが、判明した。また、ある種の抗酸化剤を添加すると、その凝集が減少した。このことは、線維芽細胞でみられた変化が、神経細胞でも、再現していると考えられる。さらに、凝集は細胞治療における指標とりうることを示唆された。以上から、確立された iPS 由来神経細胞は、ALS のモデル細胞になりうることを、示された。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

確立した患者・対照の iPS 細胞由来神経細胞を用いて、さらに、ubiquilin2 および SQSTM1/p62 の発現促進・抑制、ユビキチンプロテアソームまたはオートファジーの促進・抑制剤を用いて、どのような条件・薬剤添加により、凝集が減少・消失するかを観察することにより、関連する細胞内シグナルの同定、治療薬の検索を行う。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Neurology	雑誌	2013年1月
Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener	雑誌	2014年 e-pub