

# News Release



2013年2月20日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

長崎大学

科学技術振興機構(JST)

## 患者さん由来 iPS 細胞でアルツハイマー病の病態を解明

### iPS 細胞技術を用いた先制医療開発へ道筋

#### Cell Stem Cell に掲載

#### ポイント

- アルツハイマー病患者<sup>注1)</sup>さんの iPS 細胞<sup>注2)</sup>を用いて、若年発症および高齢発症どちらも共通に、アミロイドベータ(Aβ)<sup>注3)</sup>というタンパク質が、細胞内に蓄積するタイプがあることを明らかにした。
- 細胞内に蓄積した Aβ は凝集物(Aβ オリゴマー<sup>注4)</sup>)となり、細胞内ストレスを引き起こしたが、Aβ 産生阻害剤(BSI)<sup>注5)</sup>もしくは DHA<sup>注6)</sup>投与によりそのストレスは軽減した。
- iPS 細胞技術による、疾患の病態解明および創薬研究に加え、「病態を予め予測し、適切な治療を提供する先制医療<sup>注8)</sup>」への道筋を示した。

#### 1. 要旨

近藤孝之大学院生(京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学(高橋良輔教授)/CiRA リサーチアシスタント/JST CREST)、井上治久准教授(京都大学 CiRA/JST CREST/JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト)、岩田修永教授(長崎大学薬学部/JST CREST)の研究グループは、山中伸弥教授(京都大学 CiRA/JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト)らの研究グループと協力し、複数のアルツハイマー病(AD)の患者さんごとに存在する病態を明らかにして、iPS 細胞を用いた先制医療への道筋を示しました。

筆者らは、若年性(家族性)AD の原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)に遺伝子変異をもつ患者さんと、家族歴のない高齢発症(孤発性)AD の患者さんの皮膚から iPS 細胞を作製し、大脳の神経系細胞に分化誘導させました。解析の結果、APP-E693Δ と呼ばれる変異があると、アミロイドベータ(Aβ)というタンパク質がオリゴマーと呼ばれる凝集体となって細胞内に蓄積し、小胞体ストレス<sup>注9)</sup>と酸化ストレス<sup>注10)</sup>を引き起こし、細胞死を生じ易くすることがわかりました。また、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は軽減され、神経細胞死も抑制されました。さらに高齢発症の孤発性 AD 患者さんの中にも APP-E693Δ 変異と同様の細胞内 Aβ オリゴマーおよび細胞ストレスが見られるケースがあることがわかりました。

これらの研究結果は、iPS 細胞技術応用は、疾患の病態解析や創薬研究に留まらず、孤発性を含めた患者さんごとの病態を事前に把握し適切な治療介入を行う「先制医療」にも用いることができることを示しています。この研究成果は 2013 年 2 月 21 日(米国東部時間)に米国科学誌「Cell Stem Cell」のオンライン版で公開されます。

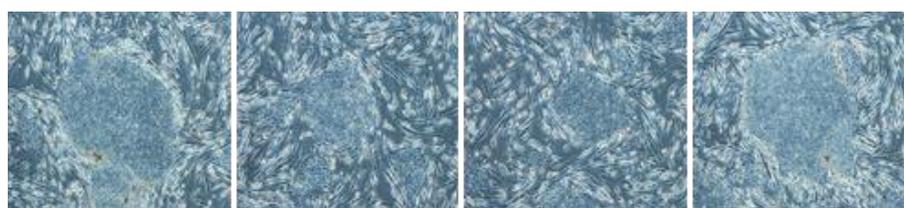
## 2. 研究の背景

アルツハイマー病 (AD) は、老年期認知症の中で最も多い疾患であり、その病理特徴としては、脳内に老人斑といわれるタンパク質の蓄積が見られます。この老人斑の主成分が  $A\beta$  であり、 $A\beta$  の過剰な蓄積がアルツハイマー病の発症に深く関わっていると考えられていましたが、病態への関与の仕方は、ヒトの脳の細胞では良く分かっていませんでした。

## 3. 研究結果

### 1) アルツハイマー病患者さんから iPS 細胞を作製し病態を再現

健常人 (コントロール) 3 名と、APP-E693 $\Delta$  変異もしくは APP-V717L 変異を持つ若年発症の家族性 AD 患者 2 名、さらに家族歴のない高齢発症の孤発性 AD の方 2 名から iPS 細胞を作製しました。



コントロール APP-E693 $\Delta$  APP-V717L 孤発性

図 1 本研究で作製した iPS 細胞の位相差顕微鏡写真

そしてヒト iPS 細胞から神経系細胞 (大脳皮質神経細胞やアストロサイト<sup>注 11)</sup>) に分化誘導する技術を開発し、患者さんの神経系細胞群を *in vitro* (生体外) で作製しました。すると APP-E693 $\Delta$  変異を持つ iPS 細胞由来の神経系細胞で、細胞内に  $A\beta$  オリゴマーが蓄積し、小胞体ストレスを引き起こしていることがわかりました。さらに、マイクロアレイチップを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、酸化ストレスに応答する遺伝子群の発現が増加していることが明らかになりました。また、活性酸素 (reactive oxygen species : ROS)<sup>注 12)</sup> が増加していたことから、細胞内  $A\beta$  オリゴマーを持つ AD の神経系細胞内部では細胞内酸化ストレスが引き起こされていますが、それに対して細胞が対抗措置を取り、細胞内環境を正常化しようとしていることが考えられました。

これらの細胞内ストレスは  $A\beta$  の合成阻害剤である  $\beta$  セクレターゼ阻害薬 ( $\beta$ -secretase inhibitor: BSI<sup>注 5)</sup>) により  $A\beta$  を取り除くと改善されました。

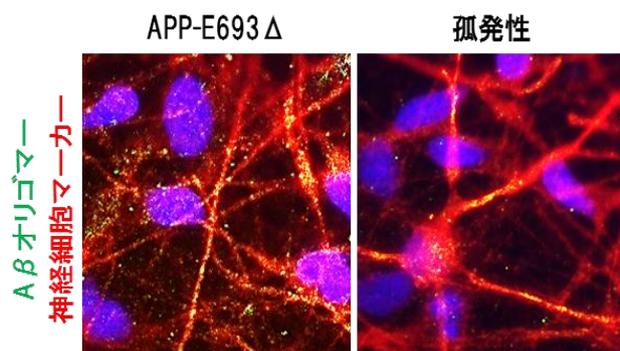
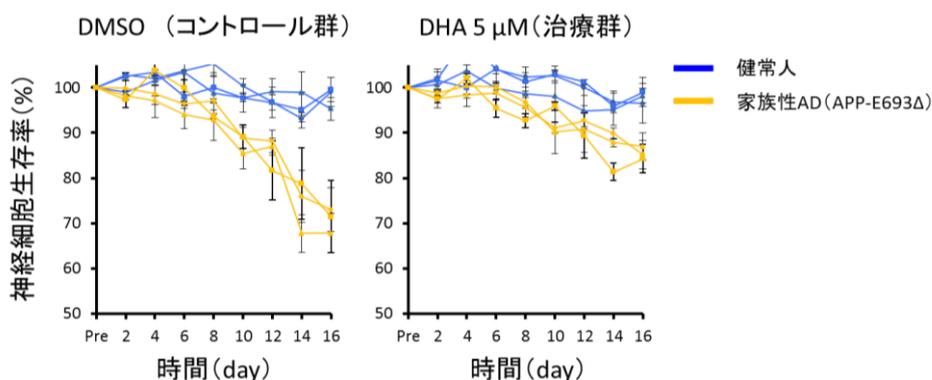


図 2 神経細胞内に蓄積した  $A\beta$  の様子

緑色 (または黄色) が蓄積した  $A\beta$  オリゴマー、青が細胞の核、赤が神経細胞を示す。コントロールの神経細胞では  $A\beta$  オリゴマーは検出されない。

## 2) A $\beta$ による細胞内のストレスは、適切な濃度の DHA で改善する

APP-E693 $\Delta$  変異を持つ iPS 細胞由来の神経系細胞に対して、3 種の化合物(活性酸素の生成阻害剤や小胞体ストレスを軽減する試薬など)を添加し、小胞体ストレスに対する治療効果を調べました。すると、低濃度の DHA を添加した時のみ、小胞体ストレスに応答するタンパク質 (BiP、Caspase-4) や酸化ストレス (peroxiredoxin-4、活性酸素種) を減らしましたが、残り 2 種の化合物や高濃度の DHA では逆に小胞体ストレスを増強してしまいました。さらに、低濃度の DHA を添加することで、APP-E693 $\Delta$  変異を持つ iPS 細胞由来神経細胞の自然細胞死を、改善させることができました。この結果は、適切な有効濃度が存在することを示しています。



**図 3 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の生存解析と DHA による治療効果**

健康人（青色線）では iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の自然細胞死は見られなかったが、APP-E693 $\Delta$ 変異を持つ家族性 AD（黄色線）では、二週間程度の培養で細胞死が見られた。適切な量の DHA を添加して培養すると、細胞死が改善された。

## 3) 一部の孤発性 AD においても細胞内 A $\beta$ オリゴマーと細胞ストレスが観察された。

若年発症型の家族性 AD のみでなく、家族歴のない高齢発症の孤発性 AD の患者さんにおいても解析を進めると、一名の方においては APP-E693 $\Delta$  変異と同様に細胞内 A $\beta$  蓄積や細胞ストレスが見られ、低濃度 DHA で細胞ストレスを除去することができました。

この結果は、DHA による処置が有効であるアルツハイマー病の集団と有効でない集団が存在する可能性を示しています。つまり、一見同じに見える AD も、背景にひそむ病態は多様であり、病態特性に応じた治療戦略が必要であるということです。そして、iPS 細胞技術による疾患を先制的に治療制御する医療への道筋を提示しています。

## 4. まとめ

本研究では、若年発症型および高齢発症の孤発性アルツハイマー病患者さんの神経細胞・アストロサイト内に A $\beta$  オリゴマーが蓄積し、種々の細胞ストレスを引き起こしているケースがあることを明らかにしました。

より表現型の強い若年発症型アルツハイマー病患者さんの iPS 細胞を用いて、病態解析や創薬研究のプラットフォームを開発し、孤発性アルツハイマー病患者さんの iPS 細胞をそのプラットフォーム上で解析す

ることで、患者さんの大部分を占める孤発性アルツハイマー病治療開発を推進する新たな方向性を示しました。

これらの成果を推し進めることで、従来の均一な疾患概念に対する画一的な治療を超えて、先制的な病態診断に基づき適切な治療を行う「先制医療」の開発が今後の課題であり、そのためには、iPS 細胞技術のさらなる進展が必要であると考えられます。

## 5. 論文名、著者およびその所属

### ○ 論文名

“Modeling Alzheimer's disease using iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness”

### ○ ジャーナル名

Cell Stem Cell

### ○ 著者

**Takayuki Kondo**,1,2,7 Masashi Asai,7,9,10 Kayoko Tsukita,1,7 Yumiko Kutoku,11 Yutaka Ohsawa,11 Yoshihide Sunada,11 Keiko Imamura,1 Naohiro Egawa,1 Naoki Yahata,1 Keisuke Okita,1 Kazutoshi Takahashi,1 Isao Asaka,1 Takashi Aoi,1 Akira Watanabe,1 Kaori Watanabe,7,10 Chie Kadoya,7,10 Rie Nakano,7,10 Dai Watanabe,3 Kei Maruyama,9 Osamu Hori,12 Satoshi Hibino,13 Tominari Choshi,13 Tatsutoshi Nakahata,1 Hiroyuki Hioki,4 Takeshi Kaneko,4 Motoko Naitoh,5 Katsuhiro Yoshikawa,5 Satoko Yamawaki,5 Shigehiko Suzuki,5 Ryuji Hata,14 Shu-ichi Ueno,15 Tsuneyoshi Seki,16 Kazuhiro Kobayashi,16 Tatsushi Toda,16 Kazuma Murakami,6 Kazuhiro Irie,6 William L. Klein,17 Hiroshi Mori,18 Takashi Asada,19 Ryosuke Takahashi,2 **Nobuhisa Iwata**,7,10,\* Shinya Yamanaka,1,8 and **Haruhisa Inoue**1,7,8,\*

### \* ) 責任著者

### ○ 著者の所属機関

- 1 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
- 2 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学(神経内科)
- 3 京都大学大学院医学研究科生体情報科学  
京都大学大学院生命科学研究科認知情報学
- 4 京都大学大学院医学研究科高次脳形態学
- 5 京都大学大学院医学研究科形成外科
- 6 京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻
- 7 科学技術振興機構(JST) CREST
- 8 科学技術振興機構(JST) 山中 iPS 細胞特別プロジェクト
- 9 埼玉医科大学医学部
- 10 長崎大学薬学部
- 11 川崎医科大学
- 12 金沢大学大学院医学研究科
- 13 福山大学薬学部

- 14 愛媛大学大学院医学研究科機能組織学
- 15 愛媛大学大学院医学研究科精神科
- 16 神戸大学大学院医学研究科
- 17 ノースウェスタン大学(USA)
- 18 大阪市立大学大学院医学研究科
- 19 筑波大学大学院人間総合科学研究科(臨床医学系)

## 6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- JST CREST <sup>注13</sup>
- JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト
- 内閣府「最先端研究開発支援プログラム(FIRST)」
- 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「シナプス病態」
- 厚生労働科学研究費補助金(iPS細胞を利用した創薬研究支援事業)
- 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業 疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性疾患の画期的診断・治療法の開発に関する研究)
- 厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))
- 臨床薬理研究振興財団研究基金

## 7. 用語説明

### 注 1) アルツハイマー病 (AD)

ドイツの精神科医、アルツハイマー博士により 1905 年に報告された進行性の記憶障害を伴う認知症。中高年で発病し、徐々に進行して生活に支障をきたすようになり、最終的には意思疎通ができなくなる。その病理特徴としては、脳内に老人斑といわれるタンパク質の沈着が見られ、この老人斑の主成分が A $\beta$  であることから、A $\beta$  の過剰な蓄積がアルツハイマー病の発症に深く関わっていると考えられてきた。

### 注 2) iPS 細胞

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: induced pluripotent stem cell) のこと。体細胞に特定因子を導入することにより樹立される、ES 細胞に類似した多能性幹細胞。2006 年に山中教授らの研究により世界で初めてマウス体細胞を用いて樹立に成功したと報告された。

### 注 3) アミロイドベータ (A $\beta$ )

40~43 個のアミノ酸が連なってできたペプチド(タンパク質断片)で、アミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質 (APP) が、酵素である  $\gamma$  セクレターゼや  $\beta$  セクレターゼによって分解されることで生じる。AD では、A $\beta$  が凝集して線維状になり、脳に沈着することが昔から良く知られている。

### 注 4) A $\beta$ オリゴマー

A $\beta$  が数個~十数個集まった凝集物のことで、アミロイドを作る線維状 A $\beta$  とは区別されている。AD 患者さんの中には、脳内の老人斑(線維状の A $\beta$ ) がみられない方もおられるので、現在、A $\beta$  オリゴマーと AD との関係が詳しく調べられている。

### 注 5) BSI ( $\beta$ -secretase inhibitor)

A $\beta$  産生に關与する  $\beta$  セクレターゼの阻害薬。 $\beta$  セクレターゼに結合し、前駆体タンパク質から A $\beta$  が生成するのを阻害する化学物質のこと。

#### 注 6) ドコサヘキサエン酸 (DHA)

不飽和脂肪酸の一種で、主に細胞膜に存在する。魚油に多く含まれており、体内では  $\alpha$ -リノレン酸から合成される。但し、 $\alpha$ -リノレン酸は体内で合成することができない。

#### 注 8) 先制医療

病気の原因や進行に関する研究知見を基に、体内の異常を早期に診断し、病気を発症する前から治療を開始することで、病気の発症を遅らせる、もしくは防ぐことを目指す医療のこと。

#### 注 9) 小胞体ストレス

細胞内で生産されたタンパク質が正しい立体構造へと折りたたまれず、細胞小器官である小胞体に蓄積してしまうことで引き起こされるストレス反応のこと。小胞体ストレスが起きると、細胞内のタンパク質生産量が減り、小胞体でのタンパク質の折りたたみ負荷が減ったり、折りたたみを助けるタンパク質が増えたり、折りたたみがうまくいかなかったタンパク質の分解効率が増える。あまりにも大きな小胞体ストレスがかかった場合には、細胞死が起きる。

#### 注 10) 酸化ストレス

通常、生体内では活性酸素が生成したとしても、それらの除去(抗酸化作用)がすみやかに行われるが、このバランスが崩れ、活性酸素の生成が増えた時に、DNA やタンパク質、脂質などが攻撃を受けて、最終的にはさまざまな細胞小器官や細胞自身が傷つくこととなる状態のこと。

#### 注 11) アストロサイト

中枢神経系に存在する脳内最大の細胞集団で、神経細胞を取り囲み、神経活動を修飾したり、血流を調節したりすることで、神経ネットワークを支える働きがある。

#### 注 12) 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)

細胞が酸素を使った呼吸をする際に生じる反応性の高い酸素のこと。多くの場合は、抗酸化物質や抗酸化酵素によって除去されるが、過剰に生じると、多くの物質と反応しやすい性質のため、酸化ストレスを引き起こす。細胞内での情報伝達、代謝調節などに加え、感染がおこった時に白血球が活性酸素で細菌を攻撃するなどの生理機能をもつ。

#### 注 13) JST 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域	「人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」 (研究総括: 須田 年生 慶應義塾大学 医学部 教授)
研究課題名	「iPS 細胞を駆使した神経変性疾患病因機構の解明と個別化予防医療開発」
研究代表者	井上 治久(京都大学 iPS 細胞研究所 准教授)
研究期間	平成21年10月～27年3月

JSTはこの領域で、iPS細胞を基軸とした細胞リプログラミング技術の開発に基づき、その技術の高度化・簡便化をはじめとした研究によって、革新的医療に資する基盤技術の構築を目指している。上記研究課題では、基礎および臨床の研究者を結集して、患者由来 iPS 細胞を用いて神経変性疾患の病因メカニズムの解明及び個別化予防医療開発を目的としている。

本件担当: 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)  
研究支援部門 国際広報室  
遠山  
TEL: 075-366-7005  
FAX: 075-366-7023  
Email: cira-pr@cira.kyoto-u.ac.jp

長崎大学広報戦略本部  
TEL: 095-819-2007  
FAX: 095-819-2156  
Email: kouhou@ml.nagasaki-u.ac.jp