

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (疾患特異的
iPS細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム) 事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 神経疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解明と新規治療法の創出を目指した研究
(英語) Study aiming at elucidation of the pathology by utilizing neurological
diseases-specific iPSCs and development of novel treatment methods

研究開発実施期間: 平成29年8月29日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 岡野栄之
(英語) Hideyuki Okano

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 慶應義塾大学 医学部 生理学教室
(英語) Keio University School of Medicine, Department of Physiology, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文: 2 ページ以上

英文: 1 ページ程度

技術開発として、ヒト iPS 細胞から、電気活動的に高い成熟性を示す興奮性神経細胞への、迅速かつ高純度分化誘導法を確立した(Ishikawa et al., Cells, 2020)。この方法で誘導した家族性アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 患者由来 iPS 細胞から神経細胞を誘導し、ROS 産生や A β 産生量上昇の検出確認にも成功した。また、抑制性神経細胞の一種であるパルブアルブミン陽性神経細胞の特異的な分化方法も開発した(パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法、細胞、及び分化誘導剤 (特願 2019-157194))。更に、ヒト iPS 細胞からアストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞を誘導する技術も新たに開発し、特許取得、論文発表を行った (Nicolas, Cells, 2020; Sonn et al, Inflamm Regen., 2022)。また、ヒト iPS 細胞から 3 次元培養を行い、より脳の環境に近い Brain organoid の構築にも成功した。これ

らは、Brain organoid のバラツキを制御する為の新たな 3 次元培養法の開発にも繋がっている。さらに、上記の技術は、複数の企業との共同研究へと発展している。

AD 関連疾患の研究においては、タウ変異を持つ患者由来 iPS 細胞の解析から、タウの異常が神経突起異常やミトコンドリア異常を引き起こすと共に、部位によっては、タウが高リン酸化ではなく、低リン酸化状態になることによって病態形成に繋がりを示すことを明らかにした (Nakamura et al, Stem Cell Rep, 2019)。また、可溶性タウが毒性の本体であると報告されている家族性神経変性を引き起こすタウ変異を導入した細胞では、Ca 振動が上昇する事を確認した。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞において、世界で初めて、1 分子のライブイメージングを成功させた。この手法を応用する事によって、タウタンパク質の減少が、抑制性シナプスを形成している GABA 受容体の細胞膜表面における拡散運動、抑制性シナプスの裏打ち構造、および Ca oscillation に影響を与えうる事を示し、タウタンパク質の未知の生理的機能を明らかにしつつ、新たな病態形成機構の関与の可能性を示した。更に、孤発性 AD の中で最も頻度の高い危険因子である ApoE4 の多型によって神経興奮性が異なり、細胞株によって老化状態を制御するタウ蛋白質を減少させた事に対する反応性が異なる事を示した。また、Presenilin (PS)1,PS2 遺伝子変異を持つ家族性 AD 患者由来 iPS 細胞に、新規に確立した興奮性神経細胞への分化・成熟を促進させる誘導法を適用し、迅速な A β 産生定量や ROS の検出を可能にした。更に PS1 遺伝子 exon9 欠失変異を持つ iPS 細胞を作製し、健常人由来 iPS 神経細胞に比べ、神経突起長および複雑性が低下していることが分かった。さらに神経細胞の刺激応答性が欠失変異神経では低下していた。また、ゲノム編集技術を用いて、家族性 AD の原因遺伝子である PS 遺伝子の conditional knock out iPS 細胞を作製し、ヒト神経細胞において PS 2 が A β 42 産生に重要であることを示した。更に、抑制性神経細胞にも、高い電氣的成熟性を持たせる手法を適用し、家族性 AD 患者由来 iPS 細胞からも成熟度の高い抑制性神経細胞を作り出した。更に、シグナル S/N 比や時間分解能の高い XCaMP を取り入れた Ca イメージングを導入した。

パーキンソン病については、本事業以前の拠点で解析してきた PARK2/PARK6 などミトコンドリアクリアラランス異常を示すタイプの家族性症例に加えて、病態が全く不明である家族性症例や研究期間中に発症のリスク因子、原因遺伝子と同定された症例に関しても樹立解析を進めることを目的とした。これらの病態解析と同時にさらに高純度なドーパミンニューロンの誘導法を開発することにより、既存の家族性パーキンソン病も含めて新たなスクリーニング系の基盤を提供し、パーキンソン病全体の病態の包括的な理解を進めるとともに、各タイプのパーキンソン病に特異的な表現型を指標に疾患修飾薬候補を同定できるシステム構築を目指した。順天堂で 2015 年に同定・報告した PARK22 (Funayama et al. Lancet Neurology 2015) においては細胞死の亢進・に加えて、世界で初めて観察された病理所見 (Lewy 小体陽性) を反映する α シヌクレイン異常蓄積の表現型を iPS 細胞でも検出することに成功した (Ikeda et al. Hum Mol Genet. 2019)。また、原因遺伝子産物である CHCHD2 がミトコンドリアに局在し、患者細胞におけるミトコンドリアの機能不全を示唆するデータを得た。PARK24 はプロサポシン遺伝子 (PSAP) に変異を有する患者家系から同定され報告された新たな家族性パーキンソン病であるが、本研究課題では患者から作製した iPS 細胞の解析を進めた。PARK24 患者由来の細胞モデル (iPS 細胞ドーパミン神経・皮膚線維芽細胞) では PSAP の細胞内蛋白量や細胞内局在が変化しており、リソソーム機能異常を示すことを示すデータを得て、家系同定と同時に報告し、表現型と遺伝子型の相関をより確実なものにすることができた (Oji et al. Brain. 2020)。

同時に疾患表現型の検出方法の改良を進め、高齢発症神経変性疾患 iPS 細胞モデルにおける iPS 細胞由来ニューロンの成熟・老化を誘導する手法を確立した。化合物を用いた方法によって、複数種類の家族性パ

ーキンソン病 iPS 細胞モデル・アルツハイマー病 iPS 細胞モデルでの表現型検出までの期間を実際に大幅に短縮することができた。

ALS 関連疾患の研究においては、新規 ALS 患者リクルート・検体採取・iPS 細胞の樹立を進めており、2018 年度以降、新たに 10 例の家族性 ALS 患者から iPS 細胞を樹立している。家族性 ALS の方には積極的に検体採取の協力もいただいております、リクルートも順調に進めることができた。Kii ALS/PDC に関しても、家系内高齢非発症例 (1 例)、疾患対照としての遺伝性 ALS 例 (6 例)、および孤発性 ALS 例 (52 例) の樹立を完了した。

高収量の検体回収を目標としたマイクロ流体デバイス (Nerve organoid device, Jiksak Bioengineering) を用いて iPS 細胞由来運動ニューロンの培養手法を確立し、目標通り高収量の軸索分画を回収可能な実験系を確立した。この手法を用いて FUS 変異および TDP-43 変異 iPS 細胞由来運動ニューロンの軸索を用いた RNA-seq を行った。FUS に関しては変異 iPS 細胞由来運動ニューロンにおける軸索異常分岐という細胞表現型を見出し、そのメディエーターが Fos-B であることを同定し、ノックダウンや阻害剤実験によりレスキューできることを示した。成果は EBioMedicine 誌に 2019 年 6 月に発表した (Akiyama T, et al. EBioMedicine 2019)。また「神経軸索分岐異常の改善 (特願 2019- 60876)」という名称で 2019 年 3 月 27 日に特許出願を行った。

TARDBP 変異による軸索局所での RNA 代謝異常の解析からは新規治療標的候補として PHOX2B を見出し、その発現抑制で健常者運動ニューロンの突起伸長抑制が再現された。動物モデルとして、ゼブラフィッシュでも、モルフォリノによる PHOX2B の発現抑制実験で、細胞モデルと同様に脊髄軸索長が低下し、さらに運動機能も低下した。PHOX2B は、ALS で発症後長期まで保たれる動眼神経や自律神経において発現が高いことから、変異運動ニューロンの選択的変性に関わる可能性が考えられる。上記の知見を Stem Cell Reports 誌に報告し (Mitsuzawa S, et al. Stem Cell Reports 2021)、各種国際学会の中で発表をおこなった (PACTALS 2021 Nagoya; ICCSR 2021 Tokyo; 32th international symposium on ALS/MND)。

これらの軸索の病態に着目した ALS の解析について、オミックス解析を中心とした総説を Frontiers in Neuroscience 誌に総説の形で発表した (Suzuki N, et al. Front Neurosci 2020)。また軸索病態全体を俯瞰した総説を J Hum Genet 誌に報告した (Suzuki N, et al. J Hum Genet 2023)。

iPS 細胞由来変異 hnRNPA1 運動ニューロン・骨格筋細胞のトランスクリプトーム解析に関してはアイソジェニック細胞の樹立に苦戦していたが、ベクターの改変などトラブルシューティングを進め樹立の目途がたった。hnRNPA1 変異例に関しては iPS 細胞を新規家系の患者から 3 例を樹立することができた。MyoD の遺伝子導入により骨格筋分化させ、細胞ストレスを負荷して表現型を解析した。

上記の 3 疾患 (AD, PD, ALS) の表現型が混在する疾患である、紀伊半島に多発する筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Kii ALS/PDC) の研究においては、Kii ALS/PDC 患者 iPS 細胞由来アストロサイトにおける病態表現型、すなわち①グルタミン酸取り込み能の低下 (L-グルタミン酸が L-グルタミン酸オキシダーゼの作用で酸化され、過酸化水素を生成するメカニズムを用いて、細胞上清を用いた吸光度測定法により検出)、②ミトコンドリア機能の低下 (Flux analyzer を用いて、ミトコンドリア呼吸の指標である酸素消費速度を測定)、および③特定の疾患特異的遺伝子およびタンパク質変化の検出 (qRT-PCR および免疫染色法による、それぞれの定量データを算出) について、5 例の Kii ALS/PDC 患者 iPS 細胞由来アストロサイトを用いて病態を検出することに成功し、世界初の Kii ALS/PDC 病態モデルの開発に成功した。また、それらと並行して薬剤スクリーニング法も確立した。

また本研究が対象とする AD, ALS, PD を対象とした病態メカニズムと創薬研究に関する総説論文を発表している (Okano and Morimoto, Cell Stem Cell, 2022)。

We developed methods to differentiate human iPS cells into various types of neurons, including highly mature excitatory neurons (Ishikawa et al., *Cells*, 2020), parvalbumin-positive inhibitory neurons, and glial cells such as astrocytes and microglia (Nicolas, *Cells*, 2020; Sonn et al, *Inflamm Regen.*, 2022). We also introduced new techniques for Ca imaging with a high signal-to-noise ratio and time resolution. In studies related to Alzheimer's disease (AD), analysis of iPS-neurons with tau mutations revealed that tau abnormalities cause neurite and mitochondrial abnormalities, possibly mediated by tau hypo-phosphorylation (Nakamura et al, *Stem Cell Rep*, 2019). Live imaging of a single molecule in human iPS-derived neurons using a brilliant fluorophore, Q-dot, showed that tau reduction affects the diffusion of GABA receptors on the cell membrane surface. We also found that neurite length and complexity were reduced in iPS-derived neurons with PS1 gene exon9 deletion mutation. Newly generated conditional knockout iPS cells of the PS1/2 genes demonstrated that PS2 is important for A β 42 production in human neurons (Watanabe et al, *eNeuro*, 2021). For Parkinson's disease, we aimed to establish iPS cell lines for familial cases with unclear pathology to promote a comprehensive understanding of the disease. We successfully detected abnormal α -synuclein accumulation in iPS cells from patients with PARK22 (Ikeda *Hum Mol Genet.* 2019) and identified abnormal lysosomal function in iPS cells from patients with PARK24, a new familial Parkinson's disease with a mutation in the prosaposin gene (Oji et al. *Brain.* 2020). We also developed a method to induce maturation and senescence of iPS cell-derived neurons, which significantly shortened the time to phenotype detection in multiple familial Parkinson's disease and Alzheimer's disease iPS cell models. These studies contribute to a better understanding of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and the development of new drug discovery systems.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable disease that systematically affects motor neurons. Using iPSCs with the FUS mutation, a causative gene for familial ALS, we found that abnormal axonal branching in mutant iPS cell-derived motor neurons is mediated by Fos-B and can be rescued by knockdown or inhibition of Fos-B (Akiyama T, et al. *EBioMedicine* 2019, Patent Application 2019- 60876).

Analysis of abnormal RNA metabolism in axonal regions caused by TARDBP mutations revealed PHOX2B as a novel candidate therapeutic target, and suppression of its expression reproduced the inhibition of neurite outgrowth in healthy motor neurons. PHOX2B is highly expressed in oculomotor and autonomic neurons, that persist long after the onset of ALS, suggesting that it may be involved in the selective degeneration of mutant motor neurons (Mitsuzawa S, et al. *Stem Cell Reports* 2021).

Review articles on the axonal pathology of ALS were also published (Suzuki N, et al. *Front Neurosci* 2020; Suzuki N, et al. *J Hum Genet* 2023). For the field of ALS research, iPS cells from 29 sporadic ALS patients were established and deposited at RIKEN BRC.

To reveal the crosstalk of the three diseases described above (AD, PD, ALS), we also studied Kii amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonian dementia complex (Kii ALS/PDC), in which the three pathologies are observed in the same pedigrees. Some pathological phenotypes of Kii ALS/PDC patients were recapitulated using iPS cell-derived astrocytes, including reduced ability to uptake glutamate, reduced mitochondrial function, and altered gene expression (Nicolas, *Cells*, 2020). This was the first model of Kii ALS/PDC that was not caused by a single gene mutation, making it impossible to model in experimental animals.

The newly established iPSC lines, differentiation methods, culture methods, analysis methods, and insights into the pathogenesis of neurodegenerative diseases will certainly improve drug development. In fact, we have translated one of our findings into a clinical trial (Morimoto et al, *Cell Stem Cell*, 2023).