

ALS 患者 iPS 細胞由来神経細胞に対するオートファジー促進薬や抗酸化薬による治療研究

Treatment of ALS-patient-derived iPS cells with agents promoting autophagy and anti-oxidants

近畿大学医学部堺病院 神経内科

平野牧人

## 要旨

ALS では運動ニューロン内に異常な蛋白凝集が認められる。それは病理上の凝集マーカーp62 陽性であり、p62 はオートファジーでのみ分解されるため、ALS の病態に蛋白分解経路(特にオートファジー)の異常が関与すると考えられてきた。ALS 原因遺伝子の産物であるユビキリン2、VCP、p62 は蛋白分解経路のユビキチン-プロテアソームとオートファジー両者に関連する。以上から p62 は単なる病理マーカーでなく、病因に直結した蛋白であることが判明した。本邦の p62 変異例の臨床像は、従来の孤発性 ALS と区別できず、病理像は、従来の孤発例に合致していた。本研究では、孤発性 ALS 患者由来 iPS 細胞を神経に分化し、p62 や VCP の関連蛋白を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、p62 と共局在する蛋白は同定できなかつた。また、オートファジー促進薬ラパマイシン、バルプロ酸、アミオダロン、および種々の抗酸化薬も使用し、抗凝集効果を検証した。その結果、オートファジー促進薬の一部、抗酸化薬の一部において、p62 の凝集抑制効果がみられた。一方、バルプロ酸では、細胞障害が強く、低濃度では凝集抑制効果はなかつた。運動ニューロンへの分化を行ったところ、対照 iPS 細胞や p62 陰性 ALS 患者由来細胞では成功したが、p62 関連 ALS 患者由来では、細胞死が誘導された。物質 X を培養液に添加すると、細胞死が抑制された。今後、この物質の作用経路を探索する必要がある。

## 研究の目的

ALS では運動ニューロン内に異常な蛋白凝集が認められる。それは病理上の凝集マーカーp62 陽性であり、p62 はオートファジーでのみ分解されるため、ALS の病態に蛋白分解経路(特にオートファジー)の異常が関与すると考えられてきた(*J Neuropathol Exp Neurol* 2011;70:349)。申請者は家族性 ALS 原因遺伝子ユビキリン 2 の同定に携わり(*Nature* 2011)、さらに孤発性 ALS の解析から p62/*SQSTM1* 遺伝子や *VCP* 遺伝子変異例を本邦で初めて報告した(*Neurology* 2013, *Neurobiol Aging* 2015)。ユビキリン 2、VCP、p62 は蛋白分解経路のユビキチン-プロテアソームとオートファジー両者に関連する。以上から p62 は単なる病理マーカーでなく、病因に直結した蛋白であることが判明した。本邦の p62 変異例の臨床像は、従来の孤発性 ALS と区別できず(*Neurology* 80;458:2013)、また、別の研究による病理像は、従来の孤発例に合致していた(*Acta Neuropathol.* 2013;125:511)。仮に、オートファジーの低下が ALS 病態の 1 因とするならば、その亢進は治療につながる可能性がある。申請者は p62 変異を有する ALS 患者由来の iPS 細胞を樹立し、神経に分化させると、正常コントロールにはない p62 の凝集が見いだされることを発見した。変異のない場合にもやや軽度であるが、少なくとも一部では同様の所見が観察された。また、p62 は酸化ストレス時に増加し細胞保護に働くとされる。

本研究では、孤発性 ALS 患者由来 iPS 細胞を神経に分化し、p62 や VCP の関連蛋白を観察し、オートファジーの促進薬や抗酸化薬で p62 の凝集や細胞障害が減少するかを観察する。最近免疫抑制薬として認可され、オートファジー促進薬として有名なラパマイシン、以前から臨床で使用されている抗てんかん薬バルプロ酸、抗不整脈薬アミオダロン、および種々の抗酸化薬も試みた。

## 本研究のこれまでの経緯と成果

申請者は、これまで ALS 原因遺伝子の探索に携わり、Alsin (*Nat Genet* 2001; 29:160), ユビキリン 2 (*Nature* 2011; 477:211) の同定に至った。さらに、日本人孤発性 ALS を対象に p62/*SQSTM1* 遺伝子や *VCP* 遺伝子解析を行い、本邦初の遺伝子陽性例を報告した。本研究の予備実験として、孤発性 ALS 患者さん (p62 や *VCP* 変異を有する方も含む) にご協力いただき、患者由来線維芽細胞を 20 名分樹立しており、別の研究により順次 iPS 細胞へ誘導している。すでに、5 名分の孤発性 ALS 患者の iPS 細胞を樹立しており、神経への分化も成功している。上述の p62 異常を有する ALS 患者由来の iPS 細胞も樹立し、神経に分化させると、正常コントロールにはない p62 の凝集が見いだされることを発見した。

## 方法

### 1. iPS 細胞の神経への分化

ALS では、運動ニューロン障害以外にも、自律神経障害 (J Neurol Sci. 2007;254:78) や認知障害などの合併が多いことが以前から報告されている。運動ニューロン優位の障害が指摘されてきた SOD1 遺伝子変異ですら申請者は排尿障害や感覚障害などの多彩な神経障害が生じうることを報告した (*Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*15;312:2014)。したがって、本研究では、まず一般的な神経への分化を行い、実験を行った。まず、フィーダー細胞 (マウス線維芽細胞) を撒き以下の培養液で培養。ES 細胞培養液: Stemsure DMEM (high-glucose)、Stemsure SR(血清代替品):20%、Non-Amino acid:x100、GlutaMax(L-glutamine の代替品):x100、2-mercapethanol (抗酸化剤):100ml に対して 182  $\mu$  l、basicFGF:4  $\mu$  g/ml になるように添加。神経幹細胞の誘導方法は細胞をトリプシンで単離し、ペトリディッシュ (非接着性) 上で神経幹細胞誘導培地にて浮遊培養を 1 週間行う。神経幹細胞誘導培地として ES 細胞培養液、bFGF:10  $\mu$  g/ml、EGF:20  $\mu$  g/ml。神経細胞誘導方法として浮遊培養で得られた neurosphere 様細胞を培養ディッシュ (接着性) 上で神経細胞誘導培地にて接着培養を行う。神経細胞が増殖したら一度継代し、実験へ使用する。神経細胞誘導培地は ES 細胞培養液、bFGF:10  $\mu$  g/ml。

## 2. p62、VCP および関連蛋白の抗体を用いた免疫染色

p62 遺伝子変異の有無により ALS の病態が変わるのか否かは重要である。p62 は酸化ストレス時に Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) をオートファジーに誘導分解して nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) を活性化、細胞死を防御することが知られている。正常対照、p62 に遺伝子変異のある ALS 患者由来 iPS 細胞と変異のない患者由来細胞での p62 や VCP との二重染色を行い、変異の有無により、反応性が異なるのかを検証した。ALS 病理に関連の深い TDP43 についても二重染色をおこなった。さらに p62 は Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B の抑制因子としても知られるので、シグナリング蛋白との関連も調べた。

## 3. iPS 細胞由来神経細胞に対するオートファジーの活性化と抑制、抗酸化薬の効果判定

オートファジー促進薬であるラパマイシンや抗てんかん薬バルプロ酸、抗不整脈薬アミオダロンを種々の濃度で、培養液中に混合することで、凝集減少が見られるかを検証した。細胞障害性に関しても、形態観察および核染色することでクロマチンの凝集が生じるかを評価する。また、CoenzymeQ10(およびその誘導)、

レチノイン酸など種々の抗酸化薬の添加による効果も検証した。

#### 4. iPS 細胞の運動ニューロンへの分化

最近報告された比較的短時間に iPS 細胞から運動ニューロンへ分化させる方法 (Molecular Brain 2015;8:79) も p62 の凝集性を確認するため試みた。当初、対照細胞でも分化誘導ができなかったが、論文著者である愛知医科大学岡田洋平先生にアドバイスをいただき、実験方法を改善した。具体的には、フィーダー細胞上で培養した iPS 細胞のコロニーを Dissociation 溶液で剥がし、懸濁してゼラチンコート培養皿に撒き FGF-2 を除いた EB 用標準メディウムに 1 – 2 時間培養後、以下の培養液で培養をおこなった。DMEM/F-12, 5 % KSR, 2 mM L-glutamine, 1 % NEAA, and 0.1 mM 2-ME with 3  $\mu$ M dorsomorphin dihydrochloride, 3  $\mu$ M SB431542, 3  $\mu$ M BIO, and 1  $\mu$ M retinoic acid (RA)。

2 日目からメディウムを下記含有するものに変更した。3  $\mu$ M dorsomorphin dihydrochloride, 3  $\mu$ M SB431542, 3  $\mu$ M BIO, and 1  $\mu$ M retinoic acid (RA)。

4 – 14 日目は 1  $\mu$ M RA and 1  $\mu$ M purmorphamine を含有するメディウムに変更した。また、メディウムは 2 – 3 日に一度交換した。14 日目に TrypLE Select (Thermo Fisher) にて剥離、ラミネンコート培養皿撒き、以下を含むメディウム

で培養した : Media hormone mix (MHM) or KBM Neural Stem medium (Kohjin Bio, Japan), 2 % B27 上清, 1 % NEAA, 50 nM RA, 500 nM purmorphamine, 10  $\mu$  M cAMP, 10 ng/mL recombinant BDNF (R&D systems, USA), 10 ng/mL recombinant GDNF, 10 ng/mL recombinant human IGF-1, 200 ng/mL L-ascorbic acid。分化した細胞について、神経のマーカーTuj1 および運動ニューロンのマーカーCholine acetyl-transferase (ChAT)により染色した。

## 結果

### 1. 神経への分化

p62 変異 ALS 患者由来 iPS 細胞から一般的な神経への誘導は対照細胞と同様に行うことができ、形態的には大差がないようであった。神経マーカーTuJ 1 の発現も確認できた。

### 2. 凝集の観察

通常神経への分化を行った p62 関連 ALS 患者由来神経細胞では、p62 の凝集が観察されたが、Keap1 や NRF2 との二重染色を行っても、凝集には共局在しなかった。また、対照細胞や変異陰性患者由来神経細胞との染色性の差も明らかでなかった。VCP についても同様であり、p62 の凝集と共局在しなかった。さらに、TDP43 との二重染色を行ったが、TDP43 は核内に留まっており、p62 とは共局在しなかった。NF- $\kappa$ B の染色も行ったが、共局在はなく、また、細胞質から核への変異も明らかでなかった。

### 3. iPS 細胞由来神経細胞に対するオートファジーの活性化と抑制、抗酸化薬の効果

オートファジー促進薬の一部では凝集が減少した。しかし、バルプロ酸では一般