



京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
国立研究開発法人日本医療研究開発機構

患者さん由来 iPS 細胞を用いた化合物スクリーニングにより、 筋萎縮性側索硬化症の治療標的分子経路を同定

ポイント

- 筋萎縮性側索硬化症(ALS)^{注1}は、運動ニューロンが変性して筋萎縮と筋力低下を来す疾患で、そのメカニズムは詳しく知られておらず、十分な治療法がない。
- SOD1 遺伝子に変異を有する家族性 ALS 患者さん由来 iPS 細胞から作製した運動ニューロンを用いて、化合物スクリーニングを行い、ALS 運動ニューロンの細胞死を抑える既存薬と、ALS の病態に関与する分子経路を同定した。
- 同定した既存薬は、オートファジー^{注2}を促進することにより、異常タンパク質蓄積と細胞死を抑制した。
- 同定した既存薬は、SOD1 変異を有する ALS マウスや、他の変異を有する家族性 ALS 患者さんあるいは孤発性 ALS 患者さん由来運動ニューロンでも有効性を認めた。

1. 要旨

今村恵子特定拠点助教および井上治久教授（京都大学 CiRA 増殖分化機構研究部門）らの研究グループは、国内外の研究グループらとともに、ALS 患者さん由来 iPS 細胞を用いて治療薬探索のための薬剤スクリーニングを行い、ALS の治療標的となる分子経路と ALS 運動ニューロンの細胞死を抑える既存薬を同定しました。

ALS は、運動ニューロンが進行性に変性して筋萎縮と筋力低下を来す疾患で、そのメカニズムは詳しく知られておらず、まだ十分な治療法がありません。ALS はほとんどの場合が孤発性ですが、家族性では、遺伝要因として SOD1 遺伝子や TDP-43 遺伝子の傷（変異）、C9orf72 遺伝子内のくり返し配列の伸長などが知られています。

本研究では、SOD1 遺伝子に変異を有する家族性 ALS 患者さんから作製した iPS 細胞、遺伝子変異を修復した iPS 細胞と健康な方から作製した iPS 細胞（対照群）に、Lhx3、Ngn2、Isl1 という 3 つの転写因子^{注3}を加えて運動ニューロンへと変化（分化）させました。すると、患者さん由来運動ニューロンでは異常に折りたたまれたタンパク質が蓄積し、細胞死を起しやすいたことが分かりました。そこで、ALS 患者さんの運動ニューロンの細胞死を抑制する化合物を見つけるため、SOD1 変異を有する家族性 ALS 患者さん由来運動ニューロンを用いて、細胞死を標的としたスクリーニング系を構築しました。既存薬を含む 1,416 個の化合物について、運動ニューロンの細胞死を抑えるかどうかのスクリーニングを行ったところ、27 個の薬が細胞死を強く抑えました。また、その約半数が Src/c-Abl というタンパク質の分子経路に関連していることが分かりました。さらに、細胞死を強く抑える化合物の中で、慢性骨髄性白血病の治療薬として用いられているボスチニブという

既存薬は、オートファジーといわれる不要なタンパク質を分解する働きを促進し、ALS の病態の一つである異常に折りたたまれたタンパク質を減らすことが分かりました。ボスチニブを、SOD1 変異を有する ALS マウスに投与したところ、有効性を示しました。さらに、TDP-43 遺伝子変異あるいは C9orf72 リピート伸長を有する家族性 ALS 患者さん由来 iPS 細胞から作製した運動ニューロンや、孤発性 ALS 患者さん由来 iPS 細胞から作製した運動ニューロンの一部でもボスチニブが細胞死を抑制することが分かりました。本研究は、今後の ALS の治療薬開発研究に貢献するものと期待されます。

この研究成果は 2017 年 5 月 24 日(米国時間)に米国科学誌「Science Translational Medicine」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

ALS は、主に中年以降に発症し、運動ニューロンが選択的に変性・消失していく原因不明の疾患です。筋萎縮と筋力低下が主な症状で、進行すると歩行障害、嚥下障害、呼吸障害などを生じます。病気の進行が比較的速く、人工呼吸器を用いなければ通常は 2~5 年で死亡することが多いといわれています。しかし、病気を起こすメカニズムは詳しく知られておらず、まだ十分な治療法がありません。そこで、井上教授らの研究グループは、ALS の治療薬を探索するため、患者さん由来の iPS 細胞から運動ニューロンを作製して ALS の病態を再現し、その病態を改善する化合物のスクリーニングを行いました。

3. 研究結果

1) 家族性 ALS 患者さん iPS 細胞由来運動ニューロンの細胞死を標的とした化合物スクリーニング系を構築した

まず、グループは、SOD1 遺伝子に変異をもつ家族性 ALS 患者さんの皮膚細胞から iPS 細胞を作製しました。その際、CRISPR-Cas9 というゲノム編集技術を用いて、患者さんの遺伝子変異を修復した iPS 細胞も作製しました。その後、iPS 細胞に Lhx3、Ngn2、Isl1 という 3 つの転写因子を加えて、運動ニューロンへと分化させました。すると、家族性 ALS 患者さん由来運動ニューロンでは、折りたたみ異常を示すタンパク質が蓄積しており、健康な方由来運動ニューロンや変異を修復した運動ニューロンよりも、細胞死を来しやすいことが分かりました。そこで、運動ニューロンの細胞死を抑制する薬を見つけるため、SOD1 変異を有する家族性 ALS 患者さん iPS 細胞由来運動ニューロンを用いて、多くの化合物の効果を調べることができるスクリーニング系を構築しました。既存薬を含む 1,416 個の化合物について、運動ニューロンの細胞死を抑えるかどうかのスクリーニングを行ったところ、27 個の化合物が細胞死を強く抑えることが分かりました。

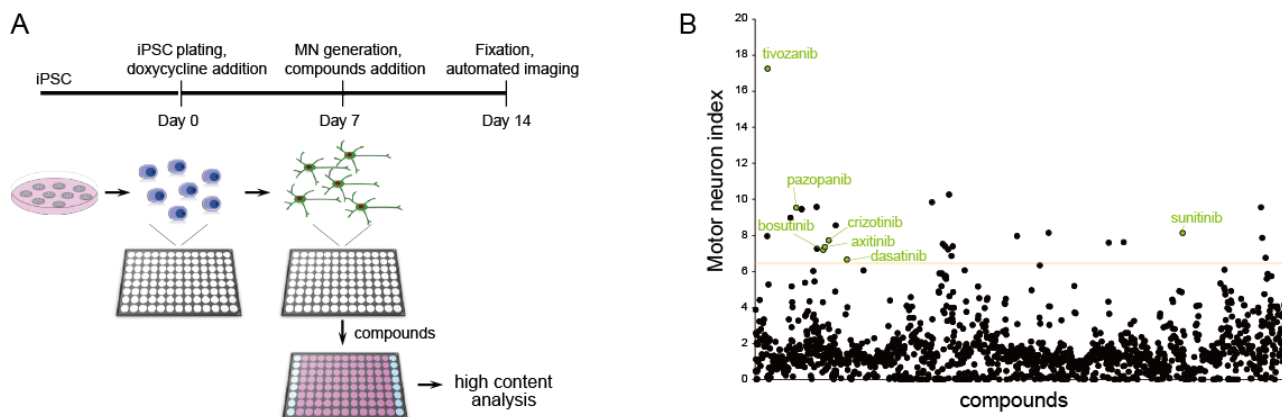


図 1. ALS 患者さん iPS 細胞由来運動ニューロンを用いた化合物スクリーニング

- A. 化合物スクリーニングのプロトコール。iPS 細胞から運動ニューロンへと分化した7日目に、化合物を運動ニューロンに投与し、14日目にその効果を解析した。
- B. 1,416個の化合物のスクリーニング結果。1つの点が、1種類の化合物を示す。縦軸は運動ニューロンの生存率を示す。

2) 化合物スクリーニングの結果から、ALS 運動ニューロンの細胞死に関連する分子経路を明らかにした

スクリーニングにて細胞死を強く抑えた27個の化合物の中で、14個の化合物が Src/c-Abl というタンパク質の分子経路に関連していることが分かりました。そこで、細胞内の Src/c-Abl を調べてみると、家族性 ALS 患者さん iPS 細胞由来運動ニューロンでは、リン酸化された Src/c-Abl が増えており、細胞死に関連していることが分かりました。

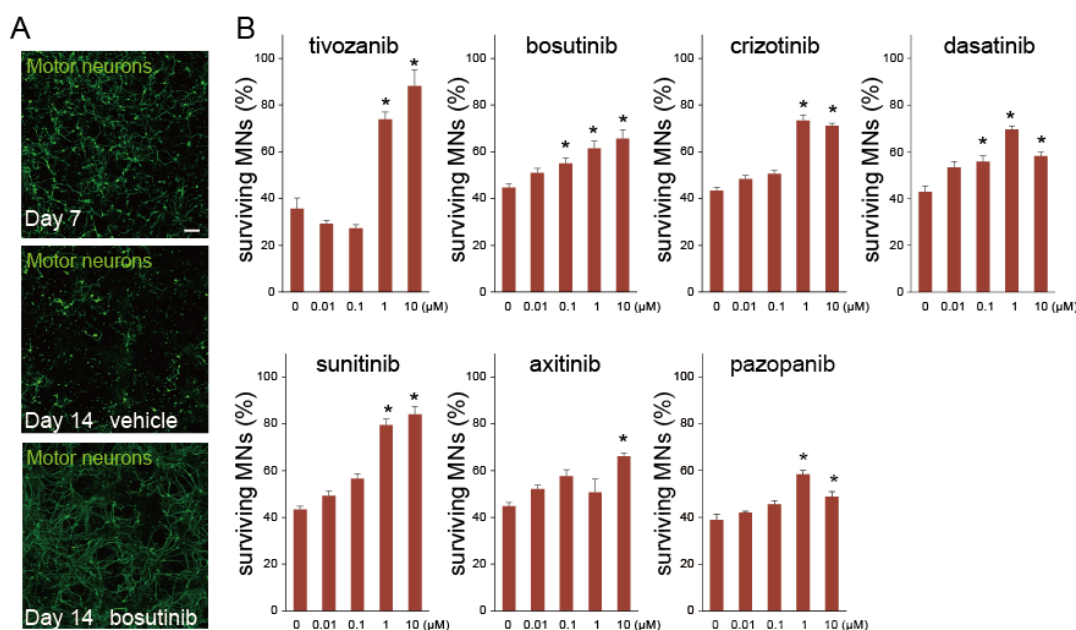


図2. ALS 運動ニューロンの細胞死を抑える既存薬の効果

A. 運動ニューロンの染色像 (スケールバー ; 100 μm)

上 : iPS 細胞から分化7日目の ALS 運動ニューロン

中 : 化合物を投与しない場合の ALS 運動ニューロン (14日目)

下 : ボスチニブを投与した場合の ALS 運動ニューロン (14日目)

B. 細胞死を抑える既存薬の効果

縦軸は運動ニューロンの生存率、横軸は既存薬の投与量を示す。

3) ボスチニブはオートファジーを促進し、異常タンパク質の蓄積と細胞死を抑制した

グループは、運動ニューロンの細胞死を抑制した化合物の中で、ボスチニブという既存薬に注目しました。この薬は、Src/c-Abl というタンパク質のリン酸化を抑制する既存薬ですが、この物質がどのようにして ALS 運動ニューロンの細胞死を抑制するのかについてのメカニズムを調べました。すると、ボスチニブは、オートファジーといわれる不要なタンパク質を分解する働きを促進することが分かりました。これにより、ALS 運動ニューロンに蓄積した折りたたみ異常を示すタンパク質を、ボスチニブが減らすということが分かりました。

4) ボスチニブは ALS マウスの病気の発症を遅延させ、生存期間を延長させた

さらに、SOD1 変異を有する ALS マウスにおけるボスチニブの効果を調べました。このマウスは、SOD1 変異を持ち、ALS と同様に進行性の筋力低下を来して死亡するマウスです。このマウスにボスチニブを投与すると、ALS の発症を遅らせ、生存期間を延長することが分かりました。また、ALS マウス脊髄中の折りたたみ異常を呈するタンパク質の量を減少させました。

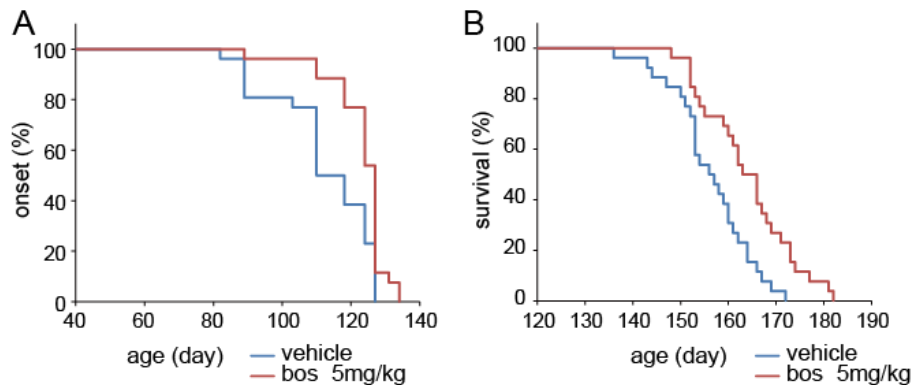


図 3. ALS マウスにおけるボスチニブの効果

A. ボスチニブは ALS マウスの発症を遅らせた。

縦軸はマウスの ALS 発症率、横軸は日齢を示す。赤線は、ボスチニブを投与した ALS マウスの発症率、青線は投与しなかったマウスの発症率の推移を示している。

B. ボスチニブは ALS マウスの生存期間を延長させた。

縦軸はマウスの生存率、横軸は日齢を示す。赤線は、ボスチニブを投与した ALS マウスの生存率、青線は投与しなかったマウスの生存率の推移を示している。

5) ボスチニブは他の家族性 ALS 運動ニューロンや孤発性 ALS 運動ニューロンの細胞死にも有効性を示した

最後に、SOD1 変異を有する家族性 ALS 患者さん以外の ALS 患者さん由来 iPS 細胞から作製した運動ニューロンにおけるボスチニブの効果を調べました。TDP-43 遺伝子変異や C9orf72 リピート伸長をそれぞれ有する家族性 ALS 患者さん由来運動ニューロンや、孤発性 ALS 患者さん由来運動ニューロンでもボスチニブが細胞死を抑制することが分かりました。

4. まとめ

ALS 患者さん由来 iPS 細胞を用いた化合物スクリーニングを行うことにより、ALS に関連する分子経路と ALS 運動ニューロンの細胞死を抑える既存薬を同定することに成功しました。この既存薬は、ALS マウスでも有効であることが分かりました。しかし、すぐに ALS 患者さんの治療に使用できるわけではありません。今後、ALS の治療へと応用するためには、生体内での薬の有効濃度や髄液への移行性、安全性などを詳細に調べる必要があります。

本研究は、iPS 細胞を用いた化合物スクリーニングが ALS の治療薬開発に有用であることを示し、また同定した分子経路や有効性を示した化合物は、今後の ALS の治療開発研究の進展に貢献するものと期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

○ ジャーナル名

Science Translational Medicine

○ 著者

Keiko Imamura¹, Yuishin Izumi², Akira Watanabe¹, Kayoko Tsukita¹, Knut Woltjen^{1,3}, Takuya Yamamoto^{1,4}, Akitsu Hotta^{1,4,5}, Takayuki Kondo¹, Shiho Kitaoka¹, Akira Ohta¹, Akito Tanaka¹, Dai Watanabe⁶, Mitsuya Morita⁷, Hiroshi Takuma⁸, Akira Tamaoka⁸, Tilo Kunath⁹, Selina Wray¹⁰, Hirokazu Furuya¹¹, Takumi Era¹², Kouki Makioka¹³, Koichi Okamoto¹⁴, Takao Fujisawa¹⁵, Hideki Nishitoh¹⁶, Kengo Homma¹⁵, Hidenori Ichijo¹⁵, Jean-Pierre Julien¹⁷, Nanako Obata¹⁸, Masato Hosokawa¹⁸, Haruhiko Akiyama¹⁸, Satoshi Kaneko¹⁹, Takashi Ayaki²⁰, Hidefumi Ito²¹, Ryuji Kaji⁴, Ryosuke Takahashi²⁰, Shinya Yamanaka^{1,22}, Haruhisa Inoue¹

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 徳島大学医学部
3. 京都大学白眉センター
4. 京都大学物質-細胞統合システム拠点
5. PRESTO, JST
6. 京都大学医学研究科
7. 自治医科大学
8. 筑波大学
9. エジンバラ大学
10. UCL institute of Neurology
11. 高知大学
12. 熊本大学
13. 群馬大学
14. 老年病研究所附属病院
15. 東京大学
16. 宮崎大学
17. ラヴァル大学
18. 東京都医学総合研究所
19. 関西医科大学神経内科
20. 京都大学医学部神経内科
21. 和歌山医科大学神経内科
22. グラッドストーン研究所

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。

- AMED 再生医療実用化研究事業
- AMED 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 細胞を活用した難病研究)
- AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (iPS 細胞研究中核拠点)

-
-
- 公益財団法人 持田記念医学薬学振興財団
 - 公益財団法人 第一三共生命科学振興財団
 - 日本学術振興会・文部科学省
 - iPS 細胞研究基金
 - Parkinson's UK

7. 用語説明

注 1) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)

運動ニューロンが選択的に変性・消失していく原因不明の疾患。筋萎縮と筋力低下が主な症状で、進行すると上肢の機能障害、歩行障害、嚥下障害、呼吸障害などを生じる。病気を起こすメカニズムは詳しく知られておらず、まだ十分な治療法ない。全国で約 9,200 人の患者さんがいる。約 5%が家族性で、そのうちの約 20%に SOD1 遺伝子変異を伴う。その他、TDP-43 遺伝子変異や C9orf72 遺伝子内のくり返し配列の伸長などの遺伝要因が知られている。

注 2) オートファジー

細胞自身が、細胞内のタンパク質を分解するしくみのひとつ。自食ともいわれる。

注 3) 転写因子

タンパク質合成は、DNA 上の遺伝子を鋳型としてメッセンジャーRNA (mRNA) が転写され、この mRNA が核外のリボソーム上で翻訳される過程で成り立っている。転写因子は、転写開始に関わるタンパク質因子で、DNA に結合して働くものや因子間の相互作用によって機能するものがある。