

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09719

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた胎児脳グルコルチコイド暴露モデルの確立と病態解明

研究課題名(英文) Modeling the neural impact of maternal immune modulation using human induced pluripotent stem cells.

研究代表者

森本 昌史 (MASAFUMI, MORIMOTO)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10285265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：健康人由来iPS細胞をSFEBq法によって神経系外胚葉に分化誘導し、浮遊培養をし続け神経凝集体を得た。神経系細胞マーカーの推移から、この神経凝集体が大脳皮質の発生を模倣することを確認した。この胎児脳モデルにIL-6を24時間暴露したところ、リン酸化STAT3が増加し、10日後に対象と比較してアストロサイトが増加し、神経細胞が減少した。ルテオリンの同時添加は濃度依存的にSTAT3のリン酸化を阻害し、IL-6による神経分化障害を抑制した。本研究で用いた神経分化系は、胎内環境による胎児脳障害の病態解析・治療探索に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We induced differentiation of iPS cells derived from healthy individuals into neuroectodermal cells. We then cultured these iPS cells in suspension cultures to obtain neuronal aggregates. Based on the shift of neuronal cell markers, we confirmed that these neuronal aggregates were emulating the cerebral cortex. When we exposed this fetal brain model to interleukin-6 (IL-6) for 24 hours, we observed increased levels of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Ten days later, we found increased levels of astrocytes and a reduction in neuronal cells. Simultaneous administration of luteolin downregulated the phosphorylation of STAT3 and inhibited the attenuation in neuronal differentiation induced by IL-6. We believe the neuronal system model used in this study can greatly contribute to the pathophysiological analysis and treatment discovery in fetal encephalopathy caused by the fetal environment.

研究分野：小児神経学

キーワード：iPS細胞 インターロイキン6 神経分化 神経凝集体

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の発生の様々な段階において多様な環境ストレスが障害に働くことが知られている。特に妊娠中の母胎の感染症は胎児の神経発達に悪影響を与え、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の発症に影響することが報告されている。疫学研究でも、妊娠中のウイルス感染や細菌感染で、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の発症率が上がるとの報告がされている。齧歯類の研究では、病原体そのものの影響というよりは、感染に際して起こる母胎の免疫反応、特に母胎におけるインターロイキン 6 (IL-6) の上昇が神経発達の障害に関係することが示唆されているが、ヒトでは同じように IL-6 の上昇が胎児の神経発達にどのような影響を与えるかを調べることは難しい面があった。

一方、ヒト由来 iPS 細胞やそれを分化させた神経前駆細胞は、胎生早期の神経系に母胎環境がどのような影響を与えるか、また、それらの影響を緩和する薬剤の候補となる物質の検索においても有用なツールになる。

### 2. 研究の目的

ヒト由来 iPS 細胞を用いて、胎児期大脳皮質の神経分化を *in vitro* で再現し、齧歯類の実験で神経発達の障害に関与することが知られている IL-6 を暴露し、IL-6 が胎児大脳皮質の分化に与える影響について調べた。また、IL-6 による神経発達への影響を緩和する物質の候補としてフラボノイドの一種であるルテオリンの効果についても検討した。

### 3. 研究の方法

ヒト由来 iPS 細胞は理研 BRC 細胞材料開発室から供与を受けた。本研究は、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認を受けた。ヒト由来 iPS 細胞を単離した後、96 穴プレートにまき、神経系に誘導させる培養液中で 20 日間培養し、神経凝集体を作成した。培養 20 日目からは神経細胞の分化を進める培養液に変更し培養を続行した。

各培養期間において、神経凝集体における神経幹細胞のマーカである PAX6、神経細胞のマーカである MAP2、 $\beta$  III-tubulin、アストロ細胞のマーカである GFAP、GLT1、GLAST の mRNA の発現について定量的 RT-PCR 法によって調べた。

培養 51 日目に母胎の感染時の免疫反応としてみられる IL-6 への暴露として培養液中に 100 ng/ml の IL-6 を 24 時間だけ添加し、IL-6 を添加しなかったものと凝集体の大きさを測定した。また、神経系のマーカ (GFAP, TBR1, CTIP2, SATB2) の変化については免疫組織化学法を用いて、STAT3 のリン酸化の度合いについてはウェスタンブロット法を用いて調べた。次に IL-6 の添加と同時に種々の濃度 (10, 20, 40, 80  $\mu$ M) になるようにルテオリンを加え、IL-6 添加によってみられた

STAT3 リン酸化の変化がどのようになるかについて調べた。

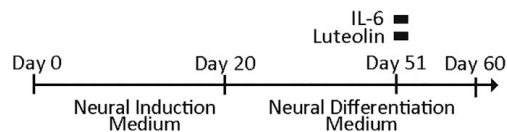


図1 培養方法

### 4. 研究成果

#### 1) 神経凝集体は胎児脳の発達段階を反映する

神経凝集体の 60 日の培養期間において神経系への誘導期間である培養 20 日目までは神経幹細胞のマーカである PAX6 mRNA の発現が上昇した。神経細胞への分化を誘導する培養液で培養を開始後、Pax6 の発現は減少し、神経細胞のマーカである MAP2、 $\beta$  III-tubulin mRNA の発現が増加した。また、培養 40 日目以降は、アストロ細胞のマーカである GFAP、GLT1、GLAST mRNA の発現が増加した (図 2)。このことから神経凝集体は培養下において、神経細胞への分化が先で、その後神経膠細胞が分化する胎児脳の発達段階を反映していると考えられた。

#### 2) IL-6 暴露の神経系への影響

IL-6 の暴露によって培養 60 日目の神経凝集体の大きさには変化はなかった (図 3) が、IL-6 暴露群では、IL-6 を添加しないコントロール群と比較してアストロ細胞のマーカである GFAP 陽性を示す細胞の割合が増加していた。また、早期に分化した皮質の深層にある神経細胞のマーカである TBR1 及び CTIP2 陽性を示す細胞の割合は減少し、後半に分化した皮質の浅層にある神経細胞のマーカである STAB2 陽性細胞の割合に変化はなかった (図 4)。さらにウェスタンブロット法において IL-6 の暴露を受けた神経凝集体ではリン酸化された STAT3 の量がコントロール群と比較して増加していた (図 5)。

#### 3) ルテオリンは IL-6 による影響を緩和する

IL-6 添加と同時にルテオリンを添加した条件では、IL-6 暴露でみられた STAT3 のリン酸化が阻害された (図 5)。阻害の効果はルテオリンが 10 から 80  $\mu$ M の濃度の範囲では濃度によらず、効果を認めたが、80  $\mu$ M の濃度では細胞障害性を示す可能性が示唆された (data not shown)。

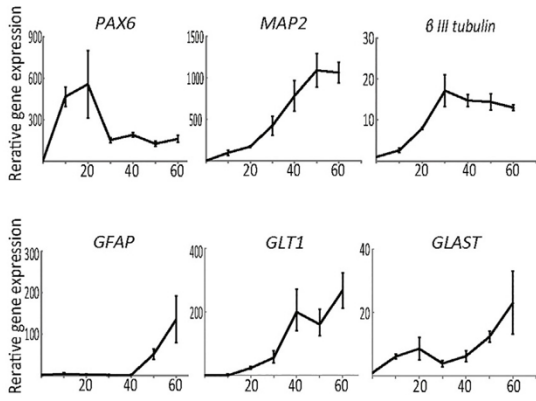


図 2 神経凝集体の各種 mRNA 発現

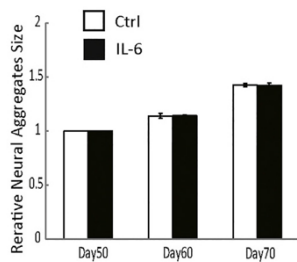


図 3 IL-6 添加による神経凝集体の大きさの変化

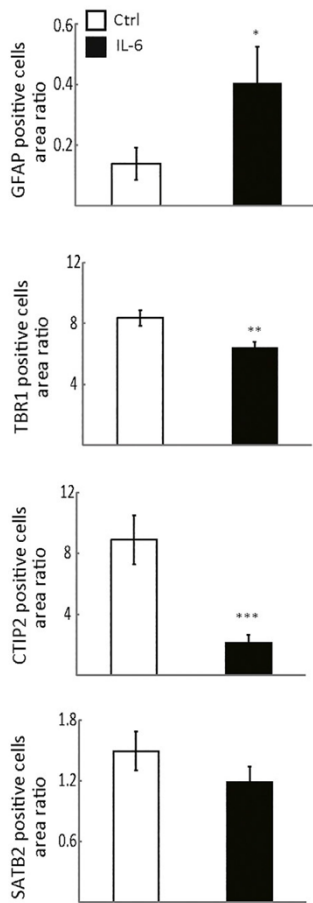


図 4 IL-6 による神経系マーカの変化  
\* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$

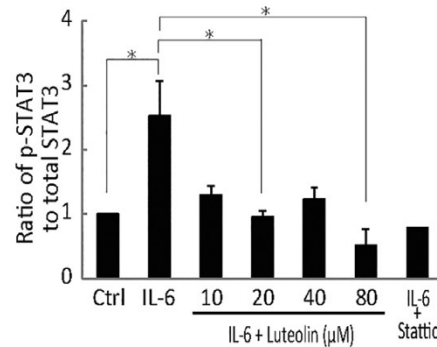


図 5 IL-6 とルテオリンによる STAT3 リン酸化に対する影響

\* $<0.05$

#### 4) 結論

本研究で用いた神経凝集体の分化は胎児の大脳皮質の発達段階を反映し、胎内環境による胎児脳障害の病態解析・治療探索に有用である。

IL-6 の胎児期の脳への暴露は、神経分化に影響を与える。

IL-6 による STAT3 リン酸化の変化は、ルテオリンによって緩和され、神経発達の障害に対する治療薬となりうる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Zuiki M, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Yamashita S, Kidowaki S, Hasegawa T, Gotoh H, Nomura T, Ono K, Hosoi H, Morimoto M. Luteolin attenuates interleukin-6-mediated astrogliosis in human iPSC-derived neural aggregates: A candidate preventive substance for maternal immune activation-induced abnormalities. *Neuroscience Letters* 査読有、2017; 653: 296-301.

[学会発表] (計 2 件)

1) Zuiki M, Chiyonobu T, Yoshida M, Kidowaki S, Yamashita S, Hasegawa T, Morimoto M. Modeling the neural impact of maternal immune activation using human induced pluripotent stem cells. The 14<sup>th</sup> International Child Neurology Congress. 2016 May 1-5; Amsterdam, the Netherlands.  
2) 瑞木 匡, 千代延友裕, 前田裕史, 山下哲史, 吉田路子, 長谷川龍志, 森本昌史. ルテオリンは IL-6 による神経分化障害を改善するヒト iPS 細胞を用いた母体炎症による胎児脳障害の治療探索. 第 59 回日本小児神経学会学術集会. 2017 年 6 月 16 日; 大阪

[図書] (計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森本 昌史 (MORIMOTO Masafumi)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号：

10285265

##### (2) 研究分担者

千代延 友裕 (CHIYONOBU Tomohiro)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：

40571659

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

瑞木 匡 (ZUIKI Masashi)