

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05376

研究課題名(和文)AD/HDのiPS細胞を用いた生物モデルの解析

研究課題名(英文)Analysis of biological model using iPS cells derived from AD/HD individuals

研究代表者

曾良 一郎(Sora, Ichiro)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40322713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：注意欠如・多動性障害(AD/HD)の病態解明と新たな治療法の開発を目指し、大脳皮質オルガノイドの解析を行った。先行研究にて報告されたSFEBq法(Kadoshima 2013, Eguchi 2018)を用い、健常者、AD/HD由来のiPS細胞から大脳皮質オルガノイドを分化誘導した。オルガノイド内に形成される皮質様構造の解析により、AD/HD者では、神経細胞の層である皮質板が健常者に比して薄いことを見出した。これはMRIを用いた先行研究(Shaw 2007)の報告と合致すると考えられ、我々の大脳皮質オルガノイドが生物モデルとして利用可能である可能性が考えられる。今後更なる解析を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AD/HD者の神経細胞を得ることができないことや、実験動物での病態再現ができないことで、AD/HDの病態解明や新たな治療法の開発に関する研究はこれまで限定的にしか行うことができなかった。我々はiPS細胞から分化誘導した大脳皮質オルガノイドがAD/HDの生物モデルとして利用できる可能性を見出した。大脳皮質オルガノイドが生物モデルとして利用可能となれば、AD/HDの病態を実験的に再現することや、薬剤への反応性を確認することが可能となる。このことは、今後のAD/HD治療を飛躍的に発展させると期待され、個人の生活のみならず、社会全体の活動や経済にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathogenesis and new effective treatments of attention deficit hyperactivity disorder (AD/HD), we analysed telencephalon organoids including cerebral cortex-like structures. We induced telencephalon organoids from iPS cells derived from control and AD/HD individuals by SFEBq method (Kadoshima 2013, Eguchi 2018). The analysis of cerebral cortex-like structures revealed AD/HD showed thinner cortical plate, the layer of neuron than controls. Previous study using MRI reported AD/HD showed delayed maturation of cerebral cortex (Shaw 2007). Our result indicates early development of cerebral cortex is delayed in AD/HD, that might be consistent with previous report using MRI which reported AD/HD showed delayed maturation of cerebral cortex (Shaw 2007). It suggests that our telencephalon organoids might be available as biological model of AD/HD. Further investigation is needed to establish the model.

研究分野：精神医学

キーワード：ドーパミン 脳神経疾患 発生・分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

注意欠如・多動性障害 (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, AD/HD) は多動性、不注意、衝動性を症状の特徴とする発達障害の一つである。学童期の 3-7% にみられ、成人後も不注意などが残存することが報告されており、個人の生活に長く影響するのみならず、社会全体にも大きな影響を与えると考えられる。AD/HD の治療薬としていくつかの薬剤が開発されているが、その反応性は個人により差があり、今後も更なる治療法の開発が望まれている。AD/HD の病態は未だ不明であり、死後脳を含めた神経組織を得られないことや、実験動物で病態を再現することができないことが、研究の大きな妨げとなっている。このため、AD/HD の特徴を実験的に再現できる生物モデルの開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では AD/HD 者の白血球より人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 細胞) を作成し、さらに大脳皮質を模した構造を含む組織 (大脳皮質オルガノイド) を分化誘導し解析を行うことで、実験に利用できる生物モデルを確立し、AD/HD 研究を発展させ病態解明や治療法の開発へ結びつけることを目的とした。

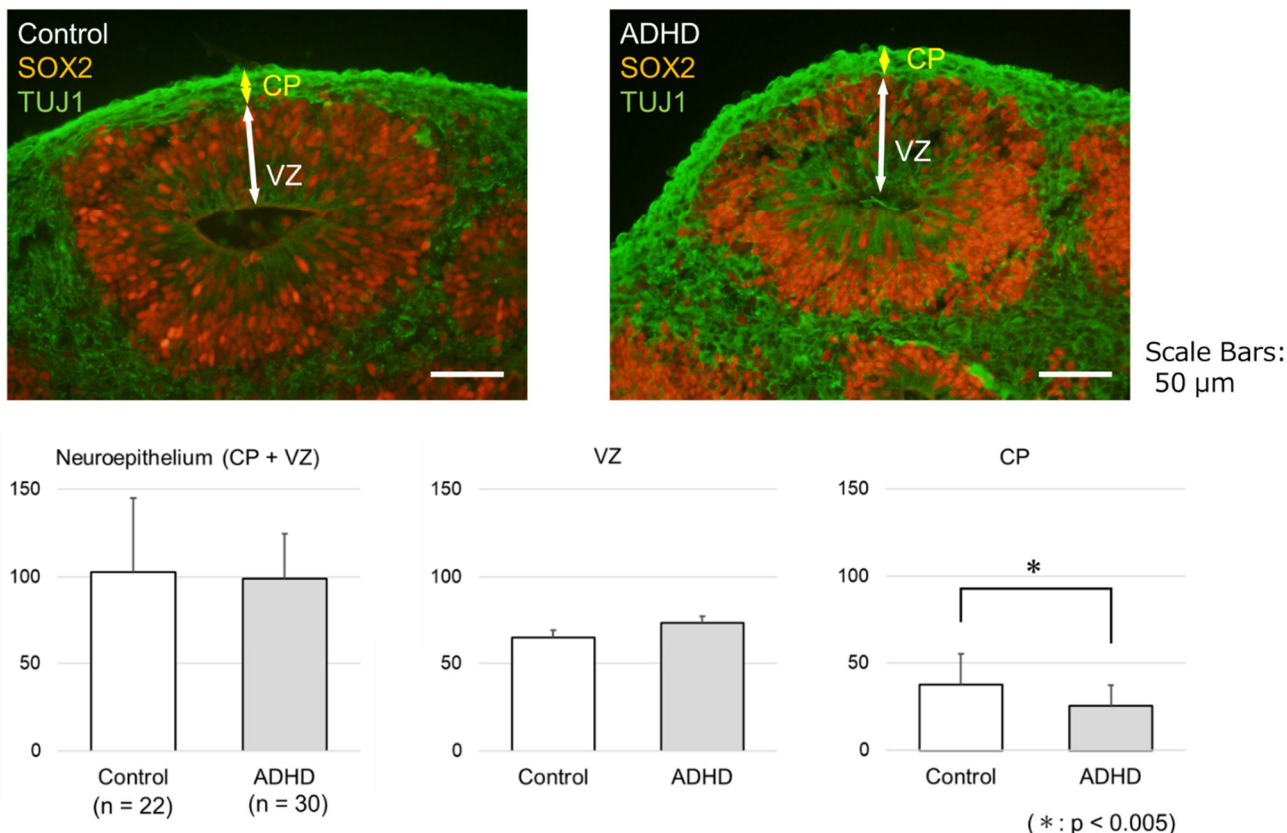
### 3. 研究の方法

DSM-5 に従い AD/HD と診断された患者 (18 歳、男性) から同意を得て、末梢血単核球を採取し、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの遺伝子をセンダイウイルスベクターを用いて導入し、iPS 細胞を作成した。AD/HD 群として、実験には 3 つの細胞株を用いた。健常者由来の iPS 細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センターから二つの細胞株 (Okita et al. 2011, Nakagawa et al. 2014) の提供を受け実験に使用した。これらを発表者が先行研究で報告した方法を用い (Kadoshima et al. 2013; Eguchi et al. 2018) 大脳皮質オルガノイドへ分化誘導させた。分化誘導 35 日目の大脳皮質オルガノイドの免疫染色を行い、組織中に構成される大脳皮質の層構造を模した構造 (大脳皮質様構造) を評価した。

### 4. 研究成果

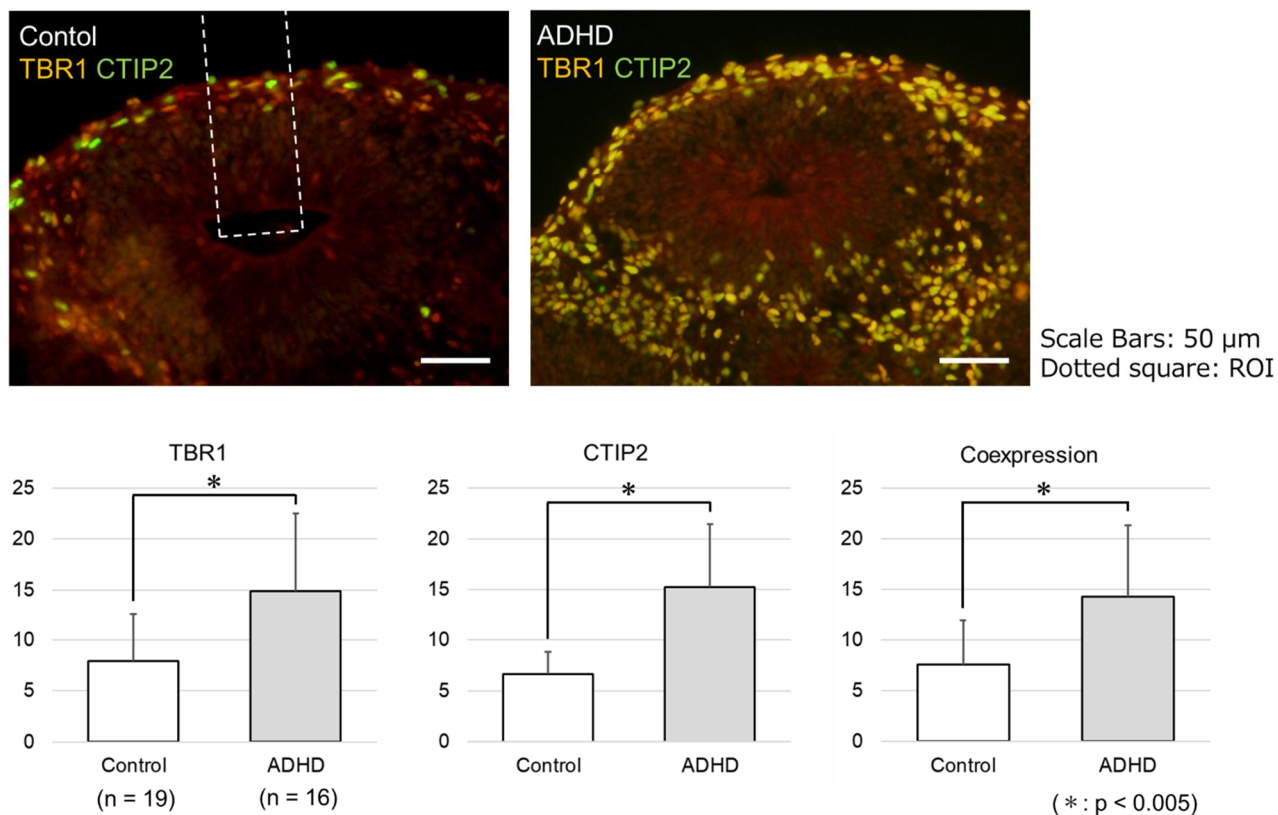
健常群、AD/HD 群の iPS 細胞いずれに由来する組織も、神経細胞に発現する TUJ1 や終脳の細胞に発現する FOXG1 が確認でき、大脳皮質オルガノイドへ分化したと考えられた。これらの組織中に構成された大脳皮質様構造は、AD/HD 群では、健常群と比較して、神経細胞の層である皮質板 (Cortical plate, CP) が有意に薄い一方、神経幹細胞の層である脳室帯 (Ventricular zone, VZ) と、CP、VZ を合わせた構造全体 (神経上皮、Neuroepithelium) の厚さは差がないことが明らかとなった (図 1)。

図 1



また、CPを構成する神経細胞のうち、皮質第5層、第6層となる細胞に発現するTbr1、Ctip2に注目し、これらが陽性となる細胞の細胞数を計測したところ、いずれの細胞もADHD群では健常群より有意に細胞数が多かった(図2)。以上のように、ADHD群の脳皮質様構造は、神経細胞の層が薄い一方で、そこに含まれる神経細胞の数は少ないという結果が得られた。

図2



#### 引用文献

1. Keisuke Okita, Tatsuya Yamakawa, Yasuko Matsumura, Yoshiko Sato, Naoki Amano, Akira Watanabe, Naoki Goshima, Shinya Yamanaka, An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells From Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *Stem Cells*. 2013 Mar;31(3):458-66.
2. Masato Nakagawa, Yukimasa Taniguchi, Sho Senda, Nanako Takizawa, Tomoko Ichisaka, Kanako Asano, Asuka Morizane, Daisuke Doi, Jun Takahashi, Masatoshi Nishizawa, Yoshinori Yoshida, Taro Toyoda, Kenji Osafune, Kiyotoshi Sekiguchi, Shinya Yamanaka, A Novel Efficient Feeder-Free Culture System for the Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 2014 Jan 8;4:3594.
3. Taisuke Kadoshima, Hideya Sakaguchi, Tokushige Nakano, Mika Soen, Satoshi Ando, Mototsugu Eiraku, Yoshiki, Sasai Self-organization of Axial Polarity, Inside-Out Layer Pattern, and Species-Specific Progenitor Dynamics in Human ES Cell-Derived Neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 10;110(50):20284-9.
4. Noriomi Eguchi, Ichiro Sora, Keiko Muguruma, Self-organizing Cortex Generated From Human iPSCs With Combination of FGF2 and Ambient Oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Apr 15;498(4):729-735.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青井 貴之  (Aoi Takashi)  (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授   (14501)	
研究分担者	菱本 明豊  (Akitoyo Hishimoto)  (50529526)	神戸大学・医学研究科・准教授   (14501)	
研究分担者	朴 秀賢  (Shuken Boku)  (60455665)	神戸大学・医学研究科・講師   (14501)	
研究分担者	毛利 健太郎  (Kentaro Mouri)  (00642125)	神戸大学・医学研究科・助教   (14501)	