

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16386

研究課題名(和文) iN 細胞を用いた自閉症スペクトラム障害の病態解明

研究課題名(英文) Toward the understanding of the pathogenesis of autism spectrum disorder using human direct induced-neuronal (iN) cells

研究代表者

佐方 功明 (Sagata, Noriaki)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：00632308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害を併発しやすい神経線維腫症1型(NF1)は、アデニルシクラゼ(AC)の機能低下が病因の一つであるが、その詳細は明らかでない。AC活性化剤であるフォルスコリン(FSK)が、NF1患者由来の直接誘導神経(NF1-iN)細胞の遺伝子発現パターンを救済することを明らかにした(Sagata et al., 2017)。

またFSKが、扁平なNF1-iN細胞を球形の形態へと劇的に変化させ、神経突起伸長も増強した。FSKまたはAC活性化剤が、NF1患者の神経細胞の成長に治療効果をもたらす可能性を示した(Sagata et al., 2020 (in Press))。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症スペクトラム障害(ASD)や学習障害などの神経発達障害と併存することがよくある神経線維腫症1型(NF1)に着目し、NF1患者由来の直接誘導神経(NF1-iN)細胞にみられた遺伝子発現異常および細胞の形態異常がフォルスコリンによって明らかな改善を示すことを明らかにした。

生検等では得られないヒトの神経細胞を線維芽細胞から誘導したiN細胞を利用し、細胞レベルでの解析を行うことによって薬剤の効果を比較的容易に評価する一つの手法を提示しつつ、フォルスコリンなどのアデニルシクラゼ活性化剤のNF1についてはASDを含む神経発達障害の治療薬・予防薬としての可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a multifaceted disease, and frequently comorbid with neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorder (ASD). Dysfunction of adenylyl cyclase (AC) is one of the candidate pathways in abnormal development of neuronal cells in the brain of NF1 patients, while its detailed abnormalities have not been revealed. Direct conversion technology can generate induced-neuronal (iN) cells directly from human fibroblasts. I have revealed that forskolin, an AC activator, rescues the gene expression pattern of iN cells derived from NF1 patients (NF1-iN cells) (Sagata et al., 2017). Only 20 minutes after forskolin treatment, the morphology of the NF1-iN cells were dramatically changed from flat-form to spherical-form. Forskolin also enhanced neurite outgrowth of NF1-iN cells. Forskolin or AC activators may have therapeutic effects on the growth of neuronal cells in NF1 patients (Sagata et al., 2020 (in Press)).

研究分野：分子精神医学

キーワード：トランスレーショナル研究 自閉症スペクトラム障害 ASD 神経線維腫症1型 NF1 直接誘導神経細胞 iN細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経発達障害の病態基盤は十分に解明されていないが、患者の脳内の生きた細胞を用いた研究が困難であることがその一因である。ヒトの脳に局在するニューロンは他の臓器と比較して生検が非常に困難であったが、脳以外の細胞から作成した iPS 細胞の開発によってヒト由来ニューロンも利用できるようになった。しかしながら、最近では iPS 細胞作製の効率化が進んだとはいえやはり数か月単位の時間が必要とされる。また一方で iPS 細胞への細胞運命の初期化によってエピジェネティックな情報までもがリセットされてしまう可能性が危惧されている。それでは我々が望むような患者一人一人の微細な情報の多くは失われてしまう。

この iPS 細胞とほぼ同時期に開発された iN 細胞 (induced-Neuronal cells) は幹細胞を経由せずに線維芽細胞からニューロンへと直接転換されるため、生体の情報を比較的良く反映している可能性が高い。自己複製が可能な iPS 細胞のような恒久的な利用には向かないが、この直接転換による時間短縮の恩恵は大きく、ニューロンとしての生理活性を持つヒトの細胞がおよそ 2 週間程度で得られる (Vierbuchen et al., 2010 Nature; Pang et al., 2011 Nature; Kano et al., 2015 Curr Mol Med)。そのためニューロンの研究に局限すれば効率的に手間と費用が省け、大規模な創薬 / 治療薬スクリーニング研究等にも多大な貢献が期待される。

iN 細胞を利用した研究としては筋萎縮性側索硬化症や家族性自律神経失調症を対象とした報告はあるが (Wen et al., 2014 Neuron; Wainger et al., 2015 Nat Neurosci)、iN 細胞を用いた ASD (autism spectrum disorder, 自閉症スペクトラム障害) を含む精神疾患における報告は未だなかった。このことは iN 細胞が精神疾患研究のツールとしてまだ限界点が多く、完成しきれていないためだと考えられた。

2. 研究の目的

あらゆる研究に利用可能なニューロンを in vitro で再現することは非常に困難であると想像できるので、神経発達障害研究に特化した iN 細胞の開発を第一の目的とした。そのために主に二つの戦略を立て、一つは神経の発達期を表現するような iN 細胞の開発、もう一つは抑制性の iN 細胞の開発を目標とした。特に後者は統合失調症や自閉症などの精神神経疾患の原因の一つと考えられている興奮 / 抑制バランスを in vitro で再現・評価するために非常に有効であり、かつ活用の幅も広いと期待される。

これらを用い ASD とその周辺疾患患者の iN 細胞の包括的表現型解析を行う。特に ASD を併発しやすい単一遺伝子病の ASD 関連疾患の解析を行い、ニューロンにおける異常を明らかにすることで、これらの疾患の病態への細胞レベルでの理解をより深めることを目的とした。

3. 研究の方法

研究を進めるにつれ、ASD を併発しやすい神経線維腫症 1 型 (NF1) について興味深い結果が得られ始めたため、特に NF1 に注目する研究を推進した。

3-1. NF1 患者由来の線維芽細胞より作出した iN 細胞 (NF1-iN 細胞) の網羅的遺伝子発現解析を行った。

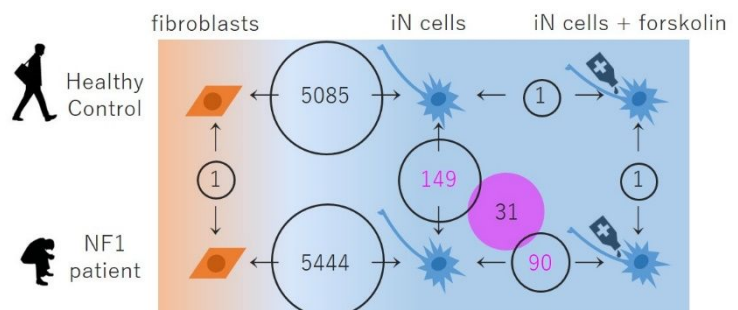
3-2. 成熟した iN 細胞とは異なる遺伝子発現パターンを示す早期 iN 細胞を開発し、NF1-iN 細胞を用いてその有用性を検討した。

3-3. 早期 iN 細胞の成熟ニューロンマーカー・未成熟ニューロンマーカー等の遺伝子発現プロファイルをより詳細に調査した。

3-4. NF1-iN 細胞で機能低下が疑われるアデニリルシクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンによる影響について、iN 細胞の形態を経時的に観察した。

4. 研究成果

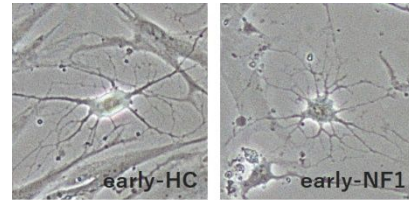
4-1. ASD を併発しやすいとされる NF1 患者由来の線維芽細胞より作出した iN 細胞のマイクロアレイ解析を行い、健康者 iN 細胞と比較して 149 遺伝子の発現が異常であることを明らかにした (右図)。また NF1-iN 細胞にフォルスコリンを与えると、90 遺伝子の発現が有意に増大もしくは低下した。この 2 群の遺伝子で共通して現れた 31 遺伝子は、NF1 の変異に責任があり、フォルスコリンによって健康者レベルに戻ることが示唆された (Sagata et al., Sci Rep 2017)。



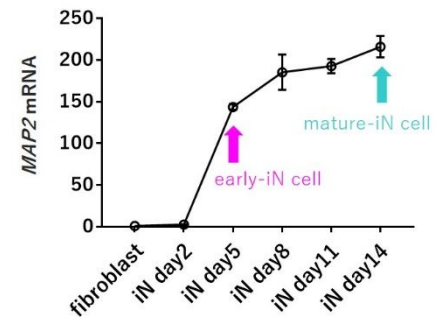
以上のことよりフォルスコリンが主に男性 NF1 患者の神経細胞の遺伝子発現異常をある程度正常化する可能性が示された。

またそれらの遺伝子の中でも MEX3D と呼ばれる遺伝子の発現が NF1 患者の性別を問わず低いことを初めて示した。さらに MEX3D の分解標的としている可能性のあった FOS mRNA 発現量が高いこと、一方で MEX3D の分解標的として知られている BCL2 mRNA 発現量には影響がないことが明らかにした。

4-2. NF1 ノックアウトマウスの神経幹細胞ではこの BCL2 の発現量が増加していることが知られており、成熟した NF1-iN 細胞での BCL2 遺伝子の発現に異常はみられなかったのだが、iN 細胞への誘導後早期(5 日目：右図)では BCL2 遺伝子の発現量が高いことを示した(Sagata et al., Sci Rep 2017)。

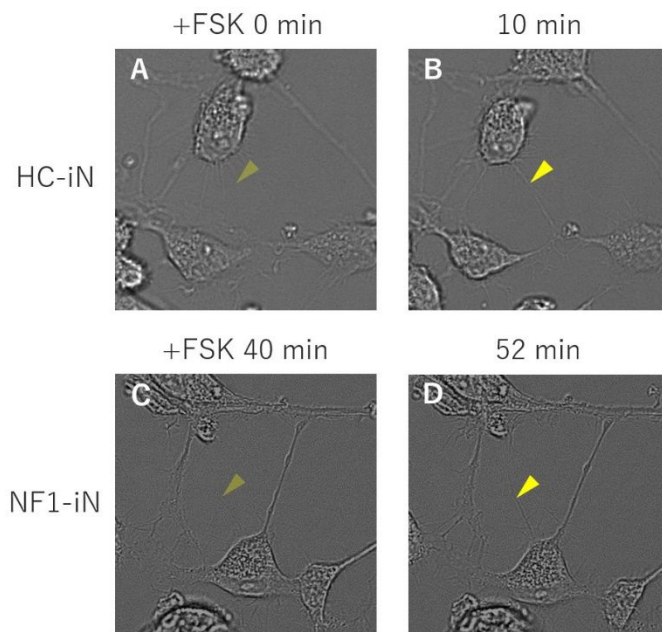


ヒトの体細胞から神経細胞へと直接誘導して作製した iN 細胞では「ニューロンの発達の経過」を観察することは出来ないとされてきたが、誘導後早期の iN 細胞では特定の時期に限局すればそれらの観察が可能となることを提唱した。この早期 iN 細胞は誘導からわずか 1 週間で観察可能であり、iPS 細胞等由来の神経幹細胞の分化という方法と比較して大幅な時間と費用の節約になる。さらに近年 iPS を経由した神経細胞では細胞の老化状態など一部の情報がリセットされ、一方 iN 細胞ではそれらの情報を保持していたという報告が海外の研究グループからなされ(Victor et al., 2018 Nature)、特に患者個人個人の細かな差異が重要な情報となりうる精神疾患などの研究領域では iN 細胞の需要もさらに高まっている。この早期 iN 細胞が実用的なものであることが証明できれば、多検体・短時間での作製・解析システムの樹立が可能となる。



4-3. 早期 iN 細胞の成熟ニューロンマーカー・未成熟ニューロンマーカー等の遺伝子発現プロファイルをより詳細に調査し、新たに成熟ニューロンマーカー遺伝子 1 種の発現が低く、未成熟ニューロンマーカー遺伝子 2 種の発現が高いことを明らかにした(Sagata et al., unpublished)。これは先の早期 iN 細胞がニューロンの発達過程の一部の観察を可能にする仮説の傍証の一つとなり、早期 iN 細胞の有用性にさらなる期待が高まった。

4-4. NF1-iN 細胞での機能低下が疑われるアデニルシクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンの非存在下では、健常者 iN 細胞と比較して NF1-iN 細胞の殆どは扁平な形態をしていることを明らかにした。さらにこの NF1-iN 細胞にフォルスコリンを与えると、わずか 20 分間の間に細胞体の隆起や神経突起の伸長(右図)など健常 iN 細胞へ近づく細胞形態変化を示すことを発見した(Sagata et al., Neuropsychopharmacology Rep 2020 (in press))。フォルスコリンの効果は先の報告においても NF1 の iN 細胞の遺伝子発現を正常化する働きを示しており、アデニルシクラーゼの活性化が NF1 の神経細胞における治療の標的になり得る可能性を示す結果が得られた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sagata N, Kato TA, Kano SI, Ohgidani M, Shimokawa N, Sato-Kasai M, Hayakawa K, Kuwano N, Wilson AM, Ishizuka K, Kato S, Nakahara T, Nakahara-Kido M, Setoyama D, Sakai Y, Ohga S, Furue M, Sawa A, Kanba S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dysregulated gene expressions of MEX3D, FOS and BCL2 in human induced-neuronal (iN) cells from NF1 patients: a pilot study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-14440-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐方功明, 加藤隆弘
2. 発表標題 Why do we need translational research of psychiatric disorders using human direct induced neuronal (iN) cells? 精神疾患の橋渡し研究にヒト直接誘導神経 (iN) は有用か?
3. 学会等名 NEURO2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐方功明, 扇谷昌宏, 加藤隆弘
2. 発表標題 Introducing our psychiatric translational research system to clarify the pathological neuron-glia interaction using human induced microglia-like (iMG) cells and induced neuronal (iN) cells
3. 学会等名 AsCNP2019 Open Lab Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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