

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08958

研究課題名（和文）ヒト神経細胞の低酸素・虚血ストレス障害発生メカニズム解明と新規治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of hypoxic-ischemic injury on human neurons and developing of new therapeutic strategies against them.

研究代表者

金村 米博（KANEMURA, Yonehiro）

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（臨床研究センター）・先進医療研究開発部・部長

研究者番号：80344175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素環境がヒト神経細胞に及ぼす影響を評価するため、培地中溶存酸素濃度を経時的に取得しながらリアルタイムに細胞の生死判定を行うことが可能な新規培養システムの開発を行い、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞（iPSC-NPCs）の低酸素耐性能を評価した。その結果、ヒトiPSC-NPCsは、培地中溶存酸素濃度が0.1%以下の超低酸素状態が8時間以上持続した時点から細胞死が誘導されるが、超低酸素ストレスに暴露後も生存可能なヒトiPSC-NPCsが少数存在し、それらは神経前駆細胞としての特性を維持し得ることが見出され、ヒトiPSC-NPCsの低酸素耐性に関する新たな知見を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、培地中の溶存酸素濃度を経時的に取得しながらリアルタイムに細胞の生死判定を行うことが可能な培養システム（溶存酸素濃度モニタリング生細胞ライブイメージング解析システム）を開発し、このシステムを用いて超低酸素ストレス下におけるヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の低酸素耐性能に関する新たな知見を得ることに成功した。生物種差の影響を無視できない実験動物由来神経細胞を用いた従来研究手法と異なり、ヒト神経系細胞を研究対象として、未だ有効な治療法がない脳梗塞および低酸素脳症等、低酸素・虚血ストレスで発症する神経疾患の発症メカニズム解明と新規治療法開発に寄与し得る成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanisms of hypoxic-ischemic stress on human neurons, we developed a novel culture system that can real-time monitor both dissolved oxygen concentration in the medium and cell viability, and we validated hypoxic tolerance of human iPS cells-derived neural progenitor cells (iPSC-NPCs) using this system. iPSC-NPCs were well tolerant in ultra-hypoxic condition less than 0.1% oxygen for 8 hours, and subsequently their cell death was induced. In this ultimate hypoxic condition, some iPSC-NPCs were still viable and maintain their properties as NPCs. These findings suggested novel and important features of iPSC-NPCs against hypoxic-ischemic stress.

研究分野：脳神経外科

キーワード：ヒト神経系細胞 ヒトiPS細胞 ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞 低酸素培養 虚血ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

脳組織の栄養動脈の狭窄、血栓あるいは心原性塞栓等による閉塞(脳梗塞) 大量出血や過度の低血圧等による頭蓋内灌流の低下(重症頭部外傷等) 気道閉塞に伴う低酸素血症等の影響で、脳組織が虚血状態や低酸素状態に陥った場合は、神経細胞へ種々の障害が発生し、最終的には神経細胞死が誘発される。その結果、臨床的にはこれら疾患においては様々の重篤な神経症状を発症する。多くの患者がその神経機能障害の後遺に苦しんでおり、障害を受けた神経細胞の機能を改善・修復する治療法を切望している。

しかし本病態に対して、神経細胞は低酸素・虚血ストレスに脆弱で、短時間の低酸素・虚血ストレスの影響で容易に不可逆的な機能障害を被り、その障害を改善させるための有効な手法は存在しないとするのが当該領域の学術的ドグマであり、解決法は未だ見えない。その打開を目指し、現在まで数多くの研究が精力的に実施され、低酸素・虚血ストレス環境が神経細胞に及ぼす影響の詳細な分子メカニズム等を含む多くの知見が報告されてきた。その結果、当該領域研究は十分に進歩してきたと認識されがちである。しかし、現実には脳梗塞や低酸素脳症等の神経疾患に対する真に有効な治療法開発は未だ成功には至っていない。

従来研究の大きな弱点は、得られた知見の大部分はマウスやラット等の実験動物由来の神経細胞を用いた研究成果であり、本来、最も解析すべき対象である「ヒト神経細胞」の低酸素・虚血ストレス反応性に関する知見は非常に乏しい点である。低酸素・虚血ストレスを含む外的ストレスに対する反応性には動物細胞とヒト細胞間での生物種差が存在し、とりわけ他生物と比較してヒトで高度に発達している神経細胞に関しては、げっ歯類細胞とヒト細胞との間の特性差は小さくは無く、実験動物由来神経細胞で得られた知見をそのまま無検証でヒト神経細胞の反応性として外挿することは困難であると考えられる。

過去 20 年間、悪性腫瘍の研究は大きく発展し、分子標的薬を代表とする数々の画期的な新規治療薬開発に成功している。その理由は、ヒト細胞(患者由来癌細胞)を研究対象として使用することの重要性と必要性を十分に認識したうえで研究を展開してきたからである。低酸素・虚血ストレス誘発神経障害に関する研究において大きなブレークスルーを引き起こすためには、今後はこの点に関して大きな注力が必要であり、従来研究の大きな学術的欠落部分である、「ヒト神経細胞」を使用した研究を本格的に実施していくことが非常に重要なアプローチであると考えられる。

## 2. 研究の目的

現在有効な治療法が存在しない脳梗塞および低酸素脳症等の神経疾患の治療法開発の実現化に向けて、培地中の溶存酸素濃度を経時的に取得しながらリアルタイムに細胞の生死判定を行うことが可能なシステムの開発を行う。さらに、このシステムを用いて、低酸素環境がヒト神経系細胞に及ぼす影響を評価する。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞 (iPSC-NPCs) の維持培養  
ヒト iPSC-NPC(1210B2 株)は、neurosphere として神経前駆細胞用培地(DMEM/F12, B27, heparin, bFGF, EGF, LIF)を用いた浮遊培養法により増殖させた。培地は、3~4日に1回の頻度で全量を交換した。また、継代は、8~10日ごとに細胞解離液を用いて単一細胞に分散し、 $1 \times 10^5$ 細胞/mLで再播種することで行った。
- (2) ヒト iPSC-NPCs の接着培養  
細胞解離液を用いてヒト iPSC-NPCs を単一細胞に分散後、 $7.5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>で Matrigel 上に播種し、神経前駆細胞用培地を用いて 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター(通常酸素濃度)で培養した。
- (3) 低酸素培養システム  
気密環境は、ガスバリア性パウチを用いて構築し、パウチ内の脱酸素化は脱酸素剤を用いて行った。溶存酸素濃度は、非接触酸素モニターシステムを用いて測定した。パウチ内の温度は、ガラスヒーター(37°C)を用いて維持した。
- (4) ライブセルイメージング  
細胞の状態を経時的にモニタリングするために、(3)で構築した低酸素培養システムを倒立型顕微鏡(IX81)にセットし、顕微鏡制御ソフトウェア(Lumina Vision)を用いて位相差像と蛍光像を5分毎に撮影した。

- (5) 経時的細胞死評価  
低酸素培養過程で生じる細胞死は、あらかじめ培地中に添加した核酸染色試薬である Propidium Iodide (PI) で染色される細胞として検出した。細胞死の経時的評価は、細胞の位相差像で得られる細胞面積あたりの PI 陽性面積で算出した。
- (6) 低酸素培養後の回復培養と終末分化  
低酸素培養システムを用いてヒト iPSC-NPCs を培養後、通常酸素濃度下に戻して、神経前駆細胞用培地中で培養を継続した。細胞が十分に増殖した時点から、神経分化用無血清培地 ( Neurobasal Plus, B27 Plus, BDNF, DAPT ) に切り替えて終末分化培養を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 溶存酸素濃度モニタリング生細胞ライブイメージングシステムの開発  
低酸素培養を行う方法として、既知のガスバリア性パウチの内部に、培地中の溶存酸素濃度を経時的に取得し、パウチ内の CO<sub>2</sub> 濃度の低下を抑えて長期培養を行うことが可能なシステムを構築した。この低酸素培養システムを倒立型蛍光顕微鏡にセットすることで、溶存酸素濃度をモニタリングしながら生細胞ライブイメージングを行うことが可能となった。
- (2) 培地中の溶存酸素濃度とパウチ内の CO<sub>2</sub> 濃度のモニタリング  
前項で開発した溶存酸素濃度モニタリング生細胞ライブイメージングシステムを用いて、培地中の溶存酸素濃度およびパウチ内の CO<sub>2</sub> 濃度をモニタリングした結果を図 1 に示す。培地中の溶存酸素濃度は、脱酸素剤投入後から減少を始め、およそ 9 時間経過時点で 0.1% 以下となり、パウチを密封しているクリップを解除する時点まで安定して維持された。一方、パウチ内の CO<sub>2</sub> 濃度は、5% に到達するまでに 5 時間ほど要したが、その後は安定して維持された。またパウチを解放後、溶存酸素濃度の急激な上昇と CO<sub>2</sub> 濃度の急激な減少を確認した ( 図 1 ) 。

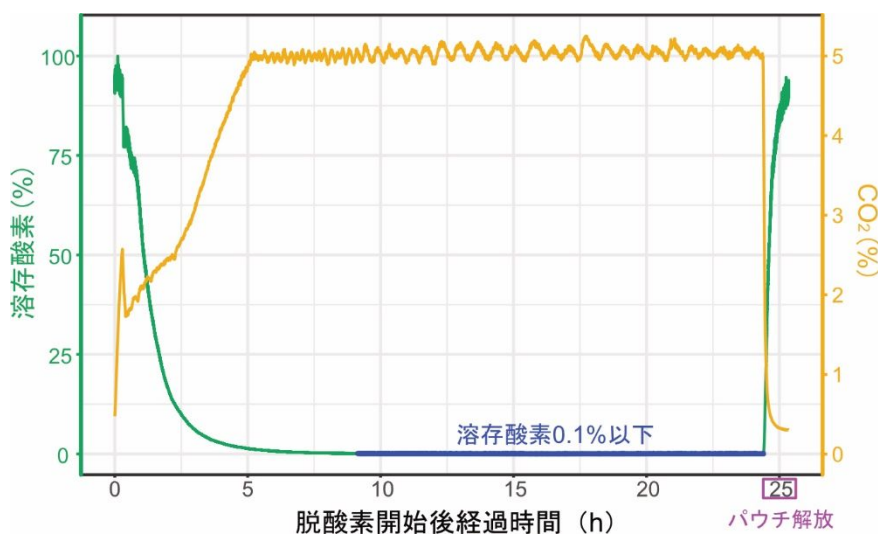


図 1: 培地中の溶存酸素濃度とパウチ内の CO<sub>2</sub> 濃度のモニタリング結果

- (3) 低酸素培養時のヒト iPSC-NPCs の細胞死評価  
(1) で開発した溶存酸素濃度モニタリング生細胞ライブイメージングシステムと死細胞染色試薬 (PI) を組み合わせて、培地中溶存酸素濃度の減少過程におけるヒト iPSC-NPCs の細胞死を評価した ( 図 2 )。その結果、ヒト iPSC-NPCs は、溶存酸素濃度が 0.1% 以下になってもすぐには細胞死が誘導されず、超低酸素培養がおおよそ 8 時間持続した時点から細胞死が誘導された。また、図 3 に脱酸素開始後 9 時間時点と 23 時間時点における、ヒト iPSC-NPCs の位相差像および PI 染色像を示す。脱酸素 23 時間時点においても PI 陰性の生細胞が確認されたことから、ヒト iPSC-NPCs は一定の低酸素耐性能をもつことが明らかとなった。

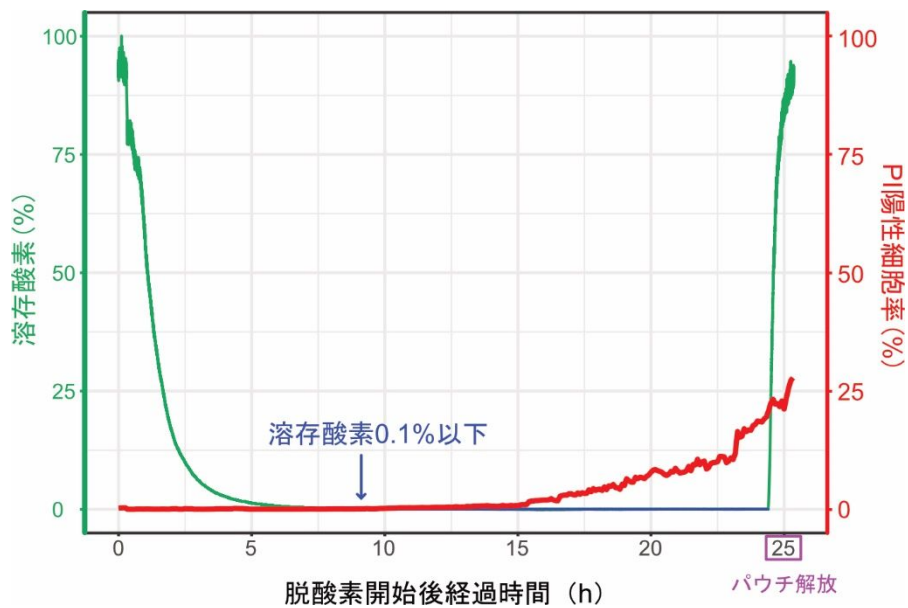


図 2: 培地中の溶存酸素濃度とヒト iPSC-NPCs の細胞死評価結果

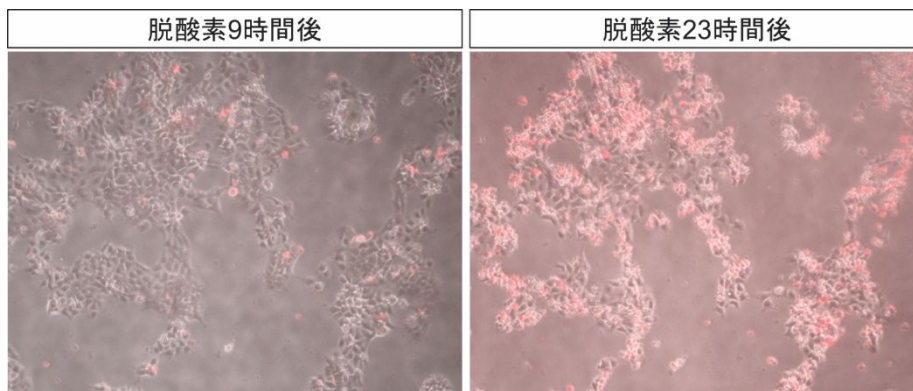


図 3: 脱酸素過程におけるヒト iPSC-NPCs の位相差像と PI 染色像(赤)

(4) ヒト iPSC-NPCs の低酸素培養後の回復培養と終末分化能評価

前項で示したように、ヒト iPSC-NPCs は低酸素耐性能をもち、一定の細胞が超低酸素培養下で生存したため、本細胞の細胞特性として増殖能と神経細胞へと終末分化能を評価した。

超低酸素条件下で生存した細胞は、通常酸素濃度の培養条件に戻して培養継続すると、増殖を再開し、この再増殖過程は、平面上に単層で増殖するパターンと、神経ロゼット様の立体的な構造を形成しながら増殖するパターンの 2 種類に分類された(図 4)。

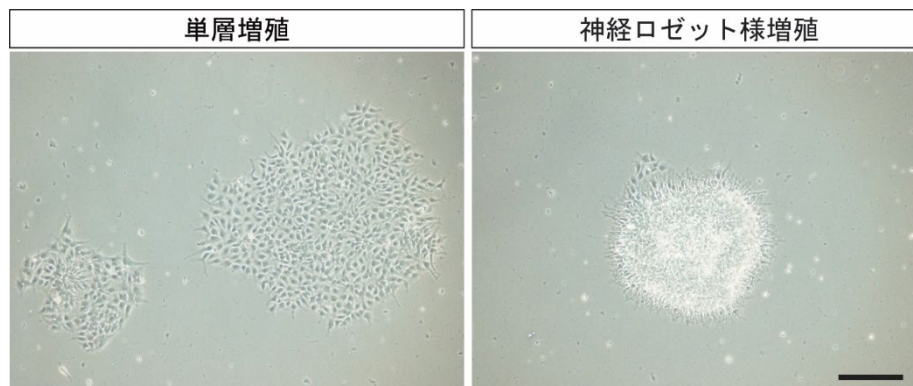


図 4: 13 日間の回復培養期にみられた再増殖パターン(スケールバー: 200 μm)



これらの異なる増殖パターンを呈した細胞の神経前駆細胞としての特性検証を、増殖因子を除去した無血清培地下での単層培養で実施した結果、いずれの細胞も非常に長い神経突起を持つ神経細胞に分化する特性を有することが確認された（図5）。

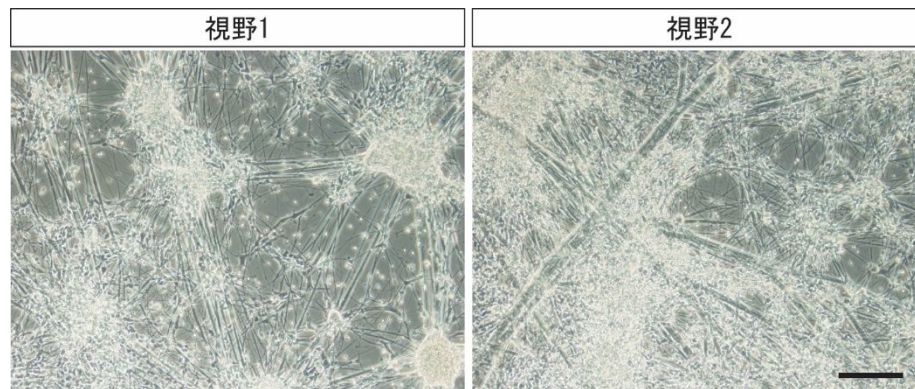


図 5: 13 日間の無血清培養により長い神経突起を形成

以上より、超低酸素条件下で生存可能なヒト iPSC-NPCs が少数存在し、本細胞は超低酸素ストレスに暴露後も、神経前駆細胞としての特性を維持し得ることが確認され、ヒト iPSC-NPCs の低酸素耐性に関する新たな知見を得ることに成功した。本研究で開発した溶存酸素濃度モニタリング生細胞ライブイメージング解析培養法は、ヒト iPS 細胞由来神経系細胞の低酸素環境下での細胞特性評価に有用な評価系であり、未だ有効な治療法がない脳梗塞および低酸素脳症等、低酸素・虚血ストレスで発症する神経疾患の発症メカニズム解明と新規治療法開発に寄与し得ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukusumi Hayato, Handa Yukako, Shofuda Tomoko, Kanemura Yonehiro	4. 巻 140
2. 論文標題 Evaluation of the susceptibility of neurons and neural stem/progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells to anticancer drugs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 331 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.08.002	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 -

1. 著者名 金村米博, 岡野栄之	4. 巻 下巻
2. 論文標題 第2節 細胞・組織利用再生医療製品の開発 第6項 神経細胞	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオロジクスの開発と品質・安全性確保	6. 最初と最後の頁 284-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金村米博、正札智子、福角勇人、兼松大介、山本篤世、勝間亜沙子、隅田美穂、山口 亮、峯 裕、中村雅也、岡野 栄之
2. 発表標題 中枢神経領域での再生医療【総合討論あり】
3. 学会等名 一般社団法人日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福角勇人、半田有佳子、正札智子、金村米博
2. 発表標題 ヒトiPS 細胞由来分化神経細胞の抗がん剤感受性評価
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東郷一行、福角勇人、正札智子、馬場孝輔、望月秀樹、金村米博
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の長期分化誘導法の検討
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金村米博
2. 発表標題 Differentiation method of human iPS cells derived neurons and evaluation of their maturation level
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福角勇人、半田有佳子、正札智子、金村米博
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来分化神経細胞の薬剤感受性評価
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福角勇人、勝間亜沙子、兼松大介、半田有佳子、隅田美穂、山本篤世、吉岡絵麻、正札智子、金村米博
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来神経系細胞の低酸素耐性能評価システムの開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	正礼 智子  (SHOFUDA tomoko)  (40450895)	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室・室長   (84414)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------