

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03584

研究課題名(和文)AD/HDのiPS細胞を用いた中枢神経モデルの解析

研究課題名(英文)Modeling pathogenesis of ADHD using cortical organoids differentiated from patient-derived iPS cells.

研究代表者

曾良 一郎 (Ichiro, Sora)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：40322713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：未だ病態が不明である注意欠如・多動性障害(Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, AD/HD)の病態を再現したモデルを作成することを目的に、AD/HD由来のiPS細胞を大脳皮質の細胞からなる三次元的な組織(大脳皮質オルガノイド)へと分化させ、解析を行った。免疫染色と用いた形態的な解析により、発生初期の大脳皮質に相当する構造のうち、層構造の厚さ、層に含まれる神経細胞数に、健常由来とAD/HD由来の細胞とで有意な差があることを見出した。この形態的な変化を生じる原因を検討し、細胞分裂とアポトーシスの数、自己増殖と分化の割合に有意な差があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、AD/HD者では大脳皮質の発生に変化が生じていることを示唆するものである。MRI等を用いた画像研究など、先行研究においてもAD/HDにおける大脳皮質の形態的な変化が指摘されており、本研究の妥当性を支持していると考えられる。本研究で得られた大脳皮質オルガノイドはAD/HDにおける大脳皮質の発生を実験的に再現しており、AD/HDの生物モデルとして更なる研究に利用可能であると考えられる。本研究の成果はAD/HDの病態解明、新たな治療法の開発に利用可能であり、将来のAD/HD治療を促進するという社会的、学術的意義を有するものである。

研究成果の概要(英文)：Pathogenesis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (AD/HD) is still unclear. We focused on telencephalon organoids derived from AD/HD patients to establish biological model of AD/HD. We generated induced pluripotent stem cells (iPS cells) derived from an AD/HD patient and differentiated them into telencephalon organoids. Morphological analysis of the telencephalon organoids revealed the significant differences in the thickness of early cortex-like layer structures and the number of neurons between AD/HD and control. Further analysis showed the significant differences in the number of cell division and apoptosis, and proportion of proliferation and differentiation, that might lead the morphological alteration in the layer structures. These findings have been published in the paper (Zhang, Eguchi, Sora et al., Telencephalon Organoids Derived from an Individual with ADHD Show Altered Neurodevelopment of Early Cortical Layer Structure. Stem Cell Rev Rep. 2023. PMID: 36872412)

研究分野：精神医学

キーワード：AD/HD iPS細胞 幹細胞 大脳皮質

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。AD/HD の学童期での有病率は 3-7% と極めて高率であり、成人後も約三分の一に不注意などの残遺症状が継続すると報告されている (斉藤, 心身医学 2010)。他方、AD/HD 症状は広汎性発達障害、反応性愛着障害などにも認められ、その疾患概念が不明確となり、臨床診断は生育歴の聴取や診断者の経験に依るところが大きい。また AD/HD 治療薬が効果を発現する機序についても不明な点が多い。これらのことから、さらに有効な診断方法、治療法の確立が望まれるが、一方で病態を完全に再現した動物モデルがない、患者由来の神経細胞を実験に利用することができないなどの理由から、AD/HD の病態、治療についての研究は限定的であった。

## 2. 研究の目的

MRI を用いた研究で、AD/HD 患者では認知機能に重要な役割を果たす前頭前野皮質の発達が遅延していると報告されている (Shaw P et al., PNAS 2007)。我々は AD/HD 患者の前頭前野皮質で生じていると考えられる形態的な変化に着目し、患者由来の細胞から iPS 細胞を樹立し、これを分化させることで前頭前野皮質の細胞、組織を実験的に再現し、AD/HD の病態解明や診断方法の確立、将来の創薬に利用可能な生物モデルを構築することを考え、研究を行った。

## 3. 研究の方法

国際的な診断基準である DSM-IV-TR に従い ADHD と診断された患者 (18 歳、男性) から提供された末梢血単核球を用いて iPS 細胞を作成した。健常対照群の iPS 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) から提供を受けた。先行研究で報告された分化誘導法 (SFEBq 法、Kadoshima 2013, Eguchi 2018) を用いて iPS 細胞を大脳皮質様組織に分化させ、凍結切片を作成して免疫染色で形態的な解析を行った。

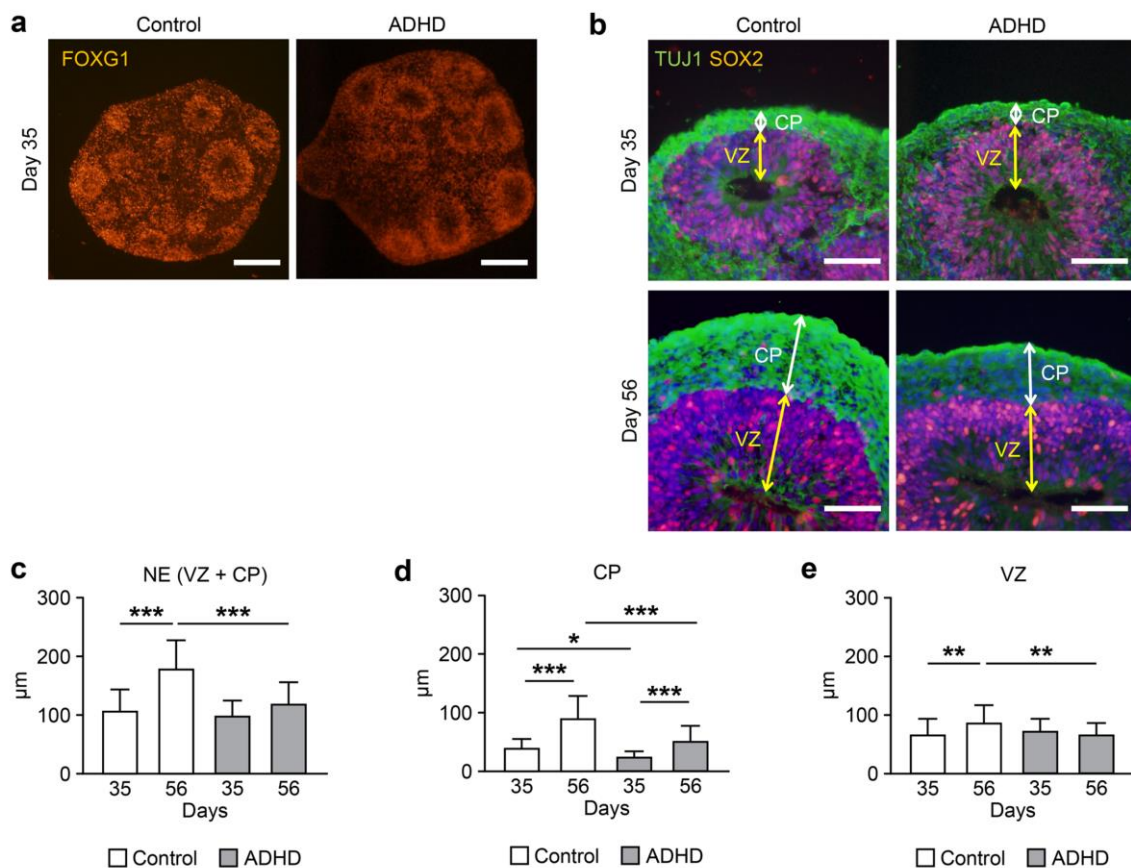
## 4. 研究成果

分化 35 日の組織で、終脳特異的に発現する FOXG1 が陽性となった (図 1a)。これらには神経特異的に発現する TUJ1、幹細胞特異的に発現する SOX2 が陽性となる細胞からなる層が含まれており、大脳皮質の初期の神経発達で観察される皮質板 (Cortical plate, CP) や脳室帯 (Ventricular zone, VZ) に相当する構造と考えられた (図 1b)。

次に、大脳皮質様構造の層構造について検討した (図 1c)。層構造全体の厚さである神経上皮様構造 (NE) の厚さは、分化 35 日目には ADHD と健常群との間に有意な差はなく、分化 56 日目には ADHD の方が健常群よりも有意に薄い結果となった。さらに、健常群の NE は分化 35 日目から 56 日目にかけて有意に増加していたが、ADHD では NE の厚さに有意な変化は見られなかった。この結果は、ADHD では NE の成長が見られないことを示唆している。

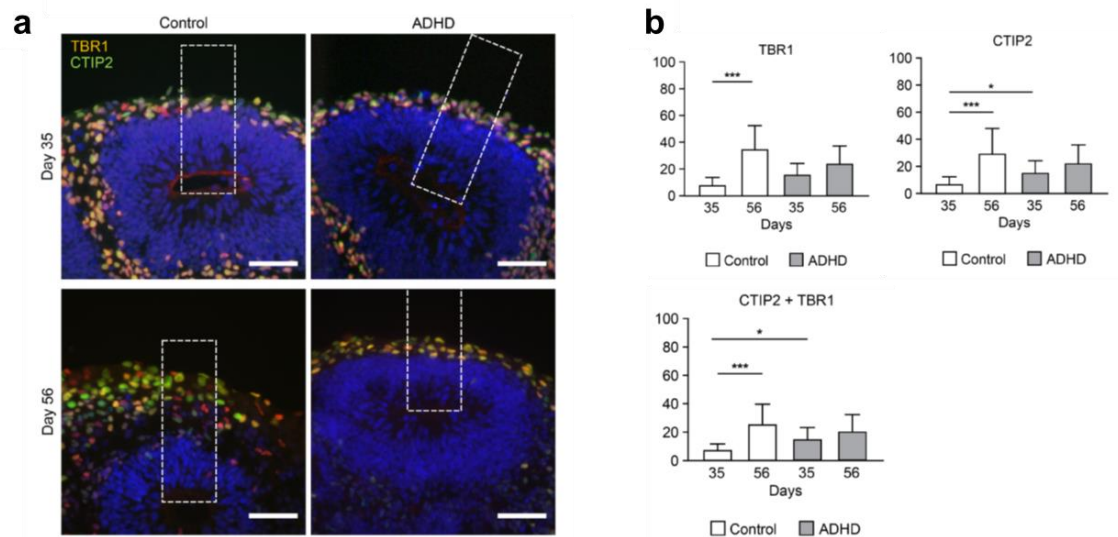
さらに、NE 中の CP、VZ について検討した (図 1d, e)。CP の厚さは分化 35 日目と 56 日目の両方で、ADHD の方が健常群よりも有意に薄かった。一方、分化 35 日目には、ADHD と健常群の VZ の厚さに有意な差は見られなかったが、56 日目には、ADHD の VZ は健常群より有意に薄かった。分化 35 日目から 56 日目の間の厚さの比較では、CP の厚さは ADHD と健常群の両方で有意に増加していたが、VZ の厚さは ADHD では有意な増加は認められなかった。

図 1



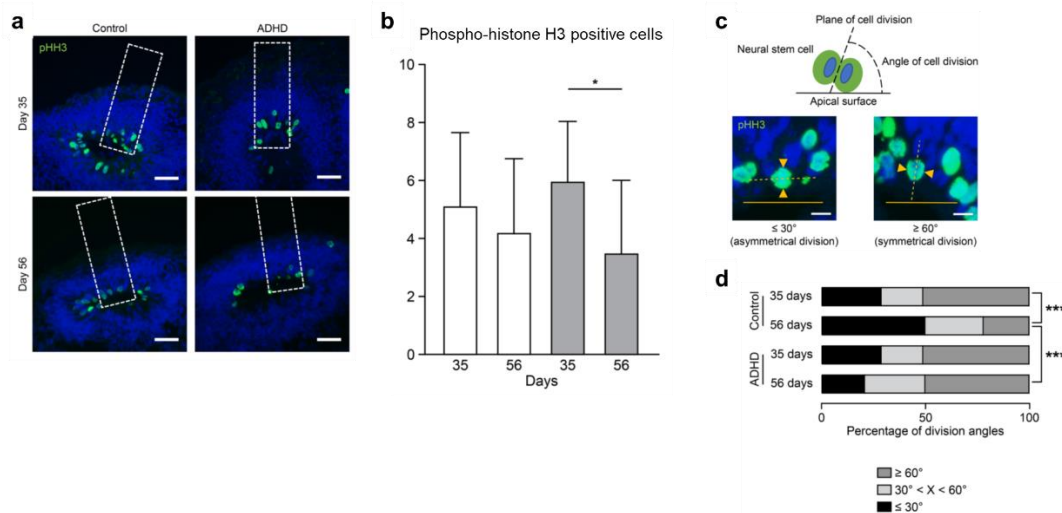
次に、大脳皮質第 6 層および第 5 層の神経細胞に特異的に発現する TBR1 および CTIP2 が発現している細胞の数を解析した (図 2a)。分化 35 日目には、ADHD で CTIP2、および TBR1、CTIP2 を共発現している細胞の数が健常群と比較して有意に多かった (図 2b)。また、それらの細胞の数は健常群では分化 35 日目から 56 日目の間に有意に増加したが、ADHD では有意な増加は認められなかった。

図 2



これまでの結果を生じる原因として、神経細胞の増殖とアポトーシスに変化が生じていると仮説を立て、検討を行った。有糸分裂中の細胞で陽性となる phospho-histone H3 (pHH3) の発現を解析したところ (図 3a, b)、ADHD では、分化 35 日目と 56 日目の間で pHH3 の発現が有意に減少しており、細胞分裂数が減少していることが示された (図 3b)。

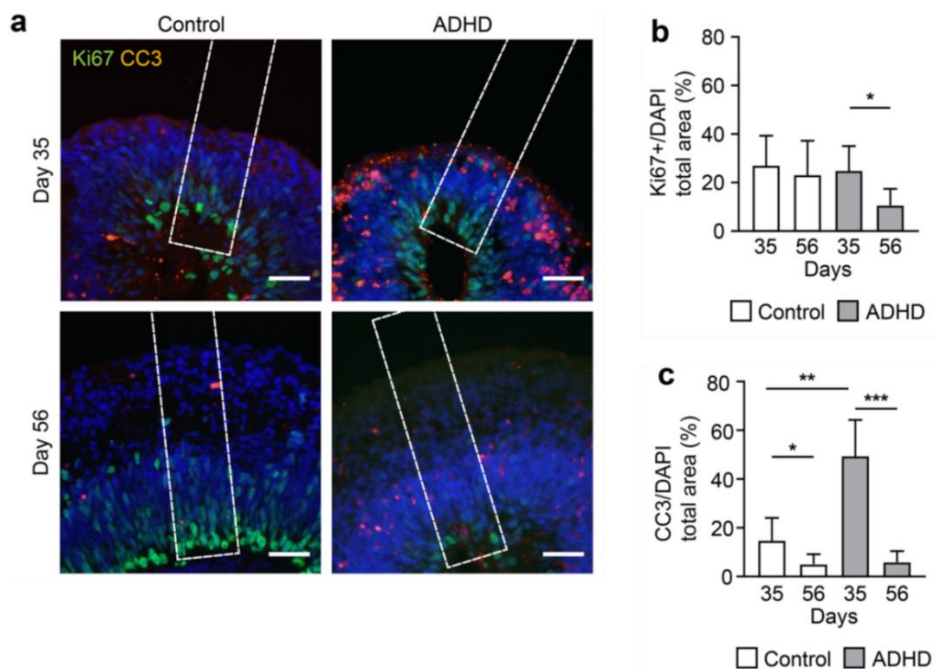
図 3



さらに、神経幹細胞の自己複製である対称分裂と、神経幹細胞から神経細胞への分化である非対称分裂について検討した。細胞分裂面の角度によって対称分裂、非対称分裂を定義し、その割合を解析した (図 3c, d)。健常群と ADHD との間で対称分裂と非対称性分裂の割合に有意な違いがあり、健常群では ADHD より非対称性分裂が多く、対称分裂が少なかった。これらの結果は、発生早期において、健常群では細胞分裂の割合が徐々に対称分裂から非対称分裂へ、すなわち神経幹細胞の自己複製から神経細胞への分化へと移行していくが、ADHD ではそれが起こらないことを示唆している。

最後に、細胞のアポトーシスを示す cleaved-caspase 3 (CC3) と細胞分裂を示す Ki67 の発現を解析した (図 4)。ADHD では分化 35 日目から 56 日目の間に Ki67 の発現が有意に減少していた。また、分化 35 日目での CC3 の発現は ADHD で有意に多かった。これらの結果は、ADHD では発生初期に細胞分裂数が減少し、さらにアポトーシスも多いことを示している。これらの細胞増殖とアポトーシスの変化が、神経細胞数や層構造の変化を引き起こしている可能性が考えられた。

図 4



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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhang Danmeng, Eguchi Noriomi, Okazaki Satoshi, Sora Ichiro, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 -
2. 論文標題 Telencephalon Organoids Derived from an Individual with ADHD Show Altered Neurodevelopment of Early Cortical Layer Structure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	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） 10.1007/s12015-023-10519-z	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Danmeng Zhang, Noriomi Eguchi, Satoshi Okazaki, Ichiro Sora
2. 発表標題 Telencephalon organoid derived from iPSCs showed immature differentiation of cortical neurons of an ADHD individual.
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会
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	江口 典臣 (Eguchi Noriomi) (80814566)	神戸大学・医学部附属病院・助教  (14501)	

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
---------	---------