

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07986

研究課題名（和文）ヒト末梢神経のin vitro髄鞘形成モデルの開発

研究課題名（英文）Development of in vitro myelination model of human peripheral nerve

研究代表者

菅 三佳（岸本三佳）（Mika, Suga）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員

研究者番号：00340448

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）：末梢神経の髄鞘形成障害や脱髄疾患の病態研究ならびに創薬研究においては、ヒトの末梢神経系の有髄神経のin vitroモデルの開発が期待されている。本研究では、ヒトiPS細胞からシュワン細胞をin vitroで高効率に誘導する方法を確立するため、ヒトiPS細胞に直接分化転換を誘因するマスター遺伝子を選定し、そのマスター遺伝子の発現を人工的に制御するコンストラクトを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの末梢神経において軸索の髄鞘（ミエリン）を構成するシュワン細胞の成熟化と髄鞘形成を制御する分子機構は解明されていない。ヒトiPS細胞からシュワン細胞をin vitroで高効率に誘導する方法を確立することにより、シュワン細胞の成熟化と髄鞘形成を制御する分子機構の解明、ヒトの末梢神経の髄鞘形成障害や脱髄疾患の病態解析と治療法開発に資する。

研究成果の概要（英文）：Development of an in vitro model of myelinated nerves in the human peripheral nervous system is expected for pathological research and drug discovery research on myelination disorders and demyelinating diseases of peripheral nerves. In this study, in order to establish a method for inducing Schwann cells from human iPS cells with high efficiency, we constructed a master gene expression system that directly convert into Schwann cells from human iPS cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 末梢神経 シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトの末梢神経系の有髄神経の軸索を取り巻く髄鞘(ミエリン鞘)は、髄鞘形成細胞であるシュワン細胞(Schwann細胞)の細胞質で構成される。髄鞘と髄鞘との間をランビエ絞輪と呼び、有髄神経の跳躍伝導に重要な役割を果たすが、髄鞘の障害は伝導ブロックや伝導遅延による神経症状を引き起こす。有髄神経の髄鞘が障害される脱髄疾患では、先天的に髄鞘形成不全をきたす *dysmyelination* といった形成された髄鞘が何らかの原因で破壊される *demyelination* が生じると考えられている。しかしながら、ヒトの末梢神経においてこれらの脱髄や、髄鞘の形成および成熟、障害時の修復を制御する分子機構は解明されていない。そこでこれらの分子機構の解析のためにヒトの末梢神経系の有髄神経の *in vitro* モデルが有用と考えられるが、未だその開発には至っていない。

患者由来の体細胞(皮膚線維芽細胞や血液単核球など)から作製した疾患特異的 iPS 細胞は、患者のゲノム情報を保持したまま増幅させ、さらにすべての体細胞に分化させることができるため、疾患の病態モデルとして期待されている。患者の iPS 細胞からシュワン細胞と末梢神経、さらには炎症反応を担う免疫細胞などと組み合わせて、病態を再現する *in vitro* モデルを作製することができれば、シュワン細胞の成熟化と髄鞘形成を制御する分子機構の解明、ヒトの末梢神経の髄鞘形成障害や脱髄疾患の病態解析と治療法開発に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、シュワン細胞の成熟化と髄鞘形成を制御する分子機構の解明、ヒトの末梢神経の髄鞘形成障害や脱髄疾患の病態解析と治療法開発に資するヒト末梢神経の有髄神経 *in vitro* モデルをヒト iPS 細胞から作製する方法を開発することを目的とする。

これまでに、シュワン細胞を作製する方法については、ヒトの線維芽細胞にシュワン細胞への分化を制御するマスター転写因子を複数種類組み合わせる強制発現させる直接分化転換法によりシュワン細胞の前駆細胞を含む細胞群を誘導し、セルソーティングにより選別して増殖させ、最終分化させる方法が報告されている。誘導効率は低いものの、髄鞘形成能を有するシュワン細胞が培養できることが示された。これらの知見と、シュワン細胞が末梢神経と同じく神経堤から発生するという発生学的な知見をもとに、ヒト iPS 細胞からシュワン細胞へ誘導する方法を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞からシュワン細胞へ誘導するため、健常者の体細胞から作製した iPS 細胞(健常コントロール iPS 細胞)に直接分化転換を誘発するマスター転写因子の遺伝子の発現を人工的に誘導した。最も誘導効率、誘導日数、再現性の安定した条件を選択し、選択した条件で複数のヒト iPS 細胞株からシュワン細胞を誘導し、誘導したシュワン細胞のマーカー遺伝子発現を蛍光免疫染色、定量 RT-PCR で解析し、開発したシュワン細胞誘導方法の汎用性と再現性について検証した。

(2) さらに、末梢神経の髄鞘形成を誘導するため、ヒト iPS 細胞由来シュワン細胞とヒト iPS 細胞由来末梢神経を共培養する系を構築した。ヒト iPS 細胞由来末梢神経は直接分化転換法ではない従来の分化誘導方法により作製した。

末梢神経の生理学的機能を解析するため、末梢神経の電気的活動を多電極アレイ(MEA)システムを用いて解析した。

(3) 末梢神経脱髄疾患の病態を *in vitro* で再現するため、末梢神経脱髄疾患の患者由来 iPS 細胞株から上記で開発した方法により末梢有髄神経を作製する系を構築した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞からシュワン細胞を *in vitro* で高効率に誘導する方法を確立するため、これまでに、ヒト iPS 細胞に直接分化転換を誘因するマスター遺伝子を選定し、そのマスター遺伝子の発現を人工的に制御するコンストラクトを作製し、健常者由来のヒト iPS 細胞に導入した。具体的には、Tet-On 発現誘導システムに候補のマスター転写因子の cDNA を組み込んだプラスミドベクターを健常コントロール iPS 細胞にトランスフェクションして導入したのちに、ドキシサイクリン(DOX)含有分化誘導培地で培養することにより、シュワン細胞へ誘導した。この誘導系を用いることにより、健常コントロール iPS 細胞からシュワン細胞へ誘導し、シュワン細胞のマーカー遺伝子発現が上昇していることを蛍光免疫染色および定量 RT-PCR によって確認した。

(2) さらに、ヒト iPS 細胞由来シュワン細胞とヒト iPS 細胞由来末梢神経を共培養することにより末梢神経の髄鞘形成を誘導するため、ヒト iPS 細胞由来末梢神経と、上記(1)の方法により誘導したシュワン細胞とを共培養した。

共培養系で細胞を識別するため、ヒト iPS 細胞由来シュワン細胞が恒常的に蛍光タンパク質 mCherry を発現する系で Tet-On 発現誘導システムのコンストラクトを構築し、(1)と同様に健常コントロール iPS 細胞にトランスフェクションにより導入してシュワン細胞を誘導した。一方、GFP を恒常的に発現する健常コントロール iPS 細胞から末梢神経を誘導した。GFP を発現する末梢神経と mCherry を発現するシュワン細胞を厳密に識別して共培養する系を構築した。

一方、末梢神経の生理学的機能解析のために、多電極アレイ (MEA) システムを用いて末梢神経の自発活動、神経ネットワーク形成、および軸索の伝導速度を解析した。

(3) 末梢神経の髄鞘形成障害や脱髄疾患の病態を *in vitro* で再現するため、これらの病態が特徴的な遺伝子疾患患者から作製した疾患特異的 iPS 細胞を培養し、遺伝子変異解析を含む基本的な特性解析をおこなった。この疾患特異的 iPS 細胞からも上記(1)と(2)の方法を用いてシュワン細胞を誘導する系を構築した。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hidefumi Suzuki et al.	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line derived from a Parkinson's disease patient carrying SNCA duplication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.101828	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
---------------------------	-----------------------	----

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