

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08265

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた髄鞘形成不全症の新規細胞病態解明：活性酸素仮説の検証

研究課題名(英文) Modeling and Phenotypic analysis of Pelizaeus-Merzbacher disease using patient-derived iPS cells

研究代表者

鈴木 禎史 (Suzuki, Sadafumi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・リサーチフェロー

研究者番号：70465003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、PLP1遺伝子重複によって起こる先天性大脳白質形成不全症の代表的疾患であるPelizaeus-Merzbacher病(PMD)の新規病態解明を行うことである。そのために、疾患特異的iPS細胞の樹立、病態モデル構築、病態研究を行った。オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)からオリゴデンドロサイト(OL)への分化早期に活性酸素の高蓄積とミトコンドリア障害を確認した。活性酸素の増加はLate-OPCの時点ですでに起こっていることがわかった。活性酸素の増加に伴い、OPCのprocessの全長や分岐数の低下がみられ、細胞形態の異常を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PLP1重複変異によるPMDの病態理解における大きな疑問は、なぜ野生型PLP1の発現量が1コピー分増加しただけで重篤な髄鞘化不全を来すのか、という点であり、その機序は変異の発見から四半世紀経っても全く分かっていなかった。適切な病態解析ツールがなかったという点が大きな要因であったが、疾患特異的iPS細胞を用いることで、病態モデルの構築、PLP1遺伝子重複変異が及ぼす細胞病態解析が可能となった。前駆細胞から蓄積する活性酸素が病態の分子機序に関係する可能性を見出したことで、本疾患の細胞病態の一端を捉えることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To address cellular pathology of PMD more precisely, we have been generating human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from patients with PMD harboring PLP1 duplication and aim to differentiate them into oligodendrocytes to recapitulate the cellular pathology of PMD in culture.

At this point we have generated hiPSCs from 4 PMD patients. In the early differentiation phase of OL, we observed increase of reactive oxygen species (ROS) accumulation and a partially depolarized inner mitochondrial membrane in OLs in a PMD-derived hiPSC line comparison with a normal control. Also we observed ROS accumulation in oligodendrocyte precursor cells (OPCs). We found abnormalities of process number and length of OPCs. These findings suggest that the cellular phenotypes of PMD-derived hiPSCs may occur at early stage of OL differentiation, which is earlier than previously thought.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：病態再現 iPS細胞 先天性大脳白質形成不全症 オリゴデンドロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性大脳白質形成不全症は髄鞘の低形成を主体とする遺伝性の疾患群で、その代表的疾患である PMD は、髄鞘膜蛋白質をコードする *PLP1* 遺伝子の異常で起こる X 連鎖性劣性疾患である。*PLP1* 遺伝子のゲノム重複が最も頻度の高い PMD 疾患原因変異であることが示されてきたが、*PLP1* ゲノム重複がもたらす *PLP1* コピー数増加による野生型蛋白質の過剰発現が、なぜ重篤な髄鞘形成不全を引き起こすのか、その分子・細胞病態については依然不明である。その一因として、*PLP1* 過剰発現トランスジェニックマウスや *PLP1* 遺伝子重複変異マウスが作製され PMD の病態解析に用いられてきたが、これらのモデル動物は必ずしもヒト患者と同様の表現型や病態を示さないことから (Kagawa T et al, *Neuron* 1994, Bradl M et al, *Acta Neuropathol* 1999) 患者脳において *PLP1* 重複変異によって起こる詳細な病態解析を行うための適したツールが存在しなかったことが挙げられる。

そこで、PMD 患者由来 iPS 細胞を用いた発症メカニズム解析や新規治療法の開発を計画した。しかしながら、iPS 細胞からオリゴデンドロサイト (OL) への誘導効率の低さ、OL 以外の細胞の混入、細胞株間による分化度の違い、長期誘導期間 (~100 日) による再現実験の難しさなどの問題が残存しており、現状の技術では iPS 細胞を用いた PMD の多面的な発症メカニズム解析や治療法の開発には大きな制約があった。

2. 研究の目的

本研究では、*PLP1* 遺伝子重複によって起こる PMD の新規病態解明を行うことである。そのために 短期間かつ高効率に iPS 細胞からオリゴデンドロサイト (OL) を分化誘導する応用技術を開発し、患者由来 iPS 細胞を用いた網羅的な分子・細胞病態の探索を行い、髄鞘形成不全を引き起こす新規の細胞自律的病態機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

< OL 分化誘導法の改善検討 >

低酸素培養によるアストロサイト分化誘導法 (Yasui T et al, *Stem Cell Reports*. 2017)、Dox によりノックインされた OLIG2 と SOX10 発現を調節する分化誘導法を (Matthias P et al, *Stem Cell Reports*. 2017) を参考にして、OLs 分化誘導改善法を構築する。低酸素培養については、Dual SMAD inhibitor を作用させた iPS 細胞を Sphere 培養する時点で低酸素培養 (2% 酸素) に切り替え、その後、通常酸素条件下で OL への分化誘導を行った。OLIG2 と SOX10 発現誘導法については、エピゾーマルベクターを用いて発現ベクターの導入を行った。Dual SMAD inhibitor を作用させた iPS 細胞に、OLIG2 と SOX10 発現ベクターをトランスフェクションし、神経幹細胞誘導培地、OPC 誘導培地、OL 誘導培地で OL への分化を誘導した。グリア系細胞: A2B5、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC): PDGFR α 、O4 と OL: MBP それぞれの分化を免疫染色で確認した。

< 分化過程で起こる PMD 由来細胞の細胞内異常解析 >

PMD 患者由来 iPS 細胞および健常人由来 iPS 細胞から OLs へ分化誘導を行い、分化効率や細胞形態、分化過程で最初期に生じる細胞内変化、分化過程で生じる細胞内変化の時系列的検出を行い、OL 分化誘導の過程で *PLP1* 重複変異によってどのような細胞内異常が誘導されるか解析を行った。分化誘導は OPC を高効率に得られる方法 (Panagiotis Douvaras & Valentina Fossati et al., *NATURE PROTOCOLS*, 2015) を一部改変して行った。

4. 研究成果

疾患特異的 iPS 細胞は、PMD 患者 4 名から樹立した株 (樹立済みの 2 株、新規に樹立した 2 株) を使用した。

< OL 分化誘導法の改善検討 >

OL 分化効率を上げるため、低酸素培養法、または、OLIG2 と SOX10 発現ベクターの遺伝子導入法による分化誘導法の改善検討を行った。低酸素誘導については、誘導 50 日後に免疫染色による O4 陽性細胞 (OPC マーカー) の確認を行ったところ、通常酸素培養と比較して、約 10% 増加することがわかった。OLIG2 と SOX10 発現ベクター導入法については、誘導 17 日後に A2B5 (グリア系細胞マーカー) の免疫染色、誘導 20 日後に PDGFR α (OPC マーカー) の免疫染色を行い、A2B5 陽性細胞は約 90%、PDGFR α 陽性細胞は約 60% であった。たった 20 日間で OPC が効率よく得られることがわかった。しかしながら、OL へ誘導後、MBP 陽性 (OL マーカー) 細胞について確認したが、どちらの方法についても、全く分化しない、または非常に低い誘導効率という結果であった。OPC への分化誘導については、どちらも改善効果がみられた。しかし、OL への分化効率を改善するには至らなかった。OPC の誘導効率を上げることで、OL への分化効率の底上げが可能となると考えたが、OL 分化誘導を促進するには共存細胞や足場など他の要素を検討する必要があると考える。

<分化過程で起こる PMD 由来細胞の細胞内異常解析>

iPS 細胞から OL へ分化誘導する過程で細胞内にどのような異常が起きているか解析を行った。比較検討群として、健常人由来 iPS 細胞 2 株から同様に分化誘導した細胞をコントロールとして用いた。

・iPS 細胞から O4-OPC への分化効率を解析したところ、PMDOPC において誘導効率が低下することがわかった (図 1)。

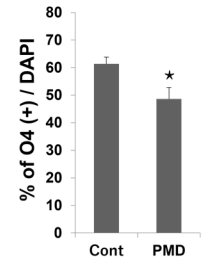


図1 O4陽性細胞の割合

・OPC から OL への分化誘導 4 日後 (誘導 84 日) に CellRox (活性酸素検出試薬) を用いて ROS (活性酸素) の解析を行ったところ、PMD-O4 陽性細胞において ROS の増加傾向を示し、CellRox の蛍光強度から細胞内 ROS 蓄積量の優位な増大を検出した (図 2)。さらに、JC-1 を用いてミトコンドリア膜電位の解析を行ったところ、PMD-O4 陽性細胞におけるミトコンドリア膜電位の低下傾向を検出した (図 3)。PMD 由来細胞の OL への分化誘導の早期に、ROS の産生/蓄積上昇とミトコンドリア障害が起きていることがわかった。

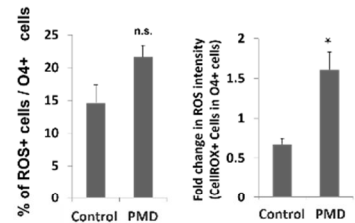


図2 ROS陽性細胞と蓄積量の割合

・これらの異常が前駆細胞から起きているか検証するために、PDGFR α 陽性細胞の Early-OPC (誘導 55 日) と O4 陽性細胞の Late-OPC (誘導 75 日) で解析を行った。Late-OPC において ROS の大きな増加傾向を認めしたが (図 4) Early-OPC では ROS は検出されなかった。活性酸素の上昇は、OPC の 55 日~75 日の間で起こっていることがわかった。

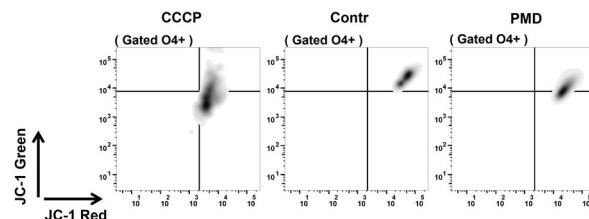


図3 ミトコンドリア膜電位解析

・ROS 上昇が検出された Late-OPC について、細胞形態を解析した。InCell Analyzer の解析ソフトを用いて、process (細胞体から出ている突起) の全長と分岐数について計測を行った。PMD-OPC において、process の全長と分岐数が低下していることがわかった (図 5)。

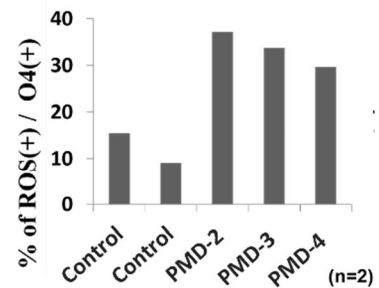


図4 ROS陽性細胞の割合

・さらに、誘導 80 日後の OPC について解析を行うと、SA- β -Gal (細胞老化マーカー) 染色について、コントロール群と比較して強く染色される細胞の出現を認めた。実際に細胞老化が起きているか検証するために、その他の細胞老化マーカーについて解析を行った。現在、PMD-OPC の一部の細胞において γ H2AX 陽性 (DNA 損傷) BrdU 陰性、肥大化細胞の存在が確認できている。さらに、p16 や SASP などの確認を行い、実際に細胞老化が起きているか確認を行っている。

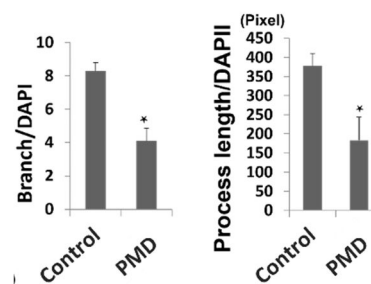


図5 process解析

PLP1 重複変異によって起こる PMD は、OL で起こる細胞病態が原因で起こる疾患だと考えられてきたが、今回の研究結果から前駆細胞の時点で細胞内異常が起きていることがわかった。前駆細胞で起こる ROS 蓄積上昇が病態に寄与しているか検証するために、ROS のインヒビターやアクチベーターを用いた解析を行い、ROS によって誘導される遺伝子発現や分子の変化について詳細に解析を進めていく。さらに、患者脳に近い環境で解析ができるブレインオルガノイドを用いて同様の検証を行い、病態解明と新規治療法の開発へつなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sadafumi Suzuki, Heng Li, Yu-ichi Goto, Ken Inoue
2. 発表標題 Modeling and Phenotypic analysis of Pelizaeus-Merzbacher disease using patient-derived iPS cells
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sadafumi Suzuki, Heng Li, Yu-ichi Goto, Ken Inoue
2. 発表標題 Modeling and Phenotypic analysis of Pelizaeus-Merzbacher disease using patient-derived iPS cells
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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