

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08344

研究課題名（和文）ヒト大脳オルガノイドを用いたダウン症の早期アルツハイマー型認知症の治療薬開発

研究課題名（英文）Drug development for Alzheimer-like dementia related to Down syndrome using iPSC-derived cortical organoid

研究代表者

栗屋 智就（Awaya, Tomonari）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：20589593

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ダウン症由来iPS細胞と自然修復株から、中枢神経細胞、大脳オルガノイド、ミクログリアを分化誘導し、APP遺伝子、DYRK1A遺伝子の発現変化について検討した。APP遺伝子、DYRK1A遺伝子をはじめとする21番染色体上の遺伝子は概ね1.5倍程度の遺伝子発現量を有していたが、 β -アミロイドやタウタンパク質の有意な蓄積は大脳オルガノイドにおいても196日程度の培養期間では観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究ではiPS細胞を使ってダウン症の中枢神経病態を再現し、アルツハイマー様の急激退行症の病態とその改善法を検討することを試みたものです。iPS細胞から大脳オルガノイドというヒトの脳に類似した組織を作り出すことが出来ましたが、7か月程度の培養ではアルツハイマー病に関連した明確な変化は得られませんでした。一方、アルツハイマー病に関連するAPP遺伝子、DYRK1A遺伝子等の遺伝子は予想通りダウン症由来の細胞で高発現しており、これらの細胞を用いてダウン症が有するアルツハイマー病のリスクと病態との関連について、今後検討していくことが出来ると考えられます。

研究成果の概要（英文）：We differentiated CNS cells, cerebral organoids, and microglia from Down syndrome iPSCs, and compared gene expression levels of APP and DYRK1A with control samples. The expression levels of the genes on chromosome 21 were mostly over than 1.5 fold in the DS-derived cells, however, cerebral organoids derived from DS-iPSC showed no apparent accumulation of beta-amyloid protein or tau even after 196 days of differentiation.

研究分野：小児神経学

キーワード：iPS細胞 ダウン症候群 中枢神経 ミクログリア アルツハイマー病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ダウン症 (DS) は 21 番染色体の過剰により生じる最も頻度の高い染色体異常症であり、知的障害、身体発育遅延、筋緊張低下症、先天性心疾患、鎖肛、先天性食道閉鎖症、造血系腫瘍、内分泌異常、眼科的異常、難聴など、様々な病態を合併する。これらの症状は 21 番染色体上の遺伝子の量的効果により生じると考えられているが、合併症の頻度は様々で、それぞれの病態における分子遺伝学的機序は未解明な部分が多い。乳児期に致死率の高い先天性心疾患や造血系合併症の治療成績の向上により、DS 者の平均寿命はここ数十年間で飛躍的に向上したが、成人期以降の問題点として、肥満等の生活習慣に関わる問題や、抑うつやメンタルケアなど、様々な新たな課題が生じている。21 番染色体の過剰により生じる DS 者の中枢神経系では、早期からアルツハイマー病 (AD) 様の病態が進行していることが知られており、一部の DS 者では 20-30 歳台以降で急激に認知症が進行する (急激退行症)。しかしながら、知的障害や急激退行症などの中枢神経系の病態研究は、その実験材料の獲得の困難さからほとんど進んでこなかった。また、21 番染色体上には *APP* 遺伝子と *DYRK1A* 遺伝子の 2 つの AD リスク遺伝子があり、実際に最も若年で AD を発症する遺伝学的集団であることから、DS 者における急激退行症は、一般人口中の AD と一定の基盤を共有していると考えられており、ここで得られた知見は、幅広く AD 患者や老化現象に伴う認知症に適用出来る可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、DS の中枢神経病態における *APP* 遺伝子、*DYRK1A* 遺伝子等、21 番染色体上に存在する遺伝子の寄与について検討し、その制御による病的変化が改善するかを検討することを目的とした。具体的には、iPS 細胞から構築した三次元中枢神経培養系 (大脳オルガノイド) を用いて神経発生から神経成熟・老化に至る中枢神経病態を模擬的に再現し、AD にみられる老人斑の形成 (*APP* 処理機構の異常) やタウタンパク質の蓄積 (*DYRK1A* によるリン酸化経路の異常) を潜在的進行期から観察すること、また、神経細胞と星状膠細胞、中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアの相互作用に着目して、21 番染色体上に位置するインターフェロン受容体等が、iPS 細胞から分化誘導した神経細胞とミクログリアにおいてどのように変化しているかを観察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の作成と未分化培養と品質管理

健常対照者由来 iPS 細胞 (CTR-iPSC)、ダウン症者由来 iPS 細胞 (DS-iPSC) およびその遺伝学的等質株 (染色体数の自然修復株) をヒト ES 細胞用培地 (20%KSR 培地)/SNL フィーダー細胞、あるいは StemFitAK02N/iMatrix-511 silk で常法により培養し、未分化マーカーと多分化能を評価した細胞を使用した。維持培養中には 6 か月毎に G 分染法、または DNA マイクロアレイによる競合的ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) による染色体検査を行った。

(2) 中枢神経系細胞の分化誘導と病態解析

未分化 iPSC を単一細胞に解離した後、DMEM/F12+N2 添加物を主成分とした培地で Y-27632 (ROCK 阻害剤) と SMAD 阻害剤を用いて神経上皮細胞へと分化誘導した後、SMAD 阻害剤を除去して培養を継続することにより神経前駆細胞 (NSC) を分化誘導した。その後、Neurobasal:DMEM/F12+N2 添加物、B27 添加物を主成分とした培地で培養を継続して中枢神経系 (CNS) の細胞を得た。一部の培養では NSC に bFGF と EGF を、成熟培養に hBDNF と hGDNF と dbcAMP、あるいは 5%血清を添加した。細胞の解離には Accutase を使い、Matrigel をコートした培養容器上で接着培養を行った。分化誘導した細胞からは、常法により RNA やタンパク質を抽出して分子生物学的検討を行った。また 4%PFA で固定して免疫染色等の解析に利用した。

(3) 大脳オルガノイドの作成と病態解析

未分化 iPSC を単一細胞に解離した後、STEMdiff Cerebral Organoid Differentiation Kit (STEMCELL Technologies 社) を用いて大脳オルガノイドを作成した。作成した大脳オルガノイドは 20%蔗糖液で弛緩した後に 4%PFA で固定し、FSC 22 Frozen Section Compound (Leica Microsystems 社) を用いて急速凍結標本作製した。凍結標本はマイクロームを用いて 4~20 μm 厚に薄切し、組織染色または免疫染色を行った。

(4) ミクログリアの分化誘導と病態解析

未分化 iPSC を単一細胞に解離した後、独自の手法を用いて単球系前駆細胞を分化誘導した後、ミクログリア様細胞へと成熟分化誘導した。得られた細胞は pH 感受性色素を結合した酵母由来多糖体 (Zymosan) を用いた貪食能評価、グラム陰性桿菌莢膜多糖体 (LPS)、ポリイノシン酸ポリシチジル酸 (poly(I:C)) 等の外的刺激への応答性を評価した。分化誘導した細胞からは、常

法により RNA やタンパク質を抽出して分子生物学的検討を行った。また 4%PFA で固定して免疫染色等の解析に用いた。

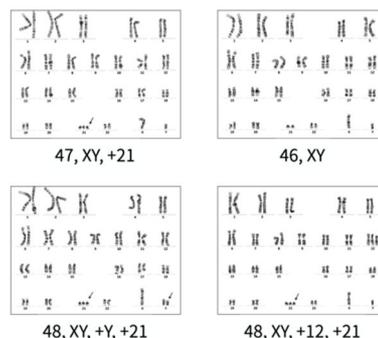
4. 研究成果

(1) 未分化維持培養における染色体異常の誘発

欧米人健常対照者由来 iPS 細胞株 201B7, 409B2, 21 番染色体数以外のゲノム背景の均質な遺伝学的等質細胞株 1 組 (欧米人細胞バンク由来株 1 株、および当該株の染色体数の自然修復株 1 株) を上記により維持培養し、染色体検査を行ったところ、StemFitAK02N/iMatrix-511 培養条件の欧米人細胞バンク由来 DS-iPSC で追加の染色体異常が頻出した。

頻出した変化は 12 番染色体、X 染色体、Y 染色体の異数性であり、自然修復株 (cDS-iPSC) においても染色体異数性が出現した (図 1: 未公表データ)。このことから、当該親細胞自体に何らかの染色体異常を誘発しやすい性質があることがうかがわれた。これらの細胞株は、染色体異常を生じさせる素地の検討に利用出来る可能性があるが、本研究課題では DS-iPSC の表現型解析が目的のため、当該 DS-iPSC はサブクローニングを行い、47,XY,+21 の DS-iPSC (T21) と 46,XY の cDS-iPSC (D21) とを各 2 クローンずつ取得し、下流の解析に使用した。

図1: 追加で生じた染色体異常



(2) 中枢神経系の分化誘導と病態解析

既に初期の神経発生過程において 21 番染色体上の *DYRK1A* 遺伝子の過剰が DS-iPSC 由来の神経前駆細胞 (PAX6+/Nestin+) の増殖異常を呈することを示してきたが、CTR-iPSC 群、DS-iPSC 群いずれにおいても神経細胞 (TUBB3+/MAP2+/SYN+)、星状膠細胞 (GFAP+) を分化誘導することが可能であった。CNS 細胞での *DYRK1A* 遺伝子および *APP* 遺伝子発現レベルについての検討では、CTR 群と DS 群との比較より細胞株間での発現の差異の方が顕著である傾向がみられたが、CNS 細胞における神経細胞 - 星状膠細胞の割合や分化成熟度にもばらつきがみられたため、解釈はより純度の高い細胞で行うことが適切と考えられた。

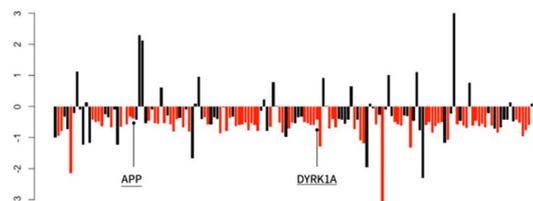
(3) 大脳オルガノイドの作成と病態解析

オルガノイド法ではマウスで得られた知見と同様、初期の細胞増殖とオルガノイドの大きさに差が見られた。長期培養 (196 日間) のオルガノイドの病理組織解析では、皮質構造の厚みに差がある傾向が観察されたが、今回標的とした β -アミロイドおよびタウタンパク質についてはタンパク質レベルでは有意な所見は得られなかった (未公表データ)。

(4) ミクログリアの分化誘導と病態解析

iPSC 由来ミクログリアを用いた遺伝子発現解析では、CNS 細胞と同様に *APP* 遺伝子と *DYRK1A* 遺伝子の約 1.5 倍程度の発現上昇を認めた。また、21 番染色体上に位置するその他の遺伝子も、21 番染色体以外の染色体上の遺伝子と比較して DS-iPSC 由来のミクログリアで有意に高く、21 番染色体の増加が遺伝子発現そのものの上昇に一致していることが示された (図 2: 未公表データ)。

図2: ミクログリアにおける遺伝子発現の違い (cDS-iPSCとDS-iPSCとの比較)



DS-iPSC 由来ミクログリアは cDS-iPSC 由来ミクログリアと比して、貪食能に差が見られ、コレステロール代謝や肥満、動脈硬化のメカニズム等に関連した遺伝子の発現変動が見られた。このことは、脳内のスカベンジャー役を担っているミクログリアの機能不全を示唆し、病的 CNS 細胞の処理に関連した病態を形成している可能性がある。今後は CNS 細胞との共培養系などを用いて相互作用の解析を行い、DS における中枢神経病態の形成機構について検討していく予定である。また、大脳オルガノイドにおける β -アミロイドやタウタンパク質については、1 年未満の解析ではタンパク質レベルでの蓄積を確認することが難しい可能性があり、寧ろそれらの蓄積を促進する方法を検索する中で、病態を加速させる要因などを検討することに利用出来ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗屋智就
2. 発表標題 実践教育セミナー6 創薬研究・機器開発
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究協力者	萩原 正敏 (Hagiwara Masatoshi)		
研究協力者	井上 治久 (Inoue Haruhisa)		
研究協力者	齋藤 潤 (Saito Megumu)		

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