

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12788

研究課題名(和文) ヒト神経細胞サブタイプへの非遺伝子導入型ダイレクトリプログラミング法の開発

研究課題名(英文) Development of non-transgenic direct reprogramming method for human neuronal subtypes

研究代表者

戴平(Dai, Ping)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20291924

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)：6種類の低分子化合物と神経細胞培地との組み合わせを詳細に検討した結果、サブタイプドーパミン作動性様ニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの部分的な誘導が確認できた。本研究で明らかとなった低分子化合物による誘導できたドーパミン作動性ニューロンを用いたパーキンソン病の病態改善、またオリゴデンドロサイトを用いた神経変性疾患の一つである多発性硬化症の原因とされている髄鞘の損傷の改善・治療のため有用となる可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で6種類の低分子化合物と神経細胞培地との組み合わせにより、部分的に誘導できたサブタイプドーパミン作動性様ニューロンおよびオリゴデンドロサイトは、いずれも再生医療に不可欠な細胞であるにも関わらず、患者自身の細胞から移植治療に利用できるほど安全な神経系細胞を、迅速に準備できるに至っていない。そのため、更なる研究により、簡単に誘導されるドーパミン作動性様ニューロンおよびオリゴデンドロサイトは、有望なヒト細胞モデルとして、今後、創薬研究や臨床研究に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The direct conversion in a chemical compound-based manner is an ideal approach to further reduce the risk for tumorigenesis. In this research, as a result of detailed examination of the combination of six small molecule compounds and neuronal medium, the dopaminergic-like neurons and oligodendrocytes were at least partially converted from human dermal fibroblasts. The chemical compound-induced dopaminergic-like neurons and oligodendrocytes could be a promising model applicable for basic research, drug development, and clinical uses for the pathological improvement of Parkinson's disease and the neurodegenerative diseases.

研究分野：分子生物学、再生医学、分子遺伝学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 神経変性疾患 ドーパミン作動性ニューロン 運動ニューロン オリゴデンドロサイト 低分子化合物

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

パーキンソン病と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、加齢による異常たんぱく質の蓄積によって、それぞれ特定の神経細胞サブタイプであるドーパミンニューロンおよび運動ニューロンが長い時間をかけ変性・消失することにより発症する神経変性疾患である。一度発症した場合の根本的な治療には、特定の神経細胞の移植による失われた細胞の供給が必要となる。実際に iPS 細胞から分化させたドーパミンニューロンの前駆細胞が、パーキンソン病モデルのカニクイザルに移植され、その症状が緩和したことが報告されている (Kikuchi T., *et al.*, *Nature*, 548, 592-596, 2017)。しかし、将来的に多数の患者への臨床応用を考えた場合、現在の技術では個々の患者から iPS 細胞を樹立することが困難なことや、他家 (他人) の iPS 細胞を用いた場合、免疫抑制剤の使用が不可欠であり、その副作用から患者にとって大きな負担になる。また iPS 細胞から分化させた神経細胞は、未分化の幹細胞が残留することによる腫瘍化のリスクが無視できない問題となっている (図 1)。このように、より臨床応用に適したより安全な神経細胞を誘導する技術の開発が必須となっている。

応募者はこれまで、低分子化合物のみによる神経細胞のダイレクトリプログラミングを世界に先駆けて成功しており、本研究ではこれをさらに発展させ、特定の神経細胞サブタイプへの直接誘導を試みる。化合物を用いる手法では、遺伝子の導入が必要ないため感染や腫瘍化のリスクが低いことや、幹細胞の残留による腫瘍化のリスクがない。また、患者自身の細胞から化合物を用いて短期間 (数週間) で誘導することができれば、免疫拒絶反応がない移植治療に最適な細胞となると期待される (図 1)。

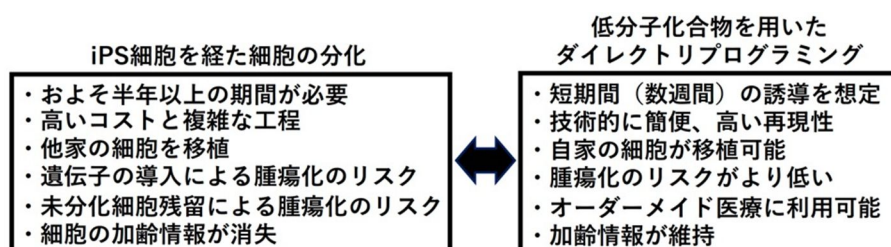


図 1. iPS 細胞を経た細胞の分化と低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングによる細胞の誘導の比較

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子の導入を避け、種々のシグナル伝達経路やヒストン修飾酵素を制御する低分子化合物を同時に用いることによって、ヒト線維芽細胞から特定の神経細胞サブタイプであるドーパミンニューロンおよび運動ニューロンへダイレクトリプログラミングすることである (図 2)。そして本研究の学術的独自性は、臨床応用のため安全性を損ねる遺伝子の導入や多能性幹細胞の使用を避け、患者自身の細胞を用いた特定の神経細胞サブタイプへの直接誘導を試みることにある。また、患者本人から短期間で誘導されるこ

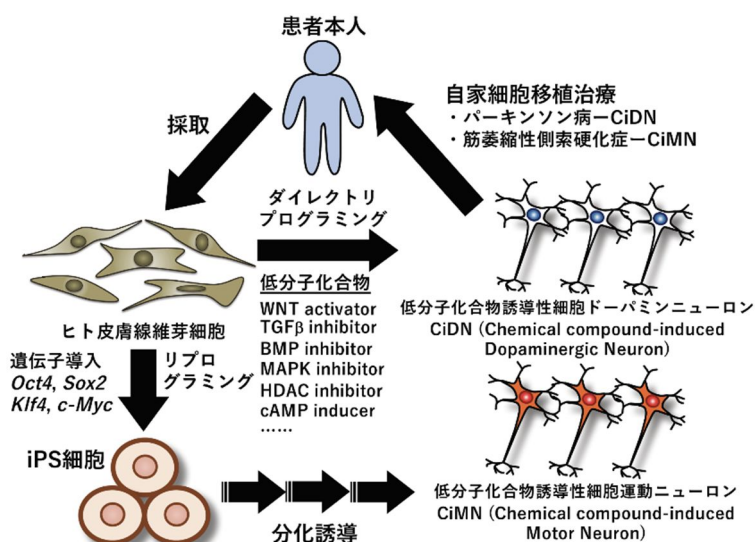


図 2. 低分子化合物を用いたドーパミンニューロンと運動ニューロンのダイレクトリプログラミング

これらの神経細胞を用いて、薬理試験や毒性試験を行うことが可能であり、より効果の高い神経変性疾患治療薬の選択や副作用の可能性のある薬の回避といったオーダーメイド

医療に利用可能である。

低分子化合物を用いてダイレクトリプログラミングされる上記の神経細胞は、ドナーの加齢情報を維持している可能性がある。パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患は、細胞の老化を主な原因とする加齢関連疾患として捉えられているが、細胞が一度 iPS 細胞へ初期化されると細胞の若返りが起こり、加齢情報の大部分を消失してしまう (Ocampo A., *et al.*, *Cell*, 167, 1719-1733, 2016)。本研究の手法では、iPS 細胞のような多能性の状態を経ないため、加齢情報を維持したヒト神経細胞モデルを構築できる可能性がある。これは、加齢により現れる新規な発症メカニズムの解明や標的分子の同定、創薬研究のためのスクリーニングなど多くの重要な研究へ発展する可能性がある。ヒトにおける神経細胞の研究は、試料を手に入れることが非常に困難なため手法が限られており、本研究のような新規なヒト神経細胞モデルの構築は、未だ不明な点の多い神経変性疾患の発症原因の解明や、創薬研究に利用されることが期待される。

3. 研究の方法

I ドーパミンニューロンおよび運動ニューロンへの直接誘導

我々の研究室から報告した神経細胞への直接誘導を可能とした6種類の低分子化合物(表1)が、特定の神経細胞サブタイプの直接誘導でも必要である可能性が高い。特に、WNT シグナル経路の活性化剤である CHIR99021 と TGFβシグナル経路の阻害剤である SB431542 は、線維芽細胞の可塑性を向上させる上で重要であると考えられる。さらにドーパミンニューロンおよび運動ニューロンの機能および分化に重要であると報告されている、あるいは可能性のある低分子化合物とサイトカイン(表2)を組み合わせ使用して使用する。これら様々な低分子化合物の組み合わせを、数種類の神経細胞用培地に添加し、ヒト線維芽細胞に対して濃度と培養時間(2~4週間)を変動しながら条件検討を行う。最終的に年齢と性別の異なる複数のヒト線維芽細胞から、最も効率的にこれらの細胞を誘導する低分子化合物の組み合わせと培養条件について決定する。また片岡製作所の協力のもと、速やかに特許の出願を行う。

ドーパミンニューロンと運動ニューロンの同定には、それぞれの細胞に特異的な遺伝子、TH(チロシンヒドロキシラーゼ)と ChAT(コリンアセチルトランスフェラーゼ)の発現を、リアルタイム PCR と免疫染色によって検出することで行う。

CiN から CiDN および CiMN への直接誘導

我々が報告した低分子化合物誘導性神経細胞(CiN)は、他のニューロンへの分化の可能性を残した比較的未成熟な状態であると考えられた。そこで線維芽細胞から CiN 細胞を一度誘導し、次に表2の化合物を組み合わせることにより、CiN を中間体として CiDN と CiMN へ誘導が可能かどうか検討する。

CiDN および CiMN における機能および発現解析

上記から誘導される CiDN と CiMN の候補について、それぞれの神経細胞における

表1. 神経細胞の直接誘導に必要な6種類の低分子化合物

Name	Functional annotation
CHIR99021	GSK3β inhibitor
PD0325901	MAPK signaling inhibitor
LDN193189	BMP signaling inhibitor
Pifithrin-α	P53 inhibitor
Forskolin	cAMP inducer
SB431542	TGFβ signaling inhibitor

表2. ドーパミンニューロンおよび運動ニューロンの機能および分化に重要な低分子化合物およびサイトカイン

• Dopaminergic neuron	
Name	Functional annotation
A83-01	TGFβ signaling inhibitor
Y-27632	Rock inhibitor
Puromophamine	Sonic hedgehog signaling pathway agonist
Dorsomorphin	BMP signaling inhibitor
SB431542	TGFβ signaling inhibitor
DAPT	γ-secretase inhibitor
LY364947	Selective TGFβR1 inhibitor
bFGF	Basic fibroblast growth factor (cytokine)
FGF8	Fibroblast growth factor 8 (cytokine)
NGF	Neural growth factor (cytokine)
GDNF	Glial-cell neurotrophic factor (cytokine)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (cytokine)
TGFβ3	TGFβ receptor ligand (cytokine)
• Motor neuron	
Name	Functional annotation
Puromophamine	Sonic hedgehog signaling pathway agonist
SAG	Sonic hedgehog signaling pathway agonist
Retinoic acid	RAR, RXR pan-agonist
dbcAMP	Increase of cellular cAMP
Retinoic acid	Retinoic acid receptor (RAR) agonist
LY294002	PI3K/Akt signal pathway inhibitor
GDNF	Glial-cell neurotrophic factor (cytokine)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (cytokine)
NT3	Neurotrophin-3 (cytokine)
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (cytokine)

ドーパミンおよびアセチルコリンの分泌や電気生理学的特性を解析し、iPS 細胞から分化させたこれらの神経細胞と同様と比較する。また、これら神経細胞の遺伝子発現を RNA-Seq 解析によって網羅的に解析し、iPS 細胞由来の神経細胞と比較することで、細胞のキャラクタリゼーションを行い臨床応用が可能かどうか検証する。

CiDN および CiMN への直接誘導メカニズムの解析

CiDN および CiMN の直接誘導に必要な低分子化合物を一つずつ除いて細胞を培養することにより、それが制御するシグナル伝達経路の重要性を評価する。そして、これらの分化・機能に主要な転写因子 (*Lmx1a* や *HB9* など) における発現活性化の分子機構について、エピジェネティクスの観点から解析し、直接誘導メカニズムの一端を解明する。

免疫不全マウス脳内に移植された CiDN および CiMN の生着および機能解析

上記の実験により機能の確認された CiDN および CiMN を、それぞれ免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の脳内に移植する。数週間後、ヒトに特異的な抗体を用いて免疫染色を行い、生体内における CiDN および CiMN の生着とその機能性について解析する。

4. 研究成果

(1) ドーパミンニューロンへの直接誘導低分子化合物及び分化誘導培地の条件検討

研究実施計画に則り、神経細胞へのダイレクトリプログラミングを可能とする 6 種類の低分子化合物に加え、目的とするドーパミン作動性ニューロンサブタイプへの誘導を試みた。具体的には、これら低分子化合物の組み合わせを神経細胞用培地に加え、濃度と培養時間 (数週間) を変化させながら、ヒト皮膚由来線維芽細胞を培養した。神経細胞用培地の組成についても、添加物やベースとなる基本培地 (Nurobasal 培地と DMEM/F12 培地) を様々に変化させ、条件検討を行った。誘導後、線維芽細胞から誘導される神経様細胞について、細胞体や軸索の長さなどの形態変化からドーパミン作動性様ニューロンの直接誘導ができた (図 3)。

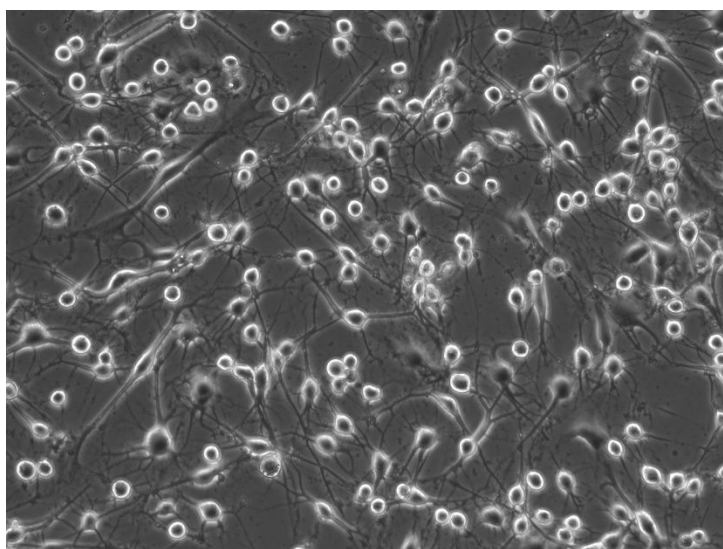


図 3. 低分子化合物誘導性ドーパミン作動性様ニューロン

更に、ドーパミン作動性ニューロンに特異的な遺伝子の発現についてそれぞれ解析を行った (図 4)。その結果、特定の条件において、ドーパミン作動性ニューロンに特異的な遺伝子である *Nurr1* や *Th* (チロシンヒドロキシラーゼ) といった遺伝子の発現が活性化していることが判明した。この結果は、低分子化合物のみで神経細胞サブタイプを誘導する実験条件を決定するために大きな進展であると考えられる。

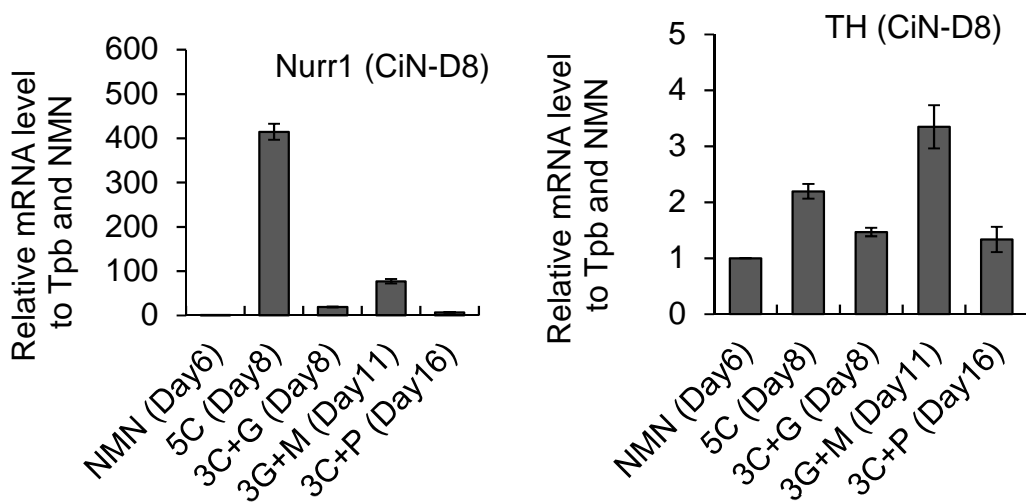


図 4. 低分子化合物誘導性ドーパミン作動性様ニューロン特異的な遺伝子発現

(2) グリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトのダイレクトリプログラミング
 特定の神経細胞サブタイプの誘導条件についてさらに検討するため、低分子化合物の種類と培養時間を変化させながら、ヒト線維芽細胞を培養した。その結果、当初予定していた細胞とは異なり、4種類の化合物を添加した神経細胞用培地で培養したところ、グリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトの遺伝子マーカーOlig2の発現が活性化しており、オリゴデンドロサイトの部分誘導が進んでいることが判明した(図5、図6)。
 本研究で明らかとなった低分子化合物による誘導できたドーパミン作動性ニューロンを用いたパーキンソン病の病態改善、またオリゴデンドロサイトを用いた神経変性疾患の一つである多発性硬化症の原因とされている髄鞘の損傷の改善・治療のため有用となる可能性がある。また、これらの細胞を創薬研究や臨床研究に応用するための科学的基盤とする。

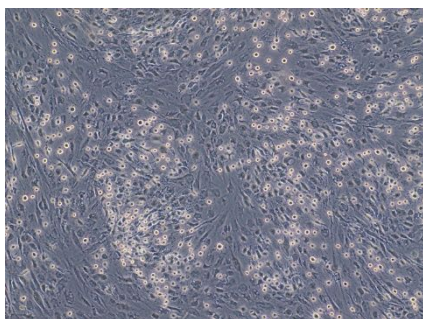


図 5. 低分子化合物誘導性オリゴデンドロサイト様グリア細胞

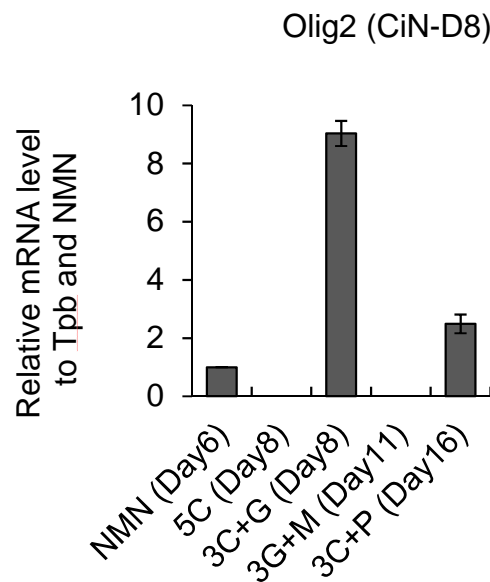


図 6. オリゴデンドロサイト様グリア細胞特異的な遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeda Yukimasa, Dai Ping	4. 巻 10
2. 論文標題 A developed serum-free medium and an optimized chemical cocktail for direct conversion of human dermal fibroblasts into brown adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60769-x	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 Takeda Yukimasa, Yoshikawa Toshikazu, Dai Ping	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome analysis reveals brown adipogenic reprogramming in chemical compound-induced brown adipocytes converted from human dermal fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84611-0	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 Takeda Y, Dai P.	4. 巻 12
2. 論文標題 Capsaicin directly promotes adipocyte browning in the chemical compound-induced brown adipocytes converted from human dermal fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10644-8.	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2件

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 270
3. 書名 ダイレクトリプログラミング-再生医療の新展開 第2編第6章	

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社ニューサイエンス社	5. 総ページ数 62
3. 書名 Medical Science Digest	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【論文掲載】皮膚線維芽細胞から低分子化合物・無血清培地でヒト褐色脂肪細胞を誘導～簡便かつ短期間で作製 https://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2020/20200303.html</p>
--

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	武田 行正 (Takeda Yukimasa) (40735552)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

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