

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16930

研究課題名（和文）神経変性疾患iPS細胞研究の基盤となる老化脳内環境モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of an aging brain environment model as a basis for iPS cell research on neurodegenerative diseases.

研究代表者

志賀 孝宏（Takahiro, Shiga）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：50784378

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）：近年、iPS細胞を用いた神経変性疾患モデルでは脳内環境の複雑なネットワークを再現する必要があると考えられるようになり、三次元培養が注目されている。しかし、高齢期の脳構造を *in vitro* で再現することは困難であり、患者剖検脳で観察される病態を明確に検出することができていない。

本研究は、従来の2D培養を使用しながら、加齢と細胞間相互作用を含む脳内環境の模倣を組み合わせることによる神経変性疾患の病態解析システムを構築し、従来の単独培養や3次元培養で実現出来なかった高精度な病態解析と創薬を実現する基盤システムを開発した。これらの研究成果は、適宜学会で発表し、一部は特許申請を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立された技術は、多検体の高齢発症神経変性疾患病態解析や創薬スクリーニングに適した手法の開発を目的として構築した基盤システムであり、従来の単層培養法と比較して高精度な結果を得ることができる。さらに、時間軸・脳内環境を模倣したモデルのため、ヒト剖検脳に近いデータを取得できる可能性を秘めている。また、様々な神経変性疾患にも応用可能なシステムなため、効率的に病態表現型や創薬スクリーニングを行うことができる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become necessary to reproduce the complex network of the brain environment in iPS cell-based neurodegenerative disease models, and three-dimensional culture has been attracting attention. However, it is difficult to reproduce the brain structure during aging, and the pathological conditions observed in patient autopsy brains have not been clearly detected.

In this study, while using conventional 2D culture, we constructed a pathological analysis system for neurodegenerative diseases by combining aging and mimicry of the brain environment including cell-cell interactions, and developed a basic system to achieve highly accurate pathological analysis and drug discovery, which could not be achieved by conventional stand-alone culture or 3D culture. These research results were presented at conferences as appropriate, and some of them were applied for patents.

研究分野：病態神経科学

キーワード：iPS細胞 パーキンソン病 老化 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

現在、ヒトの平均寿命は長くなり、国際的にも高齢社会が進んでいる。加齢と深く関与している疾患として、アルツハイマー病やパーキンソン病を含む神経変性疾患を患うヒトの増加が懸念されている。神経変性疾患には根本的な治療は存在しておらず、いまだに対処療法が主である。

これまでの iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究は、ニューロン (Stem Cell Reports, 2017 など)、グリア系細胞 (Stem Cell Reports, 2014 など)といったそれぞれの細胞における病態に焦点を当てている。一方で、近年の神経変性疾患研究では、これまでニューロンが主たる病因と考えられてきた疾患においても、グリア系細胞による病態への寄与 (Trends Neurosci. 2017, Neurotherapeutics, 2010 など) が明らかになってきた。従って iPS 細胞を用いた神経変性疾患モデルにおいても脳内環境の複雑なネットワークを再現する必要があると考えられるようになった。この問題を解決するために、脳構造と老化を模倣したモデルとしてオルガノイドが近年着目されている。しかしながら煩雑で長期的な培養が必要な現在のオルガノイド培養法では、高齢期の脳構造を再現することは困難であり、患者剖検脳で観察される病態を明確に検出することができない。一方で、平面培養 (2D 培養) による神経変性疾患の解析システムは、創薬などのハイスループット化の実現に関しては比較的容易な方法であるが、脳内環境を模倣していないという点で in vivo における完全な病態の再現性に改良の余地がある。それに加えて一部のパーキンソン病やアルツハイマー病など高齢期に発症にする異常タンパク質凝集を有する神経変性疾患については、数十日程度の長期間培養を行っても患者で数十年かかる病態変化を再現することが難しい。また、病態に関与する異常タンパク質を in vitro で検出することは、ヒト剖検脳と比較して明確な病態表現型を観察することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来の 2D 培養を使用しながら、加齢と細胞間相互作用を含む脳内環境の模倣を組み合わせることによる神経変性疾患の病態解析システムを構築し、従来の単独培養やオルガノイドで実現出来なかった高精度な病態解析と創薬を実現することである。

3. 研究の方法

(1) 申請者が同定した老化を促進させる化合物 JA 1 (特許出願中) を用いることで、iPS 細胞由来神経細胞の老化速度を速めることに成功している。化合物を用いない長期培養と化合物により老化が促進された短期培養を比較し、JA 1 が老化速度をどれくらい早めるかの検証を行った。

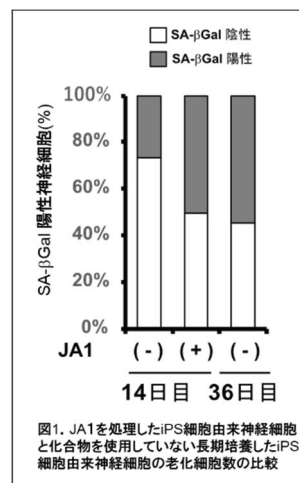
(2) JA 1 が誘導する老化促進現象がヒト体細胞の加齢とどの程度類似しているのかを検証するため、マイクロアレイを用いた解析を行った。

(3) 申請者が誘導法を確立した iPS 細胞由来アストロサイトとニューロンの共培養を用いて、経時的に同期バースト発火やスパイク数の変動をマルチ電極アレイで測定した。単層培養および共培養時における成熟指標 (同期バーストやスパイク数) への影響を検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞を用いた神経疾患モデルは、分化成熟速度が極端に遅いため高齢発症神経変性疾患の病態表現型検出に長期間の培養を要することが大きな課題である。この課題を解決するために、iPS 細胞由来神経細胞に早老症遺伝子 (progerin) の導入 (Cell Stem Cell, 2013) やテロメア合成酵素の阻害 (Cell Stem Reports, 2016) といった方法が確立されてきた。しかしながら、これらの方法は煩雑な技術が必要であり、神経細胞の老化を微弱にしか促進させることができない。

我々は、先行研究にて同定した JA 1 が iPS 細胞由来神経細胞の成熟・老化速度を促進することを確認しているが、どの程度短縮できるかは不明であった。そこで、化合物 JA 1 を処理した iPS 細胞由来神経細胞と化合物を使用していない長期培養した iPS 細胞由来神経細胞を比較してどの程度の影響があるかをイメージングサイトメーターで解析した。JA 1 を処理せずに 14 日間培養した神経細胞では、老化マーカーである SA-βGal 陽性の細胞が約 20% と低値であった。また、36 日間培養を行った神経細胞 (長期間培養) では、約



50%の神経細胞が SA-βGal 陽性であり、培養日数依存的に老化細胞が増加していることが確認された。一方で、JA1 を 14 日間処理して培養した iPS 細胞由来神経細胞では、約 50%の神経細胞が SA-βGal 陽性が確認された。このことから、JA1 を処理することにより、半分の培養期間で老化細胞した神経細胞へと分化させることが可能であることを見出した。他のマーカーである、LaminB1 の発現低下、テロメアの短縮やタンパク質分解機能の低下といった他の老化表現型に関しても同様に短縮できることが観察された。これらの結果から、化合物 JA1 を用いた培養システムは、成熟/老化を促進させることにより病態特異的な表現型を検出することが困難である神経変性疾患に対して有用なツールとして期待できる。現在、パーキンソン病 iPS 細胞由来神経細胞やアルツハイマー病 iPS 細胞由来神経細胞に応用しているが、これまで長期間必要だった病態表現系を短期間の培養で取得できることを確認できている。

(2)JA1 を処理することにより、老化速度の促進がヒト体細胞の加齢と同じであることを検証するためマイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。JA1 を 72 時間処理した若年性線維芽細胞と無処理の若年性線維芽細胞を比較した結果、発現が増加した遺伝子は 144 遺伝子、発現が低下する遺伝子は 110 遺伝子あることを見出した。次に、若年性線維芽細胞と高齢の線維芽細胞の遺伝子パターンを比較し、JA1 処理依存的に変動した遺伝子との一致率を算出した。その結果、JA1 を処理により発現が増加した遺伝子の約 27%(114 遺伝子中 40 遺伝子)、発現が低下した遺伝子では 47%(110 遺伝子中 52 遺伝子)が一致していることが分かった。また、若年性線維芽細胞に JA1 を処理することにより、高齢性線維芽細胞と同等の SA-βGal 陽性細胞、老化特異的な表現型を有することを確認している。

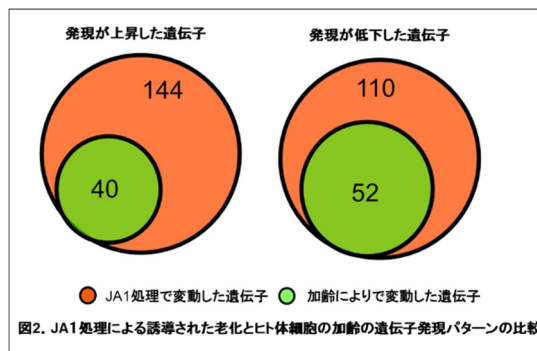


図2. JA1 処理による誘導された老化とヒト体細胞の加齢の遺伝子発現パターンの比較

このことから、JA1 処理による遺伝子の変動は、ヒト体細胞の加齢による遺伝子変動パターンと似ていることから、ヒトの加齢を模倣している可能性が示唆された。

(3)これまでの iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究は、ニューロン、グリア系細胞といったそれぞれの疾患感受性細胞そのものにおける病態に焦点を当てている。しかしながら、近年の神経変性疾患研究ではこれまでニューロンが主たる病因と考えられてきた疾患においても、グリア系細胞による病態への寄与(Nature.2020, Trends Neurosci. 2017, Neurotherapeutics. 2010 など)が明らかになってきた。従って iPS 細胞を用いた神経変性疾患モデルにおいても脳内環境の複雑なネットワークを再現する必要があると考えられるようになった。この問題を解決するために、脳構造を模倣したモデルを作製する必要がある。

我々は、iPS 細胞からアストロサイトを約 50 日程度で分化させる方法を確立している。脳内環境を模倣するため、iPS 細胞由来神経細胞と iPS 細胞由来アストロサイトを共培養することにより、脳内の複雑なネットワークと神経成熟を促進させるシステムを開発した。神経ネットワーク構築の評価は、マルチ電極アレイ(MEA) system を使用して、神経成熟の指標として発火頻度(Firing Rate)、神経細胞間のネットワーク構築を評価する指標として同期バースト(Network Bursts)を計測した。MEA で測定した結果、神経細胞の単培養では 27 日間培養しても同期バーストは観察されず、神経のネットワークが構築されていないことが観察され、発火頻度も 1Hz と非常に低かった。一方で、iPS 細胞由来神経細胞/アストロサイトを共培養した well では、培養 27 日目に同期バーストが頻繁に観察され、単培養と比較して有意に増加していることが観察された。発火頻度においても、単培養と比較すると 3 倍程度増加していた。このことから、我々が構築した共培養システムは従来の単層培養と比較して、神経成熟速度・ネットワーク形成を促進させることで、脳内環境を模倣できていることが示唆された。

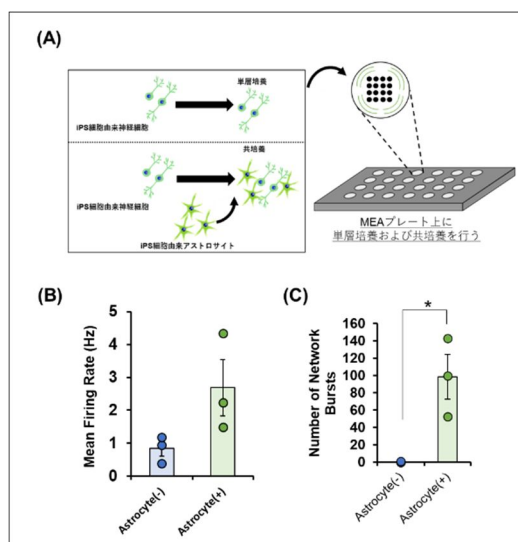


図3. MEAを用いた神経ネットワーク構築の評価 (A) MEAプレートへの単層培養および共培養の模式図。(B)共培養における自己発火率は増加傾向を示した($p = 0.1061$)。(C)共培養時の同期バーストは優位に上昇する($**p < 0.05$)。

本研究において以上(1)-(3)の結果を得ることで、高齢発症神経変性疾患に対する新たな技術を確認することができた。近年、脳構造を模倣したモデルとしてオルガノイドなどの3次元培養のオルガノイドが注目されているが、形態の均一性という観点からは薬剤スクリーニングなど

には不向きであるという大きな欠点が存在する。我々が構築している時間軸・脳構造を模倣した2D培養モデルは、加齢や細胞間相互作用といった脳内の環境・ネットワークを均一に再現できるシステムである。本研究で構築した2D培養モデルは、多検体の神経変性疾患を対象とした精度の高い病態解析や創薬スクリーニングに有用なモデルとなり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Shirai Kyoko, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Shiga Takahiro, Chen Cheng, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kawano Atsushi, Kamiya Kazusaku	4. 巻 47
2. 論文標題 Generation of two induced pluripotent stem cell lines from PBMCs of siblings carrying c.235delC mutation in the GJB2 gene associated with sensorineural hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101910 ~ 101910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101910	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Shiga Takahiro, Chen Cheng, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Matsuoka Rina, Anzai Takashi, Hibiya-Motegi Remi, Tajima Shori, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kamiya Kazusaku	4. 巻 43
2. 論文標題 Generation of the induced pluripotent stem cell (hiPSC) line (JUFMD0i004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p.V37I) mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101674 ~ 101674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101674	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 志賀孝宏
2. 発表標題 iPSC-based disease modeling for late onset neurodegenerative diseases using a chemical compound accelerating senescence
3. 学会等名 第16回 成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Shiga
2. 発表標題 iPSC-based disease modeling for late onset neurodegenerative diseases using a chemical compound accelerating senescence
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経細胞の成熟老化促進剤	発明者 赤松和土、志賀孝 宏、岡野栄之、葛巻 直子	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-073340	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------