

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20683

研究課題名（和文）脆弱X症候群モデル神経細胞における活動パターンの多様性とその応用

研究課題名（英文）Evaluation and application of the diversity of activity patterns in the population of fragile X syndrome neurons

研究代表者

矢田 祐一郎 (Yuichiro, Yada)

広島大学・統合生命科学研究科（理）・研究員

研究者番号：80805797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：脆弱X症候群（FXS）は学習障害、認知障害などが生じる遺伝性の疾患であるが、どのような電気生理的基盤に基づいて生じるのか完全には解明されていない。本研究では疾患特異的iPS細胞から分化誘導した神経細胞と多点電極アレイ、パターン解析技術を用いてFXSの電気生理的異常を明らかにすることを目指した。初めに、準備した細胞株がFXS特異的な遺伝子型・表現型を持つことを確認した。FXS患者由来の神経細胞は健常者由来に比べて高い発火率を示し、先行研究で報告された発火率上昇が使用細胞株でも認められた。また、FXS患者由来神経細胞・健常者由来神経細胞神経同期バーストが発生する時期にばらつきが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脆弱X症候群患者ではFMRPタンパクの発現が消失し、シナプス・イオンチャネルで様々なタンパク質が過剰発現する。FMRP消失が認知障害を引き起こす生理的なメカニズムは複雑であり、詳細は明らかでない。本研究においてFXS患者由来iPS細胞およびiPS細胞から分化誘導した神経細胞に対する電気生理計測系・取得した計測データ解析系の構築・基礎的な評価を実施し、使用した細胞でFXSでの電気生理的異常を同定する手がかりとなるような示唆を得た。

研究成果の概要（英文）：Fragile X syndrome (FXS) is an inherited disorder that causes learning disabilities and cognitive impairment. The electrophysiological basis that causes the disorder is not fully understood. In this study, we aimed to clarify the electrophysiological abnormalities of FXS using neurons derived from disease-specific iPS cells, multi electrode arrays, and pattern analysis techniques. First, we confirmed that the prepared cell lines has FXS-specific genotypes and phenotypes. Then, neurons derived from FXS patients showed higher firing rates than those from healthy controls. The increased firing rates reported in previous studies were also observed in the cell lines used in this study. In addition, there was variation in the initiation timing of neuronal synchronized bursts between FXS patient-derived and healthy control-derived neurons.

研究分野：神経工学

キーワード：脆弱X症候群 疾患特異的iPS細胞 多点電極アレイ 活動多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脆弱 X 症候群 (FXS) は遺伝性の疾患であり、男性では 1/4000、女性では 1/8000 程度の頻度で生じる。症状は男性で重篤で、長い顔、耳など身体的特徴に加えて、学習障害、言語障害、そしてワーキングメモリの低下等の認知障害を生じる。疾患の原因は、X 染色体の *FMR1* 領域での CGG 配列のリピートが過剰に増える変異である。健常者では ~40 程度のリピートしかないが、FXS 患者では 200 リピートを超える。*FMR1* 領域に長い CGG リピートが生じると、*FMR1* 遺伝子にコーディングされるタンパク質 FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) が発現しなくなる。FMRP は神経細胞同士の接続部位であるシナプスでのタンパク質やイオンチャネルタンパク質に関係し、基本的にはこれらのタンパク質発現を抑制する働きを持つ。FMRP の発現が消失すると、シナプス・イオンチャネルでタンパク質が過剰発現する。FMRP は極めて多種のタンパク質に関連するため、FMRP 消失が認知障害を引き起こすメカニズムは複雑であり、詳細は明らかでない。

これまで FXS の電気生理的な表現型の研究は主に *Fmr1* 遺伝子をノックアウトした *Fmr1* KO マウスで行われてきた。*Fmr1* KO マウスは FXS 患者と類似した認知機能低下を呈することが知られている [Krueger et al., 2011]。*Fmr1* KO マウスでの電気生理実験から、in vivo、in vitro (スライス、初代分散培養) の大脳皮質や海馬で、神経細胞の発火活動の亢進、細胞間同期活動の亢進、細胞間結合強度の上昇、そして “up-state” (= 神経細胞群が再帰的に連続して高頻度で発火し続ける期間) の時間長が延長すること等が in vivo, in vitro で報告されてきた [Contractor et al., 2015]。up-state は脳がワーキングメモリ機能を実行する神経基盤ではないかとも考えられている。ワーキングメモリとは、脳が一時的に情報を保持し、保持している情報に基づいて行動するのに必要な機能である。霊長類での実験から、ワーキングメモリ・タスクを与えると、脳の前頭前野に、情報を覚えている必要がある期間中 up-state が持続する神経細胞があると知られている。up-state がワーキングメモリに関連する現象と考えられることから、*Fmr1* KO マウスを用いた研究でも up-state 過剰延長が生じる分子メカニズムや、治療薬候補について多くの研究が行われてきた。ここで疑問となるのは、up-state がワーキングメモリの実行基盤ならば、その延長は単に記憶保持期間が長くなるポジティブな影響を持ちうるはずなのに、何故 FXS 患者や *Fmr1* KO マウスで認知機能低下が生じるのか、ということである。up-state 過剰延長は認知機能低下と関連する他のネガティブな変化と連動して生じているのかもしれない。申請者は、FXS では脳の神経細胞集団で発火パターンの多様性が失われて画一的になっており、そのことが認知機能低下の背景にあるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

FXS では神経細胞集団の発火パターンに多様性が失われて画一的になっている、という仮説を元に、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞と多点電極アレイ、パターン解析技術で仮説を検証することを本研究の目的とする。また、カルシウムイメージングでも神経活動の多様性を測定する系を確立し、神経活動多様性を指標とした薬剤スクリーニング系への応用を検討する。

3. 研究の方法

本研究ではまず、FXS 患者由来 iPS 細胞 (疾患株) から神経細胞を分化誘導する。iPS 細胞に *NGN2* 遺伝子を導入することで、高純度で成熟までの期間が短い神経細胞 (iN) を誘導できる [Zhang et al., 2013]。得られた神経細胞をマルチウェル多点電極アレイに播種し、電気生理計測系の検討・計測を実施する。多点電極アレイはアレイ状の平面電極群上に細胞培養ができ、神経細胞の発火など電気活動を複数の細胞から捉えられる。同様の実験を健常者由来 iPS 細胞 (健常株) から分化誘導した神経細胞でも実施し、先行研究で報告された FXS 神経細胞での発火率上昇が本研究の系でも再現される事を確認する。取得した電気生理データに対して、神経細胞集団発火パターンの多様性を解析する。

4. 研究成果

FXS 患者の iPS 細胞から神経細胞 (iN) を分化誘導した。FXS では、X 染色体の責任遺伝子 *FMR1* 領域に存在する CGG リピートの長さが 200 リピート以上に延長していることが知られている。(通常は 40 リピート未満)。使用した FXS 患者由来 iPS 細胞から抽出したゲノム DNA がこの条件を満たすかどうか、PCR に基づく手法でリピート長を確認した。また、対照群として使用する健常者由来細胞のゲノム DNA でのリピート数も確認し、通常の範囲内であることを確認した。FXS では、*FMR1* のプロモータ領域でメチル化が生じ、その転写・翻訳が行われなくなる。FXS 患者由来 iPS 細胞・健常患者由来 iPS 細胞から抽出したゲノム DNA の *FMR1* 領域をバイサルファイトシーケンシングした結果、FXS 株でのみ *FMR1* のプロモータ領域の顕著なメチル化が生じていた。iPS 細胞および分化誘導した神経細胞に対して、qPCR およびウェスタンブロッティングを実施し、転写物の *FMR1* mRNA および翻訳物 FMRP の産生が減少していた。*FMR1* mRNA の産出減少はバルクでの RNA-seq でも顕著な発現変動を示す RNA として認められた。以上から、準備した細胞

が FXS の疾患モデル細胞として使用するために必要な遺伝子型・表現型を持つことを確認することができた。

FXS 患者由来の神経細胞は健常者由来神経細胞に比べて高い発火率を示し、先行研究で報告されていた FXS 患者由来の神経細胞での発火率上昇が本研究で使用した細胞株でも認められた (Figure 1)。FXS 患者由来神経細胞・健常者由来神経細胞集団での神経同期バーストを比べると、神経同期バーストが発生する時期にばらつきが見られた。FXS による FMRP の産生減少は神経発生にも影響を与えると考えられており、このばらつきはその影響によって生じた可能性が示唆される。取得したデータに対して活動パターンの解析を実施・評価した。また、観測したい表現型を鑑みて、1細胞あたり複数の電極から電気計測を可能にする高密度 CMOS 電極アレイを用いた実験系での計測、及び、一般的な多点電極アレイでは 2 次元の計測対象から電気生理計測が可能であるが、3 次元の計測対象に対する電気生理計測を実現するための実験系の構築および計測試験を実施した。

本研究において FXS 患者由来 iPS 細胞および iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の基礎的な特徴評価、分化誘導した神経細胞に対する電気生理計測系・取得した計測データ解析系の構築・基礎的な評価を実施することができた。コロナウイルス蔓延防止のための令和 2 年 4 月の緊急事態宣言発令の影響により、所属機関が一時閉鎖となり、実験系を一定期間全て停止したことで当初の計画よりも遅れが生じたことから、当初目的とした薬剤探索および、カルシウムイオンインジケータを用いたカルシウムイメージングによるハイスループット評価系の確立は今後の課題として残された。

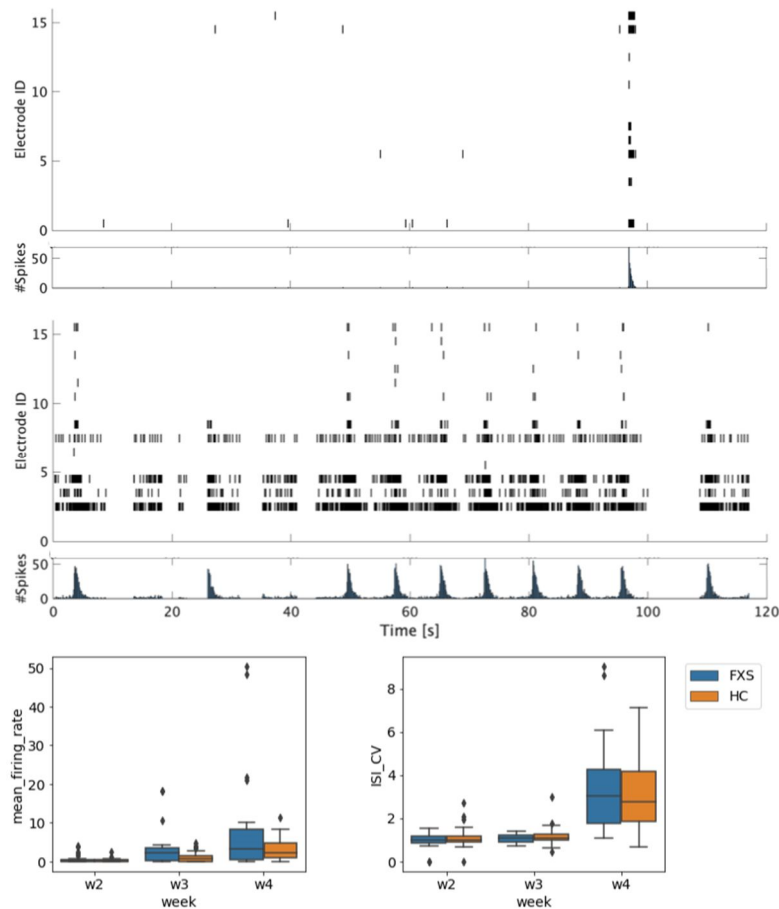


Figure. 1 マルチウェル電極アレイで取得した神経活動。(上段・中段)計測した健常者由来(上段)とFXS患者由来(中段)の神経細胞発火活動のラスタプロット。(下段)週毎の平均発火頻度及び発火間隔の変動係数。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Imamura Keiko, Yada Yuichiro, Izumi Yuishin, Morita Mitsuya, Kawata Akihiro, Arisato Takayo, Nagahashi Ayako, Enami Takako, Tsukita Kayoko, Kawakami Hideshi, Nakagawa Masanori, Takahashi Ryosuke, Inoue Haruhisa	4. 巻 89
2. 論文標題 Prediction Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis by Deep Learning with Patient Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 1226-1233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ana.26047	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 Yada Yuichiro, Kondo Takayuki, Suga Mika, Tsukita Kayoko, Enami Takako, Shibukawa Ran, Sagara Yukako, Okanishi Yasue, Imamura Keiko, Kihara Takeshi, Inoue Haruhisa	4. 巻 53
2. 論文標題 Human induced pluripotent stem cells generated from a patient with idiopathic basal ganglia calcification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102274 ~ 102274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102274	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢田祐一郎
2. 発表標題 2次元神経細胞集団の活動多様性と応用
3. 学会等名 第6回理論免疫学ワークショップ
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	井上 治久 (Inoue Haruhisa)		
研究協力者	今村 恵子 (Imamura Keiko)		

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