

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06095・19K21216

研究課題名（和文）クラスター化タンパク質によるヒトiPS細胞由来ドーパミン神経細胞の大量作製

研究課題名（英文）Controlling bi-directional Notch-Delta signaling in human iPSC derived dopaminergic neuron using multivalent protein.

研究代表者

大久保 佑亮（Okubo, Yusuke）

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究者番号：80596247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞を用いた再生医療の実現には多くの機能的な分化した細胞が必要である。本研究では、神経幹細胞の細胞分裂と分化を制御するNotch-Deltaシグナルをそれぞれ飛躍的に活性化するシグナル賦活化法を開発し、再生医療の一般化に向けた細胞の大量作製法の開発を試みた。ラットの神経前駆細胞を用いた実験により、適切な強さのNotchシグナルが神経幹細胞の増殖を亢進すること、Deltaシグナルが中枢神経においても神経分化を促進することを明らかにした。今後はヒトiPS細胞を用いドーパミン作動性神経細胞の大量作製法を開発する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療研究は世界中でなされており、小型動物を用いた有効な治療法が日々報告されている。しかしながら、ヒトは実験動物よりも大きいため再生医療の実用化を見据えた場合、移植に必要な細胞数の確保が問題となる。本研究では、細胞増殖と細胞分化をそれぞれ賦活化する手法を開発することで、mDA神経細胞の大量取得を目指す。本研究の実現により、細胞移植に必要な人的・時間的・設備的リソースが削減され、治療費の抑制や移植手術可能な病院の増加などパーキンソン病患者への再生医療治療の一般化につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：There is a strong need the numerous, functional dopaminergic neuron for Parkinson's disease therapy. To resolve it, we propose to control neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells by activating bi-directional Notch-Delta signaling. In this study, we tried to tune Notch-Delta signaling to precisely control the expansion and maturation of rat neural progenitor cells (rNPCs). To activate Notch (Delta) signaling, we created potent multivalent ligands made from the conjugation of Dll1 (Notch1) protein and hyaluronic acid. Dll1 protein, not multivalent Dll1 promoted cell proliferation of rNPC. On the other hands, we revealed that Delta signal promoted neuronal differentiation in rNPCs by both method, the overexpression of Dll1 intracellular domain and the addition of multivalent Notch1 protein. We plan to control bi-directional Notch-Delta signaling in human iPSC derived dopaminergic neuron using multivalent protein.

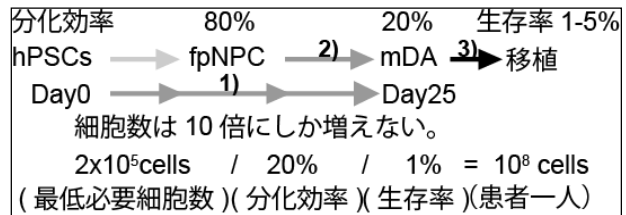
研究分野：幹細胞工学

キーワード：Notch-Deltaシグナル Multivalent ligands 神経新生 自己複製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療は、長年治療法が確立されていなかった組織・臓器の機能障害や機能不全に対して、根源的な治療を可能とする新しい医療である。しかしながら、治療の実現には多量の機能的な分化細胞が必要であり、分化率が低く細胞増殖に時間がかかるヒト細胞を用いた再生医療の大きな課題となっている。本研究の対象とするパーキンソン病の治療には、最低でも線条体毎に 10^5 個の機能的な中脳ドーパミン作動性 (mDA) 神経細胞を移植する必要があると報告されている。現在、ヒト多能性幹細胞 (hPSC) から mDA 神経細胞への分化は発生段階を模した Floor plate を経る方法が主流であり、Floor plate 神経前駆細胞 (fpNPC) への分化効率は 80% と効率が良いがチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 陽性 mDA 神経細胞への分化効率は 20% と低いことが明らかになっている。また、TH 陽性移植細胞の生存率は 1-5% 程度であり、現状では移植には 10^8 個の細胞が必要とされている。さらに、この方法では 25 日で 10 倍ほどにしか細胞が増えないことも細胞数の獲得を困難にしている。パーキンソン病の患者は日本には 14.5 万人、全世界では 500 万人いるとされ、その治療の実現のためには、莫大な細胞数が必要となる。



2. 研究の目的

Notch-Delta シグナルは発生期の中枢・末梢神経の神経分化を制御していることが知られている。fpNPC の mDA 神経分化においてもその他の中枢神経の神経分化と同様に Notch シグナルの低下は mDA 神経前駆細胞の早期の神経分化を引き起こし、結果として mDA 神経細胞の数が減少することが報告されている。このように Notch シグナルは神経前駆細胞の自己増殖を促進し、その抑制により神経分化が促進することが知られている。一方で、Notch シグナルは Delta から Notch への一方向性のシグナルとされているが、申請者は後根神経節の神経新生において Delta もまたシグナルを伝達し、Notch シグナルを抑制すること及び、Notch とは独立した経路により神経分化を促進することを明らかにした。これらの結果は、双方向の Notch-Delta シグナルを人為的に制御することで、fpNPC の自己複製と mDA 神経細胞への分化率を高め、mDA 神経細胞を大量供給できる可能性を示している。本課題では、我々が開発したタンパク質のクラスター化技術を用い、まずはラット神経前駆細胞 (rNPCs) において双方向に Notch-Delta シグナルを活性化させることで、神経細胞の細胞増殖と神経分化の賦活化が可能か検討する。

3. 研究の方法

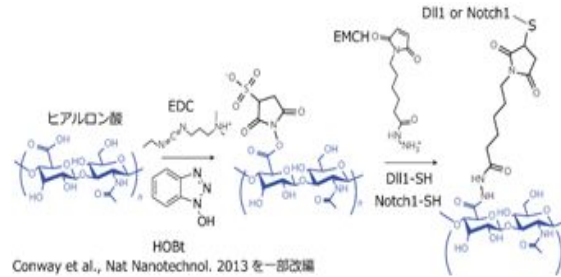
(1) 中枢神経における Delta シグナルの神経分化促進能の検証

我々はこれまでに Delta シグナルのエフェクターである Delta like 1 (Dll1) 細胞内ドメイン (D11CD) を後根神経節において発現させると細胞増殖を低下させ神経分化を促進することを明らかにしている。中枢神経系における Delta シグナルの役割を解析するために、Lentivirus を用い D11CD を海馬由来 rNPCs に強制発現させ、増殖培地 (20ng/mL の bFGF を加えた N2 サプリメント添加の DMEM/F12) から FGF を除いた分化培地において分化誘導を行った。神経細胞への分化は Tuj1 に対する免疫染色において解析した。

(2) Notch(Delta)シグナルを高効率で活性化させるタンパク質のクラスター化

栄養因子やモルフォゲンの受容体は通常は細胞膜上に散在しているが、リガンドとの結合を合図に散在する受容体が集合し、リガンド-受容体の多価結合を形成することでシグナルを伝達

することが知られている。このため、これらの中には単に培地や組織に加えただけでは十分に活性化できないシグナルが存在し、Notch-Delta シグナルもそうであった。我々はナノスケールでリガンドタンパク質をヒアルロン酸(HA)にクラスター化させることでリガンド-受容体の多価結合を誘導し、シグナル伝達を飛躍的に上昇させる技術を開発している(*Nat. Nanotechnol.* 2013)。この技術を用い、リガンドタンパク質を fpNPC においてその発現が確認されている Delta like 1 (DII1) (又は Notch1)の細胞外領域 (EC) の C 末に 6x ヒスチジンタグ及びシステインを融合させたタンパク質(DII1-EC、Notch1-EC)を 293F 細胞もしくは Expi293F 細胞に発現させ、大量の目的タンパク質を作製した。各タンパク質の C 末システインとヒアルロン酸のカルボキシ基を結合させるために次の反応を行った。1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)により 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT)をヒアルロン酸と脱水縮合させ、次に N-(E-maleimidocaproic acid hydrazide)(EMCH)と置換させる。EMCH のマレイミド基と DII1 (又は Notch1)のシステインと結合させる。クラスター化タンパク質のシグナル伝達能はヒアルロン酸の分子量とタンパク質の結合数の最適化を行うことで高いシグナル伝達能を発揮する。



(3) クラスター化 DII1(Notch1)のシグナル伝達能の評価系の開発

多様な組み合わせの全てを煩雑な操作と多大な時間がかかる hPSC からの mDA 神経細胞分化実験に用いることは難しい。そこで、まずこれまでに報告されている tet off システムを利用した Notch シグナルのレポーターアッセイ系並びにそれを改良したクラスター化 DII1 のシグナル活性化能の評価系の構築を試みた。しかしながら、Notch シグナル、Delta シグナル共に感度の良いレポーターアッセイ細胞株は樹立できなかった。そのため、クラスター化 DII1 の Notch シグナル活性化能は rNPCs を用い Notch シグナルの標的遺伝子である Hes1 の発現を RT-qPCR により評価した。Delta シグナルの標的遺伝子は明らかになっていないため、Delta シグナルの活性化により rNPCs が神経細胞に分化する際の形態変化に着目し、クラスター化 Notch1 のシグナル伝達能の評価を試みた。

(4) クラスター化 DII1 による rNPCs の細胞増殖の賦活化

96 穴プレートにおいて各ウェルに 5000 細胞の rNPCs を播種し、3 時間後に DII1-EC タンパク質、クラスター化 DII1 を加えた。毎日半分量の培地交換を行い 3 日後に Cell counting kit-8(同仁化学研究所)を用い細胞数を計測することで細胞増殖の賦活化作用を検証した。

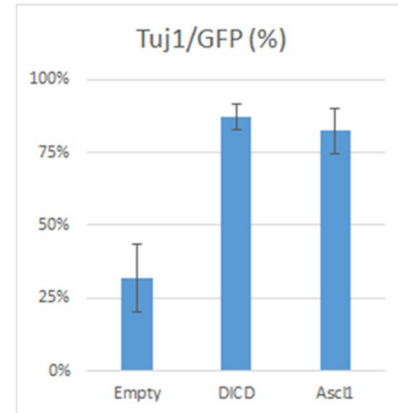
(5) クラスター化 Notch1 による rNPCs の神経分化の賦活化

8 ウェルチャンバースライドにおいて各ウェルに 20000 細胞の rNPCs を播種し、翌日から Notch1-EC タンパク質、クラスター化 Notch1、1%ウシ胎児血清+1 μ M レチノイン酸(陽性対照)を加え 6 日間分化誘導を行った。細胞数は Cell counting kit を用い、細胞分化は抗 Tuj1 抗体及び抗 GFAP を用いた免疫染色により解析した。

4. 研究成果

(1) 中枢神経における Delta シグナルの神経分化促進能の検証

rNPCs において D11CD_2A_GFP を発現させ、GFP 陽性細胞における神経分化マーカー Tuj1 発現を解析することで神経分化への影響を調べた。陰性対照として GFP のみを、陽性対照として Asc11 を発現させた。その結果、D11CD は GFP を発現させた場合に比べ有意に神経分化が促進し、その割合は Asc11 を発現させた場合をほぼ同様であった。これらの結果から D11CD は中枢神経においても神経分化を促進することが明らかになった。



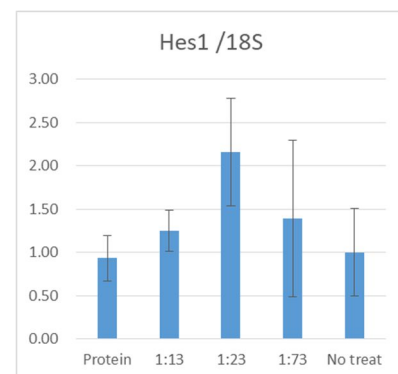
(2) Notch(Delta)シグナルを高効率で活性化させるクラスター化タンパク質の合成

293F 細胞を用いて作製した D111-EC を重量の異なる 750-1000kDa の HA に結合させ (Initial)、実際の D111 : HA の比 (Final) が 12 : 1、23 : 1、73 : 1 のクラスター化 D111 が合成された。一方、クラスター化 Notch1 に関しては、Expi293F 細胞を用いて作製した Notch1-EC タンパク質を 500-750kDa、750-1000kDa、1250-1500kDa の HA に結合させ、下図に示す比で合成された。

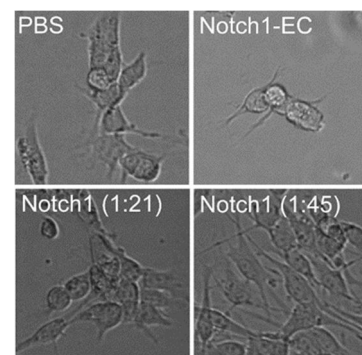
750-1000kDa HA		500-750kDa HA		750-1000kDa HA		1250-1500kDa HA	
D111: HA molar ratio		Notch1: HA molar ratio		Notch1: HA molar ratio		Notch1: HA molar ratio	
Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
40:1	12:1	17:1	8:1	37:1	21:1	111:1	55:1
80:1	23:1	28:1	22:1	74:1	39:1		
120:1	73:1	55:1	45:1				

(3) クラスター化 D111(Notch1)のシグナル伝達能の評価系の開発

シグナルレポーター系に代わり、rNPC を用い Notch シグナルの標的遺伝子 Hes1 mRNA の発現を qPCR により調べることでクラスター化 D111 の Notch シグナル活性化能を評価した。以前の報告通り、D111 タンパク質の添加では未処理の場合と比べ Hes1 の発現は変化しなかった。一方で、クラスター化 D111(1:23)は約 2 倍 Hes1 の発現が上昇していた。これらのことからクラスター化 D111 は Notch シグナルを活性化できることが明らかになった。しかしながら、今回の qPCR の結果はバラツキが多かったため、今後は簡便かつ正確にクラスター化 D111 のシグナル活性化能を評価可能な系を作る必要がある。

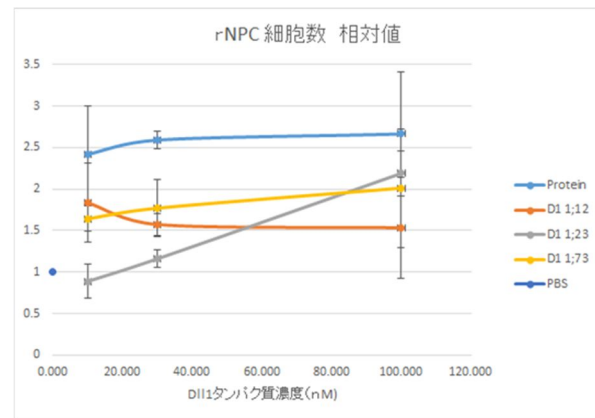


D11CD は中枢神経系においても神経分化を促進することから、rNPC が神経細胞に分化する際の形態変化に着目し、クラスター化 Notch1 のシグナル伝達の簡便な評価を試みた。その結果、陰性対照 (PBS) と Notch1-EC タンパク質、低クラスター化 Notch1 (1:22(750kDa HA)、1:21(1000kDa HA)) では形態に変化が見られなかった。一方で、高クラスター化 Notch1 (1:39 (750k HA)、1:45 (1000kDa HA)、1:55(1500kDa HA)) では神経様細胞の形態変化が観察された。これらの結果から、高クラスター化 Notch1 は神経分化を促進する可能性が示唆されたが、今後 Tuj1 の発現を qPCR や免疫染色などで確認する必要がある。



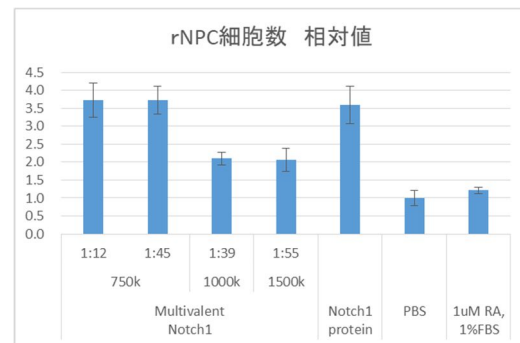
(4) クラスター化 DII1 による rNPCs の細胞増殖の賦活化

rNPCs に DII1-EC タンパク質、クラスター化 DII1 を加え細胞数を計測した。予想に反し、DII1 タンパク質の添加が最も細胞増殖が亢進した。過剰な Notch シグナルの活性化は神経幹細胞の分裂を抑制するという報告もあるため、適切な Notch シグナルの活性化のみが細胞増殖を賦活化可能であるのかもしれない。



(5) クラスター化 Notch1 による rNPCs の神経分化の賦活化

rNPC は分化培地(0.1ng/mL の FGF および N2 サプリメントを添加した DMEM/F12 培地)で分化誘導を行うとほとんど増殖しない。そのため、陰性対照群 (PBS)、陽性対照群 (1 μ M RA+1%FBS) では顕微鏡観察において細胞増殖はほとんど見られなかった。一方で、Notch1 タンパク質およびクラスター化 Notch1 添加により、分化誘導下においても細胞増殖が亢進することが明らかになった。また、これらの細胞の



多くは Tuj1 陽性であった。このことから Delta シグナルの活性化により細胞増殖を伴う神経分化が亢進した可能性がある。しかしながら、培養系における rNPC の分化と細胞密度は密接にかかわっており、本実験だけでは Delta シグナルが陰性対照や陽性対象に対して神経分化を亢進するかどうかは比較ができていないため、今後より詳細な検討が必要である。また、(2)の結果から高クラスター化 Notch1 は神経細胞への強い分化促進作用が示唆されている。本実験においても Notch1(1:45-750kDa)を除く高クラスター化 Notch1(1:39-1000kDa, 1:55-1500kDa)では単に Notch1 タンパク質を加えるよりも細胞増殖が抑えられていた。したがって、適切な Notch シグナルのみが細胞増殖を亢進したように、Delta シグナルを適切に刺激することにより、分化条件下において細胞増殖と神経分化を促進し、神経細胞を大量に作製することが可能になるのかもしれない。

本研究では、まず rNPC を用い Delta シグナルが中枢神経系においても神経分化を促進することを明らかにした。次に、リコンビナントの DII1 (Notch1)タンパク質を作製し、HA に様々なモル比で DII1(Notch1)をクラスター化することに成功した。これらを用いて rNPC の細胞増殖賦活化を試み、Notch シグナル活性化能の高いクラスター化 DII1 よりも単なる DII1 タンパク質添加の方が細胞増殖を賦活化することを明らかにした。加えて、Notch1 タンパク質及びクラスター化 Notch1 は分化誘導下においても細胞増殖を亢進し、その大部分が神経細胞に分化することを明らかにした。これらのことから、適切に Notch-Delta シグナルを活性化することで神経前駆細胞の増殖と分化を賦活化し、神経細胞を大量に作製できる可能性が示唆された。今後は Notch シグナルと Delta シグナルの活性化能と細胞増殖・分化との関係を詳細に検討すると共に、iPS 細胞を用いパーキンソン病の治療に用いられる mDA 神経細胞の大量作製法の条件検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 大久保 佑亮	4. 巻 97
2. 論文標題 タンパク質のクラスター化によるシグナル増強！？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌、バイオメディア	6. 最初と最後の頁 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----