

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06857

研究課題名(和文)ライソゾーム病の神経障害におけるミクログリアおよびニューロンの相互作用の役割

研究課題名(英文) Role of the interaction between microglia and neuron in the defected neuronal function in the lysosomal storage disease

研究代表者

沼川 忠広 (NUMAKAWA, Tadahiro)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：40425690

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)：本研究では、GM1ガングリオシドーシスやシアリドーシス*iPS*細胞を用いて、ヒトニューロンおよびヒトミクログリアの共培養系を樹立した。これにより、ライソゾーム病病態において、ミクログリアの寄与を考慮した。共存培養では、ニューロンの開口放出が減少した。この働きは疾患ミクログリアで弱かった。カルシウム応答がシアリドーシスニューロンで亢進したが、これを健常ミクログリアは緩和した。健常ニューロンに対し、健常またはGM1ガングリオシドーシスミクログリアを添加した場合、疾患ミクログリアによるニューロン生存率低下が見られた。また、疾患ミクログリア共存によるグルタミン酸受容体NR2A発現低下を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少疾患であり、重篤な神経症状を呈するライソゾーム病では、ヒトニューロンを用いた病態解析および治療法の開発が遅れている。しかも、これまで散見される研究では、ヒトニューロンのみに主眼をおいたものが主流である。そのため、本課題によって、健常と疾患ミクログリアがニューロンの機能や生存へ異なる作用を発揮することが示唆されたことは、今後のライソゾーム病研究に対し新しい指針を与えることになる。

研究成果の概要(英文)：Here, we investigated possible interaction between cortical neurons and microglia in the pathogenesis of GM1 gangliosidosis and Sialidosis. We generated human neurons and human microglia using induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with GM1 gangliosidosis or Sialidosis, and established co-culture of neurons with microglia. Using this system, we found that control human neurons showed reduced exocytotic activity when microglia (control) was coexisted. However, GM1 gangliosidosis microglia showed reduced this negative regulation in the presynaptic function of neurons. Ca<sup>2+</sup> response of neurons, postsynaptic function, was increased in the Sialidosis neurons, which was improved by control healthy microglia. Interestingly, control neurons received addition of disease microglia exhibited decreased cell viability and downregulation of NMDA receptor NR2A, suggesting negative impact of disease microglia on the neuronal survival and synaptic function.

研究分野：神経科学

キーワード：ライソゾーム病 ミクログリア ニューロン 相互作用 中枢神経系 *iPS*細胞 中枢神経系の異常

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病の発症は、不要になった分子等を分解して再利用するなど、代謝の重要な機能に関わるライソゾーム内に存在する酵素の著しい活性低下が原因とされる。多種多様な酵素の活性低下により、それぞれ特異的な代謝産物が蓄積することが原因となり、細胞機能が変化することで引き起こされる。ライソゾーム病では、肝脾腫などの症状に加えて、中枢神経系における異常が明らかな疾患が多いが、その詳細は不明であった。

本研究では、GM1 ガングリオシドーシスおよびシアリドーシスにおける病態の解明を、*in vitro* の実験系で明らかにしようとする試みであるが、すでに疾患 iPS 細胞より樹立した大脳皮質ニューロンにおいて、神経伝達物質の放出能力が著しく低下しているなどの知見を発見し、報告していた (Kajihara, Numakawa et al, 2020; Odaka, Numakawa et al, 2021; Matsushita, Numakawa et al, 2019)。ここで、GM1 ガングリオシドが蓄積する GM1 ガングリオシドーシスでは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) の欠損による代謝異常により発症するとされる。 $\beta$ -gal 欠損マウスでは脳内での神経細胞死が報告されており (Jeyakumar et al., Brain 2003) 患者の病態と一致する。ところが、申請者らの *in vitro* の実験系では、顕著な神経細胞死は観察されなかった。シアリルオリゴ糖が細胞内に蓄積 (ノイラミダーゼ欠損が原因) が顕著なシアリドーシスにおいても、患者脳で観察されるような細胞死 (Uchihara et al., Acta Neuropathol. 2010) を再現することには成功していなかった。このことは、我々の用いるニューロン単独の培養系が、ライソゾーム病の神経症状を再現するには不十分なものであることを示していた。

脳内には、多くの種類のニューロンが存在するが、そのほかにも、多数のグリア細胞が存在しており、脳機能への寄与は大きい。脳発生では、神経幹細胞はニューロンのほかにオリゴデンドロサイトとアストロサイトを生み出す。また、胎生期卵黄嚢で発生する前駆細胞から生み出されるミクログリアが脳内の免疫システムの一端を担っており、神経機能へも積極的な寄与をしていることは、近年よく知られるようになってきている。

本研究では、ニューロンだけではなく、ミクログリアの役割の寄与の可能性を想定し、健常および疾患 iPS 細胞を利用したニューロン-ミクログリア共存培養系を新たに創出し、ライソゾーム病における神経細胞死を再現できるようなモデルの確立と、詳細な病態解明を目指した。

### 2. 研究の目的

iPS 細胞由来のヒトニューロンは、様々な脳の疾患を研究する上で強力な武器となりえる。しかし、ニューロン単独の培養系では、GM1 ガングリオシドーシスおよびシアリドーシスなどで見られる病態の再現が難しい。

本研究では、ニューロン-ミクログリア共存培養系を新たに創出し、希少疾患であるがゆえに、病態解明や治療法の確立が困難であるライソゾーム病の詳細な病態解明を目指した。特に、ニューロンの機能や生存における病的変化が、ニューロン固有のものであるのか、またはミクログリアとの相互作用により生じるものであるのかを、健常および疾患 iPS 細胞より、それぞれニューロンやミクログリアを分化・誘導させ、これらを用いた健常・疾患の各組み合わせを実現して、細胞・分子レベルでの病的変化にアプローチすることにした。

### 3. 研究の方法

神経幹細胞またはミクログリアの前駆細胞を、健常および疾患患者より樹立した iPS 細胞より分化誘導させる。その後、ニューロン単独培養、またはニューロン-ミクログリア共存培養系を作り、ニューロンにおける神経機能の評価またはストレス下における細胞生存率を測定した。

プレシナプスより放出される開口放出作用(エキソサイトーシス)は、色素 FM1-43 を用いた蛍光顕微鏡によるリアルタイムイメージング法を用いた。ポストシナプス機能は、カルシウム流入を指標とするため、カルシウム感受性色素 Fluo-4 を用いた。細胞内脱水素酵素により還元される WST-8 は、ホルマザン生成が細胞数と直線的な比例関係にある。そこで、WST-8 より生じるホルマザンの吸光度(450nm)の直接測定により、生存細胞を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 神経機能(プレシナプス機能)

我々の報告したプロトコールにより機能的ヒトニューロンを作出し(Kajihara R, Numakawa T, and Era T., Bio Protoc. 2021)そこに新たに分化させたマイクログリアを添加し、共存培養を実施後、神経機能の測定を行った。ここでは健常ニューロン+健常マイクログリアにおける開口放出作用の解析を、色素 FM1-43 を用いて行った。Day225(培養初日は 100000 個/cm<sup>2</sup>)に対し、ヒトマイクログリア 10000 個を加えて 5 日または 9 日の追加の共存培養を実施した。すると、共存培養 5 日目では、ニューロンの開口放出活性が有意に減少した。共存培養を開始して 9 日目では、ニューロン単独系および共存培養系での活性の差は観察されなくなった。このことは、健常マイクログリアには、ニューロンの神経機能に対して、積極的な関与があることを示唆している。次に、疾患マイクログリアの影響を解析した。健常ニューロン(N2-1)を培養し、そこに別の iPS 細胞クローン由来の健常(N3-2)または疾患(GM1-A360)マイクログリアを添加した。添加してから、2 週間の共存培養を行った。興味深いことに、疾患マイクログリアに比べて、健常(N3-2)マイクログリアによる開口放出抑制効果がより顕著であった。

##### (2) 神経機能(ポストシナプス機能)

ポストシナプスでは、神経伝達物質が特異的な受容体へ結合することで、細胞外から細胞内への膨大なカルシウム流入が観察される。そこで、Fluo-4 を用いたリアルタイムカルシウムイメージングを行った。N2-1 単独ニューロンをコントロールとし、シアリドーシスニューロン単独、や、シアリドーシスニューロンに対して N3-2(健常)マイクログリアの添加を行った群を作成した。カルシウムイメージング解析の結果、健常ニューロンに比べて疾患ニューロンにおける著しいカルシウム亢進を観察した。興味深いことに、このカルシウム亢進において、健常マイクログリアによる抑制が観察された。疾患ニューロンに見出されたカルシウム亢進(過剰興奮)が、マイクログリアの作用で是正される可能性があることが明らかになった。

##### (3) 神経細胞死

N2-1 健常ニューロンを 2 群に分割し、それぞれ N3-2(健常)および GM1-A360(疾患)マイクログリアを添加し、共存の維持培養後に WST-8(ミトコンドリア活性による生存細胞の検出)による生存解析を行った。その結果、GM1-A360 疾患マイクログリアによる有意な生存低下が観察された。ニューロンが健常であっても、その生存維持において、疾患のマイクログリアの共存は悪影響を及ぼす可能性がある。

##### (4) シナプス関連遺伝子の発現解析

ニューロンおよびマイクログリアの共存培養の実施後、ニューロン特異的な発現で知られるシナプス関連蛋白質群の発現解析を行った。

最初に、分化ステージの確認のため、神経幹細胞(NESTIN)および分化したニューロン(MAP2

および TUJ1 )のマーカの発現を確認することにした。qPCR 法による mRNA 発現解析により、ミクログリアが N3-2 ( 健常 ) または GM1-A360 ( 疾患 ) であっても、N2-1 ( 健常 ) ニューロンにおける NESTIN、MAP2 および TUJ1 発現に、有意な差は観察されなかった。次に、開口放出システムに必須であるプレシナプスに局在する分子群の解析を行った。健常ニューロン ( N2-1 ) において、SNAP25,STX1a,および SYNAPSIN1 などの開口放出関連分子の発現を解析したところ、健常 ( N3-2 ) または疾患 ( GM1-A360 ) ミクログリアをそれぞれ添加した場合において、大きな発現の差は観察されなかった。次に、ポストシナプスにおけるカルシウム動態に着目した。カルシウム流入において、主要な働きをする分子群であるカルシウムチャンネル ( Cav1.2, Cav2.1 ) に着目した。しかし、これらカルシウムチャンネルの発現においても、共存するミクログリアが健常または疾患であるによる有意な変化は観察されなかった。大脳皮質においては、興奮性ニューロンとして、グルタミン酸を放出するグルタミン酸作動性ニューロンが主である。本研究で行った FM1-43 によるイメージングは、グルタミン酸作動性ニューロンの応答を観察している可能性が高い。そこで、ポストシナプス側に存在するグルタミン酸受容体の発現解析を行った。GluR1、GluR2、GluR3、および GluR4 など AMPA 型、そして NR1 および NR2A など NMDA 型グルタミン酸受容体の発現を解析した。その結果、GluR1、GluR2、GluR3、GluR4,および NR1 の発現は、健常 ( N3-2 ) または疾患 ( GM1-A360 ) ミクログリアによる影響を受けていないことが明らかになった。非常に興味深いことに、疾患ミクログリアの共存により、NR2A 発現が特異的に低下していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Numakawa T.* & Kajihara R.	4. 巻 13
2. 論文標題 Neurotrophins and Other Growth Factors in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life (Basel).	6. 最初と最後の頁 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life13030647.	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 Numakawa T. & Odaka H.*	4. 巻 23
2. 論文標題 The Role of Neurotrophin Signaling in Age-Related Cognitive Decline and Cognitive Diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International journal of molecular science	6. 最初と最後の頁 7726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115719.	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 Chiba S.*, Numakawa T., Murata T., Kawaminami M., & Himi T.	4. 巻 85
2. 論文標題 Enhanced social reward response and anxiety-like behavior with downregulation of nucleus accumbens glucocorticoid receptor in BALB/c mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 30-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0103.	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 Numakawa T, Odaka H.*	4. 巻 22
2. 論文標題 Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease: Beneficial Effects of Flavonoids for Neuroprotection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of molecular science	6. 最初と最後の頁 5719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115719.	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 Odaka H, Numakawa T, Soga M, Kido J, Matsumoto S, Kajihara R, Okumiya T, Tani N, Tanoue Y, Fukuda T, Furuya H, Inoue T, Era T.*	4. 巻 152
2. 論文標題 An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca <sup>2+</sup> dynamics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105279.	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 Kajihara R, Numakawa T*, Era T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid and Simplified Induction of Neural Stem/Progenitor Cells (NSCs/NPCs) and Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Protocol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3914.	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 Wakatsuki S,* Takahashi Y, Shibata M, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Araki T.	4. 巻 220
2. 論文標題 Small noncoding vault RNA modulates synapse formation by amplifying MAPK signaling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201911078.	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 Kajihara R, Numakawa T, Odaka H, Yaginuma Y, Fusaki N, Okumiya T, Furuya H, Inui S, Era T.*	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel Drug Candidates Improve Ganglioside Accumulation and Neural Dysfunction in GM1 Gangliosidosis Models with Autophagy Activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 909-923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.03.012.	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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Numakawa T.
2. 発表標題 Dysregulation of neurotransmission in human neurons derived from lysosomal storage disease iPSCs.
3. 学会等名 The 37th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Numakawa, T* and Odaka, H.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 750
3. 書名 Factors Affecting Neurodevelopment	

1. 著者名 Numakawa, T. & Odaka, H.	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 604
3. 書名 Receptor Tyrosine Kinase in Neurodegenerative and Psychiatric Disorders	

〔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
研究分担者	小高 陽樹  (ODAKA Haruki)  (40831243)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員   (82626)	

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