

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07120

研究課題名（和文）iPS細胞から成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導法の確立と髄鞘再生治療への応用

研究課題名（英文）Establishment of differentiation induction method from iPS cells to mature oligodendrocytes and application to myelin sheath regeneration therapy

研究代表者

今村 宰（IMAMURA, OSAMU）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生化学・准教授

研究者番号：40534954

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではiPS細胞を用いてドネベジル(DNP)のオリゴデンドロサイトへの分化誘導の作用機序を解明すると共に、DNPを応用したオリゴデンドロサイト分化誘導法を開発し、脱髄再生治療につなげるための基礎的検討を行った。本研究結果からDNPによるマウスiPS細胞由来神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化促進作用にはエストロゲン受容体(ER)を介する経路が重要であることが明らかとなった。また、DNPはヒトiPS細胞においてもオリゴデンドロサイトへの分化誘導作用を有することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱髄疾患の治療標的は免疫系であり、疾患の進行抑制と再発予防を狙った対症療法が主体となっている。本研究においてDNPによるオリゴデンドロサイトへの分化促進作用にはERを介する経路が重要であることを明らかにした。ER経路の活性化は、オリゴデンドロサイトへの分化誘導や髄鞘形成を促進させ、脱髄疾患モデル動物の病態を改善することが報告されているため、今後、本研究結果に基づきオリゴデンドロサイト分化誘導活性を標的にした新たな脱髄疾患治療薬の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the mechanism of action of donepezil (DNP) induction of oligodendrocyte differentiation using iPS cells, and developed a DNP-based oligodendrocyte differentiation induction method to be used for demyelination therapy. The results of this study revealed that the estrogen receptor (ER)-mediated pathway is important for DNP-induced differentiation of mouse iPS cell-derived neural stem cells into oligodendrocytes. In addition, we confirmed that DNP also induces differentiation of human iPS cells into oligodendrocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：脱髄疾患 ドネベジル エストロゲン受容体 iPS細胞 オリゴデンドロサイト

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(MS)は中枢神経系における代表的な脱髄疾患で、本邦での患者数は年々増加傾向にあり、早期の治療法開発が望まれている。脱髄は髄鞘を形成しているオリゴデンドロサイトあるいは髄鞘が傷害されることにより起こる病態である。MSの治療法として、神経幹細胞やオリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた細胞移植が期待されているが、髄鞘形成能を有するオリゴデンドロサイトへの分化効率が低いことが問題となっている。我々はマウス大脳皮質由来神経幹細胞のオリゴデンドロサイトへの分化能を指標とした既存薬のスクリーニングにより、アルツハイマー病治療薬として認可されているDNPを同定した。

2. 研究の目的

本研究はマウス/ヒトiPS細胞を用いてDNPのオリゴデンドロサイトへの分化機序の解明から、DNPを用いた効率的なオリゴデンドロサイト分化誘導法を確立し、脱髄再生治療につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスiPS細胞(理研BRC:iPS-MEF-Ng-20D-17株)はMEFフィーダー細胞を用いて培養した。神経系細胞は笹井研究室によって開発された無血清凝集浮遊培養法(SFEBq法)を改良し、分化誘導因子を段階的に加えることにより以下の手順で作製した。マウスiPS細胞からLIF非存在下で胚様体の形成、FGF2+EGF存在下で神経幹細胞の分化誘導、PDGFR+FGF2存在下でオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化誘導、甲状腺ホルモン(T3)存在下で成熟オリゴデンドロサイトの分化誘導。未分化細胞と分化細胞はNanog(多能性幹細胞)、Nestin(神経幹細胞)、PDGFR α (オリゴデンドロサイト前駆細胞)、O4(未成熟オリゴデンドロサイト)、MBP(成熟オリゴデンドロサイト)、Tuj1(ニューロン)、GFAP(アストロサイト)などの発現を蛍光免疫染色で解析した。

(2) ヒトiPS細胞(理研BRC:201B7株)はStemFit AK02Nを増殖培地として37℃、5%CO₂のもと培養した。ヒトiPS細胞から成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導法は、まずヒトiPS細胞からSB431542、LDN193189、レチノイン酸(RA)の添加によって神経幹細胞へ分化誘導後、RAとヘッジホッグアゴニストであるSAGを処理してオリゴデンドロサイト前駆細胞を作製した。次にPDGF、HGF、IGF-1、NT3存在下に浮遊培養で形成された細胞塊をオルニチン/ラミニンコーティングしたディッシュに接着させ、さらにT3、アスコルビン酸、ビオチン、cAMPを含んだ分化誘導培地で25日間培養した。分化状態は各種分化マーカーを用いた蛍光免疫染色により判定した。

4. 研究成果

(1) マウスiPS細胞由来神経幹細胞におけるDNPの影響

マウスiPS細胞からSFEBq法にて分化誘導した神経幹細胞(miPSC-NSC)を用いて、DNPが神経幹細胞の分化に与える影響について検討した。その結果、DNPはオリゴデンドロサイトへの分化・成熟を顕著に促進すると同時に、アストロサイトへの分化を抑制することが分かった。神経幹細胞の分化マーカーの発現を調べたところ、DNP処理によってオリゴデンドロサイトの分化決定因子やミエリン関連遺伝子の発現亢進とアストロサイトマーカーの発現低下を認めた。

(2) DNPによるオリゴデンドロサイト分化誘導メカニズムの解明

DNPが分化に影響を及ぼす細胞内シグナル伝達経路をSignal 45-Pathway Reporter Arrayにより検討した結果、DNPはエストロゲン応答配列(ERE)を含んだレポーター遺伝子の転写活性を

顕著に上昇させることが分かった。ERE は核内に存在する 2 つのエストロゲン受容体アイソフォーム(ER /ER)により制御されることが知られている。miPSC-NSC における ERs の発現を蛍光免疫染色で調べたところ、ER および ER は主として核に局在していた。また、miPSC-NSC を DNP 存在下に分化誘導すると、ER および ER の発現亢進が認められ、これらの発現細胞の殆どがオリゴデンドロサイトであることを分化マーカー(Tuj1、GFAP、MBP)との多重染色にて明らかにした。さらに、DNP 添加で見られたオリゴデンドロサイトの分化促進およびミエリン関連遺伝子(MAG、MBP)の発現上昇は ER 特異的アンタゴニストである ICI 182,780 の前処理により濃度依存的に阻害された。ER および ER の各アイソフォームの役割を明らかにするために、ER および ER 特異的なアンタゴニストや siRNA によるノックダウンを用いて解析した結果、アイソフォーム間による差異は認められず、両アイソフォームが DNP によるオリゴデンドロサイトへの分化促進作用に重要だと推察された。一方で、ER 特異的アンタゴニストは DNP によるアストロサイトへの分化抑制作用に大きな影響を与えなかったことから、DNP によるアストロサイトへの分化調節は ER 以外の経路によると考えられた。

(3) ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞における DNP の影響

既報の方法に基づいてヒト iPS 細胞から成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導法の確立を試みた。まず、ヒト iPS 細胞から SB431542/LDN193189/RA の添加によって神経幹細胞へ分化誘導後、RA と SAG を処理してオリゴデンドロサイト前駆細胞を作製した。次に PDGF、HGF、IGF-1、NT3 存在下に浮遊培養で形成された細胞塊をコーティングディッシュに接着させ、さらに T3、アスコルビン酸、ピオチン、cAMP を含んだ分化誘導培地で 25 日間培養すると一部の細胞が MBP 陽性成熟オリゴデンドロサイトに分化しうることを確認した。ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞に対する DNP の影響を分化マーカーを用いた蛍光免疫染色で調べたところ、オリゴデンドロサイト系譜細胞への分化効率に変化は認められなかった。また、ニューロンやアストロサイトへの分化効率にも差は見られなかった。次に、DNP のオリゴデンドロサイト前駆細胞への影響を検討するために、ヒト iPS 細胞由来オリゴデンドロサイト前駆細胞を DNP 添加した培地(DMEM/F12、PDGF-AA、GF-1、HGF、NT3、T3、ピオチン、cAMP、インスリン)で 10 日間初期培養した後、分化誘導培地(DMEM/F12、T3、アスコルビン酸、ピオチン、cAMP、インスリン)に交換して 45 日間の長期培養を続け、蛍光免疫染色で分化状態を解析した。その結果、対照群と比較して DNP 添加群では成熟オリゴデンドロサイトマーカーである MBP や PLP 陽性細胞数が有意に増加していた。このことから、DNP はヒト iPS 細胞においてもマウス iPS 細胞と同様にオリゴデンドロサイトへの分化誘導作用を有すると考えられた。

(4) iPS 細胞由来の幹細胞移植と DNP の併用投与による脱髄疾患モデルマウスへの治療効果

本研究ではこれまでに確立した培養法を用いてマウス/ヒト iPS 細胞から分化誘導した神経幹細胞あるいはオリゴデンドロサイト前駆細胞を脱髄疾患モデルマウスに移植し、DNP で分化誘導することで移植細胞が再髄鞘化に寄与しているか検証する予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大に伴いモデル動物や研究器材の導入に遅れが生じたため予定通りに研究を進められなかった。

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 0件）

1. 著者名 Imamura Osamu, Arai Masaaki, Dateki Minori, Oishi Kazuhiko, Takishima Kunio	4. 巻 155
2. 論文標題 Donepezil induced oligodendrocyte differentiation is mediated through estrogen receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 494 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14927	査読の有無 有
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 Imamura Osamu, Arai Masaaki, Dateki Minori, Takishima Kunio	4. 巻 140
2. 論文標題 Donepezil promotes differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes at the expense of astrogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 231 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.13856	査読の有無 有
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 0件）

1. 発表者名 Imamura O, Arai M, Dateki M, Takishima K.
2. 発表標題 Donepezil promotes differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes at the expense of astrogenesis
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今村宰, 新井仁明, 伊達木穰, 大石一彦, 瀧嶋邦夫
2. 発表標題 ドネベジルによる神経幹細胞のオリゴデンドロサイトへの分化誘導はエストロゲン受容体を介する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	瀧嶋 邦夫 (TAKISHIMA KUNIO) (50531365)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・生化学・教授) (82406)	

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