

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02535

研究課題名(和文)変性疾患における小脳・大脳神経細胞の脆弱性の解析

研究課題名(英文)Vulnerability of cerebellar and cerebral cortical neurons in neurodegenerative diseases

研究代表者

六車 恵子(MUGURUMA, Keiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患では、細胞の脱落および細胞死が特定の神経細胞種において生じるが、変性に至る細胞種がどのように限定されるかについて、その機序は不明である。本課題では「特定の神経細胞が由来する脆弱性」と「罹患時における脳内環境の破綻状態」の組合せが、病型毎に細胞特異的な変性をもたらす要因であるという仮説を立て、これを検証することを目指した。遺伝性脊髄小脳変性症の純粋小脳型とそれ以外の病態に由来するiPS細胞から、小脳プルキンエ細胞と大脳神経細胞を分化誘導し、組織学的・遺伝子発現解析を実施した。その結果、同じ病型であっても細胞種によって脆弱性が異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患を引き起こす原因遺伝子の変異は数多く同定されているが、神経が変性に至るメカニズムは不明なことが多い。本課題では、病型ごとに変性する細胞が異なる原因を研究するため、患者由来のiPS細胞を用いて、病気でダメージを受ける細胞を作製し、これを様々な条件で培養することにより、何が細胞の脆弱性に関与しているのかを調べたものである。本実験の結果、培養条件が多少悪くてもダメージを受けない細胞がいること、通常なら問題にならない程度の条件でもダメージを受けやすい細胞がいることを明らかにすることができた。神経変性疾患で特定の細胞のみが影響を受ける機序を解明するin vitroモデルになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxias (SCAs) are genetically heterogeneous group of autosomal dominantly inherited progressive disorders. Most SCA cause prominent damage to cerebellar Purkinje cells with consecutive cerebellar atrophy, whereas Purkinje cells are only mildly affected in some SCAs. To investigate differences of cell vulnerability in SCAs, we differentiated Purkinje cells and non-Purkinje cells, such as cortical neurons or motor neurons, from SCA patient-derived iPS cells. We examined cell type specific vulnerabilities utilizing histological analysis and transcriptome analysis combination with perturbation of culture conditions. We observed a certain type of SCA derived Purkinje cells revealed robustness whereas other SCA-derived Purkinje cells were fragile in morphological changes.

研究分野：神経発生学、幹細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 iPS細胞 脊髄小脳変性症 プルキンエ細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまで、ヒト脳の発生原理を解明することを目的として、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)から神経細胞への選択的な分化を誘導するシステムの開発を進めてきた。一連の研究の中で、当時はとりわけ分化誘導が困難であるとされた小脳プルキンエ細胞の分化誘導に成功し、電気生理学および形態学的にも成熟した細胞であることを示した(Muguruma et al., Nature Neurosci. 2010, Muguruma et al., Cell Report 2015)。本培養技術を脊髄小脳変性症(SCA)患者の体細胞から作製した人工多能性幹細胞(iPSC)に応用し、患者iPS細胞と健常者iPS細胞から小脳プルキンエ細胞の分化誘導が可能であることを示した(Morino et al., Mol Brain 2015, Ishida et al., Cell Report 2016)。これら疾患iPS細胞由来のプルキンエ細胞を用いた研究成果の中で、以下の興味深い現象を発見した。

『薬剤によるストレス負荷を与えた場合、健常者とSCA42由来プルキンエ細胞では著しい変化は認められないが、SCA6型由来プルキンエ細胞では樹状突起に異常な形態変化が生じる』  
神経細胞の中でもプルキンエ細胞の脆弱性はこれまでも指摘されてきたが、今回見出した現象とこれまでの知見を総合すると、プルキンエ細胞が示す脆弱性の表現型は必ずしも一様ではないことが予想された。遺伝性SCAのほとんどは、原因遺伝子変異が明らかにされている。病理所見と症状から、細胞変性が概ね小脳に限られるもの(純粋小脳型)と小脳の入出力路を含む多系統に及ぶもの(多系統型)に大別されることが知られているが、変性に至る細胞と原因遺伝子の発現様式の間には明確な相関はない。例えば純粋小脳型失調であるSCA6では、小脳皮質にあるプルキンエ細胞特異的に変性・脱落が認められる。プルキンエ細胞と入出力関係にある深部小脳核や顆粒細胞に二次的な変性を認めるものの、小脳以外の領域は概ね保存される。原因遺伝子はP/Q型カルシウムチャンネルサブユニットCav2.1をコードするCACNA1Aであり、翻訳領域にCAGリピートが異常に伸長することが知られているが、CACNA1AやCav2.1は中枢神経系に広く発現しており、プルキンエ細胞特異的に局在しているわけではない。このように原因遺伝子の発現様式に関わらず特定の神経細胞のみに変性が生じることは、SCAをはじめ神経変性疾患の病態において大きな謎となっている。

### 2. 研究の目的

変性する細胞は生来の脆弱性を有しているが、脳内環境の破綻様式やその程度によって、変性に至る細胞が疾患ごとに異なる、という仮説をたて、『細胞が表す脆弱性について病型横断的な解析を行うことにより、特定の神経細胞のみに変性に至る機構について解明する』ことを目的とする。

### 3. 研究の方法

SCA患者および健常者由来iPS細胞を用い、これらから分化した神経細胞の脆弱性について、形態学的・分子生物学的に解析を行った。1)細胞脆弱性が病型毎に異なるかについて、遺伝性SCAのうち、純粋小脳型としてSCA6とSCA31、多系統型としてSCA3とSCA36を対象とした。これらのiPS細胞をプルキンエ細胞に分化し、SCA6の形態変化を誘導し、細胞へのストレス負荷(甲状腺ホルモンT3の除去)が及ぼす形態変化を経時的に解析した。2)プルキンエ細胞の脆弱性がストレス負荷の種類によって異なるのかについて、4病型のiPSCsをプルキンエ細胞に分化し、環境を擾乱・修飾した培養条件下での形態変化を解析した。3)脆弱性を示す神経

細胞がプルキンエ細胞特異的であるのかについて、4病型のiPS細胞を大脳神経細胞に分化し、形態学的・遺伝子発現解析を実施した。

#### 4．研究成果

4病型それぞれのiPSCからプルキンエ細胞に分化した場合、ストレス負荷の有無によらず脆弱性を示すもの、T3除去に脆弱であるものかないもの、T3によらないストレス負荷の反応性を有するものなど、様々に形態変化上の様式を示すことを見出した。さらに、大脳神経細胞へ分化した場合は、プルキンエ細胞と同じ指向性を示す病型と一致しない病型とに分かれることも明らかとなった。発現解析により、これらの変化に関与すると思われる遺伝子群を見出した。

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 2件）

1. 著者名 Eguchi Noriomi, Sora Ichiro, Muguruma Keiko	4. 巻 498
2. 論文標題 Self-organizing cortex generated from human iPSCs with combination of FGF2 and ambient oxygen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 729 ~ 735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.03.049	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 Tamada Atsushi, Watanabe Shoji, Muguruma Keiko	4. 巻 107
2. 論文標題 Investigating developmental and disease mechanisms of the cerebellum with pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103530 ~ 103530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcn.2020.103530	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6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 多能性幹細胞からの試験管内神経分化
3. 学会等名 理研BRCセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Muguruma
2. 発表標題 in vitro models of cerebellar development and spinocerebellar degeneration utilizing human iPSCs.
3. 学会等名 The 75th Fujihara Seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Muguruma
2. 発表標題 Investigation of ontogenesis and pathogenesis with self-organized brain structure from iPS cells.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eguchi N, Sora I, Muguruma K
2. 発表標題 Self-organizing cortex generated from human iPSCs with combination of FGF2 and ambient oxygen
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eguchi N, Sora I, Muguruma K
2. 発表標題 Self-organizing cortex generated from human iPSCs with combination of FGF2 and ambient oxygen
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学学会大会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 iPS細胞からみた運動失調治療の可能性
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 六車恵子, (編集) 佐藤俊朗、武部貴則、永樂元次	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 372
3. 書名 決定版 オルガノイド実験スタンダード「11-7. 小脳オルガノイドの作製とブルキンエ細胞への誘導, 」	

1. 著者名 六車恵子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本プランニングセンター	5. 総ページ数 64
3. 書名 難病と在宅ケア, iPS細胞を活用した脊髄小脳変性症研究の現状	

1. 著者名 Tamada A and Muguruma K	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 不明
3. 書名 Modeling of human cerebellar development and diseases with pluripotent stem cell-derived brain organoids. in Cerebellum as a CNS Hub	

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

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