

平成30年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07089

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞の分化誘導系を用いた小脳の形態形成機構の解析

研究課題名(英文) An analysis of cerebellar histogenesis generated from human pluripotent stem cells

研究代表者

六車 恵子 (Muguruma, Keiko)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・専門職研究員

研究者番号：30209978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生医学研究で注目されるES細胞やiPS細胞から、様々な細胞を分化誘導する実験系は、発生生物学においても強力な研究手段となりうる。研究代表者はこれまで、幹細胞から発生過程を再現する研究を通じて、マウスES細胞から小脳神経細胞を分化誘導する培養法を開発し、これをヒトES細胞に応用できることを見出した。本研究課題では、この分化培養法を脊髄小脳変性症患者から作製したiPS細胞にも応用し、iPS細胞に由来する分化した小脳プルキンエ細胞の脆弱性が病型によって異なることを見出した。本研究課題で開発した小脳細胞の分化誘導方法が、神経変性疾患の病態解明のための解析系として活用できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The R&D PI was engaged in the pioneering works on the development of the self-organizing culture of pluripotent stem cells (PSCs) for brain tissue formation (brain organoid). Using this technique, she developed efficient methods for differentiation of PSCs into cerebellar neurons and cerebellar tissues. In this R&D project, she succeeded in construction of human disease models for cerebellar ataxia by differentiation of the patient-derived iPSCs.

研究分野：神経科学、神経発生学、幹細胞生物学

キーワード：小脳 ヒト多能性幹細胞 プルキンエ細胞 神経分化 三次元立体培養 自己組織化 脳オルガノイド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの発生生物学研究では、発生過程で生じる現象に関わる要素を同定し、細胞の破壊・遺伝子阻害などにより発生機構を明らかにする手法が主流であった。近年、ES細胞やiPS細胞から様々な細胞に分化させることが可能になり、発生生物学の新たな研究手法として期待されている。すなわち、ES細胞やiPS細胞に少数の外因性因子を加えながら培養することで、様々な器官の細胞に分化する手法は、従来型のアプローチでは見えてこなかった発生過程の原理・素過程を浮き彫りにする可能性が期待された。研究代表者らのグループはこの手法を用いて、これまでに、ES細胞からドパミン細胞、大脳細胞、網膜細胞など様々な神経細胞を分化誘導することに成功してきた。

(2) 小脳は数ある脳の領域の一つであるが、発生生物学的観点から見ると興味深い特徴を有する。器官形成の時系列の途中で、菱脳峡オーガナイザーが生じ、これにより小脳原基が誘導される。小脳構成細胞は二つの異なる神経上皮から生み出され、移動し、秩序正しく配置され、緻密な神経回路を形成する。これまでの研究により、発生初期の細胞分化機構に関しては、多くの知見が得られているが、発生中期以降の組織形成過程に関しては現象が複雑すぎることもあり、未解明な部分が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに3次元培養法SFEBq法を駆使して、マウスES細胞から小脳神経細胞を作製することに成功した。本法は、ヒトES細胞へも応用可能であるため、ヒトES細胞から立体的な小脳の組織構造を形成させる系を確立することにより、小脳の器官形成メカニズムを明らかにすることを目指した。また、確立した手法をヒトiPS細胞にも適用し、小脳の形成異常や神経変性疾患である脊髄小脳変性症の病態解明に役立てる。

### 3. 研究の方法

マウスおよびヒトES細胞で開発した、小脳の構成要素である各種神経細胞を分化誘導する方法を応用する。

(1) ES細胞の分化誘導系の改良による小脳原基の誘導と細胞分化の効率化: ヒトES細胞をSFEBq法で立体培養し、FGF2とinsulinの添加により小脳の発生に必須である菱脳峡オーガナイザーの誘導を促す。オーガナイザー作用により分化誘導される神経前駆細胞(顆粒細胞、プルキンエ細胞、小脳核細胞)を組織学的、分子生物学的に同定する。遺伝子改変により細胞種特異的なプロモータ下に蛍光レポーターをノックインした細胞株を作製し、効率的な分化誘導法の開発と細胞抽出に活用する。

(2) 小脳神経(前駆)細胞の3次元培養系による組織的配置の再現: 分化誘導された個々の小脳神経細胞の移動・配置を誘導するため、外部からシグナル因子や移動に関わる因子を添加し組織形成のメカニズムを検討する。

(3) ヒトiPS細胞からの小脳組織構造の構築: (1)(2)で見出した方法をヒトiPS細胞に展開する。また、小脳関連疾患患者から作製したiPS細胞へも展開し、病態解明のための解析系としての有用性を検証する。

### 4. 研究成果

(1) マウスES細胞で開発された小脳分化誘導法が、ヒトES細胞にも展開可能であることを見出した。培養初期のFGF2、インスリン、TGF $\beta$ 阻害剤の組み合わせにより、小脳上皮細胞からなる小脳オルガノイドのサク製に成功した。小脳顆粒細胞の分離抽出に活用するため、転写因子Atoh1の遺伝子座に蛍光レポーターをノックインしたES細胞株の作成を試みた。細胞株の作製には成功したが、ライブ下で視認可能な蛍光タンパクの発現を得るには至らなかった。

(2) 分化誘導された小脳神経前駆細胞の配向・配置を促すため、細胞外マトリックス(ラミニン、フィブロネクチン)、細胞移動を支えるケモカイン、細胞シグナル因子(SHH, FGF, BMP, WNT)の効果を検討した。顆粒細胞の移動にはCXCL12/SDF1、神経皮質構造の形成にはFGF19、脈絡叢の分化にはGDF7がそれぞれ有効であることを見出した。

(3) ヒトiPS細胞から小脳組織、小脳プルキンエ細胞を作製することに成功した。運動失調を主な症状とする常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症患者から作製したiPS細胞から、小脳プルキンエ細胞を作製したところ、変異遺伝子の違いにより分化細胞の脆弱性が異なることを見出した。

本研究課題を通じて見出したヒト幹細胞からの小脳分化誘導法は、国内外で大きなインパクトを与えた。本法を利用した国外の研究者による成果も報告され始めた。患者由来のiPS細胞にも展開することができたことで、病態解明や治療法開発につながる成果であると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Eguchi N, Sora I, Muguruma K. Self-organizing cortex generated from human iPSCs with combination of FGF2 and ambient oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有, 498, 729-35, 2018.

- doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.049
- ② Muguruma K, Self-organized cerebellar tissue from human pluripotent stem cells and disease modeling with patient-derived iPSCs. *Cerebellum* 査読有, 17, 37-41, 2018. doi:10.1007/s12311-017-0905-2
- ③ Muguruma K, 3D culture for self-formation of the cerebellum from human pluripotent stem cells through induction of the isthmus organizer. *Methods in Molecular Biology*, 査読無, 1597, 31-41, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-6949-4\_3
- ④ 六車 恵子, iPS 細胞から立体脳組織への分化誘導と疾患研究, *実験医学*, 査読無, 34, 551-6, 2016.
- ⑤ Ishida Y, Kawakami H, Kitajima H, Nishiyama A, Sasai Y, Inoue H, Muguruma K, Vulnerability of Purkinje cells generated from spinocerebellar ataxia type 6 patient-derived iPSCs. *Cell Rep* 査読有, 17, 1482-90, 2106. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.026
- ⑥ Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, 他 8 名, A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol Brain* 査読有, 8, 1-9, 2015. doi: 10.1186/s13041-015-0180-4

[学会発表] (計 15 件)

- ① Muguruma K, Construction of iPSC-derived functional brain tissue for investigation of disease mechanisms. 2018 Keystone Symposia, iPSCs: A Decade of Progress and Beyond, 2018.
- ② 六車 恵子, 疾患 iPS 細胞由来の三次元立体脳組織を活用したてんかん研究の展望, 第 51 回日本てんかん学会学術集会, 2017.
- ③ Muguruma K, Disease modeling with patient derived iPSC cells. SRC 2017 8<sup>th</sup> International Symposium, 2017.
- ④ Muguruma K, Investigation of neurodegenerative disease utilizing patient-specific iPSC cells. *SELECT BIO Advances in Drug Discovery*, 2017.
- ⑤ 六車 恵子, 患者由来 iPS 細胞を活用した神経変性疾患研究, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.

- ⑥ 六車 恵子, 試験管内で小脳を作る, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016.
- ⑦ Muguruma K, Disease modeling with patient derived iPSCs, *Cell Symposia 10 Years of iPSCs*, 2016.
- ⑧ 六車 恵子, 患者由来 iPS 細胞を活用した脊髄小脳変性症の疾患モデル開発, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016.
- ⑨ 六車 恵子, 多能性幹細胞の小脳細胞分化と疾患モデリング, 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016.
- ⑩ 六車 恵子, 小脳を作る, 第 6 回小脳研究会, 2016.
- ⑪ 六車 恵子, iPS 細胞を用いた大脳・小脳希少難治性疾患研究への取り組み, 日本動物実験代替法学会第 28 回大会, 2015.
- ⑫ Muguruma K, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Society for Neuroscience Annual Meeting 2015*.
- ⑬ Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y, Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *The 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, 2015.
- ⑭ Muguruma K, Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells, *ISSCR 13<sup>th</sup> Annual Meeting*, 2015.
- ⑮ Muguruma K, Generation of cerebellar Purkinje cells from human pluripotent stem cells, *Gordon Research Conference CAG triplet Repeat*, 2015.

[図書] (計 4 件)

- ① Muguruma K, Ed: Tsuji T, *Organ generation*, Humana Press, 2017, pp. 31-42.
- ② 六車 恵子, 宇川義一編, *運動失調のみかた、考え方*, 中外医学社, 2017, pp. 11-20.
- ③ 六車 恵子, *Annual Review 神経 2017*, 中外医学社, 2017, pp. 94-99.
- ④ 六車 恵子, *Clinical Neuroscience (臨床神経科学)*, 中外医学社, 2017, pp. 316-319.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

六車 恵子 (MUGURUMA, Keiko)  
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞シ  
ステム形成研究センター・非対称細胞分裂  
研究チーム・専門職研究員  
研究者番号：30209978