

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14318

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたヒト特有の神経回路形成に関する研究

研究課題名(英文) A study of human neuronal circuit formation using iPS cells

研究代表者

山本 亘彦 (YAMAMOTO, Nobuhiko)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00191429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から神経細胞を作製し、ヒト由来の神経細胞の分化特性を明らかにすることを旨としている。本研究では、その端緒として、神経細胞分化におけるDNA修復酵素の役割に着目し、pol欠損のヒトiPS細胞株を樹立することによって、pol遺伝子の果たす役割を解析する系を構築した。Pol欠損ヒトiPS細胞株の樹立のためには、ジーンターゲティング法CRISPR/Cas9システムを導入し、ホモ変異体を得た。得られたクローンは、DNA塩基損傷による細胞死に対して感受性が野生型と比較して有意に高くなっていた。さらに、Pol欠損ヒトiPS細胞を神経幹細胞、神経細胞へと分化誘導にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Our goal is to reveal characteristics of human neuronal differentiation and circuit formation using iPS cell technology. This study is aimed at making an experimental system to analyze the role of DNA polymerase (pol), by establishing the iPS cell line which lacks pol. To establish the cell line, CRISPR/Cas9 system was utilized, and we could obtain the homozygote after drug selection. The obtained clone showed higher sensitivity than wild type clones. We further succeed in inducing neuronal stem cells and the neuronal cells.

研究分野：神経科学

キーワード：iPS細胞 神経細胞 細胞死 細胞分化 pol

1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞が開発され、ヒトの iPS 細胞から様々なサブタイプの神経細胞を効率的に作成する方法が様々な研究グループによって開発されている。この手法を用いることにより、ヒトの神経発生過程を in vitro で再現し、神経発生の様々な過程における細胞機構や各遺伝子が果たす役割をヒト神経細胞で解析を行うことができると考えられる。実際、これらの手法は精神神経疾患との関連性において、世界中で数多くの研究が展開されている。発生過程における細胞挙動や神経系で長年に亘る問題として上げられた「Nature vs Nurture」のような問題に切り込めることを計画し、その問題に取り組むことが有意義である。

2. 研究の目的

ヒト特有の神経回路形成の仕組みあるいは哺乳類を通じて共通な仕組みを解明することは生物学的にも進化的にも重要な仮題である。本研究では、ヒト iPS 細胞から神経細胞を作製し、ヒト由来の神経細胞の分化特性を明らかにすることである。特に、神経細胞分化における DNA 修復酵素の役割に着目し、ヒト iPS 細胞由来の神経細胞における polb 遺伝子の果たす役割を解析する系を構築することを目指した。

3. 研究の方法

まず Polb 欠損ヒト iPS 細胞株を樹立し、これを培養系で神経細胞へと分化誘導を行って神経発生過程を再現し、ゲノム不安定性の解析を行うことにした。Polb 欠損ヒト iPS 細胞株の樹立に際しては、従来の方法よりも高効率に遺伝子改変細胞が得られることを期待して、ジーンターゲティング法に CRISPR/Cas9 システムを組み合わせた。また、gRNA のターゲット部位はオフターゲットの影響やターゲット部位による遺伝子改変効率の違いを考慮してターゲティングベ

クターによる組換え部位である Polb の遺伝子座のエキソン 4 付近に 3 ヶ所設計した。それぞれヒト iPS 細胞に遺伝子導入し、薬剤選択の後にクローンを得て、これらが予測通りに欠損を生じているかを確認した後、神経幹細胞への分化、さらには神経細胞への分化を行い、それぞれの過程での Polb の役割を細胞分子レベルで解析した。

4. 研究成果

iPS 細胞に遺伝子導入し、薬剤選択の後に得られたクローンをゲノミック PCR、ウェスタンブロットングによって解析した結果、複数のホモ変異体を得ることができた。これらのクローンで Polb の機能が失われていることを確認するために、塩基損傷を引き起こす methyl methane sulfonate (MMS) を培地に加えて培養を行い、細胞死に対する感受性を調べたところ、Polb ホモ変異体では野生型と比較して感受性が有意に高くなっていた。したがって、Polb 欠損ヒト iPS 細胞株を樹立できたと考えられる。次に、Polb 欠損ヒト iPS 細胞を神経幹細胞へと分化誘導し、神経幹細胞のマーカーである Nestin 陽性細胞の存在を確認した。これら Nestin 陽性細胞に対して MMS を加えるアッセイを行うと、細胞死に対する感受性が野生型神経幹細胞より有意に高かった。さらに、Polb 欠損神経幹細胞を神経細胞へ分化させることにも成功し、脳発生期におけるヒト神経細胞の発達における DNA 修復酵素の役割を解析できる系が構築できた。

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 5 件)

Kitagawa H, Sugo N, Morimatsu M, Arai Y, Yanagida T, Yamamoto N (2017) Activity-dependent dynamics of the transcription factor CREB in cortical neurons revealed by single-molecule

imaging. *J Neurosci* 37:1-10. 査読有
Sugo N, Yamamoto N (2016)
Visualization of HDAC9
spatiotemporal subcellular localization
in primary neuron cultures. *Methods*
Mol Biol 1436:119-127. 査読有
Oishi K, Nakagawa N, Tachikawa K,
Sasaki S, Aramaki M, Hirano S,
Yamamoto N, Yoshimura Y, Nakajima
K (2016) Identity of neocortical layer 4
neurons is specified through correct
positioning into the cortex. *eLife*
5:10907. 査読有
Matsumoto N, Hoshiko M, Sugo N,
Fukazawa Y, Yamamoto N (2016)
Synapse-dependent and independent
mechanisms of thalamocortical axon
branching are regulated by neuronal
activity. *Develop Neurobiol* 76: 323-336.
査読有
Sugo N, Morimatsu M, Arai Y, Kousoku
Y, Ohkuni A, Nomura T, Yanagida T
and Yamamoto N (2015)
Single-molecule imaging reveals
dynamics of CREB transcription factor
bound to its target sequence. *Sci Rep*
5:10662. 査読有

[学会発表](計 11 件)

Hayano, Y., Araki, T., Sasaki K.,
Miyasaka, Y., Nakasone, T., Hata, Y. &
Yamamoto N. “Kit ligand acts as a
negative regulator for
activity-dependent thalamocortical
axon branching”, *Axon Guidance,*
synapse formation & regeneration,
2016.9.20-9.24, Cold Spring Harbor,
USA.
Sasaki, K., Arimoto, K., Kankawa, K.,
Terada, C. & Yamamoto, N.
“ARHGGEF18 regulates axon branching
of cortical upper layer neurons”, *Axon*
Guidance, synapse formation &
regeneration, 2016.9.20-9.24, Cold

Spring Harbor, USA.

Yamamoto, N. “Positive and negative
regulation of activity-dependent
thalamocortical axon branching”, *The*
39th Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society, 2016.7.20-7.22,
Pacifico Yokohama, Yokohama,
Kanagawa. (招待講演)
Ohnishi, K., Sugo, N., Toyoda, S.,
Hirayama, T., Yagi, T. & Yamamoto, N.
“DNA polymerase β function in neural
progenitors is required for postmitotic
neuronal survival and differentiation in
the developing cortex”, *The 39th*
Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society, 2016.7.20-7.22,
Pacifico Yokohama, Yokohama,
Kanagawa.
Uyeda, A., Sugo, N., Ohnishi, K, Toyoda,
S., Hirayama, T., Yagi, T. & Yamamoto,
N. “Involvement of DNA polymerase β
in postnatal development of cortical
neurons”, *The 39th Annual Meeting of*
the Japan Neuroscience Society,
2016.7.20-7.22, Pacifico Yokohama,
Yokohama, Kanagawa.
Miyasaka, Y., Hayano, Y., Araki, T. &
Yamamoto, N. “Role of Kit ligand as a
negative regulator in
activity-dependent thalamocortical
axon branching”, *The 39th Annual*
Meeting of the Japan Neuroscience
Society, 2016.7.20-7.22, Pacifico
Yokohama, Yokohama, Kanagawa.
Uyeda, A., Onishi, K., Sugo, N., Toyoda
S., Hiyayama, T., Yagi, T. & Yamamoto,
N. “Pol β deficiency increases DNA
double-strand breaks in postnatal
cortical neurons”, *The 38th Annual*
Meeting of the Molecular Biology

Society of Japan, 2015.12.1-12.4, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo.

Onishi, k., Sugo, N., Toyoda, S., Hirayama, T., Yagi, T. & Yamamoto, N. “DNA polymerase β activity in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival in the developing cortex”, Society for Neuroscience, 2015.10.17-10.21, Chicago, USA.

Kitagawa, H., Sugo, N. & Yamamoto, N. “Activity-dependent dynamics of CREB in cortical neurons: A single-molecule imaging study”, Society for Neuroscience, 2015.10.17-10.21, Chicago, USA.

Matsumoto, N., Hoshiko, M. & Yamamoto, N. “Involvement of mitochondria in thalamocortical axon branching”, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015.7.28-7.31, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo.

Sasaki, K., Arimoto, K., Kankawa, K., Terada, C. & Yamamoto, N. “Rho guanine nucleotide exchange factor Abr promotes axon branching in cortical layer 2/3 neurons”, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015.7.28-7.31, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本亘彦 (YAMAMOTO, Nobuhiko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号 : 00191429