

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10083

研究課題名(和文) 血液からの神経系直接誘導：エピジェネティック変異患者由来血液を用いた神経病態解析

研究課題名(英文) Direct differentiation of peripheral blood cells into neurons for the analysis of epigenetic-related diseases

研究代表者

石川 充 (ISHIKAWA, Mitsuru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10613995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、末梢血単核球からセンダイウイルスを用いて効率よく神経細胞への分化転換をさせる技術を構築した。これまでの報告に比べて、迅速かつ生存効率の高い方法である。本法では既存法と同様にグルタミン酸作動性神経細胞が主要素として産生されてくるものの、GABA作動性や、ドパミン作動性神経細胞も産生されてくることが分かった。このことから、迅速な技術の上に、今後、分化指向性を調整することで選択的な神経サブタイプを作りだすことが可能になると考えられる。また、本培養技術で産生された細胞のキヤラクターを知るためのハイコンテツセルイメージャーや1細胞RNAシーケンスを組み合わせる技術も構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して末梢血細胞からiPS細胞を介することのない、極めて迅速な神経分化転換技術(ダイレクトリプログラミング)のプラットフォームができ、その詳細な性質も把握できるようになった。さらに、iPS細胞からの分化誘導時と導入している因子がほぼ同じであるにもかかわらず血球細胞からの分化転換ではより多岐のサブタイプの神経細胞が産生されている。これは細胞個々がもつエピジェネティック情報を完全にリプログラミングしていないことも大きな理由の一つであると予想される。そのため、これまで困難であったエピジェネティックに關与する疾患の病態評価や治療法開発に向けて、新しく機能的実験系を提唱できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a technique for an efficient conversion of peripheral blood mononuclear cells into neurons using Sendai virus system. It is faster and more survival efficient than previously reported. This method produced glutamatergic neurons as the main population as the previous methods, but it also included GABAergic and dopaminergic neurons. These results suggested that it will be possible in the future to create selective neural subtypes by adjusting or adding another differentiation factors. In addition, we were successfully able to construct efficient platforms using high-content cell-image analyzers and a single-cell RNA sequencing for validating the character of the cells produced by the culture systems like this study.

研究分野：神経生物学

キーワード：ダイレクトリプログラミング iN エピゲノム 神経疾患 末梢血細胞 直接誘導 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

疾患モデル細胞として、患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析は近年とてもさかんである。しかし、iPS 細胞の作出には、研究開始当初の時点において、大きく二つの問題点があると考えられた。一点目は iPS 細胞の作出と品質管理、さらに標的体細胞への分化誘導にかかる時間や労力が大き過ぎることである。もう一点は、細胞の初期化には DNA メチル化レベルの著しい変化をとめない、特異的な DNA メチル化異常の疾患を取り扱う場合、iPS 細胞を利用する意義は弱くなる。

これらの問題点に対して、体細胞の完全なリプログラミングを介さずに、体性幹細胞や分化成熟した細胞に転換する技術(直接転換、ダイレクトリプログラミング)の開発が発展してきた。具体的には、ヒト皮膚線維芽細胞に、転写因子群を強制発現させることで、神経細胞(induced Neuron; iN)に転換する技術である。これにより、一定のエピゲノム情報を維持しながらヒトの神経細胞を作出できるようになった(Qiang et al, 2011, Cell; Yoo et al, 2011, Nature; Matsui et al, 2012, Stem Cells)。しかし、これまでの iN 技術は、すべて、由来となる細胞が皮膚線維芽細胞であり皮膚切開・縫合という、検体採取時のドナーへの侵襲性が高いことが問題であった。そこで申請者らは、以前より血球系を用いた iN 細胞技術に着手していた(斉藤ら、2015 年、第 38 回日本神経科学大会)。この技術をより最適化・一般化し、血球系細胞からのダイレクトリプログラミング技術をロバストなものにしたいと考えた。この研究が完成すると、サンプリング時の侵襲性を低く抑えつつ、様々な神経疾患の解析を迅速、かつエピゲノム情報を付与しながら病態や創薬スクリーニングに応用できると予想される。

## 2. 研究の目的

本研究においては、ヒト末梢血 T 細胞からの直接的な神経細胞誘導技術を開発し、神経疾患のモデル細胞化を目指すものである。この着想には、申請者自身が関わった下記の研究が基盤となっており、これらの研究の統合と最適化が主要な研究内容となる。

(1) ヒト末梢血 T 細胞からの iPS 細胞樹立法応用とそこから神経系への分化誘導法の最適化(Matsumoto et al, 2016, Stem Cell Rep)。 (2) iPS 細胞から迅速な神経幹細胞への分化誘導、および神経難病の病態解析(Ichiyanagi et al, 2016, Stem Cell Rep)(Nakazawa et al, 2016, Schizophr Res)。 (3) iPS 細胞から、神経幹細胞を介さず、興奮性神経細胞(Ngn2 遺伝子の強制発現)、および抑制性神経細胞(Ascl1, Dlx2 遺伝子の強制発現)へと誘導できる新型細胞株の樹立。 (4) 神経疾患などを含む種々のドナーからの iN 細胞の作出とその効率の比較検証。

これらの知見を基盤として、研究期間内に、(1)細胞培養液、細胞接着基質、遺伝子導入の内容や方法を最適化し、(2)作出された細胞の分化効率の定量化の方法を設定しドナーによって異なるかどうかを実際に評価する(3)出現する神経細胞の種類がどのようなものであるかを分別し、状況に応じて 1 細胞 RNA シーケンスと組み合わせ、定量的な結果を得る。

以上の研究を行うことで、ロバストな血球系細胞からのダイレクトリプログラミング技術を作り出し、様々な神経疾患の解析を迅速かつエピゲノム情報に関する内容を付与した病態や創薬スクリーニングに応用できるようなプラットフォームを用意する。

## 3. 研究の方法

1 年目では、すでに皮膚線維芽細胞からある程度、神経細胞への直接分化誘導ができると考えられている iN 因子(: NeuroD1, Ascl1, Brn2, Zic1)を用いて、血球系でも同様の検証を行う。この方法で誘導効率が低い場合は、初期化因子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)も導入しながら検討する。また、分化転換には遺伝子の一過性の強制発現を行うわけだが、これまで行ってきた遺伝子導入方法(エレクトロポレーション)以外にも、ウイルス感染を用いたりして、比較を行う。さらに小分子化合物・生理活性物質・血清成分などが分化にどのような影響を与えるかを検討する。

2 年目では、センダイウイルスによる初期化因子と神経分解因子の組み合わせ(: 上記 8 因子)での分化誘導の効率や産生細胞のキャラクターを検証する。さらに神経分化因子種の削減を行った場合の効率や細胞キャラクターの変動を RT-PCR や免疫染色で検証し、より高効率でロバストなダイレクトリプログラミングの方法を確立する。また、疾患患者由来の血球細胞を用いた直接誘導への応用を目指して、複数の健康人ドナーからの誘導効率の再現性確認や凍結サンプルを解凍した際の実験の再現性などを確認する。

最終年度は、疾患の大規模スクリーニングができるような系を作ることを見据えて、接着因子や培地交換など詳細の手法を調整し、最適化・一般化する。これに加えて、産生細胞のキャラクターを明示するために、免疫染色とバルク RNA シーケンス、(また研究の進捗が十分であれば 1 細胞 RNA シーケンスも行う)を行って効率や分化指向性についての評価を行う。さらに、進捗に応じて、レンチウイルスでの神経サブタイプ特異的な分化指向性制御ができるかどうかも行なう。

#### 4. 研究成果

研究1年目においては、末梢血T細胞からの神経分化誘導の効率化に成功した。

すでに皮膚線維芽細胞から、iN因子と呼ばれる *Ngn2*, *Ascl1*, *Brn2*, *Myt1L* などを用いてある程度の神経細胞への分化誘導が可能なのは知られていた。しかしながら、血液系細胞からの神経誘導は極めて誘導効率が低かった。そこで、我々は初期化因子 (*Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*) も導入しながら検討することにした。

分化転換には遺伝子の一過性の強制発現が必要であるが、これまで行ってきた、遺伝子導入方法 (エレクトロポレーション) では、細胞死が顕著で、現実的な方法ではなかった。そこでセンダイウイルスを用いた遺伝子発現法に変更した。さらに、誘導時の基礎培地と細胞外基質の選定をしておし、神経誘導に関する生理活性物質や化合物を検討した。この結果、従来の10倍以上の神経細胞誘導効率を発揮することができるようになった。さらに、これまで誘導された神経細胞はその生存性や成熟性が極めて低かった。この問題については、ウシ血清 (FBS) を添加させることである程度を解決することもできた。実際、神経細胞の誘導効率自体を低下させてしまうおそれがある FBS は、ES/iPS 細胞からの分化誘導時には利用されてこない経緯があった。しかしながら、誘導効率が比較的向上した現在の状態で、FBS を用いれば神経成熟を亢進させることが分かった。

研究2年目は構築した血球細胞からの神経細胞へのダイレクトリプログラミングにおける産生細胞のキャラクタライゼーションを行い、一定の分化指向性についての情報を得ることに成功した。

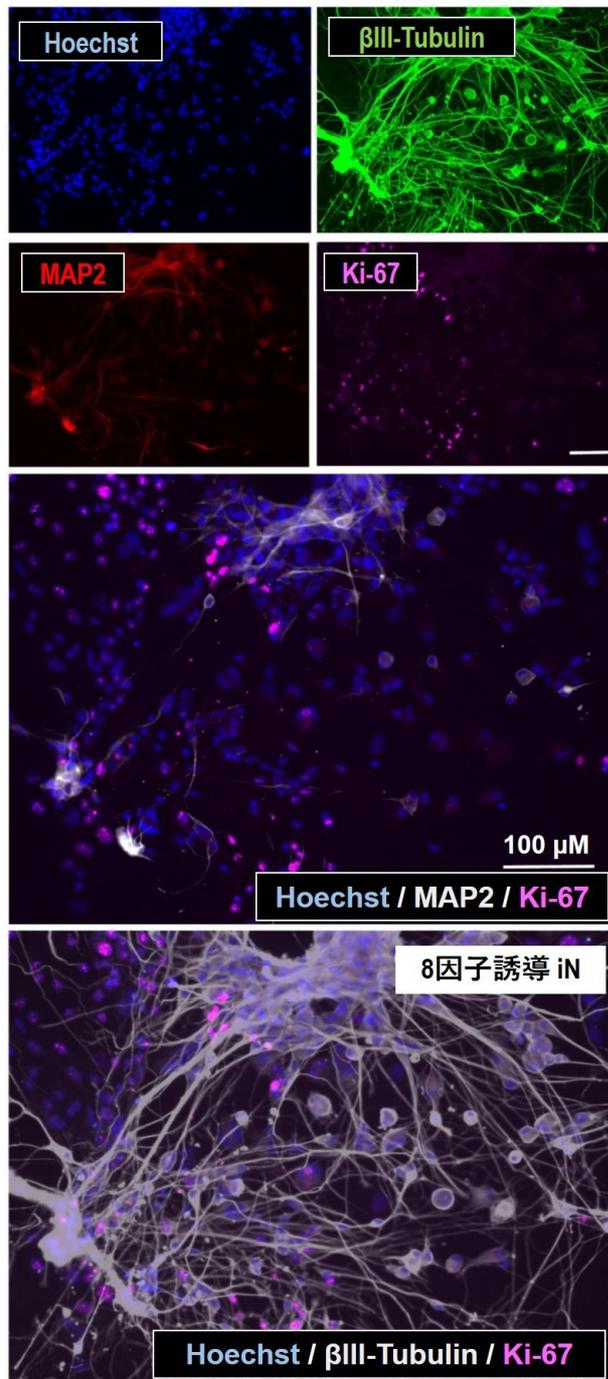
8因子 (*NeuroD1*, *Ascl1*, *Brn2*, *Zic1* および山中4因子) 神経分化転換は主にグルタミン酸作動性神経細胞が産生されるものの一部は GABA 作動性神経細胞が認められた。また、神経細胞マーカー発現を呈している細胞のほとんどは、確かに増殖性マーカーの Ki67 発現は陰性で、これは実際のヒト組織や幹細胞から分化誘導された神経細胞と同様の状態であることが分かった。【図1】また、末梢神経系のマーカーは発現されず、基本的に中枢神経細胞であることも分かった。なお、本実験系で神経分化誘導に最も重要な因子は *NeuroD1* 遺伝子であることが分かった。これらの実験は日本国内ドナーに限らず海外の凍結末梢血サンプルでも同様の結果を得ることができた。

最終年度は神経疾患のスクリーニングを見据えた実験系構築として、効率的かつ簡便な分化誘導方法の最適化、さらにはバルクおよび1細胞 RNA シーケンスによる細胞キャラクタライゼーションに成功した。

センダイウイルスの神経分化5因子導入を用いると興奮性神経細胞のマーカー遺伝子 (VGluT1) 陽性の細胞が多いことがわかった。またイメージングの詳細条件を検討し、VGluT1 は *in vivo* で見られるような Puncta が軸索に散在するかたちで同定された。すなわちマーカー遺伝子が単に発現しているだけでなく、正しい局在性や機能性を担っていると考えられる。しかもこれをイメージサイトメーター (In Cell Analyzer 6000) で迅速に定量するシステムを構築した。

また RNA シーケンスの結果、ドパミン作動性神経細胞マーカー、運動神経細胞マーカーの発現は低いものの、一般的な神経分化法である iPS 細胞に対する *Neurogenin2* 遺伝子導入法よりは高い誘導効率が得られていることが分かった。そこで、その効率を上げ、サブタイプ特異的な神経細胞を作出させることを試みることにした。ここでは、遺伝子の追加付与を効率よくさせるため、センダイウイルスとは別途に、まずはレンチウイルスでの分化因子導入を行えるように、iN 細胞作出過程でのレンチウイルス導入方法も構築した。なお最終年度で構築した定量解析方法や、遺伝子導入方法については論文としても報告した (Ishii T. et al., 2019, *eNeuro*) (Ishikawa M. et al., 2020, *Cells*)

以上の成果から、末梢血細胞を調製し、迅速に神経分化転換を行うプラットフォームができ、その性質も把握できるようになった。さらに、iPS 細胞からの分化誘導時に加えている因子がほぼ同じであるにもかかわらず、血球細胞からの直接分化転換では異なるサブタイプの神経細胞が産生されている。これは DNA メチル化などのエピジェネティック情報の完全なリプログラミングを介さないことも大きな理由のひとつであると強く予想される。そのため、これまで困難であったエピジェネティックに關与する疾患の病態評価や治療法開発に向けて、新しい実験系を提唱できたと考えられる。



**【図1】**

血球細胞からの神経直接誘導21日目免疫染色像

末梢血T細胞に対して神経分化用の8遺伝子をセンダイウイルスに搭載し、感染させた。写真は培養21日目という非常に短い期間で細胞固定像である。 $\beta$  III-tubulin (+) Ki-67(-)の細胞が血球細胞から短期間で非常に多く産生されることが免疫染色でわかる。

(Hoechst：細胞核、 $\beta$  III-Tubulin：一般的な神経細胞マーカー、MAP2：成熟性神経細胞マーカー、Ki-67：増殖性細胞マーカー)

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 Ishii Takaya, Ishikawa Mitsuru, Fujimori Koki, Maeda Takuji, Kushima Itaru, Arioka Yuko, Mori Daisuke, Nakatake Yuhki, Yamagata Bun, Nio Shintaro, Kato Takahiro A., Yang Nan, Wernig Marius, Kanba Shigenobu, Mimura Masaru, Ozaki Norio, Okano Hideyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 In Vitro Modeling of the Bipolar Disorder and Schizophrenia Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells with Copy Number Variations of PCDH15 and RELN	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0403 ~ 18.2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1523/ENEURO.0403-18.2019">https://doi.org/10.1523/ENEURO.0403-18.2019</a>	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 Ishikawa Mitsuru, Aoyama Takeshi, Shibata Shoichiro, Sone Takefumi, Miyoshi Hiroyuki, Watanabe Hirota, Nakamura Mari, Morota Saori, Uchino Hiroyuki, Yoo Andrew S., Okano Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 miRNA-Based Rapid Differentiation of Purified Neurons from hPSCs Advancetowards Quick Screening for Neuronal Disease Phenotypes In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 532 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9030532	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishikawa Mitsuru, Okano Hideyuki
2. 発表標題 Investigation of excitatory and inhibitory neuronal phenotypes in Angelman syndrome neurons using rapid-single step neuronal differentiation methods
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishikawa Mitsuru
2. 発表標題 Cellular Modeling of a Neurodevelopmental Disorder using Functionally Matured Human Excitatory / Inhibitory Neurons
3. 学会等名 Neuro2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishikawa Mitsuru
2. 発表標題 Rapid, robust, and subtype-specific neuronal differentiation from human pluripotent stem cells for multi-dimensional screening of neurodevelopmental / psychiatric disorders
3. 学会等名 The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishikawa Mitsuru
2. 発表標題 Comparative gene expression analysis of excitatory and inhibitory neurons-derived from Angelman syndrome patient iPS cells
3. 学会等名 TOKYOニューロサイエンス
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>国際学会において受賞（1件）：          学会名：The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Osaka, Japan, January, 2020          受賞名：Excellent Presentation Award          演題名："Rapid, robust, and subtype-specific neuronal differentiation from human pluripotent stem cells for multi-dimensional screening of neurodevelopmental / psychiatric disorders" Ishikawa M, "P51"</p> <p>国内学会において受賞（1件）：          学会名：TOKYOニューロサイエンス研究会、第53回ポスター討論会、2018年10月 授与（東京）          受賞名：優秀賞          演題名："Comparative gene expression analysis of excitatory and inhibitory neurons-derived from Angelman syndrome patient iPS cells"</p>
--

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