

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16121

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた3次元創薬プラットフォームの構築

研究課題名(英文)Building 3D platform of patient iPS cells for drug development

研究代表者

近藤 孝之(Kondo, Takayuki)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：80536566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は、患者自身のゲノム情報を引き継ぎながら、無限の増殖性を維持しつつ、あらゆる種類の組織細胞に変化させることが出来る特性を持つことから、疾患研究応用されるようになった。その中でも、神経細胞が立体構造を取りながら、その周囲には神経細胞以外のグリア細胞種を含む、生理的状態に近い細胞外環境を再現することを目的として3次元培養系が着目されている。我々は3次元構造を再現性良く構築するための素体として、ヒトiPS細胞から大脳皮質神経を1週間程度で調整することに成功し、創薬プラットフォームへの適応性を明らかにした。今後、3次元脳組織を用いた、病態解明と創薬研究への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞から大脳皮質神経細胞を再現性良く短期間で大量に調整する方法を開発した。こうして得られた神経細胞は、疾患病態再現及び創薬プラットフォームへ応用できることも示した。さらにこの神経細胞を集積3次元構造の素子として用いることにより、培養皿の中で3次元ヒト脳組織を再構築し、病態解明と治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：iPS cells have come to be applied to disease research because of their ability to transform into all types of tissue cells while inheriting the genomic information of patients himself, while maintaining infinite proliferation potential. In particular, a three-dimensional (3D) culture system has been focused on to reproduce an extracellular environment that is similar to the physiological state of the brain, which is the structure surrounded by glial cells. We have successfully differentiated human iPS cells into cortical neurons only in one week. Established neurons can be a substrate for reproducible construction of 3D structures, and we demonstrated their applicability to drug screening platforms. It is expected to be applied to the elucidation of pathology and drug discovery research by constructing 3D brain tissue in the future.

研究分野：臨床神経学 幹細胞 神経科学 創薬

キーワード：iPS細胞 アルツハイマー病 神経細胞 分化誘導 創薬 アストロサイト

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞の2次元培養技術は、根本治療薬がない神経・精神疾患の孤発性病態解明や創薬研究に応用され、遺伝子操作に基づく既存の動物モデルや腫瘍細胞株モデルとは異なる特異的研究マテリアルとして存在感を増している。その一方で、*in vitro*系においても、細胞外の足場環境と細胞接着因子シグナルなどを生理的環境に近づけるために、3次元細胞培養の重要性が指摘されている (Clevers H. Cell 2016)。特に、制癌剤開発モデルでは治療薬効果が3次元細胞モデルを用いるとより *in vivo* 応答に近くなる (Fong LS. et al. Biomaterials 2016)、肝細胞化合物代謝モデルでは CYP 代謝酵素誘導が3次元培養でより大きな応答性を得られる (Catherine C. et al. Scientific Reports 2016)、など3次元細胞モデルの重要性が指摘されている。

脳神経組織において、神経細胞の他にグリア細胞や血管内皮などの構成細胞が直接的に接触し、あるいは細胞外マトリクスおよび細胞外間質液を介して互いにクロストークをしながら、脳構造を構築していると考えられている。特に神経変性疾患の病因物質 (アミロイドβ等) は、細胞外周囲環境に放出され沈着し病態を修飾することが想定されている。神経疾患研究においても、平面培養下における神経細胞のみを対象とするのではなく、様々な細胞が本来の位置情報を有している3次元モデルを導入することでより精緻な病態および創薬研究が出来るのではないかと着想し研究を開始した。

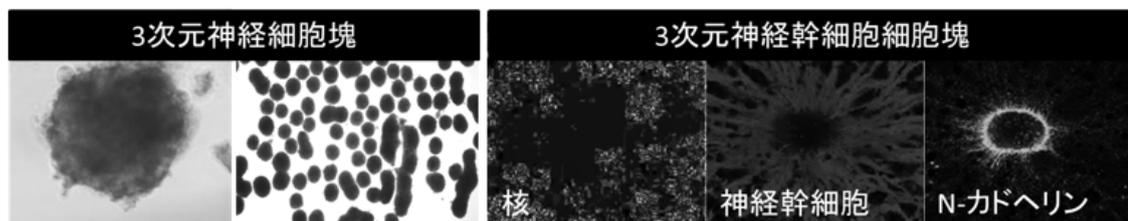
2. 研究の目的

iPS細胞技術を用いた神経疾患研究が展開されているが、立体構造・神経細胞以外のグリア細胞種を含んだ、より生理的状态に近い細胞外環境を含んだ病態解明と創薬研究が重要である。ヒト iPS 細胞から脳神経系細胞への分化誘導法を確立し、3次元脳組織を *in vitro* で再構築を目指す。最終的に、生理的ヒト脳組織構造を模したモデルを用いた病態再現と、創薬プラットフォームの構築を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から神経系細胞を分化誘導する際には、ヒトの自然発生を模した分化誘導法が利用されてきた。また、3次元構造を持つヒト iPS 細胞由来の神経組織を構築する際にも、ヒト発生を模して大脳皮質に特徴的な層構造の原器を作ることで、Mini brain あるいは Brain organoid といった呼称で研究されてきた。我々も同様の方法を用いて、3次元脳組織を作ることに取り組み成功した (図1)。

図1 自然発生を模した分化誘導法による iPS 細胞由来の3次元神経組織

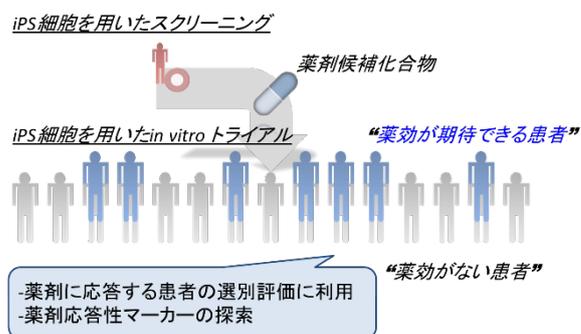


しかしながら、構築された3次元脳組織の内部あるいは組織塊外周の大脳皮質層構造に相当する構造は、必ずしも一様ではなく、病態研究および創薬スクリーニングなどへは、慎重な適応が望まれると判断される (Sutchcliffe and Lancaster 2017)。そこで、我々は3次元構造を要素に分解し再構築する戦略をとることとした。

4. 研究成果

脳を構成する素子としての神経細胞やグリア細胞を、均質かつ再現性良く調整する必要がある。この点を解決するため、我々は、一度の継代操作で500倍以上に細胞数を増やすことが出来るiPS細胞から起算して、わずか1週間ではほぼ100%という高い均質性を持つ大脳皮質神経細胞を調整する分化誘導系を開発した (Kondo et al. 2017 Cell Reports)。この分化誘導系を用いたアルツハイマー病疾患モデルでは、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である PSEN1 遺伝子に変異を持つ患者から大脳皮質神経細胞を調整したときに、病原性の高い Aβ 種である Aβ 42 がより多く産生されることを見出した。この分化誘導系をも用いて、Aβ 蛋白動態に与える薬効をスクリーニング出来る評価系を構築した。安全性情報が整備された1000種類を超える既存薬ライブラリを用いて、Aβ タンパク量あるいは毒性 Aβ 42 の比率を下げる既存薬を6薬剤同定し、このうち Bromocriptine・Cromolyn・Topiramate の組み合わせを抗 Aβ カクテルとして構築することに成功した。この中で、異なる遺伝子変異を持つ家族性 AD や孤発性 AD、あるいは健康人など、異なる15名程度の神経細胞にカクテルを投与した。そして、どの個体に有効性が期待できるかを調べるために、培養皿の中での臨床試験 (クリニカルトライアル)、「*in vitro* トライアル」を提案、実施することにも成功した (図2)。

図2 *in vitro* トライアル



さらには、脳神経系で最も細胞数が多いグリア細胞であるアストロサイトについても、アレキサンダー病というアストロサイトが障害される疾患モデルの構築を通して、ヒト iPS 細胞からほぼ 100%という高い均質性を持つアストロサイトの調整法開発にも成功しており (Kondo et al. 2016, Suga et al. 2019), これら神経細胞あるいはグリア細胞を要素として、3次元神経組織を用いたスクリーニングに応用するべく研究開発を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kondo Takayuki, Imamura Keiko, Funayama Misato, Tsukita Kayoko, Miyake Michiyo, Ohta Akira, Woltjen Knut, Nakagawa Masato, Asada Takashi, Arai Tetsuaki, Kawakatsu Shinobu, Izumi Yuishin, Kaji Ryuji, Iwata Nobuhisa, Inoue Haruhisa	4. 巻 21
2. 論文標題 iPSC-Based Compound Screening and In?Vitro Trials Identify a Synergistic Anti-amyloid Combination for Alzheimer ' s Disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2304 ~ 2312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.109	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 Suga Mika, Kondo Takayuki, Inoue Haruhisa	4. 巻 20
2. 論文標題 Modeling Neurological Disorders with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3862 ~ 3862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20163862	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 Suzuki Hidefumi, Egawa Naohiro, Kondo Takayuki, Imamura Keiko, Enami Takako, Tsukita Kayoko, Suga Mika, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Uchiyama Tsuyoshi, Inoue Haruhisa, Takahashi Ryosuke	4. 巻 online
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line derived from a Parkinson's disease patient carrying SNCA duplication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101828 ~ 101828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101828	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤孝之
2. 発表標題 アルツハイマー病患者の神経細胞を用いた化合物スクリーニングと “ in vitro trial ”
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----