

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16130

研究課題名(和文) グリアニューロン相互作用を再現する神経変性疾患iPS細胞モデルの確立

研究課題名(英文) To establish a new model to co-culture iPSCs derived neurons and glial cells to mimic brain structure

研究代表者

志賀 孝宏 (SHIGA, TAKAHIRO)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：50784378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞由来の細胞は同等の生体由来の体細胞と比べて分化成熟/老化速度が極端に遅いため、高齢発症神経変性疾患を対象とした解析において大きな課題を抱えていた。本研究は、同定した化合物を処理することにより、従来の培養法より短期間で成熟/老化速度を促進させる技術を確立した。また、生体内の脳構造を模倣するためiPS細胞由来神経細胞とグリア系細胞を共培養する新しいモデルの確立を構築した。これらの結果は適宜学会で発表し、一部は特許申請を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立された技術は、特に高齢発症の神経変性疾患解析・多検体創薬スクリーニングや多検体病態解析に適した手法であり、従来の培養法と比しても短期間で高精度な結果を得ることが可能である。さらに、平面上に脳構造を模倣した共培養モデルは、これまで疾患感受性細胞に焦点を当てていたため検出できなかった病態特異的な表現型を検出することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：iPSCs derived cells have an extremely slow of differentiation, maturation and aging as compared to somatic cells. Thus, analysis of late onset neurodegenerative disease as Parkinson disease and Alzheimer disease were difficult. We established a technology to accelerate the maturation and aging in a shorter compare as conventional method by using compound A. We also established a new model to co-culture iPSCs derived neurons and glial cells to mimic brain structure in vivo. These results were announced at the conference as appropriate, and some filed for patent applications.

研究分野：神経科学

キーワード：iPS細胞 細胞老化 グリア系細胞 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの平均寿命は長くなり国際的にも高齢社会化が進んでいる。神経変性疾患の患者数の1位2位を占めるアルツハイマー病やパーキンソン病における病理変化は加齢と深く関与していることが知られており、実際に高齢化に伴いそれらの患者数は年々増加の一途を辿っている。しかしながら神経変性疾患においては、病変部位へのアクセスが困難なことから剖検脳やマウスなどのモデル動物がその病態解析に用いられてきたが、前者は解剖によってしか得られないこと、後者は実際の患者と異なる表現型を示すことが問題点であった。

2007年にヒトiPS細胞の樹立技術が確立され、生体外での神経変性疾患の病態の再現や創薬のツールとして極めて有用な基盤技術と考えられている。我々の研究グループでは、分化誘導技術を開発しながら、神経変性疾患を中心とした多くの研究結果を報告している(Stem Cell Reports.2017など)。これまでのiPS細胞を用いた神経変性疾患の研究は、ニューロン、グリア系細胞といったそれぞれの疾患感受性細胞そのものにおける病態に焦点を当てている。しかしながら、近年の神経変性疾患研究ではこれまでニューロンが主たる病因と考えられてきた疾患においても、グリア系細胞による病態への寄与(Trends Neurosci. 2017, Neurotherapeutics. 2010など)が明らかになってきた。

患者細胞を用いた神経疾患モデルや神経再生の医療用細胞として有用なツールと期待されているiPS細胞を用いてグリア系細胞を含めた生体に近い中枢神経系の再現を行うことができれば、神経変性疾患の病態解明の再現性は大幅に向上すると考えられる。しかしながらiPS細胞由来の細胞は同等の生体由来の体細胞と比べて分化成熟速度が極端に遅いことが知られており(Genes Dev.2004など)、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞からニューロンへの分化傾向が強い初期型幹細胞を誘導することは比較的容易であるが、グリアへの分化能力を有する成熟型幹細胞へは分化しづらく、*in vitro*でのヒトiPS細胞からの高効率かつ迅速なグリアへの誘導は極めて難しい。2014・2015年には、オリゴデンドロサイトへの分化誘導法が報告されているが、約100-200日間の長期間培養を要し誘導効率は低く研究効率が極めて悪かった(Stem Cell reports.2014)。他グループからもヒトES/iPS細胞からグリアへの誘導方法が報告されているが、誘導効率が使用する細胞株に大きく依存し、多くのiPS細胞クローンを扱う疾患研究への応用が難しかった(Stem Cell Reports.2014)。さらに、これらのニューロン グリアネットワークは複雑な構造をしていることに加え、長期間の培養を要することが障壁となり再現が難しかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)パーキンソン病といった高齢発症神経変性疾患の病態を*in vitro*で早期に検出可能な化合物を用いた短期間培養システムを開発すること(2)iPS細胞からアストロサイトへの分化誘導法を最適化し短期間で得るシステムを開発すること(3)これまでに行われていないiPS細胞を用いたグリア ニューロン間の共培養による*in vitro*内での中枢神経系の再現を確立することである。

3. 研究の方法

(1)我々は、BMP、TGF 受容体、GSK3 の3つ阻害剤カクテルを用いることで、ヒトiPS細胞からニューロンへの分化誘導効率・成熟速度が速い神経幹細胞を誘導することに成功している(Stem Cell Reports. 2017)。この方法を基盤として、先行研究で同定した成熟/老化促進化合物(化合物A)を用いて、iPS細胞由来神経細胞の成熟・老化を促進させるシステムの構築を行った。

(2)従来報告されている神経幹細胞を介し、PDGF-AA・Neurotrophin といった細胞外因子や神経保護因子を用いることでグリア系細胞への誘導を高効率に誘導を行えるシステムの構築を行った。

(3)中枢神経系の再現を行うため、iPS細胞由来ドーパミン作動性ニューロン・アストロサイトを共培養するための条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1)ヒトiPS細胞を用いた神経疾患モデルは、分化成熟速度が極端に遅いため高齢発症神経変性疾患の病態表現型検出に長期間の培養を要することが大きな課題である。この課題を解決するために、iPS細胞由来神経細胞に早老症遺伝子(progerin)の導入(Cell Stem Cell. 2013)やテロメア合成酵素の阻害(Stem Cell Reports. 2016)といった方法が確立されてきた。しかしながら、これらの方法は煩雑な技術が必要であり、神経細胞の老化を微弱にしか促進させることができない。

我々は、先行研究にてiPS細胞由来神経細胞にGFP-Synapsinを導入し、既知の神経成熟を促進させるアストロサイトコンディション培地(ACM)と同等の成熟促進効果を持つ化合物Aを同定した。神経分化培地に化合物Aを加え10日間培養を行い、神経前駆細胞マーカー(Nestin)を用いて神経分化効率を測定した。その結果、Nestin陽性細胞は化合物A濃度依存的に減少した。また、同様の手法により分化させたドーパミン作動性神経細胞の量を比較するため、特異的なマーカーであるTyrosine Hydroxylase (TH)を染色し測定した。その結果、化合物A濃度

依存的にドーパミン作動性神経細胞の分化効率を上昇させていることを確認した。このことから化合物 A は神経分化の効率を促進させることを見出した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞はクローン間における分化誘導効率に差異が生じるため、セルソーターを用いた純化が主要な方法として提唱されている。本研究で、我々が同定した化合物を用いた分化誘導システムはセルソーターを必要としない簡便な分化誘導システムを構築した。

一方で、この化合物を用いた分化誘導法は神経分化の効率を上昇させるだけではなく、細胞老化も促進させることを見出した。老化細胞特異的な表現型として核膜の構成因子である LaminB1 の異常が挙げられる。このような老化特異的な核膜の崩壊は、100 日間程度の長期間培養を行っても観察することが困難である。我々は、化合物 A を用いた培養により短期間培養(14 日間)にて、老化特異的な核膜の構造異常を確認した。我々が構築した化合物 A を用いた培養システムは、成熟/老化を促進させることにより病態特異的な表現型を検出することが困難である神経変性疾患に対して有用なツールとして期待できる。現在、パーキンソン病 iPS 細胞由来神経細胞への応用を検討している。

(2) 従来、報告されているグリア系細胞への誘導法は長期間の培養期間が必要である。我々は、短期間(約 50 日間前後)で脊髄・中脳領域アストロサイトを獲得することが可能な誘導法を確立した。しかしながら、パーキンソン病やアルツハイマー病といった高齢発症神経変性疾患を対象とした解析においては、誘導期間に加えて長期間の培養が必要となる。そこで、化合物 A をアストロサイトへの分化誘導期間中に処理することで、成熟/老化を促進させることが可能かを検証した。その結果、化合物 A を分化誘導中に処理したアストロサイトでは、細胞老化マーカーである SA-Gal(Senescence Associated β Galactosidase)陽性細胞が多く観察された。このことから化合物 A を用いたアストロサイト分化誘導システムは、細胞老化を促進させることを見出した。

(3) これまでの iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究は、ニューロン、グリア系細胞といったそれぞれの疾患感受性細胞そのものにおける病態に焦点を当てている。しかしながら、近年の神経変性疾患研究ではこれまでニューロンが主たる病因と考えられてきた疾患においても、グリア系細胞による病態への寄与(Trends Neurosci. 2017, Neurotherapeutics. 2010 など)が明らかになってきた。従って iPS 細胞を用いた神経変性疾患モデルにおいても脳内環境の複雑なネットワークを再現する必要があると考えられるようになった。この問題を解決するために、脳構造を模倣したモデルを作製する必要がある。そこで、脳内環境を模倣した中枢神経系の再現を行うため、iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞と中脳領域アストロサイトの共培養を試みた。誘導したアストロサイトに Synapsin-GFP を導入したドーパミン作動性神経細胞を重層し、7 日間培養を行いドーパミン作動性神経細胞の形態および蛍光強度を測定した。共培養を行ったドーパミン作動性神経細胞は神経細胞単独と比較して、短期間で GFP-synapsin の発現が上昇することが確認できた。しかしながら、共培養期間が長くなるにつれ双方の細胞に過剰な細胞死が見受けられた。このことから、それぞれの細胞に対する最適な培地条件が必要であることが示唆された。今後は、脳内環境を模倣した共培養モデルを維持するための適切な培地条件を検討する予定である。

本研究において以上(1)-(3)の結果を得ることで、高齢発症神経変性疾患に対する新たな技術を確立することができた。これまで、神経細胞・グリア系細胞といったそれぞれの疾患に対応する細胞への解析が盛んに行われてきたが、長期間の培養が高い障壁となり疾患特異的な病態を検出することが困難である事例が多く存在した。本研究で確立した分化誘導法は、遺伝子導入といった煩雑な手法を必要とせず、今後の神経変性疾患の解析に貢献できる技術である。近年 iPS 細胞を用いた神経変性疾患モデルにおいても脳内環境の複雑なネットワークを再現する必要があると考えられるようになった。この問題を解決するために、脳構造を模倣したモデルとして 3 次元のオルガノイドが着目されている。オルガノイドは局所的な発生過程を加味した病態の再現には強力なツールとなり得るが、一方でその形成が自発的な分化誘導によるランダムな自己組織化を利用するために、形成されたオルガノイドの形態の均一性という観点から

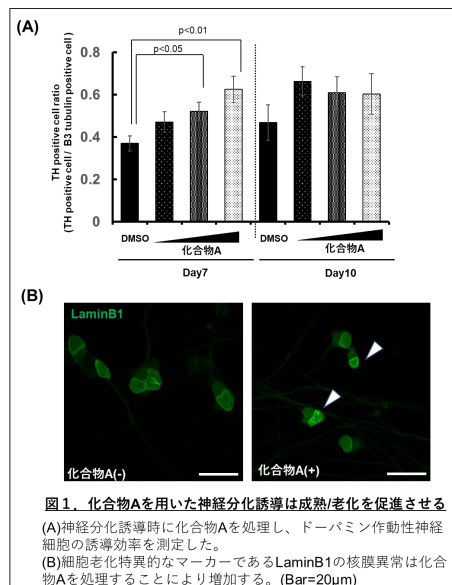


図1. 化合物Aを用いた神経分化誘導は成熟/老化を促進させる
(A)神経分化誘導時に化合物Aを処理し、ドーパミン作動性神経細胞の誘導効率を測定した。
(B)細胞老化特異的なマーカーであるLaminB1の核膜異常は化合物Aを処理することにより増加する。(Bar=20 μ m)

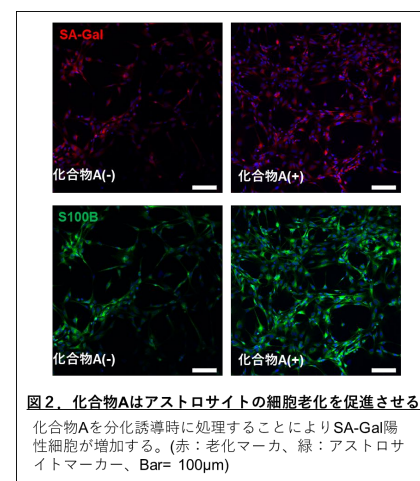


図2. 化合物Aはアストロサイトの細胞老化を促進させる
化合物Aを分化誘導時に処理することによりSA-Gal陽性細胞が増加する。(赤: 老化マーカー、緑: アストロサイトマーカー、Bar= 100 μ m)

は、多検体を対象としたハイスループットな病態解析や薬剤スクリーニングには不向きであるという大きな欠点が存在する。一方で従来の神経細胞もしくはグリア系細胞を用いた平面培養による神経変性疾患の解析システムは、創薬などのハイスループット化の実現に関しては比較的容易であるが、脳内環境を模倣していないという点で in vivo における完全な病態の再現性に改良の余地がある。本研究で検討した iPS 細胞由来神経細胞・アストロサイトの共培養システムは、より精度の高い病態解析を行うために、「両者（オルガノイド・平面培養）の両方の利点を活かせるような、脳内環境の均一的な再現を可能とする新しい神経変性疾患解析 iPS 細胞モデルになり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Koji Nishihara, Takahiro Shiga, Eri Nakamura, Tomohiko Akiyama, Takashi Sasaki, Sadafumi Suzuki, Minoru S.H. Ko, Norihiro Tada, Hideyuki Okano and Wado Akamatsu. Induced pluripotent stem cells reprogrammed with three inhibitors show accelerated differentiation potentials with high levels of 2-cell-stage marker expression. *Stem Cell Reports*. 2019 Feb 12;12(2):305-318.
DOI:10.1016/j.stemcr.2018.12.018

〔学会発表〕(計5件)

1. Takahiro Shiga, Sakura Miyoshi, Naoko Kuzumaki, Ke-ichi Ishikawa, Nobutaka Hattori, Hideyuki Okano, Wado Akamatsu. Screening of compounds promoting maturation and ageing in iPSC-derived neurons. *International Society for Stem Cell Research*. 2017.
2. 志賀 孝宏, 三好 さくら, 葛巻 直子, 石川 景一, 服部 信孝, 岡野 栄之, 赤松 和土, 神経変性疾患 iPS 細胞モデルの表現型の発現を加速する低分子化合物の探索と評価 日本再生医療学会 2017
3. 志賀 孝宏, 三好 さくら, 葛巻 直子, 石川 景一, 服部 信孝, 岡野 栄之, 赤松 和土, 神経分化と老化を加速する低分子化合物を用いた神経変性疾患 iPS 解析システムの構築 日本再生医療学会 2018
4. 志賀 孝宏, 三好 さくら, 葛巻 直子, 石川 景一, 服部 信孝, 岡野 栄之, 赤松 和土, ATM 阻害はヒト iPS 細胞由来神経細胞の老化を加速させる 日本分子生物学会 2018
5. 志賀 孝宏, 三好 さくら, 葛巻 直子, 石川 景一, 服部 信孝, 岡野 栄之, 赤松 和土, 老化を加速する低分子化合物を用いた神経変性疾患 iPS 解析システムの構築 神経科学学会 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：神経細胞の老化促進剤
発明者：赤松和土、志賀孝宏、葛巻直子、岡野栄之
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-077304
出願年：平成 30 年
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。