

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03567

研究課題名（和文）サブタイプ特異的な抑制性神経の選択作出が可能にする精神疾患神経活動スクリーニング

研究課題名（英文）Neuronal Activity Screening for Psychiatric Disorders Enabled by Subtype-specific Neuronal Induction Systems

研究代表者

石川 充（Ishikawa, Mitsuru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：10613995

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では精神疾患の病態解析や創薬スクリーニングを見据えて、ヒトiPS細胞からの効率的なサブタイプ特異的な神経分化誘導を行うこと、さらにin vitroで簡単に神経活動をモニターできる実験系を構築することが目標である。今回研究代表者は複数の統合失調症患者や神経発達障害患者、さらにアルツハイマー病患者などのiPS細胞からサブタイプ特異的な神経細胞を誘導する遺伝子導入システムの構築に成功した。さらに、光遺伝学的な神経活動惹起に応じて神経活動を光計測として計測するシステムをiPS細胞由来神経細胞に適用した。これによって、疾患患者由来神経細胞のシナプス形成能や神経活動能を測定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の主要な意義としては精神疾患の病態評価や治療薬開発のための有用なツールを開発できた点である。具体的には、iPS細胞の効果的な活用方法を作出した点である。一般的に、iPS細胞からの神経細胞分化には時間・労力を要する上に細胞クローンごとの多様性が大きいことで、実験結果の再現性が低くなる傾向にあった。そこで我々はより選択的なサブタイプ特異的な神経細胞への分化誘導法を作出した。また、神経活動のモニターもロバストに行えるように、光操作・光計測を基盤とした手法を適用した。これによって、特定の家族性疾患のみならず、大規模な検体数の孤発性患者に対するiPS細胞実験の応用ができるようになる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the aim is to induce efficient subtype-specific neuronal differentiation from human induced pluripotent stem (iPS) cells, envisioning the analysis of the pathology of psychiatric disorders and drug screening. Furthermore, the study seeks to establish an experimental system that can easily monitor neuronal activity in vitro. We have successfully constructed a gene introduction system that induces subtype-specific neurons from iPS cells of patients with various schizophrenia, neurodevelopmental disorders, and Alzheimer's disease. Additionally, a system that measures neuronal activity as optical measurement in response to optogenetically induced neuronal activity has been applied to neurons derived from iPS cells. This allows us to measure the synaptic formation ability and neuronal activity ability of neurons derived from patients with disorders.

研究分野：神経発生・精神医学

キーワード：iPS細胞 神経活動 抑制性神経細胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系疾患の治療研究として、iPS細胞の活用は有用なツールとなっている。実際に、研究代表者らは iPS 細胞を用いて筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療候補薬を発見し (Fujimori K, Ishikawa M. et al., 2018, Nat Medicine) 世界初となる iPS 細胞研究に基づく ALS 治療薬師主導治験に移行した。しかし精神疾患については、世界の大学等研究機関において iPS 細胞を用いた具体的な治療法・治験に到達したケースは皆無といえる。これは精神疾患の発症原因の複雑さに加え、iPS 細胞研究がもつ次の潜在的な問題が原因と考えられる。

- (1) iPS 細胞由来の神経細胞が疾患の表現型をあらわしていない可能性がある。
- (2) ドナーや、クローン間の統計的「バラつき」が大きく、科学的評価が困難である。
- (3) 神経系疾患の電気的機能解析には時間と労力を要し、スループット性が低い。

これらの具体的な理由と、研究代表者がそれに対して取り組んだ解決手段を次に記載する。

(1) 「表現型が現れづらい」原因と研究代表者による問題解決提案・準備状況

これは、表現型が現れる標的の神経細胞に正しく分化誘導ができていないためと考えられる。これに対し、米国 Stanford 大学 Werning M. 博士らは転写因子導入を基盤とした効果的な分化技術 (Zhang Y. et al. 2013, Neuron) を開発した。研究代表者は当米国グループと共同研究を行った。そして、新たに興奮性と抑制性神経細胞を、別々に 100% の割合で作分けする技術を確立した。(Ishii T, Ishikawa M. et al, 2019, eNeuro) しかし、一方で抑制性神経細胞のうち、パルプアルブミン陽性神経細胞 (PV+神経) は精神神経活動に非常に重要な役割をもつ (Lewis DA et al, 2012, Trends Neurosci) にもかかわらず、極めて作出困難なままであった。

(2) 「サンプル間のデータがバラつく」原因と研究代表者による問題解決提案・準備状況

これは、精神疾患の遺伝的背景が複雑・多様であること、また同一個体内でも、iPS 細胞クローンごとの分化成熟性にバラつきが大きく、統計解析が困難 (Volpato V. et al, 2018, StemCell Rep) なたためと考えられる。これに対し研究代表者は、神経分化能をもつ miRNA-9/9*, -124 (Yoo AS et al., 2011, Nature) に着目した。これを活用して、あらゆる iPS 細胞の神経分化・成熟の高速化、データのバラつきの収束に成功した。(Ishikawa M et al. 2020, Cells)

(3) 「スループット性が低い」原因と研究代表者による問題解決提案・準備状況

そもそも、精神疾患解析では神経ネットワークの形成に必要な神経活動性を評価しなければならない。スループット性が低くなる理由は、電気生理学的アプローチには、技術力・時間・労力が必要であり、多検体解析が困難だからである。これに対し研究代表者は、米国グループの報告 (Fan LZ et al. 2018, Nat Methods) をもとに、パッチクランプ法に代わる光遺伝学的操作・光計測法 (オプトパッチ) のセットアップが重要であると考えた。このパイロット実験によって多検体かつ細胞個別に神経活動の計測を行えるようになりつつあった (石川、Neuro2019、シンポジウム口演、2019年7月)。以上から、研究代表者は本研究の背景にある「iPS 細胞技術における問い」には応えてきた。そこで、精神疾患表現型の評価系をつくり、治療法の開発に到達できるか、という「精神医学領域における問い」に応えたいと考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は、iPS 細胞を用いた疾患研究における基礎的問題を克服してきた。そこで、医学実装して「精神疾患で現れる神経活動性の低下を再現し、その原因を突き止め、改善するような創薬スクリーニング系の構築にまで発展させる」という目的をもって研究することとした。

なお、本研究の独自性について、ここで記述する。精神疾患の病態解明には、神経ネットワークレベルで研究する必要があるが、それは非常に困難であった。そこで、まず興奮/抑制の制御システムに着目し、世界に先駆けて興奮性神経細胞と抑制性神経細胞をほぼ 100% の割合で作分けする技術を構築した (Ishii T, Ishikawa M, et al, 2019, eNeuro, 2019年10月プレスリリース)。さらに、iPS 細胞特有の分化・成熟傾向のバラつきをなくすために、これまで報告のない高速神経誘導法を確立した (Ishikawa M. et al, 2020, Cells)。さらにパルプアルブミン陽性神経細胞 (PV+神経) は抑制性神経の中でも、最も精神活動に重要な神経細胞だが、その分化作出技術は停滞していたため、研究代表者のグループで、独自作成した脳オルガノイド (Nakamura Met al, 2019, Stem Cell Rep) に新たに 1 細胞 RNA シーケンス法を施し、わずかに含まれていた PV+神経における遺伝子プロファイルを精密解析した。そして、PV+神経を作り出すためのあたらしい転写因子 A、B を同定した。これにより、従来以上の PV+神経細胞の純化に成功した。

3. 研究の方法

3年間の研究計画を時系列順に記載する。

(1) 1年目

疾患特異的 iPS 細胞に各種神経分化誘導を可能にする遺伝子発現システムを適用する iPS 細胞の Tet-On 神経誘導システムを準備する。

これらに、下記の誘導用遺伝子発現システムを導入する。

- (i) グルタミン酸作動性神経誘導因子 (Tet0-Neurog2)
- (ii) GABA 作動性神経誘導因子 (Tet0-Ascl1, Dlx2)
- (iii) 高速神経誘導因子 (Tet0-pri-miR-9/9*-124)
- (iv) PV+神経誘導因子 (特許出願技術)

PV+神経の Fast-Spiking (FS) 性を検証

PV+神経は、その強い抑制能力をもつ高頻度活動スパイクを示す「Fast-Spiking (FS) Neuron」として知られている。そこで健常人由来の PV+神経をパッチクランプ法で電氣的に解析し、一定の活動性を保っていることを確認する。

(2) 2年目

FS を光計測系に移行し多検体でも解析が可能にする

FS を光計測で確認できるようにするために、膜電位インジケータを遺伝子導入して活動性を光評価する。あるいは光刺激依存的な神経活動を Ca²⁺イメージングとしてモニターする系の確立を行う。

疾患 PV+神経の生化学的な表現型解析

患者由来 PV+神経の Total RNA から RNA-Seq を行い、パスウェイ変動・遺伝子オントロジー (GO) 等を評価する。

(3) 3年目

Fast-Spiking 表現型を検証・パイロット試験で改善性を評価

(2)- で明らかになった変動遺伝子をレスキューすることを見据え、患者 PV+神経の FS を光学的に解析し、薬剤スクリーニングが可能な系としての導出を目指す。

4. 研究成果

(1) 疾患特異的細胞に対する遺伝子導入と分化誘導

疾患特異的 iPS 細胞から PV+神経細胞への作出を目的として、実際に、プレセニリン遺伝子変異型家族性アルツハイマー病、ナトリウムチャンネル NaV1.1 変異難治性てんかん Dravet 症候群、神経発達障害 Angelman 症候群、および 22q11.2 欠損統合失調症の患者由来細胞、さらには統合失調症リスク遺伝子の一つ SETD1A 遺伝子にゲノム編集で変異導入した iPS 細胞に対して、グルタミン酸作動性神経細胞、GABA 作動性神経細胞、迅速神経成熟化細胞、PV+GABA 神経細胞を誘導する遺伝子の導入を完了させた。また、PV+神経細胞との共培養対象としてグルタミン酸作動性神経細胞への迅速分化誘導も行えるように、TetOn システムで細胞株を調製し、凍結保存しておくなど、柔軟にスクリーニングに使える試料調製ができた。さらに、作出した健常人由来 PV+神経細胞が神経活動特性を現わすかどうかについて、電気生理学的な解析を行った。その結果、通常の GABA 作動性抑制性神経細胞に比較して、頻度の高い発火特性を持つことが示された。すなわちこれは PV+神経細胞特有の性質である Fast-Spike 性を疑似的に表していると予想され、今後の *in vitro* 疾患表現型探索として有用な解析項目となると考えられた。また、疾患と健常とで誘導した神経細胞の scRNA-SEQ による網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、抑制性神経において疾患の種類横断的に共通な GO やパスウェイが得られることが分かった (Ishikawa M et al, *in preparation*)。

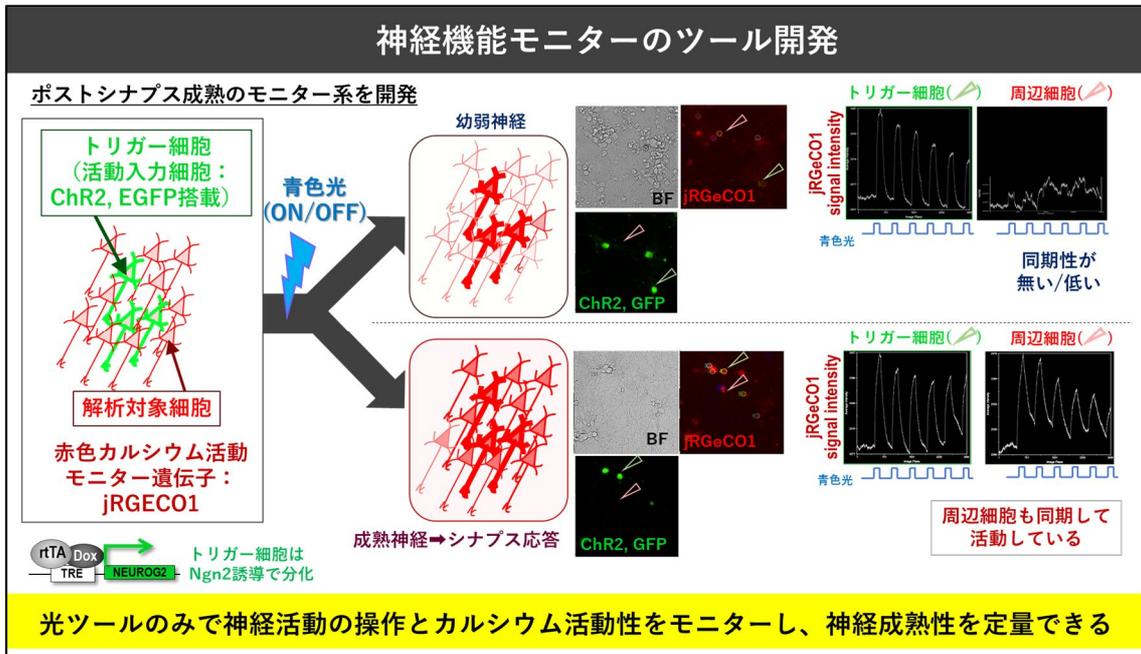
(2) 神経活動の光操作・光計測技術の開発

病態や創薬スクリーニングに応用できる実験系を作出するため、電気生理学的な神経活動解析をイメージングベースの操作・計測プラットフォームとして導出した。具体的には、光遺伝学 (Optogenetics) と膜電位イメージングのツール開発と iPS 細胞由来神経細胞への適用を行った。既にベクター構築に成功していた膜電位インジケータ QuasAr (実際には Syn1::QuasAr3-mCitrine-P2A-NLS/mCherry) をレンチウイルスに搭載して光計測を試みたところ、神経培養日数に従って高強度の蛍光を示すことが分かった。そして、オプトパッチ (光刺激と光計測による遺伝学ベースの非パッチクランプ性の神経活動評価法) として、既存の顕微鏡の蛍光フィルター系の改良を行った。また、より簡便な手法として、細胞活動の間接的なインジケータとして Ca イメージングを行っている。青色刺激による、ChR2 活性に伴って、jRGECO1 など赤色系インジケ

ーターの活動が応答することを確認できた。

(3) 誘導神経細胞と光技術との組み合わせによる、疾患解析へのアプローチ
研究年度 1-2 年目に樹立した精神疾患関連の患者 iPS 細胞、およびゲノム編集による変異導入 iPS 細胞に対して、膜電位インジケータ用レンチウイルスまたは、カルシウムインジケータ用のレンチウイルスを感染後、グルタミン酸作動性および GABA 作動性神経細胞の選択的な分化誘導を行った。その結果、とりわけカルシウムインジケータ (jRCaMP7b や jRGECO1) による活動性のモニターは優れており、他のインジケータと比較して高い S/N で経時的にカルシウム活動性を検出することができた。さらに、光遺伝学的に細胞活動を上昇させるレンチウイルスあるいは AAV (Syn1::ChR2 等) の導入によって、光 (神経活動) 依存的に iPS 細胞由来神経細胞のカルシウム流入をイメージングできた。また、この際に、刺激光の干渉なく赤色カルシウムイメージングを行うことができるようになった。興味深い結果として、ChR2(+)および ChR2(-)細胞の共培養下において、シナプス結合が強固に行われている培養系では、ChR2(-)細胞においても、光刺激依存的に、細胞内カルシウム濃度の一過的な上昇を捉えることができた。すなわち、我々の導出した、iPS 細胞由来の神経細胞分化誘導系で、シナプス形成の評価を簡単にライブセルでモニターできる培養系として導出できたことになる【図 1】。この培養系を用いたところ、一定の精神疾患関連 iPS 細胞由来の神経細胞で、カルシウム活動性および、シナプス形成能が低いことが分かった。これは、すでに知られている in vitro/in vivo の実験結果と一致する。また、この解析方法とは別に、より多検体で実験できるシステムとして多点電極アレイ (MEA) を用いた神経活動モニターのための分化培養法も構築し(Kondo et al, 2023, Int J Mol Sci) 【図 2】 in vitro イメージングと MEA の両面から神経活動についてデータを取得できるようになった。このように、最終年度において、簡易的に神経活動や神経ネットワークに関連する機能を評価する新しいスクリーニング系が導出できた。

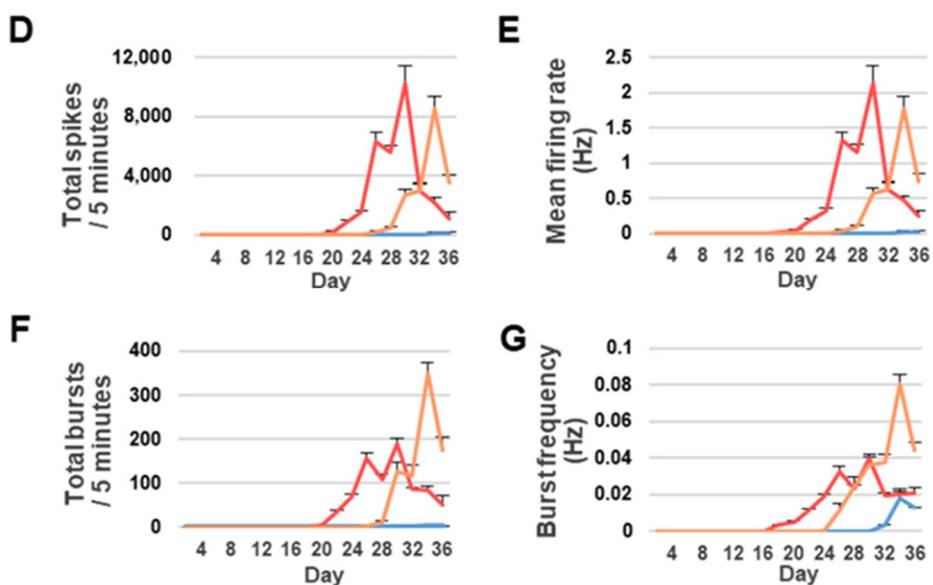
【図 1】



【図 2】

Kondo T et al, 2023、IJMSより引用

— Healthy donor
— FUS-ALS
— SOD1-ALS



短期間の培養でALS患者由来運動神経細胞の神経「過」活動をモニターすることができた

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 Kondo Toshio, Ebinuma Ichori, Tanaka Hiroataka, Nishikawa Yukitoshi, Komiya Takaki, Ishikawa Mitsuru, Okano Hideyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Rapid and Robust Multi-Phenotypic Assay System for ALS Using Human iPS Cells with Mutations in Causative Genes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6987 ~ 6987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24086987	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 Saeki Tsubasa, Yoshimatsu Sho, Ishikawa Mitsuru, Hon Chung-Chau, Koya Ikuko, Shibata Shinsuke, Hosoya Makoto, Saegusa Chika, Ogawa Kaoru, Shin Jay W., Fujioka Masato, Okano Hideyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Critical roles of FGF, RA, and WNT signalling in the development of the human otic placode and subsequent lineages in a dish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 165 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.04.008	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13件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石川 充
2. 発表標題 サブタイプ特異的なヒト神経細胞をカスタム作成する
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuru Ishikawa
2. 発表標題 A Platform for Pathological Analysis Based on Robust and Subtype-specific Neuronal Differentiation from Human iPS Cells
3. 学会等名 SLDDRS WEBINAR SERIES 2021-2023. 5th Keio-Stanford Webinar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuru Ishikawa
2. 発表標題 A Phenotypic Analysis Based on Robust Neural Differentiation using bHLH-type Transcription Factors
3. 学会等名 ISSCR/JSRM Tokyo 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川充
2. 発表標題 神経疾患の病態・創薬スクリーニングのためのロバストな神経分化誘導
3. 学会等名 リプロセル 第20回ウェビナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川充
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を利用した神経変性疾患・精神疾患の病態・創薬スクリーニングの実例
3. 学会等名 高崎健康福祉大学 第16回薬学部研究発表会 (特別講演) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川充
2. 発表標題 Diverse approaches to neuronal cell culture from iPS cells: toward a modeling for neurodevelopmental disorders
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 充
2. 発表標題 In vitroスクリーニング利用を目指したロバストな神経サブタイプ分化プラットフォームの構築
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 充
2. 発表標題 アンジェルマン症候群患者 iPS 細胞からの様々な神経細胞の作出と遺伝子発現解析
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 充
2. 発表標題 miRNA を用いたヒト iPS 細胞からのロバストな興奮性神経分化
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 充
2. 発表標題 E / I 均衡解析を見据えた多能性幹細胞からのロバストな神経分化
3. 学会等名 第42回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 銭映美
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた神経サブタイプ特異的な分化誘導法の検証とHDAC阻害剤の関与
3. 学会等名 第42回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 銭映美
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からのサブサイブ特異的な抑制性神経細胞の分化誘導と可視化
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮岡賢太郎
2. 発表標題 神経細胞ネットワーク形成関連遺伝子解析のためのiPS細胞由来興奮性/抑制性神経細胞の分離解析法
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------