

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16599

研究課題名（和文）患者アストロサイトを用いたアルツハイマー病病態の解明

研究課題名（英文）Modeling Alzheimer's disease with patient astrocyte

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病は、高齢化社会の到来とともに激増することが予測されるが、治療法は限られる。アルツハイマー病病態の理解のために、脳内で最も数が多い細胞種であるアストロサイトに焦点をあてた。患者のiPS細胞からアストロサイトを調整するため、分化誘導法の改良に取り組んだ。また、アルツハイマー病の90%以上を占める孤発性アルツハイマー病はモデル化することが困難であった。アストロサイトで孤発性アルツハイマー病でモデル化するためのプラットフォームとして、コホート規模の疾患特異的iPS細胞と、細胞種と表現型ごとに遺伝的背景を探索できるcellGWAS法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞技術に基盤を置くiPS細胞コホートおよびcellGWASを用いたCDiP技術は、細胞種および病態ごとに遺伝背景を紐解くことで、今までモデル化が困難であった孤発性ADの病態リスク評価と創薬標的を明らかにし、得られた遺伝子データに基づく実社会での発症予測を提供した。将来的に、遺伝情報から、孤発性ADを発症する老年期から何十年も前の時点で、発症リスク展望を提示し、予防的あるいは治療的介入の必要可否を明示してくれる未来につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease is expected to increase dramatically with the advent of an aging society, but treatment methods are limited. To understand the pathogenesis of Alzheimer's disease, we focused on astrocytes, the most abundant cell type in the brain. In order to prepare astrocytes from patient iPS cells, we worked on improving the differentiation induction method. In addition, we established a method to model sporadic Alzheimer's disease, which accounts for more than 90% of Alzheimer's disease. As a platform for modeling sporadic Alzheimer's disease in astrocytes, we constructed a cohort-scale disease-specific iPS cell and cellGWAS method that can explore the genetic background by each cell-type and phenotype.

研究分野：神経科学

キーワード：アストロサイト iPS細胞 アルツハイマー病 孤発性 GWAS

1. 研究開始当初の背景

我が国のアルツハイマー病患者数は、超高齢社会の到来とともに激増しているため、医学的・社会・経済的観点からあらゆる手段を講じ対策する必要がある。アルツハイマー病病態は数十年かけてゆっくり進行し、無症候期の脳内では神経細胞で産生されるアミロイドβ蛋白やタウ蛋白が蓄積し、最終的に神経回路機能の不調とともに認知機能低下が生じる。しかし、アルツハイマー病の病態は不明な点が多く、治療法も十分に開発されていない。

この背景として、アルツハイマー病病態の根幹にあると想定される遺伝的背景の理解不十分である。例えば、アルツハイマー病患者の遺伝学的コホートにおいて、免疫応答・脂質代謝など、アストロサイトが司る遺伝子パスウェイがアルツハイマー病態に関連すると示唆されている (Cuyvers et al. Lancet Neurol 2017)。また、アストロサイトが能動的にアミロイドβ蛋白の分化に寄与する可能性も指摘されている (Kidana et al. EMBO Mol Med. 2018) など、アストロサイト病態が徐々に明らかになりつつある。しかし、アストロサイトが、いつ、どこで、どのようにして、加齢に伴い進行するアルツハイマー病態に関わっているのか? という問いの答えは未解明で、遺伝的背景の有機的な理解必要である。この問いに答えるため、本計画を策定した。

2. 研究の目的

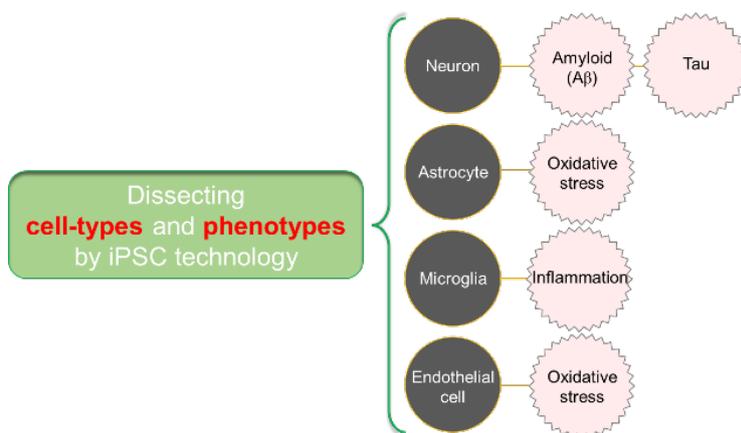
アルツハイマー病患者および健常人から樹立した iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) を材料として、分化誘導して調整された神経細胞やアストロサイトを用いて病態を再現し、その遺伝学的背景と病態形成過程の理解に取り組むことを目的とする。

3. 研究の方法

患者の線維芽細胞や末梢血リンパ球から作製された iPS 細胞は、無限に増えあらゆる細胞種に変化 (分化誘導) させられる特性を持つ。このため、患者個々人の特性を反映できる状態で、研究資料が手に入りにくい脳・神経系細胞を研究に用いることが出来る、という他のモデルにはない独自性を有する。特に、個々の患者ごとに異なることが想定されている孤発性アルツハイマー病の患者の遺伝的背景をそのまま in vitro の実験系に持ち込むことができる。

まずは、疾患特異的 iPS 細胞から、アストロサイトへの分化誘導法の確立に取り組んだ。従来のアストロサイト分化誘導には数か月単位の長期間を要するため、数十~数百単位の多検体 iPS 細胞を用いた解析や、病態評価スクリーニングに用いることが困難である。そこで、培養条件を工夫することで、アストロサイト分化誘導にかかる期間の短縮と、分化誘導効率の最適化に取り組んだ。

また、このような疾患特異的 iPS 細胞の特性を最大限活用しながら、複雑な孤発性 AD の病態を、細胞種ごとの病的形質組み合わせとして捉えて、分解することを試みた (右図)。そして細胞種特異的な病的形質と関連する遺伝子座を、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により探索する「cell GWAS」法の開発に取り組み、アルツハイマー病のアストロサイト病態と遺伝的背景を明らかにするためのプラットフォーム構築を目指した。

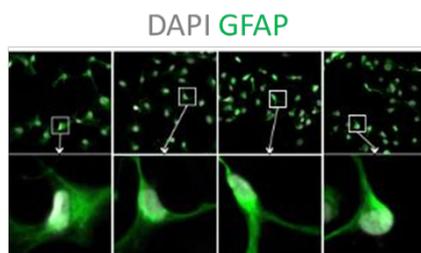


4. 研究成果

アストロサイト分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞からアストロサイト分化誘導の最適化に取り組む、分化誘導工程のサイトカインや培養環境を最適化することにより、より短い分化誘導工程と日数でも高純度の GFAP 陽性ア

ストロサイト集団を調整できるようになった。

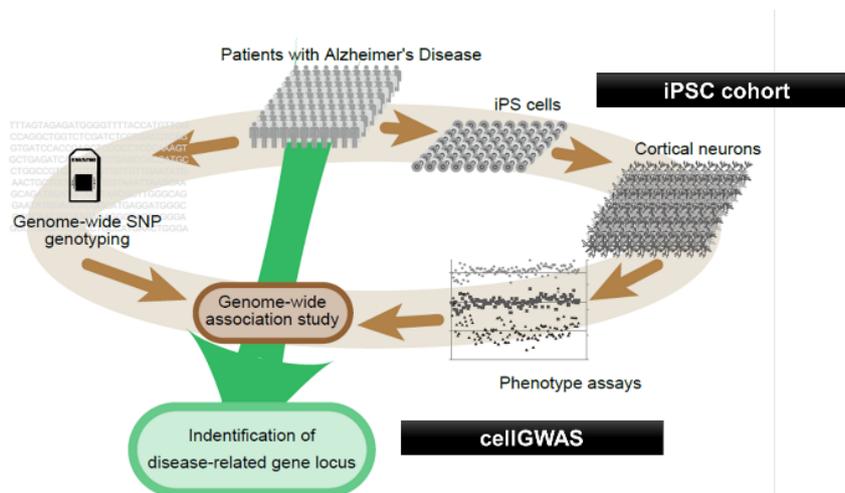


iPS コホートの構築

次に、患者体細胞を iPS 細胞という受精卵に近い状態にまで時間を遡らせることで、外的修飾因子を受ける前の病的形質とゲノム情報を用いた GWAS を行うことを計画した。iPS 細胞を用いることで、ノイズとして作用する外的修飾因子を避けることが出来るため、最小限のコホート規模で遺伝的背景を探索できると考えた。そこで我々は、102 名の孤発性 AD 患者の末梢血単核球から iPS 細胞を樹立した。さらに、100 例を超える規模の iPS 細胞を用いた検討では、すべての患者集団の間でのばらつきなく AD 病態に関連する細胞種集団を調整するために、簡便かつ高精度の分化誘導方法が必須となる。そこで我々は、ヒト NGN2 遺伝子を 5 日間だけ発現させることにより、わずか 8 日間で大脳皮質神経細胞を調整する direct conversion 法による分化誘導を行った。調整された 102 名分の大脳皮質神経細胞のほぼ全てが、神経細胞マーカーである MAP2 あるいは大脳皮質神経細胞マーカーである SATB2 を発現しており、高純度かつ均質な大脳皮質神経細胞集団であった。このように、cell GWAS に適合できる規模の iPS 細胞を集めたりソースとして「iPS コホート」を構築した。

cell GWAS の実施

iPS 細胞から分化誘導された大脳皮質神経細胞の培養上清中に放出された、AD の中心的な病因タンパクであるアミロイド β ($A\beta$) を定量した。この定量値を患者個々人の $A\beta$ の産生動態の病的形質として捉え、cell GWAS を実施した。102 名の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞が呈する病的形質として、 $A\beta$ 42/40 比率を連続変数 trait として使い、GWAS を実施した。cell GWAS の結果、 $A\beta$ 42/40 比率に関連する 24 個の遺伝子座を同定した。このうち 5 個は $A\beta$ 産生に関連することが報告されており、8 個は臨床遺伝学的コホートの GWAS で AD に関連することが示された遺伝子であった。従って、cell GWAS は大規模な患者群を必要とする臨床遺伝学的コホート GWAS の結果と一部重複しており、神経細胞での $A\beta$ 42/40 比率と関連する遺伝子を適切に抽出していると考えた。そして、残りの 11 個は新しい AD 関連遺伝子として同定された。



さらに、本研究で用いた大脳皮質神経細胞× $A\beta$ の組み合わせの他にも、細胞種としてアストロサイトなど脳を構成する細胞を準備することで、「細胞種×病的形質」の組み合わせごとの cell GWAS を通じ、アストロサイトの呈する表現型と関連する遺伝情報や病態の解明につながると考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Kondo Takayuki, Hara Norikazu, Koyama Satoshi, Yada Yuichiro, Tsukita Kayoko, Nagahashi Ayako, Ikeuchi Takeshi, Ishii Kenji, Asada Takashi, Arai Tetsuaki, Yamada Ryo, Inoue Haruhisa, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (J-ADNI)	4. 巻 2
2. 論文標題 Dissection of the polygenic architecture of neuronal A β production using a large sample of individual iPSC lines derived from Alzheimer's disease patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 125 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-021-00158-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Takayuki, Yamamoto Tsuyoshi, Okayama Kaoru, Narumi Hideki, Inoue Haruhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolites of soil microorganisms modulate amyloid β production in Alzheimer's neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06513-z	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0件

〔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
---------	---------