

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07301

研究課題名（和文）パーキンソン病iPS細胞研究の基盤となる脳内環境モデルと病態検出システムの確立

研究課題名（英文）Development of a brain environment model and pathological detection system as a basis for iPS cell analysis in Parkinson's disease

研究代表者

志賀 孝宏（SHIGA, Takahiro）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

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）：我が国の高齢化が進むにつれて、高齢発症神経変性疾患を患う人の割合が増大することが危惧される。神経変性疾患に対するアプローチとしてiPS細胞を用いた神経変性疾患モデルの研究が多く報告されているが、時間軸・脳構造・解析技術を考慮していない研究が多く、患者剖検脳に見られる病態を確認できている例はほとんど存在しない。本研究は、申請者が確立している簡易的に老化を促進させる低分子化合物と効率的なグリア系細胞への誘導を応用して、平面上に高齢期の脳構造を模倣した新たなデバイスを作成し、高齢発症神経変性疾患の病態解析に応用することを目指した研究である。

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、多検体の高齢発症神経変性疾患病態解析や創薬スクリーニングに適した手法の開発を目的として構築した基盤システムであり、従来の単層培養法と比較して高精度な結果を得ることができるとともに、時間軸・脳内環境を模倣したモデルのため、ヒト剖検脳に近いデータを取得できる可能性を秘めている。また、様々な神経変性疾患にも応用可能なシステムなため、効率的に病態表現型や創薬スクリーニングを行うことができる。

研究成果の概要（英文）：As our country ages, there is growing concern about the increasing proportion of people suffering from late-onset neurodegenerative diseases. Although many studies have reported on neurodegenerative disease models using iPS cells, most do not consider the time axis, brain structure, or analysis techniques, resulting in few examples that replicate the pathology observed in postmortem brains. This research aimed to apply the applicant's established techniques-using low molecular compounds that promote aging and efficient induction of glial cells-to create a new device that mimics the brain structure of old age on a flat surface, and to use it for the pathological analysis of late-onset neurodegenerative diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：老化 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、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。加齢と深く関与している疾患として、アルツハイマー病やパーキンソン病を含む神経変性疾患を患う人の増加が懸念されている。神経変性疾患には根本的な治療法は存在せず、対処療法が主である。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 (Stem Cell Reports, 2017 など)、グリア系細胞 (Stem Cell Reports, 2014 など) といったそれぞれの細胞における病態に焦点を当てている。一方で、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、脳構造と老化を模倣したモデルとしてオルガノイドが近年着目されている。しかしながら煩雑で長期的な培養が必要な現在のオルガノイド培養法では、高齢期の脳構造を再現することは困難であり、患者剖検脳で観察される病態を明確に検出することができない。一方で、平面培養 (2D 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な方法であるが、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。それに加えて、一部のパーキンソン病やアルツハイマー病など高齢期に発症する異常タンパク質凝集を有する神経変性疾患については、数十日程度の長期間培養を行っても患者で数十年かかる病態変化を再現することが難しい。また、病態に関与する異常タンパク質を *in vitro* で検出することは、ヒト剖検脳と比較して明確な病態表現型を観察することが困難であった。

本研究の目的は、従来の 2D 培養を使用しながら、加齢と細胞間相互作用を含む脳内環境の模倣を組み合わせることによる神経変性疾患の病態解析システムを構築し、従来の単独培養やオルガノイドで実現できなかった高精度な病態解析と創薬を実現することである。

### 2. 研究の目的

申請者らのグループが同定した老化を促進させる化合物 JA1 (特許出願中) を用いることで、iPS 細胞由来神経細胞の老化速度を速めることに成功した。化合物を用いない長期培養と化合物により老化が促進された短期培養を比較し、JA1 が老化速度をどれくらい早めるかを最初に検証した。次に、JA1 が誘導する老化促進現象がヒト体細胞の加齢とどの程度類似しているのかを検証するため、RNAseq を用いた pathway 解析を行った。最後に、申請者が誘導法を確立した iPS 細胞由来アストロサイトとニューロンの共培養を用いて、経時的に同期バースト発火やスパイク数の変動をマルチ電極アレイ (MEA) で測定し、単層培養および共培養時における成熟指標 (同期バーストやスパイク数) への影響を検証した。

### 3. 研究の方法

iPS 細胞由来神経細胞の研究には、以下の 2 つの大きな花譜台が存在している。一つ目は、ES/iPS 細胞由来細胞は、生体由来幹細胞よりも分化が遅いということ、二つ目は成熟および老化速度を制御する技術が確立されていないため、胎児に近い性質を持つことである。これらの課題により、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の発症年齢

(50~70歳)に対応するためには、非常に長期間の培養が必要とされた。複数の研究グループが、iPS細胞由来神経の成熟および老化速度を促進する技術を提唱している。例えば、早老症遺伝子である Progerin の遺伝子導入や、化合物を用いた成熟および老化速度促進技術が報告されている。しかし、これらの技術にはそれぞれ課題があり、簡便に成熟および老化速度を制御できる技術の開発が急務とされていた。JA1 は成熟/老化を促進する化合物を探索する際に、111 種類の化合物からスクリーニングされ、成熟神経細胞のレポーターである Synapsin-GFP の輝度を上昇させ、自発発火を増加させる化合物である。JA1 が老化に与える影響を観察するために老化細胞マーカーで観察した。神経細胞の成熟から老化までの指標は3つに分類される。未成熟な神経細胞は Synapsin-蛍光レポーターの発現が低く、自発発火の頻度も低い。一方、成熟神経細胞では Synapsin-蛍光レポーターの発現が高く、自発発火の頻度も高い。老化神経細胞では、老化細胞マーカーである SA-βGal 陽性細胞が観察され、自発発火の頻度が低下する。JA1 による形態的および老化促進効果を検証したところ JA1 処理した iPS 細胞由来神経細胞では、神経突起長を有意に伸ばし、老化細胞マーカーである SA-βGal の陽性細胞を増加させた。また、テロメア長の短縮や核膜形態の異常、DNA 損傷の増加など、老化特異的な表現型が観察された。また、JA1 は HSP90 を介して細胞老化を促進していることが分かった。

遺伝子発現パターンから老化に関与する pathway が変化しているかを確認するため RNAseq 解析も行った。JA1 を処理した iPS 細胞由来神経細胞では 475 遺伝子の発現が低下し、93 遺伝子の発現が増加することが分かり、KEGG pathway 解析を行うと細胞周期、DNA 複製、p53 シグナル経路、細胞老化といった pathway が変化していました。変化していた pathway は細胞老化に深く関与しており、JA1 を処理することにより、老化表現型だけではなく老化に関連する pathway を変化させることを見出した。また、若年性由来線維芽細胞、JA1 を処理した若年性由来線維芽細胞、高齢性由来線維芽細胞を RNAseq により解析したところ、似たような発現パターンを持つ遺伝子が複数観察された。タグカウント比較により標準化したデータの主成分分析を行うと JA1 を処理した若年性由来線維芽細胞は、高齢性由来線維芽細胞に近い場所にプロットされ、階層解析でも、高齢性由来線維芽細胞と同じ階層に位置することから、近い特徴を持っていることが分かった。このことから、JA1 は iPS 細胞以外の細胞の老化速度を促進し、高齢由来の細胞に近い細胞へと変換させることも確認した。

最後に、iPS 細胞由来神経細胞とアストロサイトを共培養することで、神経成熟とネットワーク形成を促進するシステムを構築した。マルチ電極アレイ (MEA) システムを用いて、神経細胞の発火頻度 (Firing Rate) と同期バースト (Network Bursts) を測定した。その結果、単層培養した神経細胞では、中程度の培養期間 (約 30 日程度) でも同期バーストは観察されず、発火頻度も 1Hz と非常に低かった。一方、iPS 細胞由来神経細胞とアストロサイトを共培養した場合、中程度の培養期間に同期バーストが頻繁に観察され、発火頻度も単培養と比較して増加した。このことから、共培養システムは神経細胞の成熟速度とネットワーク形成を促進し、脳内環境を模倣できることが示唆された。我々が作成したアストロサイトは、脳内に存在するアストロサイトと特徴が類似しており、IL1B などのサイトカインで刺激することで活性型のアストロサイトに変換することも確認している。分化したアストロサイトのポピュレーションを探索するために、single-RNAseq に供したが詳細な分類まで至らなかった。

#### 4. 研究成果

本研究により、iPS 細胞由来神経細胞の成熟および老化を促進する化合物である JA1 が同定された。JA1 は、ヒト若年者由来線維芽細胞の老化を誘導し、高齢者由来線維芽細胞に近い性質を獲得させたことが確認された。さらに、JA1 による成熟および老化促進効果が HSP90 を介して制御されている可能性も示唆された。特に、JA1 の老化促進機能を利用することで、高齢発症神経変性疾患であるアルツハイマー病およびパーキンソン病の iPS 細胞モデルの解析日数を短縮することが可能であることが明らかになった。これは、長期間の培養が必要だった従来的方法に対し、大きな進展であると考えられる。また、JA1 を用いた 2D 培養モデルは、多検体の神経変性疾患に対する精度の高い病態解析や創薬スクリーニングに有用なツールとなり得る。

共培養システムの構築により、iPS 細胞由来神経細胞とアストロサイトをを用いた場合、単層培養と比較して神経細胞の成熟速度とネットワーク形成が大幅に向上することが示された。MEA システムを用いた評価により、共培養システムが神経細胞の発火頻度と同期バーストを増加させることが確認され、脳内の複雑な環境を模倣するための有用な手法であることが示唆された。本研究をまとめると、( 1 ) iPS 細胞由来神経細胞の成熟および老化を促進する化合物 JA1 ( ATM キナーゼ阻害剤 ) を同定、( 2 ) JA1 は、iPS 細胞由来神経細胞だけでなく、ヒト若年者由来線維芽細胞の老化を誘導し、高齢者由来線維芽細胞に近い性質を獲得させることを発見し、( 3 ) JA1 による成熟および老化促進効果は HSP90 を介して制御されている可能性が示唆された。( 4 ) 共培養システムを構築することで、従来的単層培養と比較して神経細胞の成熟速度およびネットワーク形成を促進し、脳内環境を模倣できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1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<br>Sasaki Ritsuko, Kurebayashi Nagomi, Eguchi Hidetaka, Horimoto Yoshiya, Shiga Takahiro, Miyazaki Sakiko, Kashiyama Taku, Akamatsu Wado, Saito Mitsue   | 4. 巻<br>113                   |
| 2. 論文標題<br>Involvement of kallikrein PAR2 proinflammatory pathway in severe trastuzumab induced cardiotoxicity  | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>3449 ~ 3462     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.15508   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Sarkar Avijite Kumer, Nakamura Shiro, Nakai Kento, Sato Taro, Shiga Takahiro, Abe Yuka, Hoashi Yurie, Inoue Tomio, Akamatsu Wado, Baba Kazuyoshi  | 4. 巻<br>59                    |
| 2. 論文標題<br>Increased excitability of human iPSC-derived neurons in HTR2A variant-related sleep bruxism  | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>102658 ~ 102658 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2022.102658   | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Yokota Mutsumi, Kakuta Soichiro, Shiga Takahiro, Ishikawa Kei-ichi, Okano Hideyuki, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado, Koike Masato   | 4. 巻<br>14                    |
| 2. 論文標題<br>Establishment of an in vitro model for analyzing mitochondrial ultrastructure in PRKN-mutated patient iPSC-derived dopaminergic neurons  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Brain   | 6. 最初と最後の頁<br>58~             |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s13041-021-00771-0  | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Nakai Kento, Shiga Takahiro, Yasuhara Rika, Sarkar Avijite Kumer, Abe Yuka, Nakamura Shiro, Hoashi Yurie, Kotani Keisuke, Tatsumoto Shoji, Ishikawa Hiroe, Go Yasuhiro, Inoue Tomio, Mishima Kenji, Akamatsu Wado, Baba Kazuyoshi | 4. 巻<br>11                    |
| 2. 論文標題<br>In vitro monitoring of HTR2A-positive neurons derived from human-induced pluripotent stem cells  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>15437~          |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-95041-3  | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Fukunaga Ichiro, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Chen Cheng, Iizumi Madoka, Shiga Takahiro, Matsuoka Rina, Anzai Takashi, Hibiya-Motegi Remi, Tajima Shori, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kamiya Kazusaku | 4. 巻<br>53                    |
| 2. 論文標題<br>Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p.G45E/Y136X mutation in GJB2                                      | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research   | 6. 最初と最後の頁<br>102290 ~ 102290 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2021.102290  | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>志賀 孝宏                                  |
| 2. 発表標題<br>細胞老化を誘導する化合物の同定と高齢発症神経変性疾患iPS細胞モデルへの活用 |
| 3. 学会等名<br>第22回日本再生医療学会総会                         |
| 4. 発表年<br>2023年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|--------------------------------------|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 野中 里紗<br>(NONAKA Risa)<br>(90614248) | 順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教<br><br>(32620) |    |

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 |
|---------|---------|