

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20860

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来神経回路の動態可視化による22q11.2欠失症候群の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of 22q11.2 deletion syndrome by visualizing human iPS cell-derived neural circuit

研究代表者

田宗 秀隆（Tamune, Hidetaka）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任助教

研究者番号：40908498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：精神・神経疾患の発症には遺伝因と環境因が強く影響し、シナプスレベルの病理変化が推定されているが、そのメカニズムの大部分は未解明である。

本研究では、ヒト多能性幹細胞を用いてヒト由来神経細胞を誘導し、生きたマウスに移植してイメージングすることで、生理的な環境下であるマウス脳内でヒト神経細胞がどのように神経分化していくかを経時的に評価することを目指した。本研究により、安定した分化培養系と移植系を確立でき、従来の手法では解析が難しかったヒト神経細胞の生理的環境下での神経分化について、より高精度に解析できるパイプラインが構築可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神・神経疾患の発症に対して、遺伝因と環境因がどの程度影響するか、ヒトサンプルを用いて切り分けるのは極めて困難であった。本研究結果により、細胞自律の要素と脳内環境の要素を峻別することができるようになった。さらに、ヒト細胞移植マウスに対して操作を加えることで環境因の要素をも考慮できる展望が開けた。この成果は、発達段階に応じて臨床的な困りごとが変化する22q11.2欠失症候群を持つ人に対する介入法について基礎医学的な検討を進める一助となりうる。

研究成果の概要（英文）：The onset of neuropsychiatric disorders is strongly influenced both by genetic and environmental factors. Synaptic-level pathological changes are estimated to play a key role; however, much of the underlying mechanisms remain unclear.

This study aimed to induce human-derived neurons from human pluripotent stem cells, transplant them into living mice, and visualize them to evaluate how human neurons differentiate in the physiological environment of the mouse brain during developmental course. Through this research, a stable differentiation culture protocol and a transplantation method were established, enabling a more accurate analysis of the neural differentiation of human neurons in physiological conditions that was previously difficult to analyze using conventional methods.

研究分野：精神・神経医学

キーワード：Human iPS cell 22q11.2 deletion Imaging Neural development Synapse

1. 研究開始当初の背景

精神・神経疾患の発症には遺伝因と環境因が強く影響し、シナプスレベルの病理変化が推定されているが、そのメカニズムの大部分は未解明である。メカニズム解明には従来用いられてきた動物モデルに加え、ヒト細胞を用いて研究する有用性が指摘されている。

本研究では、ヒト多能性幹細胞を用いてヒト由来神経細胞を誘導し、生きたマウスの脳内でヒト神経細胞の経時的なイメージングによる評価系を確立することを目指した。この系を用いて、統合失調症の最大リスク因子として知られるヒト 22q11.2 欠失症候群患者由来神経細胞における神経回路動態がどのような特徴を持つのか検証するのが研究開始当初の目的であった。

2. 研究の目的

精神・神経疾患、特に統合失調症の発症には遺伝因と環境因が強く影響し、シナプスレベルの病理変化が推定されているが、そのメカニズムの大部分は未解明である。メカニズム解明には従来動物モデルが用いられてきたが、近年ヒト固有のメカニズムの存在が明らかになってきており、ヒト精神機能の基盤をヒト細胞で研究する必要性が高まっている。

本研究では、ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) を用いてヒト由来神経細胞を誘導し、生きたマウスの脳内でヒト神経細胞の経時的なイメージングによる評価系を確立することを目指した。この系を用いて、統合失調症の最大リスク因子として知られるヒト 22q11.2 欠失症候群患者由来神経細胞における神経回路動態がどのような特徴を持つのか検証した。

3. 研究の方法

研究開始までに得ていた予備的結果を踏まえ、以下の 3 つを具体的なマイルストーンとして設定した。

A. 細胞移植法の改良 (ホスト側因子 / ドナー側因子): ドナー細胞側の影響を切り分けて細胞移植法を改良するため、免疫拒絶を受けない CAG-GFP マウスを用いてホスト要因を検討した。具体的にはホストマウスの日齢として胎生期・新生仔期を、ドナー細胞の移植経路として複数の方法を検討し、大脳皮質への移植条件を最適化した。その際、既報にある Ca^{2+} キレーターを用いる操作で定着する細胞の数が增加するかどうかを検討した。

さらにマウス同種移植の最適条件がヒト細胞の異種移植でも適応できるか検証した。分化培養法についても複数の方法を試した。

B. 効率的な蛍光タンパク発現法の検討: 予備的検討では免疫染色を用いてマウス脳内へのヒト細胞の生着を評価した。生きたマウス脳内で経時的なイメージングを行うためには蛍光タンパクを高輝度で移植細胞に発現させる必要があるため、ウイルス等を用いた蛍光タンパク発現法を検討した。その結果、カルシウムインジケーターや回路トレーサーへの発展も期待された。

C. 細胞移植後のマウスへの介入操作系の開発: ヒト iPS 細胞が移植後にマウスの脳内の神経回路に効率良く組み込まれれば、この移植系は細胞自律的要素、神経回路活動、環境要因の 3 つを明確に分離する実験を行うツールとして利用可能である。細胞移植後のマウスを用いて神経回路または環境要因の操作などの予備的な検討を行った。

4. 研究成果

A. 細胞移植法の改良 (ホスト側因子 / ドナー側因子)

ホスト側の因子として、免疫拒絶を受けない CAG-GFP マウスを用いて検討した。

ホストマウスの日齢として胎生期・新生仔期を、ドナー細胞の移植経路として複数の方法を検討し、大脳皮質への移植条件を最適化した。既報で移植効率をあげることが報告されている Ca^{2+} キレーターである EGTA は、われわれの系では移植効率をあげられる濃度で使用するとホストマウスに対して毒性が高いことが判明したため使用しないこととした。

その結果を踏まえて、GFP を恒常発現するヒト ES 細胞を種々の方法で分化誘導し、そのうちの一つの分化誘導法を用いて適切なタイミングで細胞移植を行うことで、図 1 に示すようにマウス大脳皮質に安定して広範にヒト細胞が分布するような分化培養条件・移植条件を作ることができた。

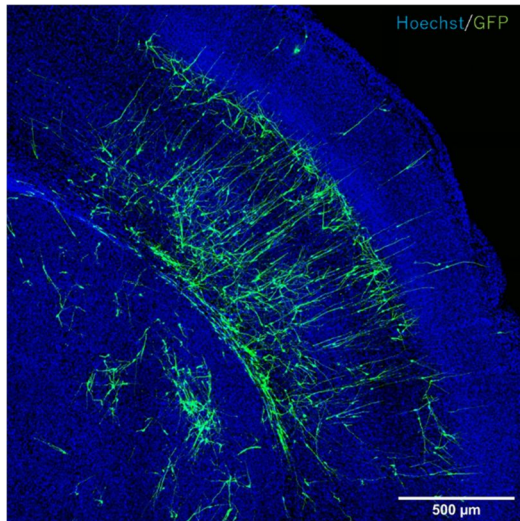


図 1：マウス脳に移植されたヒト神経細胞（緑）
マウス細胞核・ヒト細胞核（青）

B. 効率的な蛍光タンパク発現法の検討

移植後のイメージングに耐えるラベル効率・蛍光タンパク発現量が得られ、かつ毒性が許容できる範囲内のラベル法を見出すべく、AAV・レンチウイルスを中心に複数のラベル法を検討した。その結果、A で使用した多能性幹細胞の培養法と相性がよく、移植後のイメージングに耐えるラベル効率・蛍光タンパク発現量が得られるラベル法を見出した。

以上の知見を組み合わせ、対照群のヒト iPS 細胞から神経細胞を誘導し、蛍光タンパクでラベルしてマウス脳内に移植したところ、少数の細胞で生きたマウスの脳内で *in vivo* imaging することに成功した。また、免疫不全マウスを用いることで、移植後長期の観察も可能であることを確認した（図 2）。

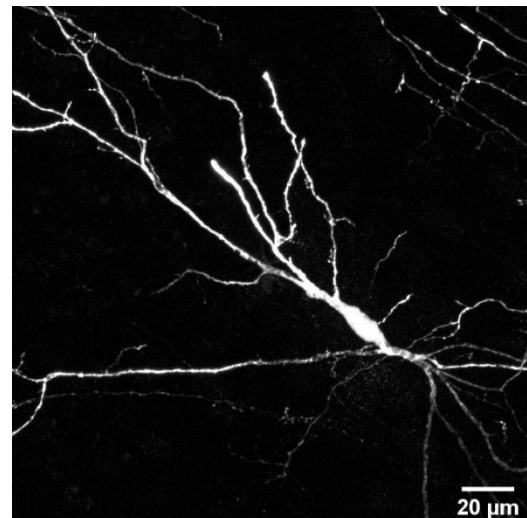


図 2：免疫不全マウスに移植して 10 週間後の
蛍光タンパクラベルされたヒト神経細胞

しかし、機能イメージングから統計学的な比較を行うには細胞数が不十分であった。また、少数ながら移植塊の残存も認められた。そこで、神経回路の影響が機能変化に結びつきやすいと考えられる 22q11.2 欠失症候群の患者さんから樹立した iPS 細胞を用いる前に、より細胞自律的な変化が報告されている精神・神経疾患に着目し、細胞の微細形態イメージングを行う方針とした。試行錯誤の結果、疾患群と対照群で再現性のある特徴量を抽出する方法を確立した。

C. 細胞移植後のマウスへの介入操作系の開発

細胞移植後のマウスを用いて神経回路または環境要因の操作などを行う予定であったが、微細形態イメージング法の開発に注力したため、予備的な検討をするにとどまった。

謝辞：本研究遂行にあたり、岡部繁男教授、柏木有太郎博士、亀井亮佑博士、水谷俊介博士、遠藤雅瑛氏、岡部研究室の同僚の皆様多大な協力をいただきました。深謝申し上げます。

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 1件）

1. 著者名 Morishima Ryo, Kumakura Yousuke, Usami Satoshi, Kanehara Akiko, Tanaka Miho, Okochi Noriko, Nakajima Naomi, Hamada Junko, Ogawa Tomoko, Ando Shuntaro, Tamune Hidetaka, Nakahara Mutsumi, Jinde Seiichiro, Kano Yukiko, Tanaka Kyoko, Hirata Yoichiro, Oka Akira, Kasai Kiyoto	4. 巻 188
2. 論文標題 Medical, welfare, and educational challenges and psychological distress in parents caring for an individual with 22q11.2 deletion syndrome: A cross sectional survey in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 37～45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.62485	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 Tanaka Miho, Kanehara Akiko, Morishima Ryo, Kumakura Yousuke, Okouchi Noriko, Nakajima Naomi, Hamada Junko, Ogawa Tomoko, Tamune Hidetaka, Nakahara Mutsumi, Jinde Seiichiro, Kano Yukiko, Kasai Kiyoto	4. 巻 36
2. 論文標題 Educational challenges for 22q11.2 deletion syndrome in Japan: Findings from a mixed methods survey	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities	6. 最初と最後の頁 558～570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jar.13079	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 Chiba Takuyo, Takaku Reo, Ito Erina, Tamune Hidetaka, Rivera Marisa, Ikeda Shunya, Shiga Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Are hospitals with both medical/surgical and psychiatric services associated with decreased difficulty in ambulance transfer for patients with self-harm behaviour? A nationwide retrospective observational study using ambulance transfer data in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e065466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjopen-2022-065466	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〕

医療・福祉・教育の困難と22q11.2欠失症候群をもつ子の養育者の心の健康 https://22q-pedia.net/library/ 研究代表者が本申請の範囲外として所属する22q研究事務局での共著論文につき日本語解説を一般公開した。また「22q11.2欠失症候群のある人とその家族の統合的支援のためのガイドンス」を分担執筆した。 AMED『特発性基底核石灰化症の診療，病態解明，創薬のためのエビデンス創出研究』に協力し「脳内石灰化症診療の手引き2021」「特発性基底核石灰化症の診療・療養の手引き」の精神科領域の執筆を担当した。

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
---------	---------