

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461379

研究課題名(和文) マウス疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性中枢性尿崩症in vitro実験系の確立

研究課題名(英文) Establishment of in vitro FNDI model using disease specific mouse iPS cells

研究代表者

須賀 英隆 (Suga, Hidetaka)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、家族性中枢性尿崩症モデルマウスから疾患特異的iPS細胞を樹立、既存培養法を改良することでAVPニューロンへの分化を行った。疾患特異的iPS細胞由来AVPニューロンの、細胞質内に存在する変異タンパクを経時的に観察した結果、家族性中枢性尿崩症の特徴的な所見である小胞体内封入体様構造物をin vitroで再現出来ていることが判明した。この封入体様構造物が、培養時間の経過と共に変化し、生体での変化と似た経過を辿ることを確認した。これらの成果は、ヒト疾患特異的iPS細胞への応用に際して基盤技術になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：One of the goals for our study is establishing in vitro disease model using disease specific iPS cells. In this study, we chose familial neurohypophysial diabetes insipidus (FNDI) as a degenerative neuronal disease model. We already have made a mouse model for FNDI, an autosomal dominant disease characterized by progressive polyuria, which usually manifests several months or years after birth in human patients. We induced disease specific mouse iPS cell lines from those FNDI model mice, and confirmed the successful induction into hypothalamic vasopressin neurons from disease specific mouse iPS cells after the technical improvement for in vitro differentiation methods. Importantly, those induced vasopressin neurons contained round shaped aggregates in the cytoplasm, which is the same phenomenon in the hypothalamus of FNDI mice. We are planning to use this induced vasopressin neuron as a disease model for further pathologic analyses and drug screening.

研究分野：再生医療

キーワード：疾患特異的iPS細胞 家族性中枢性尿崩症 神経変性疾患 疾患モデル 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス ES 細胞から視床下部-下垂体 *in vitro* 産生の成功。

近年、体性幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞を用いた発生・再生研究が精力的に行われる中、理化学研究所、発生・再生科学総合研究センターの笹井芳樹グループディレクターらが、マウス ES 細胞から抗利尿ホルモン (AVP) 分泌ニューロンを分化させることに成功した。申請者らの属する名古屋大学のグループでは、この技術を開発当初より導入し、理研との共同研究で基礎研究を進展させてきた。

また、申請者らはこれまでに、マウス ES 細胞を SFEBq 法で立体的に培養することで、下垂体原基であるラトケ嚢様組織を誘導することに成功し (須賀ら, *Nature*, 2011)。そこから ACTH 産生細胞を分化させることにも成功した。*in vitro* での CRH 添加による刺激試験において生体と同じオーダーの ACTH を分泌することを確認した。副腎皮質ホルモン添加によるネガティブフィードバック機構も保たれていた。

(2) 疾患特異的 iPS 細胞の利用法のひとつとしての難病研究。

ES 細胞・iPS 細胞や体性幹細胞などを、ヒトに役立てるには、大別して二つの方法がある。一つが再生医療であり、もう一つが疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態モデルの作製である。本研究課題では後者の基盤技術の確立を目標とした。

視床下部-下垂体系は非常に複雑で緻密な制御を受けており、これまで良い *in vitro* のモデル系が存在しなかった。また、生体内にも少量しか存在しないため、実験動物からの初代培養でも解析に必要な量の調製が困難であった。本研究課題では、この問題点を、iPS 技術を用いて解決しようという試みである。候補となる視床下部疾患は多数あるが、まずは申請者らが既に評価系を有している家族性中枢性尿崩症をターゲットにした。

家族性中枢性尿崩症 (FNDI) は、常染色体優性遺伝の疾患で、生後数ヶ月から数年で進行性に多尿を呈する。しかし、なぜ AVP 分泌神経細胞が機能不全や変性を起こすかについての細胞レベルの機序は不明であり、そのため根本的な治療法は存在せず、現在、対症療法のみが可能である。これまでに申請者らは、AVP キャリアタンパク質であるニューロフィジンの点突然変異の 1 つである Cys98stop を導入したノックインマウスを作製し (有馬ら, *Am J Physiol*, 2009)、この FNDI モデルマウスがヒトと同様に進行性の多尿を呈し、また尿崩症の進展と共に視床下部 AVP ニューロンの小胞体内腔に凝集体 (封入体) が蓄積する特徴を有することを明らかにしてきた。この FNDI モデルマウスから疾患特異的 iPS 細胞株を樹立し、視床下部 AVP ニューロンを作製すれば、疾患の発生メカニズムについて、より患者の病態に即した解析モ

デル化が可能となる。

2. 研究の目的

本研究課題では、家族性中枢性尿崩症モデルマウスから疾患特異的 iPS 細胞を樹立、*in vitro* の視床下部モデルを作製し、創薬も視野に入れつつ、*in vitro* の利点を活かした細胞レベルでの病態解明と治療法の開発とを行うことを目的とした。

視床下部-下垂体系には、これまで良い *in vitro* のモデル系が存在しなかった。申請者らはこれまで、理化学研究所との共同研究で、マウス ES 細胞から視床下部神経組織や下垂体前葉組織を *in vitro* で分化誘導することに世界初で成功してきた。本研究課題では、ヒトと同じ変異をもつ家族性中枢性尿崩症マウスから疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、*in vitro* での病態研究モデルを作製することを目的とした。将来、ヒト疾患特異的 iPS 細胞での応用に際して基盤技術になると考えられる。

3. 研究の方法

前述の目的をふまえ、本研究課題では以下の実験テーマに沿って研究を進めた。

(1) 確実に AVP ニューロンに分化する疾患特異的 iPS 株を樹立する。

最初に、Cys98stop マウスから iPS 細胞 (mFNDI iPS 細胞) を樹立する。具体的には、マウスの皮膚細胞もしくはリンパ球を採取し、エピゾーマルベクターを用いて樹立する。iPS 細胞の樹立方法は、共同研究を行っている理研から技術移転する。樹立できない場合は、市販のレトロウイルスやセンダイウイルスベクターを用いたり、専門業者に作業委託したりすることも検討する。

次に、既に確立したマウス ES 細胞から AVP ニューロン分化培養法に従って、mFNDI iPS 細胞を AVP 細胞 (mFNDI iPS-AVP 細胞) に分化させる。疾患特異的 iPS 細胞からの分化培養の際、一般に、対照群の置き方が難しい。例えば AVP ニューロンが失われる疾患では、iPS 株そのものが不良で AVP ニューロンまで分化しないのと、疾患ゆえに AVP ニューロンが現れないのとを鑑別する必要がある。FNDI では病初期には AVP ニューロンが生存しており、変異タンパク蓄積により徐々に細胞死に至ることが分かっている。この性質を利用し、mFNDI iPS-AVP 細胞分化直後に AVP と変異タンパクと両者が発現する iPS 細胞株を選別し、その後の実験に用いる。

一般に、ES 細胞や iPS 細胞では株ごとに分化能が異なる問題が指摘されている。mFNDI iPS 細胞から AVP 細胞への分化誘導効率が悪い場合、iPS 細胞株を大量に作製して網羅的に分化能を検討するのが対策の一つである。また、これまでの検討で、既報の分化方法を更に改良し、視床下部前駆細胞のマーカーである Rax を従来よりもロバストに発現

させる条件を発見しており、これを試す。

以上の実験で、疾患特異的 iPS 細胞から AVP ニューロンへの分化法を最適化する。

(2) 分化誘導した AVP ニューロンの長期培養法確立。

FNDI では、生後数ヶ月から数年の経過で病態が進行する。一方で、マウス ES・iPS 細胞由来の AVP ニューロンでは長期培養方法が確立されていない。疾患の *in vitro* モデルとして利用するには、長期維持培養法を確立する必要がある。

まずは wild type のマウス ES 細胞を用いて、分化誘導した AVP ニューロン（既に分化方法は完成している）の長期維持培養方法を検討する。現状における長期培養の問題点は、AVP 細胞の *viability* 低下である。酸素と栄養因子の供給が重要な因子だと考えられる。酸素濃度が制御できるインキュベータを用い、神経栄養因子の種類・濃度・期間を検討する。また、*spinning bioreactor* と呼ばれる培養器も長期培養に使用されるようになってきており、これを用いて *viability* の向上を目指す。

次に、(1)で樹立した疾患特異的 iPS 細胞を用いて、長期維持培養を行う。これまでの FNDI マウスの検討で、1ヶ月齢から電子顕微鏡で、2ヶ月齢から光学顕微鏡で小胞体内の封入体が観察され、時間経過と共に封入体が増大することが判明している。mFNDI iPS-AVP 細胞の長期培養でも同様な小胞体内封入体形成とその増大が観察できるか検討する。

FNDI マウスでは脱水条件負荷により AVP 合成を亢進させる状態を3ヶ月間維持すると、多飲多尿の表現型が進行する。mFNDI iPS-AVP 細胞の長期培養で、封入体などの特徴的な構造が出現しない場合は、cAMP で AVP 合成を亢進させたり、*tunicamycin* や *thapsigargin* で小胞体ストレスを亢進させることで、FNDI マウスの脱水条件と同じ状況を負荷し、AVP ニューロンへの影響を検討する。

(3) 病態解析や薬剤スクリーニング。

FNDI マウスモデルではこれまでに、小胞体ストレスやオートファジーが表現型進行に関与していることが示唆されてきた。しかしながら、オートファジーと細胞死との関連、あるいは AVP ニューロンが細胞死する経過など、細胞レベルでの詳細な検討は今後の課題である。

今回確立する *in vitro* モデルで、詳細な経時変化や、オートファジーの亢進もしくは抑制による条件検討など、動物モデルでは煩雑もしくは不可能な条件を検討し、病態の解明に利用する。

また、iPS 細胞の増殖能を利用し、mFNDI iPS-AVP 細胞を大量調整することで、治療薬のスクリーニングを行う。小胞体ストレスが関与するとされる神経変性疾患は多く存在し、抗アポトーシス薬、神経保護剤など

それらの疾患で用いられる治療薬について本実験系での効果を検討する。

以上の実験を通じ、マウス細胞を用いて視床下部の疾患特異的 iPS 細胞疾患モデルを確立する。別の課題にてヒト iPS 細胞から視床下部ホルモン産生細胞への分化培養方法開発に取り組んでおり、将来それらを組み合わせ、ヒトにおける視床下部疾患 *in vitro* モデル構築に展開していく。

4. 研究成果

(1) AVP ニューロンに分化する疾患特異的マウス iPS 株を樹立した。

ドナーの家族性中枢性尿崩症モデルマウス (FNDI マウス) としては、実際にヒトの疾患で存在する変異と同じものを導入した Cys98stop マウス (既に樹立済み) を用いた。iPS 細胞樹立のための遺伝子導入ベクター (具体的には、エピゾーマルベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター) や、マウス由来細胞 (リンパ球や線維芽細胞) を実際に樹立作業に用いて検討した。その結果、エピゾーマルベクターを用いて線維芽細胞から、Cys98stop 変異をもつマウス iPS 細胞を 10 株樹立した。染色体変異など、iPS 化作業に伴う異常が生じていないことを確認した。

これらのマウス疾患特異的 iPS 細胞から、4. (2) の第 1 ステップで改良した AVP ニューロンへの分化法を適応した。その結果、AVP ニューロンへの分化が可能であることを確認したが、一方で分化効率の低さという問題が判明した。この問題は 4. (2) の第 2 ステップで解決し、AVP ニューロンに高効率で分化する疾患特異的マウス iPS 細胞株を樹立するという目的を達成した。

(2) 疾患特異的 iPS 細胞由来 AVP ニューロンの高効率分化法と、長期培養法の確立。

第 1 ステップとして、wild type のマウス ES 細胞を用いて培養法を改良した。従来用いられてきたマウス ES 細胞からの AVP ニューロン分化誘導法では、視床下部前駆細胞にて特異的に発現する Rax 遺伝子に蛍光蛋白をノックインした細胞株を樹立して、*cell sort* を行う必要があった。この蛍光蛋白ノックイン作業を行わなくとも AVP ニューロンを誘導できる分化法が必要と考え、分化方法を改良した。その結果、表面抗原を利用するだけで視床下部前駆細胞濃度を上げる方法を確立した。これにより、マウス iPS 細胞でも Rax 遺伝子にノックイン作業を行う必要がなくなった。

上記第 1 ステップの分化法を、(1) にて樹立した疾患特異的 iPS 細胞に適応したところ、確かに AVP ニューロンは分化するものの、効率が低いという問題点が判明した。そこで、第 2 ステップとして、樹立した疾患特異的 iPS 細胞を用いて更なる改良を試みた。胎児での

発生を参考に分化条件を検討した結果、分化培養中にシグナルXを加えることで、有意に分化効率が上昇することが判明した。

これまでの FNDI モデルマウスの検討で、マウス生体では、1ヶ月齢から電子顕微鏡で、2ヶ月齢から光学顕微鏡で小胞体内の封入体が観察され、時間経過と共に封入体が増大することが判明している。この特徴的な構造が *in vitro* でも再現出来るかどうかが重要なポイントとなる。その為に、第3ステップとして、誘導した AVP ニューロンの長期維持培養法の開発を行った。従来法では AVP ニューロンを誘導することは可能だが、*in vitro* のまま長期維持することは困難で、誘導後1週間程度で AVP ニューロンが失われてしまう問題点があったためである。ここを改良するため、3次元培養と2次元培養と、それぞれの特長を組み合わせ、最終的に4週間の維持培養が可能になった。

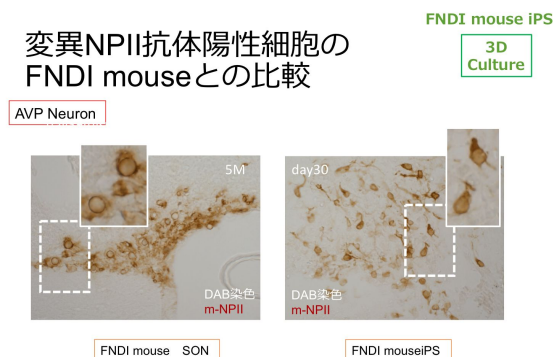
以上のように、(1)で樹立した疾患特異的 iPS 細胞から、AVP ニューロンの高効率分化法と、長期培養法との確立を達成した。

(3) 病態解析や薬剤スクリーニング。

前述のような技術的改良を採り入れ、疾患特異的 iPS 細胞から AVP ニューロンを分化誘導させた。この疾患特異的 iPS 細胞は、Cys98stop 変異をヘテロで保持しているわけだが、誘導した AVP ニューロンも、変異タンパクと正常タンパクとで共染色されることを確認した。

次に、長期維持培養を行って、変化を観察した。図に示すように、光学顕微鏡にて細胞体内に封入体様の構造物が再現されることを確認した。現在、電子顕微鏡で小胞体との関連を検討している。小胞体内封入体の再現が証明できれば、*in vitro* の疾患モデルが完成したと言える。加えて、小胞体ストレス亢進剤や低減剤の添加による、封入体様構造の変化についても検討中である。これらのデータを揃え、今後、薬剤スクリーニングのツールとして用いていく予定である。

変異NPII抗体陽性細胞の FNDI mouse との比較



その他、副次的な成果：

最終的にはヒト疾患特異的 iPS 細胞で疾患モデルを樹立するのが目的である。従って、ヒト iPS 細胞から AVP ニューロンを分化誘導させる方法の樹立にも着手した。現在、正常

ヒト iPS 細胞から AVP ニューロンを分化させることが技術的に可能になりつつある。

以上のまとめ：

FNDI マウス iPS 細胞を樹立し、既存培養法を改良することで AVP ニューロンへの分化を行った。成熟度の問題なのか、従来法では本来同一ニューロン内に同居すべき AVP と NP とが共染色しない問題点が存在したが、改良後は共染色するようになり、生体と同じ性質を示すようになった。

こうして成熟を達成した疾患特異的 iPS 細胞由来 AVP ニューロンの、細胞質内に存在する変異タンパクを経時的に観察するため、分化後長期にニューロンを維持する方法を確立した。一部は分散培養法を併用することで長期間の維持培養を行い、細胞内の観察を行った。その結果、FNDI の特徴的な所見である小胞体内封入体様構造物を *in vitro* で再現出来た。

この封入体様構造物が、培養時間の経過と共に変化し、生体での変化と似た経過を辿ることを確認した。更なるデータ蓄積で疾患モデルとしての妥当性を確認できれば、薬剤スクリーニングのツールとしての疾患細胞が出来上がったと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Hidetaka Suga, Making pituitary hormone-producing cells in a dish. *Endocrine Journal*. 査読有, 63(8), 2016, 669-680.

DOI: 10.1507/endocrj

Hidetaka Suga, Differentiation of pluripotent stem cells into hypothalamic and pituitary cells. *Neuroendocrinology*, 査読有, 101(1), 2014, 18-24.

DOI: 10.1159/000369821

[学会発表](計13件)

須賀英隆, 下垂体再生医療の現状と将来像、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7日-9日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

須賀英隆, 立体培養による視床下部・下垂体の誘導と成熟、第27回日本間脳下垂体腫瘍学会、2017年2月24日-25日、日経ホール(東京都千代田区)

笠井貴敏, 須賀英隆, 榊原真弓, 大曾根親文, 水野正明, 有馬寛, ヒト多能性幹細胞から下垂体前葉と視床下部の同時誘導、第43回日本神経内分泌学会学術集会、2016年10月14日-15日、アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)
須賀英隆, 光本一樹, 山田登美子, 加納

麻弓子、水野正明、有馬寛、マウス ES 細胞から視床下部神経への誘導法ではグリア細胞も出現する、第 43 回日本神経内分泌学会学術集会、2016 年 10 月 14 日-15 日、アクトシティ浜松コンgres センター（静岡県浜松市）

Hidetaka Suga . Recapitulating pituitary development using ES/iPS cells. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016 (ISPGRS 2016) . 2016 年 9 月 1 日-5 日, Honolulu (Hawaii)

Hidetaka Suga . Differentiation of pluripotent stem cells into hypothalamic and pituitary cells. 17th International Congress of Endocrinology & 15th Annual Meeting of Chinese Society of Endocrinology (ICE-CSE 2016). 2016 年 8 月 31 日-9 月 4 日, Beijing (China)

須賀英隆、多能性幹細胞を用いた視床下部・下垂体の分化誘導法開発研究、第 89 回日本内分泌学会学術集会総会、2016 年 4 月 21 日-23 日、国際京都国立会館（京都府京都市）

笠井貴敏、須賀英隆、大曾根親文、水野正明、有馬寛、ヒト iPS 細胞から下垂体前葉組織への分化誘導、第 89 回日本内分泌学会学術集会総会、2016 年 4 月 21 日-23 日、国際京都国立会館（京都府京都市）

光本一樹、須賀英隆、山田登美子、有馬寛、家族性中枢性尿崩症における疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明へ、第 89 回日本内分泌学会学術集会総会、2016 年 4 月 21 日-23 日、国際京都国立会館（京都府京都市）

須賀英隆、機能的なヒト視床下部・下垂体細胞の分化誘導、第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17 日-19 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

Hidetaka Suga . In vitro differentiation of hypothalamic tissue such as AVP neurons from human ESCs、第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート、2016 年 2 月 12 日-13 日、あいち健康プラザ（愛知県知多郡東浦町）

Hidetaka Suga. Recapitulating hypothalamus and pituitary development using ES/iPS cells, Stem Cells in Neuroendocrinology, 2015 年 12 月 7 日, Paris (France)

Hidetaka Suga. Differentiation into hypothalamic and pituitary cells from pluripotent stem cells. The International Congress of Neuroendocrinology 2014, 2014 年 8 月 17 日-20 日, Sydney (Australia)

Chikafumi Ozone, Hidetaka Suga 他、Springer New York, Organ Regeneration, 2017, 248 (57-65)

Hidetaka Suga 他, Springer International Publishing, Stem Cells in Neuroendocrinology, 2016, 156 (35-50)

大曾根親文、須賀英隆 他、医歯薬出版、医学のあゆみ、2016、70 (1226-1227)

大曾根親文、須賀英隆 他、科学評論社、内分泌・糖尿病・代謝内科、2016、462 (433-439)

須賀英隆 他、診断と治療社、下垂体疾患診療マニュアル改訂第 2 版、2016、310 (254-255)

須賀英隆 他、羊土社、実験医学増刊、2016、197 (123-130)

須賀英隆 他、北隆館、BIO Clinica、2016、126 (33-37)

大曾根親文、須賀英隆 他、メジカルビュー社、Mebio、2016、84 (4-10)

須賀英隆 他、医歯薬出版、医学の歩み 2014、70 (1081-1089)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：ヒト多能性幹細胞から視床下部ニューロンへの分化誘導法

発明者：須賀英隆，小川晃一郎，笠井貴敏，有馬寛

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2016-010940

国際出願番号 PCT/JP2017/001544

出願年月日：平成 28 年 1 月 22 日（国内）

平成 29 年 1 月 18 日（国際）

国内外の別：国内・外国双方

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 英隆 (SUGA, Hidetaka)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569818

(2) 研究分担者

長崎 弘 (NAGASAKI, Hiroshi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：30420384

有馬 寛 (ARIMA, Hiroshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50422770

萩原 大輔 (HAGIWARA, Daisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70710086

〔図書〕（計 9 件）