

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 2.5次元共培養系を用いたヒト神経細胞シナプス成熟法の開発
(英語) Development of synaptic maturation methods of human neurons using
2.5-dimensional co-culture system

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 金村 米博
(英語) Yonehiro Kanemura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 先進医療研究開発部・部長
(英語) Director
Department of Biomedical Research and Innovation, Institute for Clinical Research
National Hospital Organization Osaka National Hospital

II 研究開発の概要

背景

本邦では既に数多くの神経難病患者由来 iPS 細胞が樹立・バンク化されている。しかし、神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究は限定された一部の研究者・研究室での実施に止まるため、樹立された神経疾患特異的 iPS 細胞を神経疾患研究領域全体に広く普及させ、有効活用する方策が必要である。また、神経疾患特異的 iPS 細胞を用いて、アルツハイマー病や小児発達障害等のシナプス機能障害が推定される神経疾患の病態解析を行うためには、初代培養神経細胞と同等レベルのシナプス成熟度を有するヒト神経細胞が必要である。ヒト iPS 細胞の神経分化誘導技術は最も研究開発が先行している分野であるが、現行の2次元単層培養系やオルガノイド等の3次元培養系では、依然として十分な病態再現・病因解析が技術的に困難であり、現行の公知技術と比較して短時間で高効率に再現性よく、神経疾患特異的 iPS 細胞からシナプス機能が十分に成熟した神経細胞を作製するための、簡便でロバストな分化誘導法の開発が求められている。

本研究では、現行の2次元単層培養法およびオルガノイド等の3次元培養法の弱点を克服するために、独自に樹立したヒト由来グリア系株化細胞を用いて、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞から成熟シナプスを有する神経細胞を作製することが可能な簡便でロバストな2.5次元共培養系の開発に取り組んだ。

研究の成果

1. hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法の開発

独自に樹立したヒト由来グリア系株化細胞が、ヒト iPS 細胞 (iPSC) から胚様体を経て作製されたヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞 (iPSC-NPC) と適切な細胞間相互作用を生成し、神経分化誘導成熟促進効果を有するヒト由来神経分化成熟促進細胞 (human derived-Neuronal Differentiation and Maturation Promoting Cells: hNDMPC) となり得ることを検証した (図 1A)。ヒト由来グリア系細胞を播種して作製したフィーダー細胞上に、3次元浮遊細胞塊 (ニューロスフェア) として維持された健常人 iPSC-NPC を播種し、2.5次元共培養法を4週間行い、細胞免疫染色を実施した結果、蛍光タンパク質 AcGFP を発現する健常人 iPSC-NPC 由来神経細胞においてシナプス成熟マーカーである drebrin A 発現が認められた (図 1B)。したがって、ヒト由来グリア系株化細胞が hNDMPC となり得ることが明らかとなり、ヒト由来グリア系株化細胞を hNDMPC として用いた 2.5次元共培養法が簡便でありながらも、健常人 iPSC-NPC から成熟したシナプスを有する神経細胞の作製を可能とすることが明らかとなった。

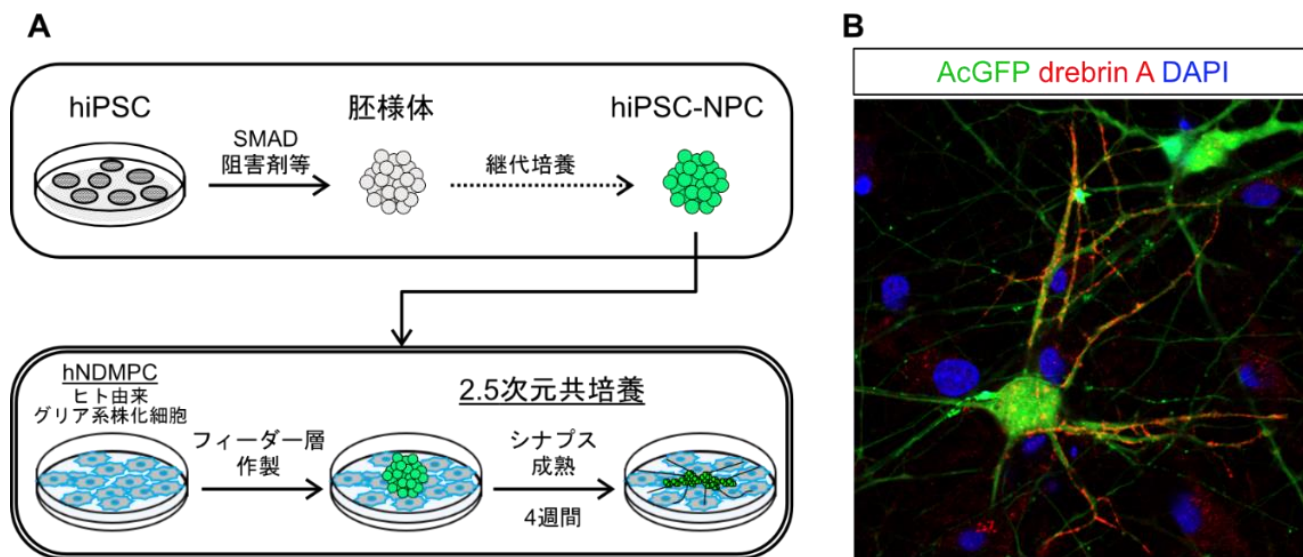


図 1. 開発した 2.5 次元共培養法

2. hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法で作製された健常人 iPSC-NPC 由来神経細胞の分化成熟度評価

hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法で作製された健常人 iPSC-NPC 由来神経細胞の分化成熟度を評価するために、hNDMPC との 2.5 次元共培養法に加えて、フィーダー細胞無し培養法を比較対照に用いて、健常人 iPSC-NPC を 39 日間培養し、多点電極アレイを用いた細胞外電位記録法による電気生理学的評価を行った。その結果、フィーダー細胞無し培養法を用いた場合に比べて、hNDMPC との 2.5 次元共培養法を用いた場合には、健常人 iPSC-NPC 由来神経細胞の神経活動が有意に多くなることが明らかとなった。また、これらの神経活動は、NMDA 受容体阻害剤である AP-5 投与により減少したことから、NMDA 受容体を介した神経活動であることが示唆された。さらに、ELISA 法を用いてシナプス成熟マーカーである drebrin A 発現量解析を行った結果、フィーダー細胞無し培養法を用いた場合に比べて、hNDMPC との 2.5 次元共培養法を用いた場合には、drebrin A 発現量が有意に多くなることが明らかとなった。以上より、hNDMPC との 2.5 次元共培養法を用いて作製された健常人 iPSC-NPC 由来神経細胞は、従来法であるフィーダー細胞無し培養法を用いて作製された場合と比べて、十分な成熟度を有することが明らかとなった。

3. hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法の多施設バリデーション試験

ヒト由来グリア系株化細胞を hNDMPC として用いた 2.5 次元共培養法は簡便でありながらも、成熟神経細胞を作製可能であるが、他施設における再現性を検証するために、共通の細胞、試薬および資材を用いて、従来法であるフィーダー細胞無し培養法を比較対照として、2.5 次元共培養法の多施設バリデーション試験

を実施した。その結果、フィーダー細胞無し培養法を用いた場合には、培養過程で細胞の剥離等が生じたことにより、数施設が4週間の培養を完了できなかったが、2.5次元共培養法を用いた場合には全施設が培養に成功した。また、神経細胞マーカーである ELAVL3/4 に対する細胞免疫染色を行った結果、従来法であるフィーダー細胞無し培養法を用いた場合と比べて、2.5次元共培養法を用いた場合には、健常人 iPSC-NPC 由来神経細胞 (ELAVL3/4 陽性細胞) の割合がいずれの施設でも高値であることが明らかとなった。以上より、hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法は簡便であるだけでなく、ロバストな培養法であることが確認された。

4. 自閉症スペクトラム障害患者由来成熟神経細胞の作製

本研究で開発した hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法は、健常人 iPSC-NPC だけでなく、疾患特異的 iPSC-NPC に対しても有効であり、患者由来成熟神経細胞の作製を可能とすることを検証するために、理研 BRC セルバンクから、シナプス機能障害が疑われる自閉症スペクトラム障害患者 iPS 細胞を入手し、患者 iPSC-NPC を作製し、健常人および患者 iPSC-NPC を対象として、hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法の多施設バリデーション試験を実施した。その結果、健常人 iPSC-NPC だけでなく、患者 iPSC-NPC を用いた場合でも、hNDMPC との 2.5 次元共培養法に全施設が成功し、神経細胞マーカーである ELAVL3/4 陽性細胞の割合はいずれの施設でも高値となることが確かめられた。また、ELISA 法を用いて、シナプス成熟マーカーである drebrin A 発現量解析を行った結果、健常人由来神経細胞と同様に患者由来神経細胞においても drebrin A 発現が確認され、シナプス成熟傾向が示唆された。一方、多点電極アレイシステムを保有する施設において、細胞外電位記録法による電気生理学的評価を行った結果、健常人由来神経細胞と患者由来神経細胞の間に神経活動に差異が存在することが確認され、患者由来神経細胞における神経機能障害が示唆された。以上より、hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法は、健常人 iPSC-NPC だけでなく、患者 iPSC-NPC においても有効であり、神経機能障害を有する疾患の病態解析を可能とすることが示唆された。

研究成果の意義

本研究で開発した hNDMPC を用いた 2.5 次元共培養法は、簡便でロバストであるが、健常人だけでなく患者 iPSC-NPC からも十分なシナプス成熟度を有する神経細胞を作製可能とするため、これまで技術的に困難であった各種神経難病患者由来 iPS 細胞を用いた神経機能障害の病態解明研究を活性化させ、これら疾患に対する新規薬剤・治療法開発に寄与することが期待される。

Background

In Japan, various disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs), especially from patients with intractable neurological diseases, have been established and banked. However, because these patient-derived iPSCs have been studied by a limited number of researchers and laboratories, it is necessary to expand the use of banked disease-specific iPSCs by more researchers in the field of neurological disease research. Moreover, to investigate the pathogenic mechanisms of neurological diseases such as Alzheimer's disease and pediatric neurodevelopmental disorders, which are considered to be caused by synaptic dysfunction, human neurons should be as mature as animal-derived primary neurons. Although technologies for neuronal differentiation of human iPSCs are one of the most advanced fields, present standard two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) culture methods are not always enough to reproduce pathogenic conditions in human iPSC-derived neurons (iPSC-neurons), suppressing to investigate the pathogenic mechanisms using banked disease-specific iPSCs. Therefore, to induce mature neurons from neurological disease-specific iPSCs, a simple and robust new method is required that is faster, efficient, and more reproducible than 2D and 3D culture methods. This study aimed to develop a simple and robust two-and-half dimensional (2.5D) co-culture method using our originally established human-derived glial cell line to induce mature neurons from human iPSC-derived neural progenitor cells (NPCs), to overcome the limitations of present standard 2D and 3D culture methods.

Results

1. Development of 2.5D co-culture method using hNDMPC

We first validated whether our established human-derived glial cell line could be “human derived-neuronal differentiation and maturation promoting cells” (hNDMPC), which can properly generate contact with human iPSC-NPCs established from human iPSCs via embryoid body by dual-SMAD inhibition and can produce matured neurons (Figure 1A). Human iPSC-NPCs derived from a healthy control, cultured as a 3D floating aggregate (neurosphere) was seeded onto feeder cells generated from a human-derived glial cell line and cultured for 4 weeks as a 2.5D co-culture. Human iPSC-NPC-derived neurons, which expressed the fluorescent protein AcGFP, were positive for the synaptic maturation marker drebrin A (Figure 1B). Therefore, we found that our established human-derived glial cell line could be an hNDMPC and using it as a feeder cell led to the 2.5D co-culture method to induce mature neurons from a healthy control iPSC-NPC.

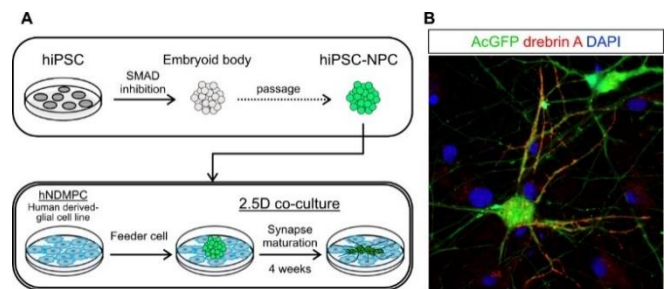


Figure 1. Developed a 2.5-dimensional co-culture system.

2. Evaluation of maturation level of human neurons derived from healthy control iPSC-NPCs using 2.5D co-culture method with hNDMPC

To evaluate the maturation level of human iPSC-neurons derived from healthy control iPSC-NPCs using the 2.5D co-culture method with hNDMPC, we performed electrophysiological evaluation by recording the extracellular voltage, using a multi-electrode array (MEA). Human iPSC-neurons derived from healthy control iPSC-NPCs using the 2.5D co-culture method were more functional than those derived from the feeder cell-free (FF) culture method. The neural activity of iPSC-neurons decreased with the addition of the NMDA blocker AP-5, indicating that neural activity is dependent on the NMDA receptor. Moreover, the expression level of drebrin A, as evaluated by ELISA, significantly increased using the 2.5D co-culture method compared with the FF method. We found that healthy control iPSC-neurons induced by the 2.5D co-culture method were more mature than those induced by the FF method.

3. Multicenter validation of 2.5D co-culture method with hNDMPC

The 2.5D co-culture method with hNDMPC is simple, easy and can induce the maturation of iPSC-neurons from healthy control iPSC-NPCs. To validate the reproducibility of this method, a multicenter validation test comparing the 2.5D co-culture method with the FF method was performed using the same cells and materials. Some facilities failed to continue the 4-week culture with the FF method via cell detachment, whereas all facilities succeeded with the 2.5D co-culture method for 4 weeks. Moreover, the population of neuronal marker ELAVL3/4-positive neurons derived from healthy control iPSC-NPCs was higher in all facilities using the 2.5D co-culture method compared to that using the FF method. Therefore, we confirmed that the 2.5D co-culture method with hNDMPC was simple and robust.

4. Establishment of mature neurons derived from iPSC-NPCs of a patient with autism spectrum disorder

To validate that our 2.5D co-culture method with hNDMPC is also useful for disease-specific iPSC-NPCs and can produce mature neurons from disease-specific iPSC-NPCs, we obtained autism spectrum disorder patient-derived iPSCs from the RIKEN BRC Cell Bank, which is considered to be caused by synaptic dysfunction. Both healthy control and patient-derived iPSC-NPCs were successfully cultured using a 4-week 2.5D co-culture method and produced high numbers of ELAVL3/4-positive neurons in all facilities. Moreover, expression of drebrin A was confirmed in both iPSC-NPC-derived neurons by ELISA, indicating the significant synaptic maturation of these neurons. However, MEA showed that there was a difference between healthy control iPSC-NPC neurons and patient-derived iPSC-NPC neurons and indicated that synaptic dysfunction occurred in the patient-derived iPSC-NPC neurons. These results suggested that the 2.5D co-culture method with hNDMPC is useful for culturing healthy control and patient-derived iPSC-NPCs, inducing mature neurons, and could be useful for analyzing the pathogenic mechanisms of diseases with neural dysfunction.

The significance of the study

We developed a novel 2.5D co-culture method with hNDMPC and confirmed that it is simple, robust, and can produce mature neurons from patient iPSC-NPCs. This new culture method is useful to investigate the pathogenic mechanisms of intractable

neurological diseases using disease-specific iPSCs and will contribute to the development of new drugs and treatment strategies.