

# 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

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 興奮/抑制均衡と神経変性疾患解析のための神経サブタイプ純化  
(英語) Subtype-specific Neuronal Purification for Excitatory/Inhibitory Balance  
and Neurodegenerative Disease Modeling

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) 石川 充  
(英語) Mitsuru Ishikawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 慶應義塾大学・医学部生理学教室・特任講師  
(英語) Department of physiology, Keio university school of medicine  
Senior assistant professor

## II 研究開発の概要

(日本語)

ヒト iPS 細胞からの中枢神経系細胞、とりわけ神経疾患に関与する細胞を正確に分化誘導することは技術力を要する手法のひとつである。そのため、ロバストに ES/iPS 細胞から特定の神経細胞へと分化誘導させる技術の確立とその普及は急務であった。当課題では、まず神経細胞分化に必須と考えられるプロニューラル因子 (NEUROG2 遺伝子: 興奮性細胞指向性、および ASCL1 遺伝子: 抑制性細胞指向性) を iPS 細胞に導入して安定的に神経細胞分化を促す分化培養系を確立した。さらに 1 細胞 RNA シーケンス(scRNA-SEQ)とバイオインフォマティクス (理化学研究所・Jay Shin ら) を利用して調査した特定の遺伝子の追加導入を検討し、種々の神経サブタイプへ選択的に分化させる技術へと応用した。この手法を軸に、発達性てんかん性脳症・アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病の病態中心となる各神経細胞種を作出した。また、以前からこれらの疾患に対する iPS 細胞研究を継続して行っていた施設 (分担研究機関: 東海大学・秦野伸二ら、東京慈恵医科大学・日暮憲道ら、星薬科大学・葛巻直子ら、北里大学・太田悦朗ら) で簡便に再現ができる系として発展させ、ロバストな神経分化誘導法として導出した。

本研究では、最初に転写因子 NEUROG2 と ASCL1 をそれぞれ個別に、TetO 駆動的に発現する *PiggyBac* ベ

クターで健常人 iPS 細胞に導入したのち、薬剤セレクションによって細胞選別した。その後、簡便に Doxycycline (Dox) 処理を施し、培養 10 日程度で選択的に 90-100% 範囲の高効率で TUBB+, MAP2+ の神経細胞に分化することを確認した。これに対し、さらに迅速に神経分化と成熟を獲得させる因子として miRNA-9,124 を追加導入した細胞株を再調製した。これらを実際に分化誘導させると、通常培養 30-40 日程度で現れる種々の神経マーカー遺伝子や電気的活動性に関与する Na, K, Ca<sup>2+</sup> チャネルや受容体の発現について、培養 20 日以下で同程度の検出ができるようになった。すなわち、神経細胞の高い出現効率に加えて、高い分化速度も付与することができた。なお、この手法の非常に優れた点として、TetO 駆動性の遺伝子導入と細胞選別を施した後であっても iPS 細胞の状態のまま、拡大培養・凍結保存ができることである。これらの細胞を様々な研究機関に分与し、簡便に Dox 処理によって神経誘導ができることは、分化法のロバストネスを確保する上で非常に重要であるといえる。

次に、前脳性グルタミン酸神経細胞、種々のサブタイプ特異的な GABA 作動性神経細胞、中枢性ドパミン神経細胞、下位運動神経細胞に対する選択的な分化誘導技術を構築するために、既存文献および、我々の確立した分化誘導系に対する scRNA-SEQ による遺伝子発現評価を行った。具体的には (わずかに) 標的神経サブタイプに分化していた一部のポピュレーションで高発現されている転写因子群に着目して、それらを NEUROG2 や ASCL1 誘導系に追加導入したのちに、scRNA-SEQ を含む遺伝子発現解析等を用いて評価した。ところで今回、様々な遺伝子導入の条件検討を行う目的で、多くの scRNA-SEQ を行う予定であったが、現状の当該解析の高コストを鑑みて、解析に工夫が必要であった。そこで新規に培養条件ごと (培養皿ごと) に、神経細胞表面にバーコードタグを付与したのちに、多条件・多検体サンプルをミックスしてライブラリ合成・シーケンスを行い、最終的に、バーコード情報をデコード (CITE-SEQ) することで、大量のサンプルのミクスチャーに対して低コストかつ迅速に scRNA-SEQ をできるようにした。これを利用して大規模に scRNA-SEQ を取り入れた実験介入が行えるようになった。具体的には「scRNA-SEQ、候補遺伝子の探索、遺伝子導入による評価、scRNA-SEQ による再検証、導入遺伝子の君合わせの再抽出」という循環の中で優れた分化誘導法を見つけ出すものである。その結果、とりわけ、グルタミン酸や GABA 作動性神経細胞の様々なサブタイプの分化誘導の候補となる追加転写因子を抽出することができた (2022 年 3 月日本薬理学会総会・シンポジウムにて一部発表)。また、これらが実際に機能していることを生細胞イメージングで確認できるように、前脳性神経細胞、VGAT+GABA 神経細胞、PV+GABA 神経細胞、SST+GABA 神経細胞のレポーター細胞を作出した。(：トランスジェニック、あるいはノックイン蛍光レポーター細胞株として作成。) なお、これと並行して、ヒトアストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、成熟オリゴデンドロサイトの蛍光レポーター細胞も作出した。

また、分化した細胞の神経機能的な成熟性を評価する手法として、多点電極アレイを用いた培養プロトコルを作成し解析したところ、グルタミン酸作動性・GABA 作動性・ドパミン作動性・運動神経細胞いずれも、培養 5 日程度から活動スパイクを、また培養 15 日程度ではバースト発火を示すようになり、最終的にはネットワークバーストを含む高頻度発火を示す細胞を調製できていることが分かった。これに加えて、生細胞イメージングとして、細胞同士がシナプス結合を作っているかどうかを試験するイメージング法を確立した。具体的には、光遺伝学ツールと遺伝性カルシウムインジケータあるいは遺伝性膜電位インジゲータとを併用できる蛍光フィルターユニットを作成し、光応答性に、シナプス投射先細胞が活動するかどうかをモニターできるシステムである。これによって、駆動細胞と対象細胞とを共培養させて、対象細胞がシナプス結合性を示す程度に成熟しているかどうかを簡便にイメージングで調査できるようになった。

さらに神経疾患解析ツールとしての導出を目指して、次の細胞を調製した。家族性アルツハイマー病 (PSEN1, PSEN2 変異)、難治性てんかんのドラベ症候群、アンジェルマン症候群、PCDH19 関連症候群に対して、前脳性グルタミン酸作動性神経細胞および GABA 作動性神経細胞。家族性 ALS (SOD1 変異、FUS 変異、TDP43 変異、ALS2 変異) に対して下位運動神経細胞。家族性パーキンソン病 (PARK2, PARK8) に対してドパミン作動性神経細胞。これらの細胞株はいずれも既に *in vitro* での表現型出現に一定の報告のあった細胞株であるが、そこで報じられたものとほぼ同質の表現型を、本誘導系においても認められることが分かった。しかも

従来よりも高効率の分化マーカー陽性細胞を得ており、かつ表現型出現までにかかる時期も短縮して、いずれも 20 日以内などで認められることから、今後の治療ターゲット解析のためのスクリーニング系への導出に大きく近づいたと考えられる。

実際に各疾患において、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、実際に疾患関連の GO 用語や、疾患関連パスウェイが抽出されたため、典型的な疾患マーカーのみでなく内部表現型につながる解析を行うこともできることが示された。また、各種の神経疾患の「異常興奮性」が神経障害や脱落につながる可能性を考慮して、MEA での電気生理学的な解析を進めた。各疾患の中でもとりわけ、興味深い結果を得たものとして家族性 ALS が挙げられる。すでに神経変性に先立ち、ALS の運動神経細胞では、神経過活動が現れる報告があったが、我々の迅速誘導系においても、培養 7 日程度という非常に短い期間にもかかわらず、活動の高い状態を呈することが明らかにした。このように迅速に過活動表現型に到達できた例は他では報告がない。また、すでに報告のある整流性カリウムチャネルの活性化剤を用いて活動が低下できたことに加えて、オートファジー誘導剤によっても、過活動が抑止されつつも細胞死も抑制されることが明らかとなった。このことは異常タンパク質凝集を伴う ALS の病態発症機構を考えるうえでの重要な知見のひとつとなった。(Kondo et al. 2023, IJMS にて論文報告)

このような疾患特異的細胞を含む各種 iPS 細胞を用いて、研究代表機関で分化誘導系の開発を行ってきたが、この手法が一部の施設のみで再現できる実験であっては分化や疾患表現型表出の堅牢性に欠ける。そこで、慶應義塾大学の他、東海大学、東京慈恵会医科大学、星薬科大学、北里大学においても、本プロトコルを踏襲し、一律の分化評価アッセイを行った。その結果、いずれの機関の分化誘導も高いマーカー陽性率で迅速な分化誘導がなされることが分かり、本神経分化誘導法には一定のロバストネスがあることが示された。

以上から、本課題で高い選択性と迅速性を示す神経分化誘導法を作出できたが、中枢神経系の難病は必ずしも単一の細胞種だけで病態の発症や進展が説明できるものではない。今後これらの細胞をより生理的条件に近いシステムに外挿していく必要がある。具体的には細胞種特異的な分化誘導法に基づきつつ、多種の共培養試験が要求されるケースが増えるだろう。とりわけ病態中心を探索したり、病気の発症や進行の因果関係を探るには、単なる組織様構造を模した培養系ではなく、細胞種によっては健常細胞由来であったり、また異なる細胞種によっては疾患細胞由来であるものを共培養するスタンスが必要である。これは近年非常に盛んにおこなわれている脳オルガノイド培養法とは一線を画す手法として発展していく必要がある。我々もこのシステムにいち早く応用できるように、iPS 細胞状態から事前に種々の蛍光ラベルを付与して、Dox 誘導によって、神経系誘導後もそれがマーキングされている培養システムを構築している。実際に青色(興奮性神経細胞)、遠赤色(抑制性神経細胞)、赤色(アストロサイト)、緑色(オリゴデンドロサイト)の共培養系を確立し、ライブモニターできるようになっている。しかもこれらの共培養細胞群にたいして scRNA-SEQ を行っても、それぞれの蛍光マーカーが相互排他的に各神経系サブタイプのマーカー発現を示していたため、分化誘導そのもののロバストネスは維持されている。

今後、iPS 細胞を用いた疾患の治療法開発を進めていくうちに、より細かい神経回路レベルでの研究を必要とすることもある。その際にももちろん上記の共培養試験が効果的であるが、一方で、神経細胞のサブタイプは非常に多種多様であることが知られている。さらに、近年の scRNA-SEQ のデータ蓄積によって、その多様性が想定以上に大きいことが分かってきた。そのため、古典的な神経伝達物質の放出機構をベースとした神経細胞サブタイプのみならず、詳細な遺伝子発現レベルでの細胞多様性に対応したモデル化が必要になるだろう。我々が本課題で精力的に取り組んだ「scRNA-SEQ、候補遺伝子の探索、遺伝子導入による評価、scRNA-SEQ による再検証、導入遺伝子の君合わせの再抽出」というデータ循環システムは、今後の疾患細胞・組織モデルにとどまらず、治療薬スクリーニングや、細胞治療のリソースとしての応用も可能となるであろう。

以上のことより、本研究課題「興奮/抑制均衡と神経変性疾患解析のための神経サブタイプ純化」では iPS 細胞由来の選択的なサブタイプ特異的な神経分化法を導出したとともに、ロバストな創薬開発法、さらにはより複雑な成体システムに対する介入ツールとしての潜在性を証明し、次世代の研究に活用されるべき成果を得たと見える。

(英語)

Neuronal induction from human iPS cells, particularly those implicated in neurological diseases, is a complex process that necessitates the development and wide dissemination of robust methodologies.

Our study involves the transfection of transcription factors NEUROG2 and ASCL1 into human iPS cells using a TetO-driven *PiggyBac* vector, followed by drug selection and cell sorting. The application of doxycycline (Dox) treatment facilitated selective differentiation into TUBB+ and MAP2+ neurons, with a high efficiency of 90-100% within 10 days of culture. Subsequent incorporation of miRNA-9,124 accelerated neuronal differentiation and maturation. Also, our findings suggest that this method allows for expansion, culturing, and cryopreservation of iPS cells post-gene transfer and cell sorting. The ability to distribute these cells across various research facilities and perform neural induction via Dox treatment underpins the robustness of this differentiation technique.

We further strived to establish a selective differentiation process for forebrain-specific glutamatergic neurons, subtype-specific GABAergic neurons, dopaminergic neurons, and lower motor neurons. We evaluated gene expression using scRNA-SEQ in our differentiation induction system and previous reports. Our temporal goal was to identify effective differentiation induction methods via a cycle of scRNA-SEQ, candidate gene search, gene transfer evaluation, and transgene re-extraction.

We also prepared cells for neurological disease analysis, including familial Alzheimer's disease, Dravet syndrome, Angelman syndrome, PCDH19-related syndromes, familial ALS, and familial Parkinson's disease. Our induction system consistently replicated previously reported phenotypes, suggesting its potential as a future therapeutic target screening system. In addition, comprehensive gene expression analysis revealed disease-related GO terms and pathways, which further supports its utility in analyzing disease markers and internal phenotypes. We also conducted electrophysiological analysis in MEA, which yielded significant findings in familial ALS. We discovered that rectifying potassium channel activators and autophagy inducers suppressed both cell death and overactivity, contributing to our understanding of ALS pathogenesis.

Reproducibility of our method was verified across various institutions, demonstrating its robustness. However, to fully elucidate the pathogenesis of intractable central nervous system diseases, future research should focus on co-culture studies and mimicking tissue-like structures. In conclusion, our research project has demonstrated the robustness of a selective, subtype-specific neural differentiation method derived from iPS cells. It has potential applications in drug discovery, complex biological intervention tools, and regenerative medicine.