

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム  
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)  
事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト前脳型コリン作動性神経細胞の選択的誘導法の開発と、薬剤評価系への応用  
(英語) Development of a selective protocol for the induction of human basal forebrain cholinergic neurons and its application to an evaluation system for medicines

研究開発実施期間: 令和3年6月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 石井 聖二  
(英語) Seiji Ishii

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学医学部 助教  
(英語) Keio University School of Medicine, Instructor

## II 研究開発の概要

(日本語)

### 本研究開発の成果

前脳型コリン作動性神経細胞(BFCN)は、認知機能において重要である。これまでに BFCN を標的とした、アルツハイマー病(AD)や統合失調症等の認知機能障害の創薬研究が展開されており、ヒト iPS 細胞由来 BFCN による薬剤評価系の構築が望まれている。しかし、(1) 既存の分化誘導法では、多くの GABA 作動性神経細胞の混入が見られ、選択的に BFCN が得られないことや(Liu Y. et al, **Nat. Neurosci.**, 2013)、(2) 二次元・三次元培養技術で得られた *in vitro* のヒト神経細胞等は未成熟であり、胎生期の脳に相当すること (Kelava I. et al, **Dev. Biol.**, 2016) が問題点として挙げられる。そこで、本研究開発課題では、(1)の問題点を解決するために、まずヒト iPS 細胞からヒト BFCN の選択的誘導法の開発することを目的として研究を進めることにした。

これまでに研究開発代表者は、マウス BFCN の発生に重要な転写因子である *Lhx8* をノックダウンしたマウス神経幹細胞の解析から、転写因子 X がマウス BFCN の分化に関与していることを見出した(論文未発表)。ヒト iPS 細胞に *ASCL1*, *DLX2*, *miRNA-9/9\*-124*, *Bcl-xL*(これらの組み合わせをこれ以降 AD-BmiRs と省略する)を強制発現することにより、GABA 作動性神経細胞に安定的に誘導できることが報告されている(Ishii T. et al, **eNeuro**, 2019; Ishikawa M. et al, **Cells**, 2020)。そこで、AD-BmiRs と転写因子 X を Tet-On 駆動性の PiggyBac 発現ベクターに挿入した。この発現ベクターを京大から分与された 414C2 ヒト iPS 細胞株に導入し、ドキシサイクリン誘導性のヒト iPS 細胞の安定発現株を初めに作製した。

*ASCL1* と *DLX2* を強制発現したヒト多能性幹細胞から誘導した MAP2 陽性の神経細胞のうち、約 70%が GABA 陽性神経細胞である一方、*ASCL1* のみを強制発現すると、MAP2 陽性の神経細胞のうち、約 10%が GABA 陽性神経細胞であったことが報告されている(Sun A.X. et al, **Cell Rep.**, 2016)。そこで、*DLX2* を除いた A-BmiRs, X をヒト iPS 細胞に強制発現することにより、抑制性神経細胞の誘導効率を減少させることが出来る可能性があると考えた。そこで、A-BmiRs, X(これらの組み合わせをこれ以降 AX-BmiRs と省略する)を発現するヒト iPS 細胞株を作製し、神経誘導を行ったところ、AD-BmiRs, X を発現するヒト iPS 細胞株から誘導した神経細胞と比較し、抑制性神経細胞のマーカーである *Glutamate decarboxylase 1 (GAD1)* の発現が顕著に減少することを見出した。一方で、BFCN のマーカーである *Choline Acetyltransferase (CHAT)* の発現は顕著に増加した。さらに、ヒト iPS 細胞から効率よく前脳型の神経幹細胞に誘導できることが報告されている、3 種類の小分子化合物存在下に、さらに腹側に誘導することのできる Shh シグナルのアゴニストを添加して前脳の腹側に誘導し、ドキシサイクリンの添

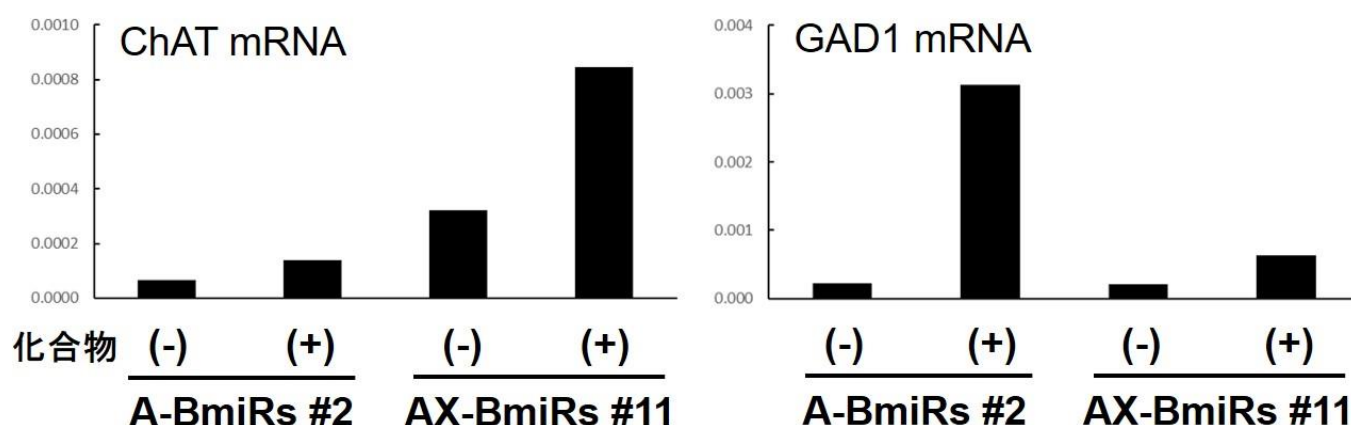


図 1. 小分子化合物存在下で、AX-BmiRs iPS 細胞から誘導した培養 20 日目の神経細胞では、小分子化合物非存在下での A-BmiRs iPS 細胞や AX-BmiRs iPS 細胞由来神経細胞と比較し、BFCN のマーカーである *CHAT* mRNA の発現が上昇した一方、抑制性神経細胞のマーカーである *GAD1* の発現が顕著に減少した。縦軸は相対発現量を示す  $2^{(-\Delta Ct)}$ 。横軸の#はそれぞれ iPS 細胞のクローンの番号。

加により AX-BmiRs iPS 細胞からヒト BFCN の誘導効率が上昇するかどうかを検討した。その結果、それらの化合物存在下で転写因子群 AX-BmiRs を強制発現すると、化合物非存在下の A-BmiRs あるいは AX-BmiRs の強制発現と比較し、BFCN のマーカーである *CHAT* mRNA の発現が顕著に上昇する一方、抑制性神経細胞のマーカーである *GAD1* mRNA の発現が顕著に減少することを見出した(図 1)。従って、DLX2 を除き、小分子化合物と X の強制発現を組み合わせた神経誘導により、前脳型の神経幹細胞を介して BFCN のマーカーが顕著に上昇することが示唆され、上記の選択的に BFCN を誘導できなかったという問題点を大きく改善出来た。

次に、依然として改善できていない上記(2)の誘導したヒト BFCN は十分に成熟していないという問題点を解決するため、ある程度ヒト BFCN と分化成熟のメカニズムが共通していると考えられるマウス BFCN の分化成熟過程を詳細に解析した。まず、BFCN が多く存在する、複数のマウス日齢の中隔領域および BFCN を生み出す神経幹細胞が存在する胎生期の内側基底核原基領域を切り出した後、核を抽出し、シングル核 RNA-seq を行った。その結果、げっ歯類 BFCN の分化成熟が促進する生後 2 週間において、アストロサイトのクラスターが多く検出されることを見出したことから、げっ歯類 BFCN の分化成熟を促進する一つの要因としてアストロサイト由来因子である可能性が示唆された。そこで、研究開発代表者も共著者の一人として貢献し、令和 4 年の 9 月に *Cell Reports Methods* に発表した効率よく前脳オルガノイドを作製する方法を使用し(Shimada H. et al, **Cell Rep Methods.**, 2022)、前脳オルガノイド内にヒト BFCN とヒトアストロサイトを誘導することで、前脳オルガノイド内のヒト BFCN の分化成熟を促進できると考えた。研究開発代表者は、ヒトアストロサイトへ誘導する転写因子群を導入している iPS 細胞と AX-BmiRs iPS 細胞を 1:1 で混ぜ、胚葉体の形成過程でドキシサイクリンを添加し、前脳ヒトオルガノイドを作製した。その結果、ドキシサイクリンによりヒトアストロサイトを誘導するための外来の転写因子の発現量が十分であった一方、ヒト BFCN を誘導するための外来の転写因子の発現量が十分でなかったため、前脳オルガノイド内におけるヒト BFCN の分化成熟は見られなかった。そこで、今後は外来の転写因子の十分な発現量が得られるように、別のヒト iPS 細胞のクローンを選択するか、あるいは遺伝子導入による影響を受けにくい安全領域に外来の転写因子を挿入することで、外来の転写因子の安定的な発現量を担保し、成熟したヒト BFCN を含む前脳オルガノイドの作製を目指す。

### 本研究開発の意義

ヒト多能性幹細胞から様々な化合物存在下でオルガノイドを作製しても、シングルセル RNA-seq 解析により、多くの種類の神経細胞のクラスターが検出された一方、BFCN のクラスターはやはり検出されない(Amin N.D. et al, **bioRxiv**, 2023)。また、マウスやヒト成体脳を用いた snRNA-seq 解析においても、マウスおよびヒト BFCN のクラスターは非常に小さいことから(Saunders A. et al, **Cell**, 2018; Siletti K. et al, **Science**, 2023)、成体脳においても稀少な細胞集団であるヒト BFCN を誘導することは非常に困難なことが予想される。しかし、本研究では、小分子化合物存在下で、AX-BmiRs iPS 細胞から誘導した神経細胞では、A-BmiRs iPS 細胞由来神経細胞と比較し、*CHAT* mRNA の発現が顕著に増加した一方、*GAD1* mRNA の発現が顕著に減少した。今後ドキシサイクリンによる外来の転写因子の発現量を安定的に制御することに成功すれば、ヒト前脳オルガノイドにおいても、分化成熟が促進されたヒト BFCN の誘導が可能になることが期待される。

現在承認されている AD 治療薬の 4 つの内 3 つが BFCN の作用を増強するものであり、AD の認知機能障害を克服する為にも、BFCN の生存と機能制御は喫緊の課題である。かつて、AD 患者の剖検脳において、80%の BFCN の消失が約 40 年前に報告され(Whitehouse P.J. et al, **Science**, 1982)、近年においても、BFCN が多く存在する前脳基底部の萎縮が複数のグループから報告されているにもかかわらず(Ballinger E.C. et al., **Neuron**, 2016)、AD 患者において BFCN が変性するメカニズムは依然不明のままである。本研究開発課題で開発された技術を用いることで、AD を含めた認知機能障害のメカニズムの解明にもつながり、薬剤評価系として、医療、創薬に大いに貢献できると考えている。

Result of research and development

Basal forebrain cholinergic neurons (BFCN) are important in cognitive function. It is desired to construct an evaluation system using human iPS cell-derived BFCN for drug discovery targeting BFCN for cognitive dysfunctions such as Alzheimer's disease (AD) and schizophrenia. However, (1) the usual protocols cannot selectively obtain BFCNs because of the mixture of BFCNs and GABAergic neurons (Liu Y. et al, **Nat. Neurosci.**, 2013), (2) *in vitro* human neurons obtained by culture techniques are immature (Kelava I. et al, **Dev. Biol.**, 2016). Therefore, in order to solve the first problem, I decided to develop a method for selective induction of human BFCNs from human iPS cells.

So far, I have found that transcription factor X is involved in the differentiation of mouse BFCNs, based on analysis of mouse neural stem cells in which Lhx8, a transcription factor important for mouse BFCN development, was knocked down (unpublished data). It was reported that forced expression of ASCL1, DLX2, miRNA-9/9\*-124 and Bcl-xL (combinations of these will henceforth be abbreviated as AD-BmiRs) in human iPS cells can stably induce GABAergic neurons (Ishii T. et al., **eNeuro**, 2019; Ishikawa M. et al, **Cells**, 2020). Furthermore, three chemical compounds, which have been reported to efficiently perform neural induction from human iPS cells, and the Shh signalling agonist was added to the ventral side of the forebrain to determine whether the efficiency of induction of human BFCNs from AX-BmiRs iPS cells is increased. The results showed that forced expression of the transcription factor group AX-BmiRs in the presence of those compounds markedly increased the expression of *Choline Acetyltransferase* mRNA, a marker of BFCN, compared to the other groups, while the expression of *Glutamate decarboxylase 1* mRNA, a marker of inhibitory neurons, was found to be markedly reduced. Thus, without DLX2, the neuronal induction by the combination of small molecule compounds and forced expression of X suggested that the markers of BFCN were markedly up-regulated. Next, in order to solve second problem as shown above, the differentiation and maturation process of mouse BFCNs, which are thought to share to some extent the same process as human BFCNs, was analyzed in detail. First, the nuclei were extracted from the regions of perinatal and postnatal septum, where BFCNs are abundant, and the region of the embryonic medial ganglionic eminence, where neural stem cells that give rise to BFCNs are located, and then single-nucleus RNA-seq (snRNA-seq) was performed. As a result, it was found that a large number of astrocyte clusters were detected in the first two weeks after birth, when the differentiation and maturation of rodent BFCNs is promoted, suggesting that astrocyte-derived factors may be one factor that promotes the differentiation and maturation of rodent BFCNs. Therefore, using an efficient method for producing forebrain organoids (Shimada H. et al, **Cell Rep Methods.**, 2022), I have developed a method to produce forebrain organoids containing human BFCNs and astrocytes to promote the differentiation/maturation of human BFCNs. However, human BFCN were not observed within the forebrain organoids because doxycycline induced sufficient expression of exogenous transcription factors that induce human astrocytes but insufficient expression of exogenous transcription factors that induce human BFCN.

Significance of research and development

Organoids in the presence of various compounds have detected clusters of many neuronal cell types by single-cell RNA-seq, while clusters of BFCNs are not detected (Amin N.D. et al, **bioRxiv**, 2023). Also, in snRNA-seq analyses using adult mouse and human brains, clusters of BFCNs are very small (Saunders A. et al, **Cell**, 2018; Siletti K. et al, **Science**, 2023), indicating that even in adult brain, because of rare cell population, inducing human BFCNs is expected to be very difficult. Future success in stably regulating the expression levels of exogeneous transcription factors by doxycycline would enable the induction of human BFCNs with enhanced differentiation/maturation in human forebrain organoids. As three out of four currently approved drugs for AD potentiate the action of BFCNs, the survival and functional regulation of BFCNs is an urgent issue to overcome the cognitive dysfunction of AD. 80% loss of BFCN was reported in autopsy brains of AD patients about 40 years ago (Whitehouse P.J. et al, **Science**, 1982), and despite recent reports from several groups of atrophy in the basal

forebrain (Ballinger E.C. et al, ***Neuron***, 2016), the mechanism that BFCNs degenerate in AD patients still remains unclear. The technology developed in this project will help to elucidate the mechanisms of cognitive dysfunction, and will contribute greatly to medicine and drug discovery.