

配付先：大学記者会（東京大学） 文部科学記者会 科学記者会

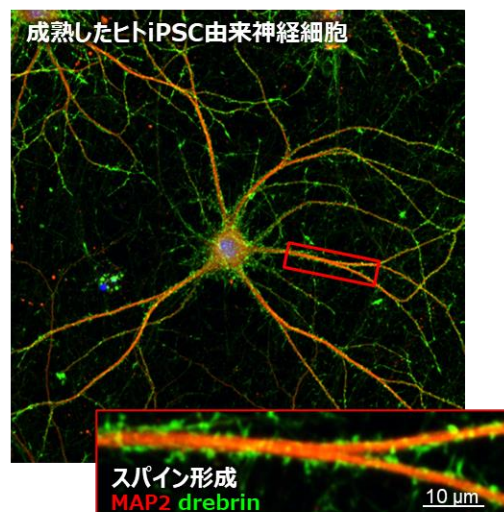
2023年3月23日
国立大学法人東京大学
株式会社リコー

記憶メカニズム研究や中枢神経系疾患の治療薬開発に有用な ヒト神経細胞の作製に成功

——転写因子で分化誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞で
迅速な樹状突起スパイン形成とシナプス機能の成熟化を達成——

発表のポイント

- ◆本研究は、転写因子誘導された iPSC 由来神経細胞を用いることで、ヒトの脳神経細胞の成熟過程を再現し、高い効率での樹状突起スパイン形成とシナプス機能の成熟化に成功しました。
- ◆成熟化に成功したことにより、記憶メカニズムにかかわるドレブリンエクソダスの現象を、世界で初めて iPSC 由来神経細胞で観察できました。
- ◆本研究で用いた iPSC 由来神経細胞は、ヒトの神経シナプス機能の研究を加速し、中枢神経系疾患の病態解明や認知機能障害などを標的とした治療薬開発への活用が期待できます。



転写因子誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞のスパイン形成

発表概要

東京大学 大学院農学生命科学研究科の關野祐子特任教授とリコー リコーフューチャーズ BU バイオメディカル事業センター バイオメディカル研究開発室の林和花リーダーらの研究グループは共同研究の一環で、転写因子^(注1)で分化誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞^(注2)が機能的に成熟し、樹状突起スパインの形成とシナプス可塑性を担うメカニズムの発現を迅速に達成することを明らかにしました。

転写因子を使ってヒト iPSC 細胞^(注3)を、脳の神経細胞に迅速分化誘導したところ、2~3ヶ月という短い期間で神経細胞の樹状突起上に棘構造（樹状突起スパイン）^(注4)が無数に形成されました。スパインが形成されるまでの遺伝子発現パターン変化は、ヒトの脳発達データと相関し、脳型ドレブリン^(注5)へのアイソフォーム変換^(注6)などが起こることを示しました。ま

た、スパインに集積しているドレブリンがグルタミン酸刺激により樹状突起内に移動する現象（ドレブリンエクソダス）を、世界で初めてヒト iPSC 由来神経細胞で観察しました。この現象は、げっ歯類の初代培養神経細胞で明らかにされたスパインの形態的可塑性^(注7)メカニズムです。ヒト神経細胞でドレブリンエクソダスが観察されたことの意義は非常に大きく、ヒトの神経シナプスの成熟過程の研究や、記憶学習メカニズムの研究が促進することが期待されます。また、転写因子誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞でスパイン形成までの期間が3分の1に短縮されたことで、大幅な実験コスト削減が実現します。

今後、ヒト中枢神経系疾患の病態解明や、神経細胞作用薬の開発、また、さらなる応用として、認知機能障害などを含む医薬品の副作用を予測する試験や、化学物質の毒性試験などへの展開を通じて、創薬や iPS 細胞産業の活性化に貢献することが期待されます。

発表内容

〈研究の背景〉

人間の様々な体細胞になる能力を持つ iPS 細胞は、入手困難なヒト細胞の研究を可能にし、病態解明や新薬開発などに活用されています。ヒト iPSC 由来神経細胞は、認知症や自閉症といった中枢神経系疾患などの研究に役立つことが期待され、特に神経ネットワークの情報伝達を司るシナプスの構造と機能を再現することは重要であると考えられます。しかし、これまでヒト iPSC 由来神経細胞はシナプス形成に時間がかかり、特に興奮性シナプス後部の棘構造（スパイン）形成が困難とされていました。一方、近年様々な種類の神経細胞を効率よく作製する分化誘導技術の開発も進められて来ました。本研究では、転写因子を使って分化誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞の、成熟過程における経時的な特徴を明らかにし、スパイン形成を評価しました。

〈研究の内容〉

エリクサジェン・サイエンティフィック社の分化誘導技術で作製したヒト iPSC 由来神経細胞を最大3ヶ月間培養し、経時的にデータを収集しました。トランスクリプトーム解析の結果、これらの細胞は培養10日で神経細胞に分化し、その後2~3ヶ月の成熟の過程を経てヒトの大脳皮質神経細胞の遺伝子発現パターンに近づくことが明らかになりました（図1）。スパインが形成されるまでの発現パターンの変化は、ヒトの脳発達データ（BrainSpan）と相関し（図2.A）、成熟に伴うシナプス関連因子の発現上昇と脳型ドレブリンアイソフォームへの変換（図2.B）などが確認されました。また、高密度多点電極アレイ（HD-MEA）を用いた電気生理学的評価を行い、発火頻度の上昇とシナプス活動を介した神経伝達ネットワークの形成を確認しました（図3）。

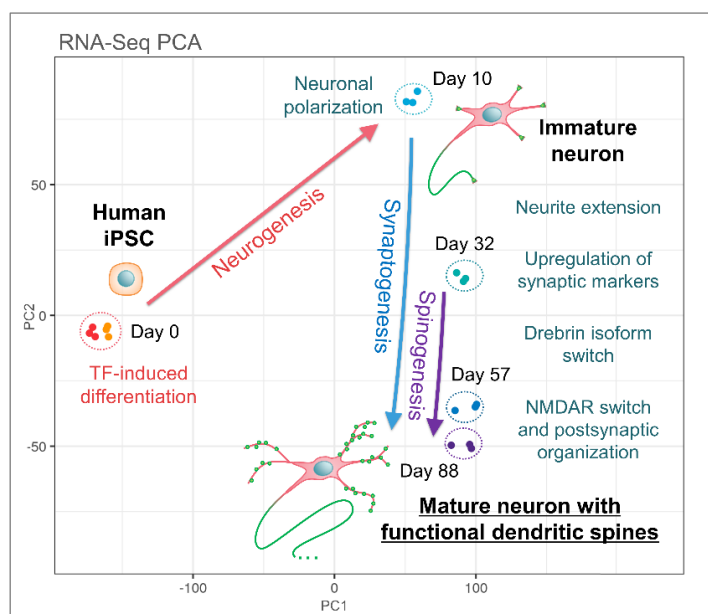


図 1 : 転写因子誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞の成熟過程

ヒト iPSC 細胞を転写因子で脳の神経細胞に迅速分化誘導して、遺伝子発現パターンや神経特異的タンパク質局在の経時的変化の解析を行い、成熟過程の特徴を明らかにした。

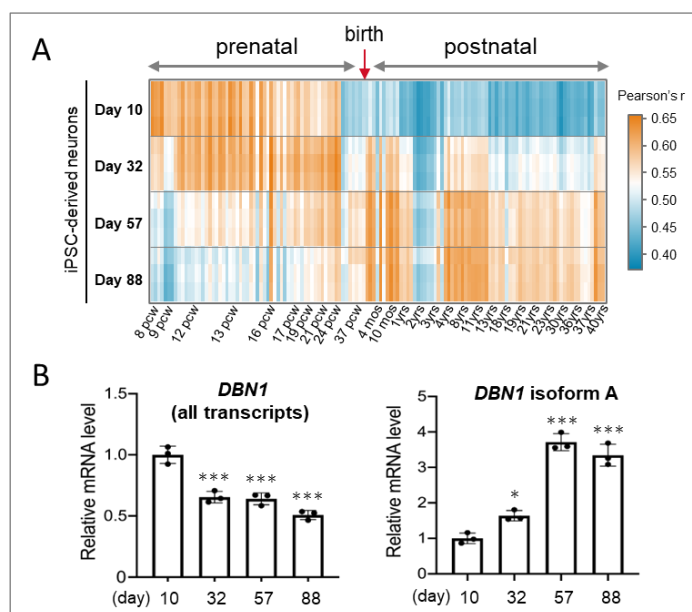


図 2 : ヒト iPSC 由来神経細胞の成熟過程における脳発達の特徴の再現

A : 脳発達における遺伝子発現データとの相関性を示した結果、ヒト iPSC 由来神経細胞の発現パターン変化はヒト胎児脳（左）から生後・成人脳（右）への移行を再現している。

B : ドレブリン全体は神経発生初期に高く発現し、以降減少するが（左）、脳型ドレブリン A アイソフォームの発現は成熟期に上昇する（右）。

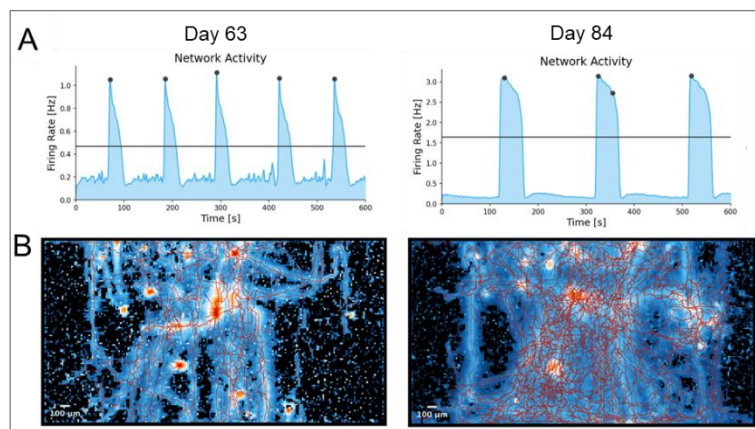


図 3：神経ネットワーク電気活動の HD-MEA 評価

A：無数の微小電極を含むセンサー上にヒト iPSC 由来神経細胞を培養した結果、成熟と共に神経ネットワークの細胞結合性と同調性を示す高頻度発火バーストを検出した（左）。バーストの持続時間の延長はさらにネットワークレベルでの成熟を示している（右）。

B：軸索の活動電位を追跡すると、信号伝播距離と回路の複雑性が、培養日数とともに増加することを観察した（左右比較）。

同時に、共焦点定量イメージサイトメーター（CQ1）を用いた免疫細胞染色で、細胞形態および神経特異的タンパク質発現の評価を行いました。その結果、神経細胞の樹状突起の成長に伴い、ドレブリンの局在変化が起こり、2~3 ヶ月という短い期間で樹状突起上にスパインが無数に形成されました（図 4）。

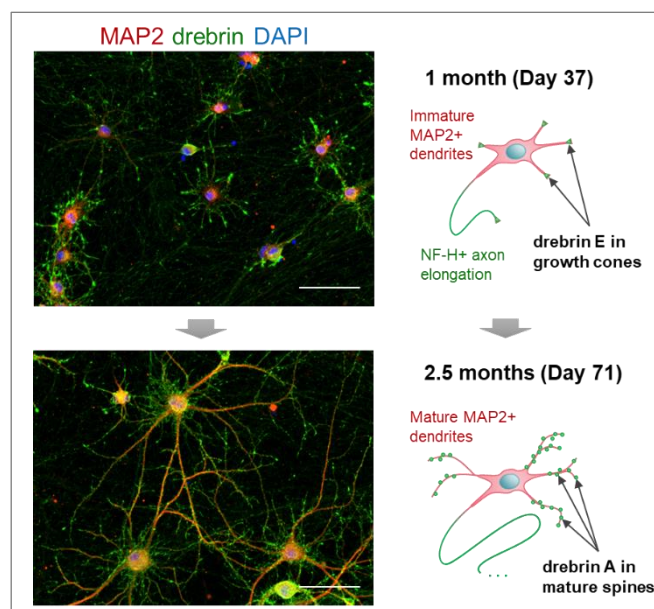


図 4：免疫細胞染色によるヒト iPSC 由来神経細胞の成熟とスパイン形成の観察

樹状突起マーカーの MAP2（赤）とスパイン形成マーカーのドレブリン（緑）の免疫細胞染色画像。
上：神経発生初期には突起が短く、ドレブリン E アイソフォームが細胞周辺の成長円錐に発現する。
下：培養 2~3 か月後に脳型ドレブリン A アイソフォームが成長した樹状突起上のスパインに集結する。（スケールバー：100 μ m）

更に、スパインの機能性を示すために、グルタミン酸刺激への応答性を評価しました。スパインに集積しているdrebrinがグルタミン酸刺激により樹状突起内に移動する現象（drebrinエクソダス）を、世界で初めてヒト iPSC 由来神経細胞で観察しました（図 5）。NMDA 型グルタミン酸受容体の活動を介するdrebrinエクソダスは、げっ歯類の初代培養神経細胞により明らかにされてきた樹状突起スパインの形態的可塑性メカニズムです。この現象の再現に成功したことにより、シナプスが分子機能レベルで成熟していることを示しました。

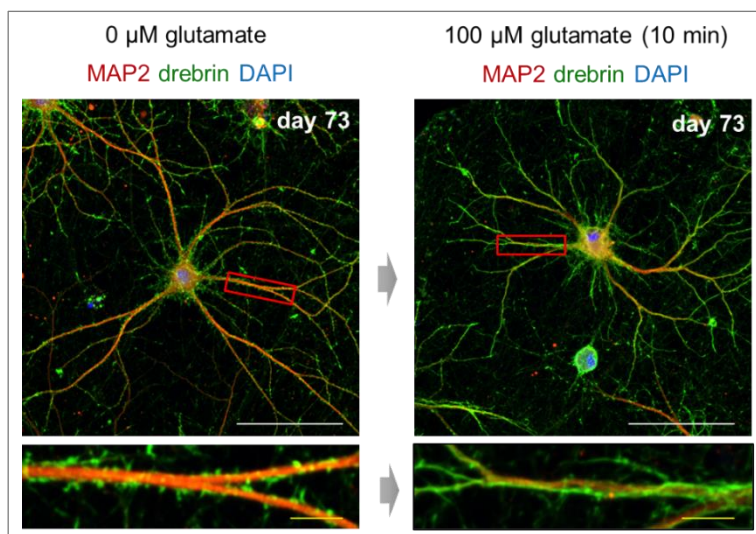


図 5：ヒト iPSC 由来神経細胞のdrebrinエクソダスの観察による機能的評価

左：グルタミン酸刺激をしていない培養 73 日目の神経細胞の樹状突起スパインの様子。

右：グルタミン酸で 10 分刺激した結果、スパインに集積していたdrebrin（緑）が樹状突起内に移動する。（スケールバー：白=100 μm、黄=10 μm）

〈今後の展望〉

ヒト神経細胞でdrebrinエクソダスが観察されたことの意義は非常に大きく、ヒトの神経シナプスの成熟過程の研究や、記憶学習メカニズムの研究が促進することが期待されます。また、他の分化誘導法ではスパイン形成が非常に遅いか少ないために、本研究のようにスパイン形成までの時間経過を免疫細胞染色により解析できた研究はありませんでした。転写因子誘導されたヒト iPSC 由来神経細胞でスパイン形成までの期間が 3 分の 1 に短縮されたことで、大幅な実験コスト削減が実現します。

今後、中枢神経系疾患の病態解明や、神経細胞作用薬の開発、また、さらなる応用として、認知機能障害などを含む医薬品の副作用を予測する試験や、化学物質の毒性試験などへの展開を通じて、創薬や iPS 細胞産業の活性化に貢献することが期待されます。

〈関連のプレスリリース〉

「リコー、mRNA を活用した創薬支援事業を強化」(2022/05/17)

https://jp.ricoh.com/release/2022/0517_1

発表者

国立大学法人東京大学 大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

關野 祐子（特任教授）〈イノベーション創薬研究所（理事長）〉

株式会社リコー リコーフューチャーズ BU バイオメディカル事業センター

バイオメディカル研究開発室

林 和花（細胞研究グループリーダー）

論文情報

〈雑誌〉 iScience

〈題名〉 Dendritic spine formation and synapse maturation in transcription factor-induced human iPSC-derived neurons

〈著者〉 Waka Lin*, Shusaku Shiimoto, Saki Yamada, Hikaru Watanabe, Yudai Kawashima, Yuichi Eguchi, Koichi Muramatsu, Yuko Sekino

〈DOI〉 10.1016/j.isci.2023.106285

〈URL〉 <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106285>

用語解説

（注1）転写因子

ゲノム DNA の遺伝子情報から転写による mRNA の発現を開始または制御するタンパク質。どの転写因子が細胞内に発現しているかにより、細胞の性質や挙動が変化する。

（注2）ヒト iPSC 由来神経細胞

ヒト iPSC 細胞を分化させることで生体外で人工的に作製された神経細胞。

（注3）ヒト iPS 細胞（ヒト人工多能性幹細胞）

ヒトの皮膚や血液などの細胞に特定の因子を導入して、身体の全ての種類の細胞へ分化する能力を持たせた細胞。

（注4）樹状突起スパイン

ヒトや動物の脳神経細胞は、細胞から情報を送る軸索と情報を受け取る樹状突起が伸びだして神経ネットワークを形成している。樹状突起にはスパインと呼ばれる無数の小さな棘のような突起構造があり軸索終末との連結部位となっている。ここには記憶や学習に関係する様々なタンパク質が集まっている。

（注5）ドレブリン

細胞の形を作っている骨格であるアクチン線維を安定化させるタンパク質。脳型ドレブリン A はシナプス後部に集積し、樹状突起スパインの形成と動態を制御する。シナプスのグルタミン酸刺激などにより、スパイン内のドレブリンが樹状突起内に移動する現象（ドレブリンエクソダス）が知られており、形態的可塑性を誘発する重要な機構の一つとして知られている。

(注6) アイソフォーム変換

一つの遺伝子から複数のタンパク質が生まれる場合に、それぞれの種類をアイソフォームと呼ぶ。特定な条件下で発現していたアイソフォームが、別のアイソフォームに置き換わることがある。例えばドレブリンは一つの遺伝子 (*DBN1*) から発現されるが、神経細胞の成熟とともに全身型ドレブリンEから脳型ドレブリンAに置き換わる。

(注7) 形態的可塑性

記憶の基盤となるシナプスの情報伝達効率が長期的に変化する際には、スパインの形や体積も可塑的に変化している。記憶や忘却などにかかわる。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

特任教授 關野 祐子 (せきの ゆうこ)

Tel: 03-5841-5390 E-mail: yukos@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

株式会社リコー リコーフューチャーズBUバイオメディカル事業センター

細胞研究グループリーダー 林 和花 (りん わか)

Tel: 050-3817-4355 E-mail: waka.lin@jp.ricoh.com

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部

事務部 総務課総務チーム 総務・広報情報担当 (広報情報担当)

Tel: 03-5841-8179 Fax: 03-5841-5028

E-mail: koho.a@gs.mail.u-tokyo.ac.jp

株式会社リコー 広報室

Tel: 050-3814-2806 E-mail: koho@ricoh.co.jp