

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」
平成 23 年度分担研究報告

－ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究－

研究分担者：佐藤 薫（国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第一室長）

研究要旨：医薬品開発の迅速化の実現に向けたレギュラトリーサイエンスの基盤整備として、ヒト幹細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells [ESCs]、または人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells [iPSCs]）から分化誘導した神経細胞の医薬品安全性評価への応用を実現するために、これらの細胞を用いた安定した薬理実験系を確立できるのかどうかについて文献調査研究することを目的とする。iPSCs から神経幹細胞塊（neurosphere）を介さずに神経細胞に分化誘導する手法（ダイレクトディフェレンシエーション法）に関する報告が増えてきていること、この手法を用いて分化誘導された神経細胞の株間比較が行われ出しているが十分な報告例がないこと、iPSC 化せずに体細胞から直接神経細胞を分化誘導するダイレクトリプログラミング法が新しい技術として出てきていること、を明らかとした。

キーワード：hiPSCs hESC neurosphere 神経細胞分化 終末分化 ダイレクトディフェレンシエーション法 ダイレクトリプログラミング法 株間比較

A. 研究目的

本研究は、医薬品開発の迅速化の実現に向けたレギュラトリーサイエンスの基盤整備として、ヒト幹細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells [ESCs]、または人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells [iPSCs]）から分化誘導した神経細胞の医薬品安全性評価への応用を実現するために、これらの細胞を用いて薬理実験に耐えうる安定した実験系を確立できるのかどうかについて文献調査研究することを目的とする。昨年度の文献調査研究により、ヒト iPSCs (human iPSCs: hiPSCs) をスタートラインとすると、分化誘導した神経細胞は安定性、再現性が不十分であることが示された。現在我々はこの問題を解決すべく、hiPSCs と分化済み神経細胞の中間的ステップであり、かつ、増幅・冷

凍・保存が可能な hiPSCs 由来神経幹細胞塊（neurosphere）をスタートラインとして薬理実験系の確立を試みている。複数研究機関より、複数株の hiPSCs neurosphere の供与を受け、神経細胞標本へ分化誘導し、真に生体内神経細胞機能を再現するまで分化するのかどうか（最終的な分化状態、つまり終末分化に達するのか）、薬理実験に応用可能なのか、という点について、神経細胞機能、シナプス成熟といったパラメーターに基づいて詳細な株間比較を行っている。しかし最近では、体細胞→ iPSCs → 胚様体（embryoid body : EB）→ neurosphere → 神経細胞へ分化誘導、というオリジナルの神経細胞分化誘導法に加えて、非常に多様な神経細胞分化誘導法が報告され始めている（図 1）。本調査研究は、hiPSCs からの神経細

胞分化誘導に特に注目して、諸外国の研究、株間比較実施例について、神経細胞機能をどこまで再現できているか、すなわち終末分化に達しているかという情報に関して文献調査を行い、現在の動向を解析し今後の研究方向に関する考察を行う。

B. 研究方法

Human iPS cell, neuron, differentiation をキーワードとして 2007 年以降の文献を PubMed 検索し文献を収集し、hiPSCs からの神経細胞分化誘導に関する文献調査を行った。

C. 研究結果と考察

hiPSCs から neurosphere を介さずに神経細胞に分化させる手法—ダイレクトディフェレンシエーション法

hESC_s においてすでに報告されていた ESC_s から運動神経に直接分化させる方法 (Li et al., Nat Biotech 23, 215-221, 2005) (ダイレクトディフェレンシエーション法) が、hiPSC_s に対しても有効であることが示されている (Karumbayaram et al., Stem Cells 27(4), 806-811, 2009)。これは、hiPSC_s を接着培養し神経上皮ロゼット (= 神経外胚葉性分化) を作りこれをまき直し、レチノイン酸 (retinoic acid: RA)、Sonic hedgehog (Shh) 存在下で 1 週間培養し、脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF)、毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor: CNTF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell-line derived neurotrophic factor: GDNF) を加え Shh 濃度を下げてさらに 3-5 週間培養

することにより、運動神経細胞 (β III-tubulin(+), ChAT(+), Islet1(+)) を分化誘導するという方法である。この方法は hESC_s からの場合も hiPSC_s からの場合も 30% 程度の細胞が Islet1(+) の運動神経となっている。これらの細胞に電気生理学的方法により脱分極電流を流す (current injection) と半数の細胞で発火が起こることも確認されている。この方法で iPSC_s を morphogen (発生、変態、再生の際に濃度勾配によって形態形成を支配する物質) なしに神経細胞に分化誘導すると rostral phenotype (吻側部の形質) を獲得し、morphogen 刺激により caudal phenotype (尾側部の形質) を獲得することも示されている。例えば、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor: FGF) 8 刺激により中脳の特徴を獲得し、RA により脊髄の特徴を獲得する。これに Shh をさらに加えるとさらに ventral phenotype (腹側部の形質) の特徴を獲得するようになることが知られている。

このダイレクトディフェレンシエーション法においては、神経細胞分化誘導効率を上げる因子の同定が進んでいる。

例えば、hESC_s を接着培養したときに PAX6(+) ロゼット誘導効率は 10% 以下であるが、Sma and Mad Related Family (SMAD) signaling の阻害薬である Noggin と SB431542 は hESC_s の PAX6(+) ロゼット誘導効率を 80% にまで上昇させる (Chambers et al., Nat Biotech 27(3), 275-80, 2009)。この方法で hiPSC_s から中脳ドパミン (DA) 神経の分化誘導が成功している。また、BDNF、アスコルビン酸 (ascorbic acid: AA)、Shh、RA の添加により脊髄運動神経も分化誘

導されている。

2010 年には、hESCs および hiPSCs の神経細胞分化誘導に対して促進方向に働く低分子薬剤 dorsomorphin が見いだされた(Zhou et al., *Stem Cells*, 28 1741-50, 2010)。この薬剤の作用には、形質転換成長因子(transforming growth factor: TGF) β 受容体の活性化に伴う activin, bone morphogenesis protein (BMP) pathways の阻害が関与していることが明らかにされた。ただし、この研究で神経細胞分化パラメーターとしているのは PAX6, SOX1, SOX2, Nestin, β III tubulin といった比較的初期の神経細胞分化マーカーと、DA 神経細胞マーカーである NURR1 であり、機能的な終末分化についての検討は不十分である。興味深いことに、dorsomorphin はマウス ES 細胞(mouse ES cells: mESCs)には影響がない。著者らはこの分化誘導法を‘Single-step cost-effective procedure of high efficiency neural conversion in defined adherent cultures’として neurosphere 法に変わる方法として推奨している。

背景として補足しておく、TGF β スーパーファミリー(TGF β , Activin, Nodal, BMP)は hESCs 分化において多様な働きをすることがすでに明らかとなっていた(Vallier et al., *J Cell Sci* 118, 4495-4509, 2005; Xu et al., *Cell Stem Cell* 3, 196-206, 2008)。TGF β /Activin/Nodal は FGF signaling と協調して NANOG 発現を調整し多分化能を維持している。BMP signaling により中胚葉と栄養外胚葉への分化が促され、Activin/Nodal

pathway により内胚葉分化が促進される。一方、Activin/Nodal および BMP signaling の阻害により(一方もしくは両方で)神経外胚葉に分化が進む。

hESCs および hiPSCs 細胞から前脳神経細胞を直接分化させている報告もある(Kim et al., *PNAS* 108(7), 3005-3010, 2011)。Noggin を入れる段階までは Chambers らと同じプロトコルであるが(この時点で PAX6, DACH1 [前脳マーカー], EMX2 [前脳マーカー] の発現が起こっている)、EB の接着後、Shh 活性化剤 purmorphamine を添加すると BF1 (FOXP1) (前脳マーカー)の発現がおこる。この時点で Shh (腹側マーカー), NKX2.1 (腹側マーカー)が発現しているので、ここで細胞をシングル細胞にしてラット グリアフィーダー細胞上にまき直すと 3 週間目までに軸索(axon)、樹状突起(dendrite)が現れる。さらに、シナプス後部形成誘発分子(postsynaptic synapse-inducing molecules)として知られる Neuroligin3, Neuroligin4 を発現した HEK293 細胞とこの細胞を共培養すると、シナプス形成が促進されることも示されている。また、ラット大脳皮質神経細胞と 5 週間共培養して電気生理学的検討も行っており、Na⁺電流、K⁺電流、current injection による発火、興奮性および抑制性自発発火の記録に成功している。6 週目には DNQX (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid : AMPA 型グルタミン酸受容体阻害剤)感受性の興奮性電流も記録できている。自閉症患者では X 連鎖遺伝子 Neuroligin に exon4 が欠損している splice variant (Neuroligin Δ E4)が見つ

かっている (Talebizadeh et al., J Med Genet 43, e21, 2006) 。 Neuroigin4ΔE4 を発現した HEK293 細胞とこの細胞を共培養した場合シナプス形成がおこらないことから、この細胞を用いた実験系がシナプス形成と病態との関連の解明に有効な実験系であることが示唆されている。興味深い点として、このグループは hiPSCs を 2 株検討しており、一方は興奮性神経細胞の、もう一方は抑制性神経細胞の割合が高いことを示している。つまり株間に分化バイアスがあることを指摘している。かなり多様な神経細胞機能について検討を行っているが、シナプス形成をシナプス前部指標タンパク質 (pre-synaptic site マーカー) のみで判断している点はデータとして不十分である。また、ラット大脳皮質細胞との共培養でしか電気生理実験を行っていないため、hiPSCs 由来神経細胞間でシナプス形成が起こるかどうかに興味をもたれる。また、シナプス形成にはアストロサイト フィーダー細胞などの補助的な細胞が必須であることも示されている。

以上のような neurosphere を介さずに神経細胞に分化させるダイレクトディフェレンシエーション法は細胞の形態を観察しながら再播種、morphogen 添加のタイミングを決める必要があり、実験者の熟練が求められるであろう。従って、実験ごとの再現性についても検討する必要がある。この点に関しては、次項からの株間比較において施設間バリデーションを行った例があるので紹介する。

hiPSCs 細胞由来神経細胞標本の株間比較

これまでも、hiPSCs は株間の細胞特

性の差が大きいことが指摘されていたが、もっぱらリプログラミングの不十分さ、hESC 細胞に比較して神経細胞分化誘導能が低い点、多能性の差に注目が集まっていた。しかし、我々同様、創薬応用という視点にもとづき、終末分化に達するかどうか、生体内の神経細胞機能 (シナプス成熟など) を再現できているのかどうか、という検討も行われ始めている。最近では、疾患 iPSCs の医療応用においても hiPSCs の細胞特性のばらつきにより疾患由来の異常がマスクされることが懸念されるようになってきている。従って、hiPSCs 株間比較は多方面からのニーズをうけて、もはや避けられないものとして報告が増えてきている。

諸外国における株間比較では、もっぱら上記項目 1 で紹介したダイレクトディフェレンシエーション法による神経細胞分化誘導法が用いられている。

Zeng らは、作成方法が様々な (遺伝子送達にレトロウイルスを使うか、レンチウイルスを使うか、どのリプログラミング遺伝子を使うか、等) 4 種の hiPSCs を用いて株間比較を行っている (Zeng et al., PLoS One 5(7), e11853, 2010)。この報告では、morphogen なしに hiPSCs に分化誘導をかけると、神経細胞マーカーの発現パターンにおいて株間の差が著しいことが示された。しかし、morphogen なしで神経細胞分化の方向に進んだ 2 株に morphogen 刺激を行うと、caudal phenotype を獲得すること、前脳グルタミン酸神経、中脳 DA 神経、脊髄運動神経を分化誘導できることをマーカー蛋白質発現により確認している。これらの株では脱分極刺激に対して発火するまでに 6-8 週間かかっており、このとき、Na⁺ 電流と

K⁺ 電流が確認されている。ばらつきの多い細胞でも神経細胞分化に進む細胞であれば、morphogen を添加することにより、強制的に分化誘導の方向性をそろえることも可能であることが示唆されている。

より大規模な株間比較も行われている。(Boulting et al., Nature Biotechnol. 29(3), 279-286, 2011)。これは二つの研究施設で同時に同じ実験を行っている。年齢、性別が多様な提供者の皮膚線維芽細胞からリプログラミング因子の数を変えて作成された 16 株について(表 1)、多能性マーカーの発現、3 胚葉分化、テラトーマ形成能、RA および Shh pathway 活性化による運動神経分化誘導能の比較を行っている。もとになった iPSCs の特性の差(多能性マーカーの発現や使用したリプログラミング因子、核型の違い)に関わらず、16 株中 13 株で機能的な運動神経細胞への分化が確認された。3 株は神経細胞に分化しなかった(分化パラメーター: ISLET1/2, HB9 等の発現、自発発火、カイニン酸刺激に対する Ca²⁺ 応答、Na⁺ 電流および K⁺ 電流の電気生理学的な手法による確認、脱分極刺激による発火)。また、hiPSCs と hESC の分化効率には差がなかった。これらの結果に研究施設間の差もなかった。このグループはこのテストを通った hiPSC 株をリソースとして分配予定のようである。また、このような多分化能と終末分化の両方について確認するという試験セットデータをデータベース化することを提案している。興味深い点は、分化誘導効率に男女差が見受けられている点である。また同じ提供者から 2-4 株ずつの細胞を樹立しているが、提供者に固有の分化傾向が見受けられている。この研究で用いられた 16 株のうち

14 株が c-myc を reprogramming factor に加えていない。これは、我が国で汎用されている hiPSC 株である 253G1 にむしろ近いといえるのではないか。

hESCs, hiPSCs 12 株の比較実験を行っている例もある(Hu et al., PNAS 107(9), 4335-4340, 2010)。これらの細胞は全て同じ神経分化プログラムに基づいて分化しており、synapsin I の発現時期、活動電位が記録されはじめた時期も一致していた。しかし、hESCs がほぼ一定の割合で安定して神経細胞に分化するのに対し(90-97%)、hiPSCs は 15-79% と株間の差が著しい。このグループはこれらの hiPSCs に morphogen を適用し運動神経細胞への分化を誘導しても、分化誘導効率は 10-23% であり、hESCs の 30-50% よりはるかに効率が低いことを示しており、Boulting らの報告と食い違っている。この原因として、hiPSCs は hESCs に比較して morphogen への反応性が悪いためであると考察されていた。10 以上の株間比較が行われた例はまだわずか 2 報であり、どちらのグループのデータを支持するか決めることはできない。今後、同じプロトコルに従った株間比較の続報を待つ必要がある。

hiPSCs の分化誘導効率の予測を可能とするマーカー、あるいはそのメカニズムも検討されている(Kim et al., Cell Stem Cell 8, 695-706, 2011)。microRNA(miRNA)の関与について報告されている。miRNA とは、20-25 塩基の 1 本鎖 RNA のことで、他の遺伝子の発現を調節している non-coding RNA である。hESCs 13 株、hiPSCs 26 株を MS5-co-culture 法、dual-SMAD-

inhibition 法によって神経細胞に分化誘導したところ、神経細胞分化誘導能が高い株では miRNA の miR-371-3 の発現レベルが低くなっており、さらに miR-371-3 の増減が積極的に神経細胞分化に関わっていることが示されている。mESCs 研究において、着床前の胎児から細胞をとってくるか、着床後の胎児から細胞をとってくるかによって、作成した ESCs が異なる多能性を示すことが明らかとなり、それぞれを ESCs、epiblast-stem cells (EPI-SCs) と区別するようになっている。ESCs は多能性が高くナイーブ (naïve) ESCs とも呼ばれる。また、EPI-SCs は多能性が比較的 low、プライムド (primed) ESCs とも呼ばれている。ヒトで報告のある多能性細胞は ESCs よりも EPI-SCs に近いことも明らかになりつつある。miR-371-3 は ESCs に高発現し、EPI-SCs で低発現の、多能性に関連した遺伝子の中から見いだされた。ただし、この報告では神経細胞分化マーカーとして PAX6, Nestin, tyrosine dehydroxigenase (TH) (DA 神経マーカー) の発現を見ているだけなので、終末分化との関連は不明である。

DA 神経細胞への分化誘導能に着目して株間比較している例もある (Rhee et al., J Clin Invest 121(6), 2326-2335, 2011)。この報告では特に、リプログラミングにウイルスを使わず直接タンパク質を細胞内に適用する方法 (膜透過性タンパク質との融合タンパク質として細胞導入する) の有効性に注目している。レトロウイルスで作った hiPSCs 2 株、レンチウイルスで作った hiPSCs 4 株、タンパク質の直接適用で作った hiPSCs 2 株、hESCs 2 株を比較検討している。分化誘導には上

記ダイレクトディフェレンシエーション法を用いている。ウイルスで作った細胞は老化が早く (2-4 継代で増殖が停止する)、継代を繰り返すとアポトーシスを起こすことが明らかとなった。また、P53 発現量も増加していた。この結果を受けて、著者らはウイルスで作った hiPSCs は移植などの医療応用には不向きであると示唆している。一方、hESCs とタンパク質直接適用で作った hiPSCs は増殖能が高く、分化誘導をかけると、遺伝子発現 (TH, hNCAM, HuC/D, MAP2, vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2), dopamine transporter (DAT), Nurr1, EN1, GirK2, calbindin1)、電気生理学的性質 (current injection にともなう活動電位、Na⁺ spike)、DA 放出、DA 取り込みがともに中脳 DA 神経と同一の特性を示した。特に、タンパク質直接適用 hiPSCs はパーキンソン病モデルラットに対しても有効であったため将来性が期待される。

マウス iPSCs (miPSCs) の報告であるが、リプログラミングに使用する遺伝子の数がリプログラミング効率ばかりか、その後の神経細胞分化誘導効率にまで関連していることが最近報告された (Lohle et al., Stem Cells 30, 570-579, 2012)。Oct4, Oct4+Klf4, Oct4+Klf4+SOX2+c-Myc により神経幹細胞から iPSCs を作成したところ、1 因子、2 因子で作成した場合は神経細胞マーカーの発現が不十分であること、1 因子で作成した場合、分化誘導 4 週間目の神経細胞機能分化 (電位依存性の内向き電流、電位依存性 Na⁺ チャネル、K⁺ チャネルを介した電流) がおこらないことを示している (2 因子以上で作成した場合は分化が起こっている)。ただし、1 因子で作成した細胞も 6 週間培養すれ

ば同様の特性を獲得することが確認されているため、因子数は分化スピードに関連していることが示唆されている。しかし我々の検討では、リプログラミング因子数の異なる hiPSCs 由来神経細胞の特性は培養期間を長くしてもそろわない、というデータも得ている(データ示さず)。したがって、因子数の違いによる分化誘導効率の違いはマウスのみにあてはまる現象かもしれない。

iPSC 化を介さない、体細胞の神経細胞へのダイレクトリプログラミング法

細胞の iPSC 化、それに続く神経細胞分化誘導の複雑なプロトコルを避けるべく、iPSC 化を介さずに体細胞を神経細胞にダイレクトリプログラミングするという研究も活発になっている。Vierbuchen らはマウス胎児線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast: MEF)に *Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l* あるいは *Ascl1*, *Brn2*, *Zic1* をレンチウイルスで遺伝子導入し、興奮性神経細胞である iN 細胞を作成した(Vierbuchen et al., Nature 463, 1035-1041, 2010)。成熟 iN 細胞数は最大で全細胞の 19.5% に達していた。遺伝子導入後 12 日目に iN 細胞同士のネットワークで自発的活動電位、AMPA 型グルタミン酸受容体、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス後部電流 (excitatory postsynaptic currents: EPSCs) を記録している。ただし、この実験はアストロサイトのフィーダー細胞上で行われており、シナプス形成にアストロサイトの補助が重要であることが示唆される。この方法では神経細胞の内、53% が興奮性神経となり、抑制性神経は 1% しか得られないとされている。同グループ

の続報ではヒト線維芽細胞から iN 細胞の作成に成功している(Zhiping et al., Nature 476, 220-223, 2011)。上記 3 因子に *NeuroD1* を加えて遺伝子導入し 4-5 週間後に神経細胞マーカーの発現、マウスと同様の興奮性神経細胞優位な分化、ステップ脱分極刺激による Na^+ 電流および K^+ 電流を観察している。しかしここでは、iN 細胞同士のシナプス形成までは確認していない。

ダイレクトリプログラミングに miRNA を使う例も報告されている。miR-124 は下流に 1000 以上の遺伝子を制御している miRNA であり、クロマチンの remodeling に関わる BAF53a サブユニットを抑制することで、神経細胞特異的な (n)BAF complex への入れ替わりを促すため、体細胞分裂後の神経細胞分化に重要であることが報告されている(Yoo et al., Nature 460, 642-646, 2009)。この miR-124 と MYT1L, BRN2 (両遺伝子は遺伝子導入) とを組み合わせることによって生後初期 および 成熟ヒト初代培養皮膚細胞からの神経細胞作成に成功している(Ambasudhan et al., Cell Stem Cell 9, 113-118, 2011)。神経細胞分化パラメーターとして、 β III-tubulin 発現, MAP2 発現, NeuN 発現, Na^+ 電流, K^+ 電流, 自発発火, 膜電気容量, access resistance, total membrane resistance が成熟神経細胞と一致しているという点, gamma-aminobutyric acid (GABA) の生成(神経細胞の内 8%), vesicular GABA transporter (VGAT) 発現(12%), NMDA 電流(67%), vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) 発現(44%)、を確認している。ただし、DA, 5-HT, ChAT 陽性の細胞は

ほとんど誘導されなかった。30日目までに DNQX 感受性の mini-EPSCs も記録されている(25%)。ただし生後初期細胞の iN 化効率は 4-8% なのに対して成熟細胞では 1.5-2.9% と効率が低い。これまでの方法に比較してこの方法が特に優れている点は、フィーダー細胞などの補助的な細胞なしでも神経細胞同士がシナプス形成し、活動電位の記録が可能になるまで分化がすすむという点である。

miRNA のみでダイレクトリプログラミングを試みている例もある (Yoo et al., Nature 476, 228-232, 2011)。miR-9* と miR-124 とをヒト線維芽細胞に強制発現することで神経細胞分化誘導がおこることが見出されている。この分化誘導はもともとなった細胞の成熟がすすむほど時間がかかるようになる。miRNA に NeuroD2, AsCL2, MYT1L を加えて遺伝子導入すると分化効率はさらに上昇する。機能的神経細胞分化パラメーターとしては current injection で発火が起こる点、Na⁺ 電流、K⁺ 電流、自発発火が起こること、遺伝子発現パターン(ほとんど大脳皮質遺伝子)、VGLUT1 発現、興奮性神経細胞への SLC1A2 (=グルタミン酸トランスポーター EAAT2) の発現、抑制性神経細胞への GAD67, DLX1 の発現などである。4 週間後には SYN1, BSN, PCLO, SHANK3 といったシナプス関連機能タンパク質も多数発現が確認されていた。

ダイレクトリプログラミング法による DA 神経細胞作成例もある (Caiazzo et al., Nature 474, 224-9, 2011)。MEF、ヒト線維芽細胞に Mash1, Nurr1, Lmx1a を遺伝子導入することにより DA 放出、80% 以上の細胞でのペースメーカー様の

自発発火(脳内 DA 神経細胞の特徴)、TH 発現, VMAT2 発現, DAT 発現, aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1A1) 発現, calbindin 発現を確認している。さらに、synaptotagmin1, synapsin の発現、Na⁺ 電流、活動電位、K⁺ 電流、DA 受容体(D2/3 受容体)作用薬である quinpirole による発火抑制も見られている。ただし、遺伝子発現網羅解析より、中脳 DA 神経とは異なる細胞であることも指摘されている。

ダイレクトリプログラミング法の場合、リプログラミングの効率に関して統一された効率算出法も確立されておらず、株間比較にはほど遠い状況である。リプログラミングの結果生じた細胞がターゲット細胞とどれだけ近い性質を獲得したか、導入した遺伝子発現を抑制してもその特性は受け継がれるのか、iN 細胞は生理的な反応を示すのか、など、iN 細胞に関しては生理学的な基礎データをそろえる必要がある。しかし、ダイレクトリプログラミング法で得られた細胞は iPSCs より、被験体の年齢を反映した細胞になることが期待されている。さらに、神経系ではないが、最近では、生体内への転写因子の直接導入による生体内ダイレクトリプログラミングも試みられている (Zhou et al., Nature 455, 627-632, 2008)。

神経細胞以外の細胞の分化誘導について

中枢神経系は神経細胞とグリア細胞から成り立っているが、ヒトの多分化能細胞の場合、分化誘導は神経細胞にすすみや早く、グリア細胞を得るのは困難とされている。しかし、2011 年に、hESCs と hiPSCs から未分化アストロサイト

(S100β(+)/GFAP(+)) への誘導が報告された (Krencik et al., Nat Biotech 29(6), 528-34, 2011)。プロトコルのアイデアとしては比較的単純であり、生体内で神経細胞→アストロサイトの順に分化がすすむことから、RA もしくは FGF8 で神経細胞分化をかけてから 8 週目に現れる GFAP(+) 細胞を増幅している。180 日目にはグルタミン酸トランスポーター GLT-1 の発現も確認している。これらの細胞は初代培養アストロサイトと同じ遺伝子発現パターンを持ち、グルタミン酸取り込み機能、シナプス形成誘導能、カルシウムオシレーション、血管との接触による成熟などの典型的アストロサイトの特徴を持つ。また、神経細胞誘導をかける際に rostral-caudal, dorsal-ventral の特性を持たせると、その後に誘導されるアストロサイトも異なる homeodomain 転写因子を持つという新発見も得られている。これは、アストロサイト分化の領域パターンを反映する新発見として非常に興味深い。しかし、実験開始から機能的アストロサイトが得られるまでに 180 日間かかるため、評価試験への応用は困難であろう。

D. 結論

hiPSCs からの神経細胞分化誘導に関する文献調査を行った。iPSCs から neurosphere を介さずに神経細胞に分化誘導する手法(ダイレクトディフェレンシエーション法)に関する報告が増えてきていること、この手法を用いて分化誘導された神経細胞の株間比較が行われ出しているが安定した細胞特性の再現が可能かという点については十分な報告例がないこと、iPSC 化せずに体細胞から直接神経細胞を分化誘導するダイレクトプログラミング

法が新しい技術として出てきていること、を明らかとした。

E. 研究発表(発表誌名巻号・ページ・発行年等も記入)

論文発表

1. Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa, K., Sekino, Y., Ohwada, T. Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors. ACS Chem Neurosci 3, 105-113 (C.A.), 2012
2. Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S., Koizumi, S., Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. Cell Mol Neurobiol (in press)
3. Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y., Koizumi, S., In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. Plos ONE (in press)
4. 佐藤 薫、グリア型グルタミン酸トランスポーター、日薬理誌 138:127, 2011

学会発表

国内学会

1. 藤森康希、高木淳平、佐藤 薫、鈴木岳之、炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011.8) (東京)
2. 佐藤 薫、高木淳平、藤森康希、鈴木岳之、関野祐子、パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込み機能低下を抑制する 第34回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
3. 鈴木岳之、高木淳平、藤森康希、佐藤 薫、炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる 第34回 日本神経科学

- 大会 (2011.9) (横浜)
4. 最上(重本) 由香里、関野祐子、大野泰雄、佐藤 薫 生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
 5. 片山 (小口) 敦子、門間彰彦、大友ゆき、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫、胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
 6. 高橋由香里、永瀬将志、落合敏平、安井 豊、中尾彩乃、渡部文子、高木 聡、佐藤 優、奥津 浩也、守口 徹、佐藤 薫、加藤総夫 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
 7. 中 誠則、真嶋悠幾、井手総一郎、佐藤 薫、南 雅文 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響 第 21 回 日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会 (2011.9) (東京)
 8. 真嶋悠幾、中 誠則、井手総一郎、佐藤 薫、南 雅文 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響 第 62 回 日本薬理学会北部会 (2011.9) (仙台)
 9. 佐藤 薫 iPS 細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム 「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」 (2012.2) (東京)
 10. 佐藤 薫、最上由香里、関野祐子 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第 132 回年会 シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」 (2012.3) (札幌)
 11. 高橋華奈子、最上 (重本) 由香里、岡田洋平、大津香苗、福角勇人、正札智子、金村米博、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫 ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3) (札幌)
 12. 最上(重本)由香里、藤森 康希、五十嵐 良明、広瀬 明彦、関野 祐子、佐藤 薫 カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3) (札幌)
 13. 片山敦子、門馬彰彦、大友ゆき、今井美鈴、秋友孝文、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫 胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3) (札幌)
 14. 藤森康希、高木淳平、佐藤 薫、鈴木岳志 炎症条件下グルタミン酸トランスporter機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会 (2012.3) (京都)
 15. 佐藤 薫、栗脇淳一、高橋華奈子、斉藤善郎、岡淳一郎、尾谷優子、沙宇、中澤憲一、関野祐子、大和田智彦 エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスporterを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見 第 85 回日本薬理学会年会 (2012.3) (京都)
- 国際学会
1. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Sekino, Y. Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ (ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を促進する) ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting (2011.8-9), (Athens, Greece; アテネ市, ギリシャ国)
 2. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Sekino, Y. The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ (生後初期脳室下帯に集積しているミクログリアの役割) ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology (2011.8), (Ljubljana, Slovenia; リュブリャナ市, スロベニア国)
 3. Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Suzuki, T., Sekino, Y. Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication (炎症化のグルタミン酸トランスporterの機能低下はグリア間コミュニケーションによって引き起こされる) SfN2011 (2011.11), (Washington D.C., USA; ワシントン D.C., アメリカ合衆国)
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

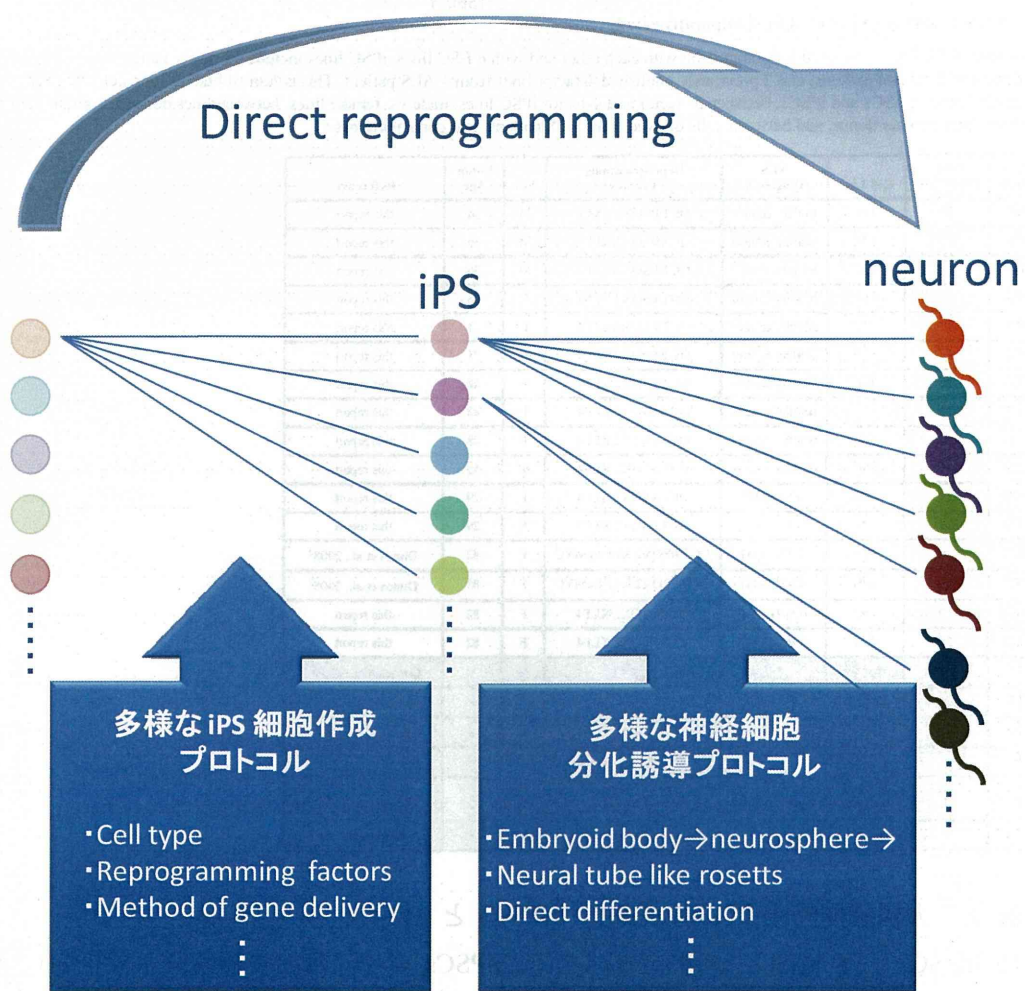


図 1. 神経細胞分化誘導の多様なプロトコル

どの細胞から hiPSCs を作るか、どの iPSC 化プロトコルを使うか、どの神経細胞分化プロトコルを使うか、iPSCs 化を介さない神経細胞分化プロトコルを使うか、など選択肢が増えてきている。

Table 1

Human stem cell lines used for comparative study

16 human iPSC lines were used for comparison with each other and with 6 ESC lines. iPSC lines include 14 newly generated 3-factor lines from 2 ALS patients and 5 control patients, and 2 previously published 4-factor lines from 1 ALS patient. This cohort of human stem cell lines allows comparisons to be made between ESCs and iPSCs, between 3- factor and 4-factor iPSC lines, male vs. female lines, between lines derived from the same donor and those derived from another donor, and between cells derived from ALS patients and control donors.

Cell Type	Donor Fibroblast	Cell Line	ALS Diagnosis	Reprogramming Factors	Sex	Donor Age	Reference
iPS	11	11a	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	M	36	this report
iPS	11	11b	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	M	36	this report
iPS	11	11c	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	M	36	this report
iPS	15	15b	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	F	48	this report
iPS	17	17a	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	F	71	this report
iPS	17	17b	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	F	71	this report
iPS	18	18a	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	F	48	this report
iPS	18	18b	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	F	48	this report
iPS	18	18c	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	F	48	this report
iPS	20	20b	healthy control	OCT4/SOX2/KLF4	M	55	this report
iPS	27	27b	<i>SOD1</i> G85S	OCT4/SOX2/KLF4	F	29	this report
iPS	27	27e	<i>SOD1</i> G85S	OCT4/SOX2/KLF4	F	29	this report
iPS	29	29A	<i>SOD1</i> L144F	OCT4/SOX2/KLF4/cMYC	F	82	Dimos et al., 2008 ²
iPS	29	29B	<i>SOD1</i> L144F	OCT4/SOX2/KLF4/cMYC	F	82	Dimos et al., 2008 ²
iPS	29	29d	<i>SOD1</i> L144F	OCT4/SOX2/KLF4	F	82	this report
iPS	29	29e	<i>SOD1</i> L144F	OCT4/SOX2/KLF4	F	82	this report
ES	-	HuES 3	-	-	M	-	Cowan et al., 2004 ²³
ES	-	HuES 6	-	-	F	-	Cowan et al., 2004 ²³
ES	-	HuES 9	-	-	F	-	Cowan et al., 2004 ²³
ES	-	HuES 13	-	-	M	-	Cowan et al., 2004 ²³
ES	-	HuES 3 HB9:GFP	-	-	M	-	Di Giorgio et al., 2008 ¹²
ES	-	R1	-	-	M	-	James et al., 2006 ²⁴

表 1. 大規模株間比較に用いられた hiPSCs と hESC

16 hiPSCs と 6 hESCs が用いられている。hiPSCs の中には筋萎縮性脊索硬化症 (ALS) 患者 2 名と健常人 5 名から 3 因子を用いて樹立された新しい hiPSCs 14 株が含まれている。これだけのサンプル数があると、ESCs と iPSCs, 3 因子と 4 因子、男女差、提供者由来の特性、ALS サンプルと健常サンプルといった様々な比較が可能となる。

Boulting et al., Nature Biotechnol 29(3) 279-286 [2011] より抜粋。

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」
平成 23 年度分担研究報告

— 中枢神経軸索輸送機能による安全性薬理評価系の構築 —

研究分担者: 五嶋 良郎 (横浜市立大学 教授)

研究要旨: 軸索輸送は、神経細胞の形体形成、維持や機能発現に必須の基本的な細胞機能の一つである。最近になり、軸索輸送はアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病などの神経変性を伴う難治疾患のモデル動物において、異常を示すことが明らかになりつつある。従って、軸索輸送を一つの細胞応答系として捉え、これを簡便にモニターする系を確立することは重要な検討課題と言える。ニワトリ後根節細胞培養系において軸索輸送を簡便に評価する系として DiI により神経細胞における小器官の動きを可視化し、デジタル画像を定量解析する自動解析ソフトを開発した。本研究では、軸索輸送の生理学的および病態生理学的機能を総括するとともに、ほぼ同時期に発表された軸索輸送解析系との比較・検討を行なった。さらに、iPS 細胞における実験系の確立を視野に、本実験系が、中枢神経細胞にも適用可能か否かを海馬培養神経細胞において検討した。

キーワード: 軸索輸送 画像解析 神経疾患 神経毒性 培養海馬神経細胞

A. 研究目的

近年、軸索輸送の障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、運動ニューロン病、統合失調症のような神経変性疾患の病因の一因として注目されている。本研究において、軸索輸送定量化の意義と他の解析法の比較を行う。また、ニワトリ後根神経節細胞において確立した本アッセイ系の、他の神経細胞への適用を試みる。さらに iPS 細胞における機能評価ならびに薬効評価系としての可能性と課題を議論する。

B. 研究方法

培養 DRG ニューロンを胎生7日目のニワトリ胚から、また、培養海馬ニューロンを胎生 18 日目のラット胚から調整し軸索輸送の観察を行った。蛍光色素 CM-DiI (1 mg/ml)を培養 12-16 時間後 (DRG ニュー

ロン)、または、培養4、7日後(海馬ニューロン)の初代分散培養細胞に加え、30 分培養した。その後、CM-DiI を含まない溶液に切り替え、6 時間以上培養を行い、過剰に負荷された色素を除いた。CM-DiI により標識された DRG 軸索内の移動粒子は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 5 Pascal (Zeiss) を用い(励起 543 nm)、40 倍レンズで観察・撮影した。また、海馬ニューロンの場合、培養開始時に、リソソームマーカーの LAMP-1 (lysosomal membrane glycoprotein-1) に EGFP (enhanced green fluorescence protein)を融合した EGFP-LAMP-1 発現プラスミドを電気穿孔法にて発現させ、EGFP の励起シグナル(励起 488 nm)として観察される軸索内粒子の観察も行った。軸索が他の細胞と重なっておらず成長円錐が残っている神経細胞を探した後、蛍光像を確認し、粒子

がよく見える神経細胞撮影に用いた。細胞体から成長円錐まで視野に入るように範囲を選択し、0.5秒に1枚撮影の間隔で2分間撮影した。各薬物の添加後、一定時間、撮影を行い、薬物投与前後の移動粒子の数および速度を比較することにより、薬物効果を評価した。

C. 研究結果

我々は蛍光色素 CM-DiI を用いた新たな軸索輸送の可視化を試み、さらに輸送粒子の動態を自動的に解析する実験系を確立することに成功した。CM-DiI によって標識される粒子は、主にリソソームであることが確認された (H22 報告)。

我々の試みの公表とほぼ同時期に、軸索輸送のイメージ解析技術が報告された (Takeshita et al., *Neurosci Res*, 61:P2-c11, 2008; Goshima et al., *J Pharmacol Sci*, 114, 168, 2010; Mukherjee et al., *Med Image Anal* 15, 354, 2011; Broeke et al., *J Neurosci Meth*, 178, 378, 2009; Welzel et al., *Eur Biophys J* 40, 1061, 2011)。この事実は、軸索輸送の可視化と定量化が、多くの研究者の間で重要課題の一つと捉えられていることの証左といえる。これらのイメージング解析の基本的な方法論は大きく2つに分けられる。一つは連続するイメージのフレームにおける追跡技術、もう一つはキモグラフィイメージの解析であり、さらにはその両者の組み合わせである。

我々が開発した追跡技術は、輸送粒子の検出と移動粒子の追跡二つのプロセスからなっており、本質的には、上記の分類に基づくイメージフレームの追跡を行なう技術といえる(詳細は、原著 (Goshima et al., 2010)を参照)。粒子の追跡において、

最も大きな課題となるのは、軸索内を移動する同一粒子の選択的な追跡を保証するシステムの確立である。我々はこれに対して、大追跡と小追跡の二つの追跡システムからなる画像処理ソフトを構築することにより解決を試みた。小追跡とは、連続する撮影画像における、粒子の平均輝度、動きのベクトルと粒子のサイズの相違にもとづいての同一粒子の対応づけである。一方、大追跡においては、最初の段階で軌跡を、複数の粒子の軌跡が交差する点において安定な軌跡の要素に分ける。次いで、各々の安定な軌跡の組み合わせの中で、以下の値、適合度 (Ea) が最も低い値となる軌跡の組み合わせを選びとるというものである。

$$\text{適合度} = x \sum_{i=1}^{i=n} H_i + y \sum_{i=1}^{i=n} D_i + z \sum_{i=1}^{i=n} I_i + w \sum_{i=1}^{i=n} L_i$$

ここで、n 個の部分的追跡ルートから成る模擬ルートに対し、それぞれの接点において H は傾き、D は X 座標値の差、I はフレーム数の差を評価し、L はルート全体の長さを評価したものである。また、x,y,z,w はそれぞれの評価に対する重みを表している。

一方、Welzel らは、軸索輸送の蛍光軌跡の直線成分を安定的に検出することを狙い Hough (ハフ) 変換を用いた方法を考案した。ハフ変換とは、デジタル画像処理で用いられる特徴抽出法の一つであり、直線の検出を行うものであるが、現在では様々な形態に対して応用されている。彼らの方法では、対象となる軸索領域を検出して撮影画像からキモグラフィを作成する。Canny (カニー) が考案したエッジ検出 (1986) により二値画像をこのキモグラフィに適応する。

また Mukherjee らは、Welzel らが採用したキモグラフの改良型ともいえる解析法を考案した。キモグラフ解析によって得られた直線を特殊なフィルター法を用いてより解像度の高い画像として獲得しようとするものである。

これらの方法いずれも一長一短があり、用いる蛍光画像などの鮮明度や輝度、対象となる神経細胞の特性や解析に要する時間など、多くの点で比較・検討することが今後の課題として残される。

今回、ニワトリ DRG 以外の培養神経細胞に適用を拡大することを試みた。ラット海馬培養神経細胞に DiI 染色を試みたところ、細胞毒性が生じ、観察可能な細胞がほとんど得られなかった為、海馬神経細胞への本方法の適用は困難であると判断した。そこで、DiI 染色で標識される粒子は、主にリソソームであることから(H23 報告)、リソソームマーカーである LAMP-1 を標的とした軸索輸送観察を試みた。その結果、EGFP-LAMP-1 を過剰発現させた海馬培養神経細胞において(図 1)、軸索内で一定の輝度を示す移動粒子を観察することができた(図 2)。また、培養 4 日後と 7 日後の比較を行ったところ、7 日後の方が、単位時間あたりにより多くの粒子が観察できる傾向が示された。今後は、iPS 細胞への適用を視野に、この EGFP-LAMP-1 を用いたイメージングを行ない、DRG において適用した本システムにおける解析を行なう必要がある。

D. 考察

iPS 細胞を用いた臨床応用の可能性の 1 つは、特定の疾患に罹患したヒトから由来する iPS 細胞を用いて、薬物の効果を評価することである。加えて、近年、アルツ

ハイマー病、ハンチントン舞踏病、統合失調症などの原因不明の難治の神経疾患の発症の比較的初期の変化として、軸索輸送の障害が目されつつある。従来、複数の分子について EGFP タグ付きタンパク質の導入、可視化、解析を試みたが、解析に耐える画像を獲得することができなかった。今回、DiI 染色粒子の同定を目的として用いた EGFP-LAMP-1 は、比較的 S/N 比の高い移動粒子イメージの獲得を可能とした。今後は、様々な蛍光色素や標識タンパク質の選択により、個々の細胞における軸索移動の可視化に最適な条件を探ることのできる可能性を示唆すると考えられる。

E. 結論

今回我々は、すでに確立した軸索輸送自動解析系が、他の細胞系に応用しうる事を示した。本実験系は、iPS 細胞を利用した病態の解明、神経毒性試験、薬物スクリーニングに有用である。

F. 研究発表

論文発表

1. Goshima Y, Usui H, Shiozawa T, Hida T, Kuraoka S, Takeshita S, Yamashita N, Ichikawa Y, Kamiya Y, Gotoh T, Gotoh T. Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J. Pharmacol. Sci.*, 114(2),168-179 (2010).
2. Goshima Y, Hida T, Gotoh T. Computational analysis of axonal transport: A novel assessment of neurotoxicity, neuronal development and functions. *Int J*

Mol Sci, 13(3), 3414-3430 (2012).

学会発表

1. 蔵岡聡, 肥田友伸, 臼井洋, 竹下紗由美, 塩澤孝仁, 後藤敏行, 五嶋良郎: 軸索輸送の自動解析系の確立と薬剤スクリーニングへの応用, 日本薬理学会部会第 120 部会, 東京 (2009, 7).
2. 五嶋良郎: 中枢神経軸索輸送機能による安全性薬理評価系の構築, 日本安全性薬理研究会第三回学術集会, 東京 (2012, 3).

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願番号 2007-247438 軸索内移動粒子の自動追跡システム

謝辞: 本研究において開発した軸索輸送自動解析システムは、横浜国立大学、後藤敏行教授、環境情報研究院 社会環境・情報研究部門および横浜市立大学分子薬理神経生物学教室の方々との共同研究による。

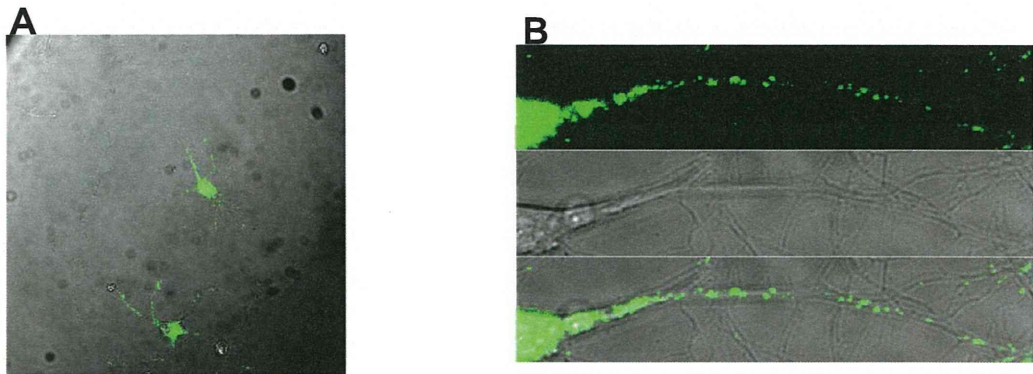


図1 EGFP-LAMP-1 導入培養海馬神経細胞における移動粒子像
 A, 低密度培養下で軸索と樹状突起を識別 B, 軸索を移動するEGFP-LAMP-1 陽性粒子

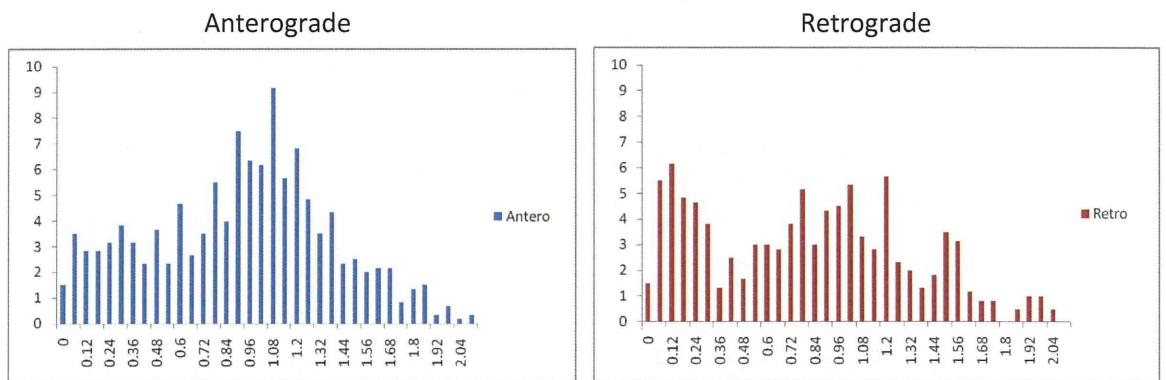


図2 培養海馬神経細胞におけるEGFP-LAMP-1移動粒子のヒストグラム
 海馬培養7日目の細胞における順向性 (Anterograde) および逆向性 (Retrograde) 輸送の各々の平均速度 (μl/sec) は、ニワトリ後根節細胞とほぼ匹敵する値を示す。縦軸は粒子数を表す。

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」
平成 23 年度分担研究報告

－ 中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベル評価系の構築 －

研究分担者: 白尾 智明 (群馬大学 教授)

研究要旨:

脳機能の細胞生物学的基盤は神経回路網であり、その接合点であるシナプスの機能の分化異常は種々の脳機能異常をもたらすことが知られている。本研究では、アクチン結合蛋白ドレブリンのスパイン集積度に注目して、中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベルを免疫染色により簡便に評価する系の確立をめざし、バンカー法により作成した初代海馬培養細胞を用いれば、アクチン結合蛋白ドレブリンの集積度をシナプス後部の分化レベルの評価に用いることが可能であることがわかっている。昨年度の研究により、ドレブリンの集積度は興奮性神経細胞ばかりでなく、抑制性神経細胞のシナプス後部の分化レベルの評価にも使用できるが、ただし、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞では、その集積度の絶対量が異なるため、集積度の絶対量を用いる場合は、シナプス後部の分化レベルの評価は興奮性神経細胞と抑制性神経細胞ではそれぞれの評価基準を別個に決定しなければならないことがわかった。本年の研究により、ドレブリン集積度をスパイン基部の樹状突起シャフトに対するスパイン頭部のドレブリンの量比 (spine-dendrite ratio: SDR) で評価することにより、より定量性を増すことができ、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の評価に同一基準を適用できることが示唆された。非刺激状態のドレブリン SDR は約 1.7 であり、NMDA 受容体活性化 5 分後の SDR は 1 以下に減少するのに比べ、セロトニン IIA 受容体の活性化による SDR の減は 15 分後でも 1 以上にとどまるので、SDR 計測により NMDA 受容体およびセロトニン IIA 受容体の活性を選択的に評価できる可能性も示唆された。以上より、シナプスの分化レベルの評価系およびシナプス後部受容体活性の評価系として、ドレブリン集積度の定量的測定法 (SDR 測定法) を用いることにより、従来の方法とは全く異なる簡便な免疫染色による評価系を開発できる可能性がある事がわかった。この評価系は、*in vitro* 系を用いた新たな迅速な薬物スクリーニング方の開発に有用であり、ES 細胞から分化誘導した神経細胞の分化レベルの評価にも使えることが示唆された。

キーワード: シナプス分化 精神神経疾患 薬物スクリーニング

A. 研究目的

脳は、複数の樹状突起と一本の長い軸索を有する大変極性の発達した神経細胞が構成する神経回路網の働きにより、学習

や記憶などの高次機能を行うことができる。アルツハイマー病等の神経難病では、神経細胞死によりこの神経回路網の機能異常が惹起される結果であると考えられてき

たが、最近では、神経回路網の接点であるシナプスの異常が着目されている。また、従来形態的異常がよくわかっていなかった精神神経疾患などでも、シナプスの形態・機能異常が報告されている。

昨年度の研究では、アクチン結合蛋白ドレブリンのスパイン集積度に着目して、中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベルを免疫染色により簡便に評価する系を確立したが、抑制性神経細胞においても本評価法が適用できるかどうかを、**glutamate decarboxylase 67 (GAD67)-GFP knock-in mice** を用いて解析し、本法によるシナプス後部の分化レベルの評価は、興奮性神経細胞ばかりでなく抑制性神経細胞にも応用できるが、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞ではそれぞれの評価基準を別個に決定しなければならないことがわかった。

そこで本年度は、この評価法を改良して、より定量性を増すことにより、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を同じ基準により評価できる評価法の開発を試みた。さらに当該方法を用いて、種々の受容体機能活性変化により惹起されるシナプス機能分化の遅延及び促進をどの程度定量的に評価できるかを解析し、中枢神経細胞を用いた *in vitro* の安全性薬理試験が開発可能であるかを検討した。

一方、昨年度の研究で、NMDA 受容体ばかりでなく、セロトニン IIA 受容体の活性評価にドレブリンをマーカーとした評価方法が応用できることが示されたので、今年度はドパミン D1 受容体活性評価への応用が可能かどうかを検定した。

B. 研究方法

動物の取り扱い、動物実験指針に基

づき実施した。なお、研究計画実施のすべてに必要な実験計画について、所属機関内の動物実験委員会の承認を得ている。

海馬初代分散培養にはバンカーらにより開発された培養方法を用いた。この方法により神経細胞のみをカバーグラス上で培養することが可能になるので、神経細胞同士のシナプス結合の発達を共焦点顕微鏡を用いることなく観察することが可能である。まず、妊娠16日目のマウスあるいは妊娠18日目のラットを深麻酔後断頭し、開腹後子宮から胎仔を取り出した。次に、胎仔脳より海馬を取り出し、トリプシン処理後単離神経細胞を調整し、ポリ L リジンでコートしたカバーグラス上に低密度(約 5000 細胞/cm²)でまき、MEM 培地で培養した。3 時間後、神経細胞が付着したカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、上下逆にし、グリア細胞と神経細胞とを対面させるようにセットし、B27 サプリメントを含む MEM 培地で共培養を開始した。共培養開始後、4 日以降は 10 μM の cytosine-D-arabinofuranoside を加えてグリアの増殖を抑制した。

グリアのフィーダー層の作成は、生後 1 日のラットを氷冷麻酔の下、大脳皮質を取り出し、トリプシン処理後単離細胞を調整し、10%ウシ胎仔血清を含む MEM 培地で、コンフルエント状態になるまで培養した。

一部の神経細胞には共培養開始後 7 日目に、形態観察のためには GFP 発現ベクターを、タイムラプスイメージングのためには、GFP 融合ドレブリン A 発現ベクターを、リン酸カルシウム法を用いて導入した。

シナプス機能の分化レベルを判断する

タンパクマーカーとして樹状突起スパインの機能蛋白に注目し、それらの樹状突起スパインへの集積を免疫細胞化学的に可視化して評価した。シナプス機能タンパクとしては、シナプス前部に関しては、シナプシン I を分化マーカーとして用いた。またシナプス後部に関しては、シナプス後部が形成されるスパインの二大主要構造であるシナプス後肥厚(PSD)とアクチン細胞骨格に着目し、PSD に特徴的な蛋白 PSD-95 とスパインのアクチンに特徴的なアクチン結合蛋白ドレブリンをマーカーとして用いた。またアクチン細胞骨格に関しては重合化したアクチン(F アクチン)の一般的標識方法であるファロイディン染色による検討も併せて行った。

機能タンパクのスパイン部位への集積度の定量的評価方法を開発するために、スパイン/樹状突起幹比(spine-dendrite ratio: SDR)の測定法としては、まず樹状突起スパイン形態のアウトラインを作成した。そして、樹状突起スパイン頭部の免疫染色濃度とスパインの付け根の樹状突起シヤフトの当該蛋白の免疫染色濃度を測定した上で、その量比としてSDRを決定した。スパイン形態のアウトラインの作成は、遺伝子導入により GFP を発現させた細胞を用いることができる場合は、GFP 蛍光像あるいは F-アクチン染色像を用いて形態のアウトラインを作成した。

ドパミン D1 受容体のアンタゴニストとしては、A68930 を用いた。

C. 研究結果

SDR の測定

図 1A に SDR の測定の実例を示した。F-アクチン染色像により、樹状突起幹とスパインの形態のアウトラインを確定したのち、

スパイン部とスパインの付け根の受容突起幹に、 $0.26 \mu\text{m}^2$ の円を描き、その内部の蛍光強度の平均を算出し、その比を SDR とした。各細胞の第一分岐から第二分岐間に存在する樹状突起幹 $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ に存在するスパインに関してドレブリン SDR を測定し、それを平均したものをその細胞におけるドレブリン SDR とした。図 1B は 170 個の培養後三週の海馬神経細胞の平均ドレブリン SDR である。通常の培養状態では、ドレブリン SDR は 1.65 ± 0.03 であった。このことはドレブリンがスパインに集積傾向があることを示し、従来の研究と一致していた。

SDR の測定に際して、GFP 蛍光像を用いてアウトラインを作成した場合もアクチン像でアウトラインを作成した場合も、ドレブリンの平均 SDR 値には相異はなかった。図 1C に 16 回の独立の実験結果を示した。各独立した実験におけるドレブリン SDR 値の変動はグルタメートを投与した場合の SDR の変動(後述)と比較すると大変小さいことがわかる。

SDR を用いた受容体活性の評価

次に、グルタメート受容体活性化により起こるドレブリンの局在変化を SDR で評価できるかどうかを検討した。図 2a に示すように、ドレブリン SDR は著減し、1 以下となり、ドレブリンの濃度が樹状突起スパイン頭部よりも樹状突起基部で高くなっていることがわかった。また、このグルタメートによるドレブリン SDR の減少は NMDA 型グルタメート受容体の特異アンタゴニストである D-(-)-2-amino-5-phosphono-pentanoic acid (APV) により完全に阻害され、従来の研究結果と一致した。一方、ドレブリン SDR のこのような大きな変化にもかかわらず