

—— 研究助成報告 ——

動物モデル作出が困難な疾患におけるiPS細胞由来の 興奮性ニューロンと脳オルガノイドを用いた研究 — Angelman症候群を例に —

石 川 充

要旨：Angelman症候群（AS）はその多くの患者で、てんかん発作と脳症が認められる。ASはインプリント遺伝子UBE3Aの母親由来アレルの変異等で発症するという、複雑な遺伝背景を有し、動物モデルの作出が容易ではなかった。本研究ではAS患者のうち、母親性アレル15q11-q13欠損症例、15番染色体父性片親アレルダイソミー例、刷り込み変異例からiPS細胞を作出し、*in vitro*での疾患モデリングを試みた。一般的にiPS細胞から神経細胞への分化誘導効率はその後の生化学的評価の品質に大きくかかわってくることが知られている。そこで本研究では、プロニューラル因子Neurog2遺伝子の一過性発現系を用い、神経細胞の純化を行い、病態の再現を行った。実際に、誘導神経細胞で特異的にUBE3Aのインプリントを再現でき、ASではその発現量が確かに低下した。また網羅的遺伝子発現解析で、転写・発生・神経機能の遺伝子変動が認められ、実際に機能解析レベルでもASではカルシウムスパイクの強度・頻度の変化が認められ、てんかん治療研究につながる結果が得られてきた。さらに大脳皮質オルガノイドでは一定の皮質層マーカー陽性の細胞存在量が少なく、皮質形成そのものに器質的な影響がうかがえた。このように、iPS細胞を用いたてんかん治療研究は、今後の治療・予防薬開発のための優れたスクリーニング系を提供したり、動物モデル代替の*in vivo*様モデルの提供にもつながったりと有益なツールのひとつと考えられる。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019；30：29-36

Key Words：iPS細胞、ゲノムインプリンティング、Neurogenin2、脳オルガノイド、Angelman症候群

【序論】

ヒト多能性幹細胞技術の利用は、難病や希少疾患、さらには動物モデルの作出が難しい疾患に対する病態・治療法の解析手段として有用性が高い。てんかん病態の治療研究においても同様で、特定の遺伝子の変異だけでなく、ゲノム欠失などを含むCNV例、遺伝子転座例、DNAメチル化の異常例などが対象となる場合、遺伝子組み換え動物の作出は容易ではない。また動物モデルにおいて、てんかん発作や脳症などの臨床症状と近似した表現型が現れないか、あるいは検出・評価が困難な例がしばしばある。こ

れは一部のてんかん病態が「ヒト」の細胞・組織特異的に表出されうことを示唆する。

具体的な実用例としては、2013年、日暮ら¹⁾によって世界に先駆けて報告された難治性てんかん・ドラベ症候群患者由来iPS細胞を用いた解析であった。SCN1A遺伝子変異によるLoss-of-function例において、GABA作動性神経細胞の電気的活動性の低下が示された。この結果は抑制性神経機能の低下によるE/Iバランス破綻の仮説をつよめることとなった。

我々は、病態モデル作出が困難な例のひとつとしてアンジェルマン症候群（Angelman Syndrome：AS）を中心に解析を行っている。

ASは出生15,000人に1人くらいの頻度で現れ、重度の精神発達遅滞、てんかん、失調性運動障害、言語機能障害などを特徴とする疾患である。特に難治性てんかんの併存が生命予後を左右するといわれる。ASはその原因遺伝子として15番染色体15q11-q13に位置するインプリント遺伝子Ubiquitin-protein ligase E3A (UBE3A)の機能喪失により発症することが想定されている。神経細胞ではゲノムインプリントにより、父親由来染色体アリルにおいて、UBE3Aの発現が抑制されており、母親由来染色体アリルのみから発現すると考えられている。UBE3A機能喪失の機序として、母親由来染色体15q11-q13の欠失 (15q11-q13 deletion: Del.), 15番染色体の父性片親ダイソミー (Uniparental Disomy: UPD), DNAメチル化制御領域の変異等による刷り込み変異 (Imprinting Center Discrepancy: ICD), UBE3A遺伝子内部の変異が知られている²⁾。

このようにASの病態発症の遺伝学的な機序は複雑で、ASのモデル動物作出は容易ではないため、我々は患者由来iPS細胞を使う意義が高いと考えた。

iPS細胞を用いた神経系研究の大きな壁は、標的細胞への分化誘導を正確に行うことの難しさである。これには、どのような神経分化誘導系と解析系を選択するかが「キモ」となる。本研究では、興奮性神経細胞^{3, 4)}の純化培養技術を構築し、それぞれを*in vitro*で高確度に定量解析を行うことにした。また、同じ*in vitro*でも複数のアプローチで疾患表現型を評価することでその結果の信頼性は高まる。我々はこれまで報告されてきた脳オルガノイド培養技術^{5, 6)}を用い、大脳皮質神経細胞の器質的变化を検証した。このような多角的方法で、てんかん病態の*in vitro*評価系を確立し、治療法開発に結び付けることを目的としている。

【方法】

1. 疾患特異的iPS細胞の樹立

Angelman Syndrome (AS) 患者より末梢血単核球を採取した。対象となる患者は母親染色体アリル15q11-q13欠損症 (Del.) 3名、15番

染色体父親アリルダイソミー (UPD) 3名、15番染色体刷り込み異常症 (ICD) 3名の計9名である。細胞初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, dominant negative-mp53, Ebna1) を発現させるエピソーマルベクターをエレクトロポレーションで導入後、複数のシングルコロニーピックアップを行った。それぞれの細胞株に対し、エピソーマルベクター残存否定試験、未分化マーカー発現、*in vitro*三胚葉分化能、正常核型の確認を行った。また、健康人由来iPS細胞に対し、CRISPR/Cas9法を用いてUBE3Aノックアウト細胞株の作出を試みた。

2. 興奮性神経細胞誘導法の確立

作出したiPS細胞に対して、プロニューラルファクターであるNeurogenin2 (Neurog2) 遺伝子をTet-Onシステムで発現誘導できる細胞株として再樹立を行った。具体的にはリポフェクションにより、Transposase発現ベクター、恒常発現型rtTA発現PiggyBacベクター (+Hygromycin耐性遺伝子)、TetO駆動性Neurog2発現PiggyBacベクター (+Puromycin耐性遺伝子) を導入し薬剤選択を行った。上記で再樹立した神経誘導用iPS細胞について5日間のDoxycyclineで選択的に興奮性神経細胞への分化誘導を行った。

3. インプリントの再現確認

iPS細胞および、分化誘導した神経細胞のゲノムDNAについて、UBE3A遺伝子インプリンティングの実態であるSNURF-SNRPN遺伝子を発現制御するDNAメチル化レベルをPyrosequenceによって検証した。さらに、UBE3A mRNA発現をRT-qPCR法で検討した。

4. 網羅的遺伝子発現解析

15q11-q13欠失型iPS細胞由来興奮性神経細胞に対し、マイクロアレイ解析 (Clariom D, Thermo Fisher Sciences 社) を行った後、変動遺伝子に関する遺伝子オントロジー (GO) を取得した。

5. カルシウムスパイクの確認

神経機能の試験として、分化誘導した興奮性神経細胞にカルシウムセンサーjGCaMP7sを発現するレンチウイルスを感染させ、生細胞イメージングにより、自発的なカルシウムスパイクを計測した。

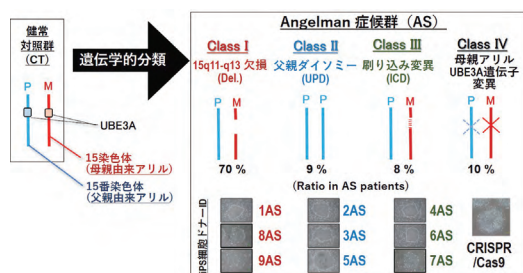


Fig. 1 ASの遺伝学的分類と作成したiPS細胞の明視野像

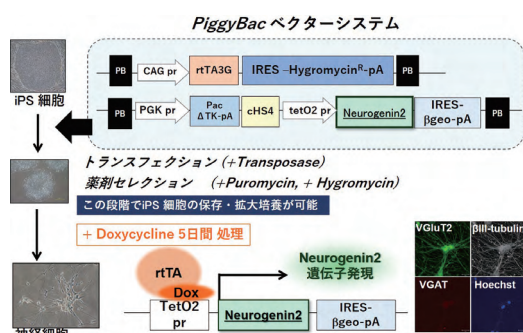


Fig. 2 Neurog2遺伝子の一過性発現を用いたiPS細胞からの高効率な興奮性神経誘導

6. 大脳皮質神経細胞のマーカー遺伝子発現パターンの検証

脳オルガノイド培養法を用いてiPS細胞から約80日間分化培養し、大脳皮質層特異的マーカーの発現量と発現パターンの検討を行った。

【結果】

1. 初期化因子を導入したAS患者由来細胞クローンはそれぞれ、エピソーマルベクターの残存を否定し、未分化マーカー陽性、三胚葉分化能を示したことによりiPS細胞の樹立に成功したといえる。また、血球細胞同様の疾患特異的ゲノム変異を示すとともに初期化に伴う核型の変化は現れなかった。またCRISPR/Cas9ダブルニッカーゼ法により、確度高くUBE3AのExon2にPGKプロモーター下流のPuromycin (あるいはHygromycin) 耐性遺伝子をノックインさせ、薬剤選択によってUBE3Aホモおよびヘテロノックアウト (KO) 株のクローニングに成功した。(Fig. 1)

2. 作出したiPS細胞に対して、TetO-Neurog2を導入し、Dox誘導処理によって、βIII-Tubulin陽性の神経細胞へと効率よく分化させることに成功した。また、これらのほとんどはVGluT2陽性の興奮性神経細胞であった。(Fig. 2)

3. 作出したiPS細胞および、Neurog2で誘導した神経細胞において、15番染色体SNURF-SNRPN遺伝子プロモーターのDNAメチル化状態は、健康対照群で約50%だが、ASで10%前後と低いメチル化レベル (父親アレルがドミナントであることを反映しているものと考えられる)を示した。さらに、iPS細胞レベルでは健康群、AS群ともにUBE3A mRNAレベルは低いものの、神経誘導後では健康群ではその発現レベル上昇がみとめられたが、AS群では発現上昇が軽微であった。(Fig. 3)

4. ASの興奮性神経細胞を用いたマイクロアレイ解析から、一定の変動遺伝子群を抽出し、遺伝子オントロジー解析を行ったところ転写・ホメオドメイン・シナプス関連・グルタミン酸受容体などに一定の変動が示唆された。(Fig. 4)

5. GCaMPイメージングでは、15q11-q13欠損型のAS神経細胞では、自発的なCa²⁺スパイク頻度が上昇傾向にあるものの、スパイクあたりの細胞内カルシウム濃度変動 (ΔF/F) が微弱な傾向にあった。(Fig. 5)

6. 培養80日目で固定したオルガノイドではASにおいては、SATB2陽性細胞の存在量が低下していた。(Fig. 6)

【考察】

本研究で用いた、iPS細胞へのNeurog2遺伝子一過性発現による高効率の神経分化誘導法では、種々のアドバンテージが認められた。UBE3A遺伝子は神経細胞特異的なインプリントを受けることから、疾患表現型が正確に*in vitro*で表出されるためには、まず、高効率な神経細胞誘導が望まれていた。実際、従来の神経幹細胞を介した神経系分化誘導法ではUBE3A遺伝子発現レベルが低いだけでなく、健康群とAS群との発現レベルの差異が小さい。一方で、Neurog2誘導法では、疾患特異的にUBE3A遺伝子発現抑制が認められた。このよ

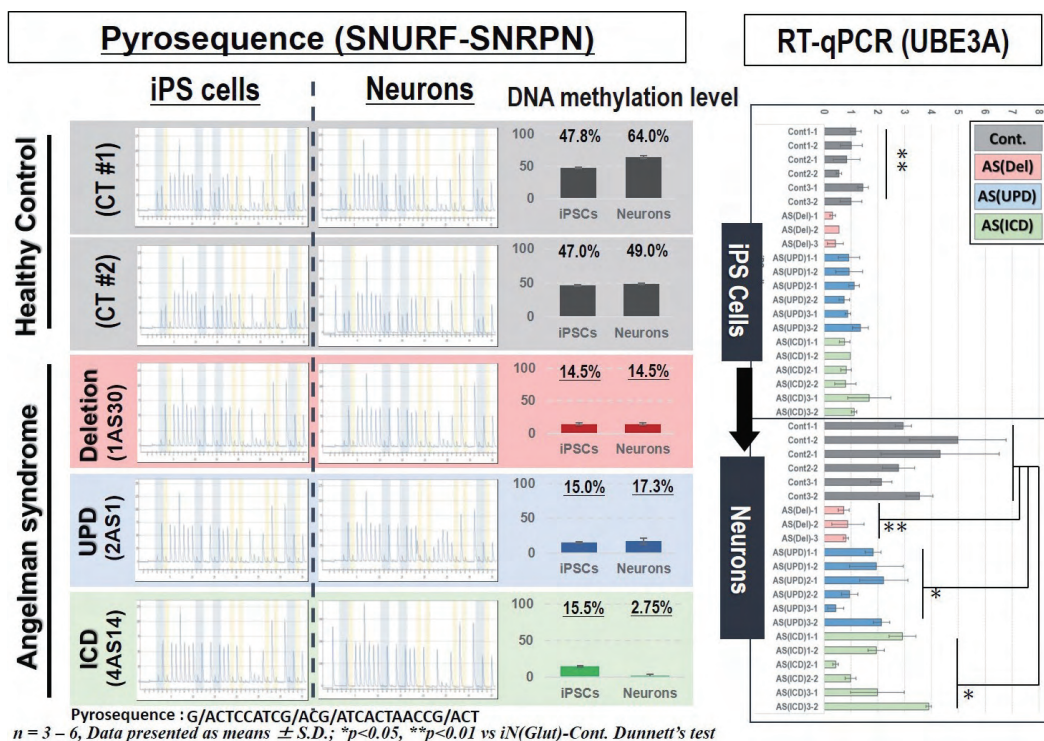


Fig. 3 iPS細胞および誘導神経細胞におけるPyrosequence結果およびRT-qPCR (UBE3A)

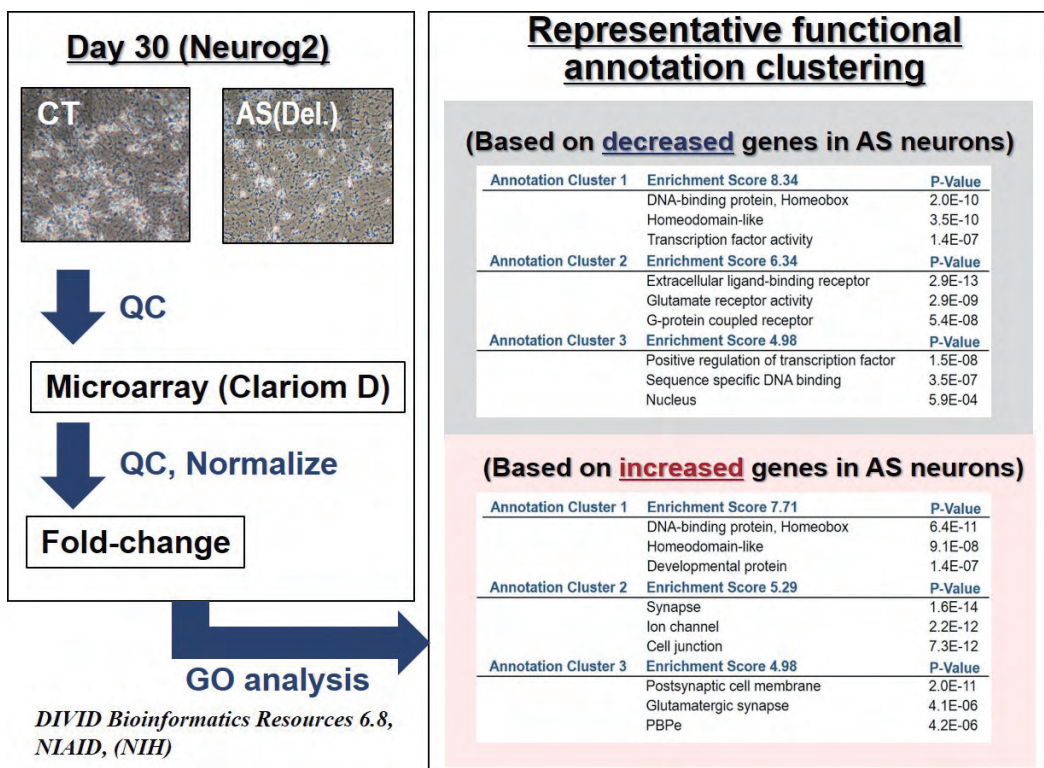


Fig. 4 誘導神経細胞のマイクロアレイから得られたGO解析

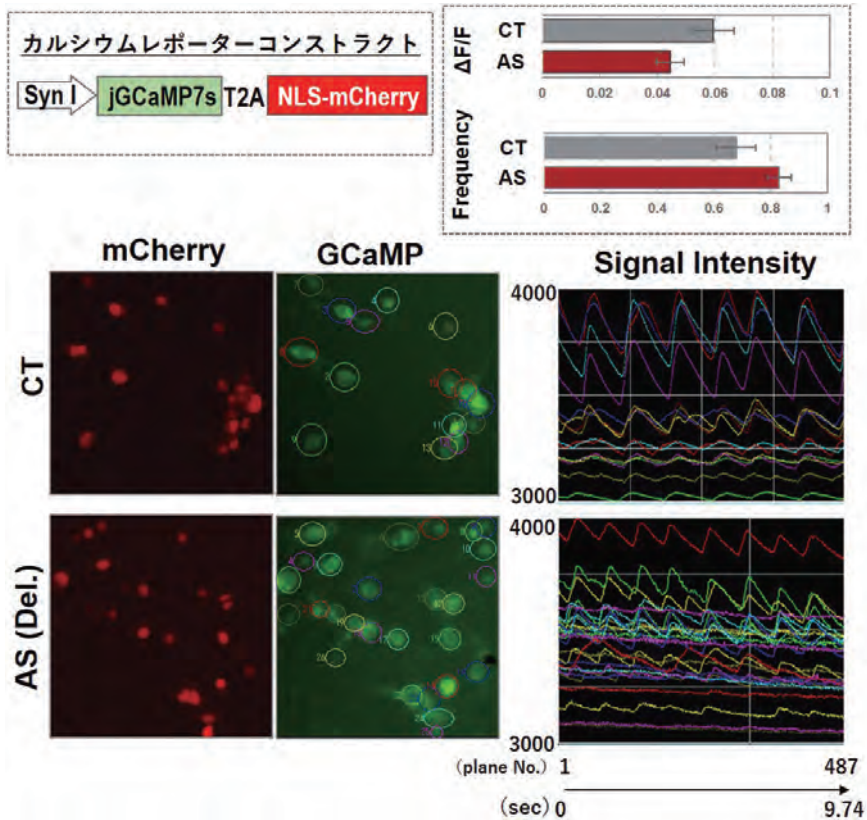


Fig. 5 jGCaMP7sを用いた誘導神経細胞のカルシウムイメージングとその定量解析

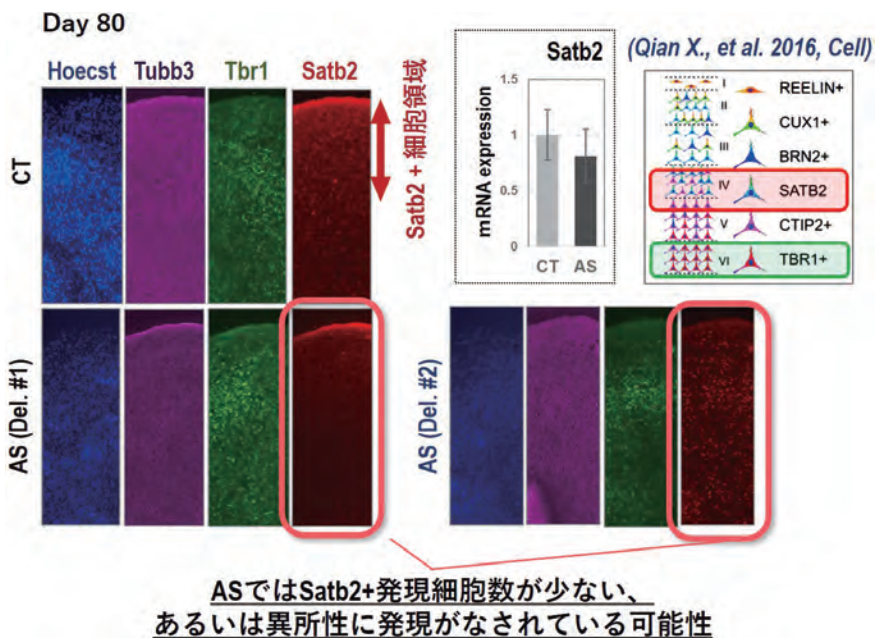


Fig. 6 大脳皮質オルガノイドにおける第4層および第6層マーカーの免疫染色像とRT-qPCR

うに遺伝子発現レベルを正確にモデリングできると、試料の品質という点で、その後の生化学的解析の解析が有意義となる。例えば、トランスクリプトームで得られたデータを詳細に解析することで、ASで特異的に生じている病態に容易にアクセスできる。実際に本研究では、GOとして転写や発生、シナプス機能に影響が出ている。これは一部の動物・細胞実験の結果をよく反映している⁷⁾。ただし、これがUBE3Aのユビキチン化酵素としての機能破綻を意味しているのか、転写因子としての機能破綻を意味しているのかはまだわからない。今後、網羅的データを詳細に検証することで、病態発症の因果関係に迫れると考えている。また生化学的にも、最終的なアウトプットの一つとして、やはり神経活動性の異常が疑われる。続けて行った、AS特異的なカルシウムスパイクの変化がその一端を表しているかもしれない。

このように、Neurog2はASにおけるUBE3A遺伝子発現抑制を正確に表出し、その機能的表現型の一部を*in vitro*で再現できることが分かった。一方で、これは、興奮性神経細胞に特化した分化誘導であるため、抑制性神経細胞ではどのような表現型が現れるかを、再び特異的な誘導法⁸⁾を用いて、総合的に病態の評価をしていく必要がある。またNeurog2誘導法では、興奮性神経細胞を作成しつつも、そのさらに詳細な興奮性神経サブタイプ特異的な作出や解析ができるとは限らない。我々はその問題を解決する方法として、脳オルガノイドによる表現型解析を行った。今回は大脳皮質層形成として影響があるかどうかを中心に解析したところ、大脳皮質第4層周辺に位置する領域マーカーSATB2の存在量がASで低下していた。これは遺伝的に、神経細胞分化とその運命決定がASでは異なることを示唆するものである。この結果が、てんかん発作を誘発する直接的な表現型であるのか、てんかんの結果として起こるものなのか、また、それとはまったく別個にUBE3A遺伝子機能の変異が引き起こす変化なのかは不明である。これらは、機能的評価として経時イメージングなどを用いると、病態発症の因果律が見えてくると考えている。

【結語】

iPS細胞を用いたてんかん治療研究のアプローチを用いると、これまでモデル化が困難であった複雑な遺伝的背景の病態を*in vitro*で再現することができる。本研究のように、選択的に表現型を抽出できる分化誘導法を用いることで、病態や治療・予防薬のスクリーニングを高確度で行えるようになる。また、器官として評価する培養法を用いることで、動物個体解析に代わりうる*in vivo*様の解析が可能になる。これらを駆使することで、ASの病態をはじめ、てんかん治療研究の新しいアプローチに結び付くと考えられることから、ここでiPS細胞の利活用の重要性を改めて提唱したい。

【謝辞】

アンジェルマン症候群患者iPS細胞の樹立にあたり、ドナー試料の提供に多大なるご協力をいただきました名古屋市立大学大学院医学研究科新生児/小児医学分野・齋藤伸治教授、慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター・小崎健次郎教授、また本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻いただきました慶應義塾大学医学生理学教室・岡野栄之教授に心より感謝申し上げます。

【文献】

- 1) Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W. et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013 ; **6** : 19.
- 2) Saitoh S. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2013 ; **33** (3) : 127-30
- 3) Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S. et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* 2013 ; **78** (5) : 785-98
- 4) Nakamoto FK, Okamoto S, Mitsui J, Sone T, Ishikawa M, Yamamoto Y. et al. The pathogenesis linked to coenzyme Q10 insufficiency in iPSC-derived neurons from patients with multiple-system atrophy. *Sci Rep*

- 2018 ; **8** (1) : 14215
- 5) Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013 ; **501** (7467) : 373-9
- 6) Bamba Y, Kanemura Y, Okano H, Yamasaki M. Visualization of migration of human cortical neurons generated from induced pluripotent stem cells. *J Neurosci Methods* 2017 ; **289** : 57-63
- 7) Buiting K, Williams C, Horsthemke B. Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat Rev Neurol* 2016 ; **12** (10) : 584-93
- 8) Yang N, Chanda S, Marro S, Ng YH, Janas JA, Haag D, Ang CE. Et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nat Methods* 2017 ; **14** (6) : 621-628

