慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ニューロン・グリア相互作用の分子機構解析手法の開発
Sub Title	Development of new technology to analyze cellular interaction between neuron and glial cells
Author	神山, 淳(Koyama, Jun)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	神経変性疾患のメカニズム解明に向けて『神経細胞とグリア細胞の細胞間相互作用の重要性』が明らかとなりつつある。本研究では『生きたまま』の状況を反映した, 神経細胞-グリア細胞間の相互作用を解析可能な手法を開発した。特に, 異なる動物種から神経細胞及びグリア細胞を調整し, 種間の配列多様性を利用した, 次世代シーケンスとバイオインフォマティクスの活用により, 各細胞で生じているトランスクリプトームのスナップショットが可能となった。この手法を利用し, 疾患iPS細胞より調整したグリア細胞の異常を検出することが可能となった。 It is becoming apparent that cellular interaction between neuronal cells and glial cells contributes to pathogenesis of neurodegenerative disease. I have developed a system to analyze the transcriptome of cocultured neurons and glial cells without mechanical isolation. Using this system, I discovered unique features in neurodegenerative patient-derived astrocytes, which lead to novel therapeutic application.
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2016～2017 課題番号：16K15240 研究分野：神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K15240seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１５２４０

研究課題名（和文）ニューロン・グリア相互作用の分子機構解析手法の開発

研究課題名（英文）Development of new technology to analyze cellular interaction between neuron and glial cells

研究代表者
神山　淳（KOHYAMA, JUN）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：３０４３７５１１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患のメカニズム解明に向けて『神経細胞とグリア細胞の細胞間相互作用の重要性』が明らかとなりつつある。本研究では『生きたまま』の状況を反映した、神経細胞-グリア細胞間の相互作用を解析可能な手法を開発した。特に、異なる動物種から神経細胞及びグリア細胞を調整し、種間の配列多様性を利用した、次世代シーケンスとバイオインフォマティクスの活用により、各細胞で生じているトランスクリプトームのスナップショットが可能となった。この手法を利用し、疾患iPS細胞より調整したグリア細胞の異常を検出することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：It is becoming apparent that cellular interaction between neuronal cells and glial cells contributes to pathogenesis of neurodegenerative disease. I have developed a system to analyze the transcriptome of cocultured neurons and glial cells without mechanical isolation. Using this system, I discovered unique features in neurodegenerative patient-derived astrocytes, which lead to novel therapeutic application.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞間相互作用　アストロサイト　神経変性疾患

１．研究開始当初の背景

中枢神経系において神経細胞の機能解析は高次脳機能理解という観点から盛んに行われてきた。一方、神経細胞よりも多く存在するグリア細胞は神経細胞の機能恒常性に重要な役割を果たすことが知られていたが、神経細胞に比して研究は遅れており、特に病態時においては周囲神経細胞に対する毒性を有することが最近になり認知されるようになってきた (Clement et al., Science 2003, Lioy et al., Nature 2012 他多数)。そのため中枢神経系における生理・病理の理解という観点から神経細胞とグリア細胞を個別に解析するのではなく、これらの細胞間相互相関を包括的に解析する必要があると言える。

２．研究の目的

ニューロンとアストロサイトを共培養することによりそれぞれの細胞種の単独での培養下では観察することのできない現象が報告されている。しかし、ニューロンとグリア細胞の相互作用の評価系は形態学的や電気生理学的な解析に限られており、また各細胞で生じている現象を詳細に解析するためには細胞を FACS などの手法で分画する必要がある。しかし、この手法では多くの実験的な操作が含まれるため実験誤差や操作のアーティファクトが結果に影響する可能性がある。また、神経細胞の電気活動やそれに伴う活動依存的な転写などは数秒～分の間に生じるダイナミックな現象である。そのため、脳内の細胞間環境を従来の手法より高い精度で模倣・再構築し、より正確に細胞内変化を記載可能な手法が必要である。そこで本研究ではまず、異なる動物種（ヒトおよびマウス）から調整した神経細胞とグリアを用いることにより、細胞間相互作用を次世代シーケンスにより解析可能な手法（方法参照）を確立することを目的とした。さらに、(1)神経細胞・グリア細胞の細胞間相関による試験管内疾患モデル作成と(2)異常アストロサイトの存在による細胞間相互作用の破綻により惹起されるトランスクリプトームレベルでの変化を記載することを目的とする。またこの手法を用いることにより、疾患疾患の新規表現型や新規概念の提唱をしたいと考えている。

３．研究の方法

ニューロンとアストロサイトの共培養下での変化を転写レベルで解析するための以下の方法により解析を行った。

(1)ヒトアストロサイト/マウスニューロンの調整：ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞よりアストロサイトを誘導した。また、胎生 15 日目マウス大脳皮質より初代培養神経細胞を調整した。また、疾患解析に関してはアルツハイマー病の患者由来 iPS 細胞を利用し、アストロサイトを調整した。

(2)RNA-seq 及び Xenome による転写産物の分類：細胞より RNA を調整し、RNA-seq を実施した。次世代シーケンスによる解析後に、Xenome によりマウスとヒトの転写産物を分類した。

４．研究成果

本研究ではまずヒト由来アストロサイトとマウス由来初代培養ニューロンを利用し、共培養下における遺伝子発現の変化を解析した。まず、アストロサイトとニューロンを共培養することにより形態学的にニューロンの形態的成熟が見出された。次にニューロン単独、アストロサイト単独、共培養の３つの条件で細胞を培養し、RNA-seq を実施し、Xenome により、転写産物を種の違いに応じて分類した。その結果 90%の転写産物はマウスとヒトと分類可能であり、単独のサンプルにおいて誤って他の動物種と判断されるのは数%程度となり、ほとんどの転写産物が種の差異に応じて分類が可能であった。ニューロンにおいてはアストロサイトの共培養により神経分化やシナプス形成に関わる因子の発現上昇が見出された。また興味深いことに

アストロサイトとの共培養により発現が低下する遺伝子が優位に多く見出され、特に細胞移動に関わる遺伝子群の発現が低下していた。そこでこの系を用いてアルツハイマー病の iPS 細胞より誘導したアストロサイトと健常対照群のアストロサイトを利用し、解析を実施した。神経細胞においては疾患群、健常群と比較し、特徴的な遺伝子発現変動は見出されなかったがアストロサイト側では神経細胞との共培養により疾患群において特徴的な遺伝子発現が見出された。特に細胞移動や細胞骨格制御に関わる遺伝子発現が見出された。実際、疾患群から調整したアストロサイトは細胞移動に異常が見出された。

アルツハイマー病は神経変性疾患であり、アストロサイトに関しては神経細胞の細胞死に対して二次的に活性化することが知られる。この過程で活性化するアストロサイトは反応性グリアと呼ばれ、他の神経損傷モデルなどでは損傷後に損傷領域に集積することが報告されている。本研究の結果よりアルツハイマー病においても反応性グリアの遊走能の異常により神経細胞死と相乗的に病態の進展に寄与していることが示唆された。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　11　件）

1. Chai M, Sanosaka T, Okuno H, Zhou Z, Koya I, Banno S, Andoh-Noda T, Tabata Y, Shimamura R, Hayashi T, Ebisawa M, Sasagawa Y, Nikaido I, Okano H, Kohyama J. Chromatin remodeler CHD7 regulates the stem cell identity of human neural progenitors. ***Genes Dev***. 2018 Jan 15;32(2):165-180. doi: 10.1101/gad.301887.117.　査読有り
2. Okuno H, Renault Mihara F, Ohta S, Fukuda K, Kurosawa K, Akamatsu W, Sanosaka T, Kohyama J, Hayashi K, Nakajima K, Takahashi T, Wysocka J, Kosaki K, Okano H. CHARGE syndrome modeling using patient-iPSCs reveals defective migration of neural crest cells harboring CHD7 mutations. ***Elife***. 2017 Nov 28;6. pii: e21114. doi: 10.7554/eLife.21114.　査読有り
3. Itakura G, Ozaki M, Nagoshi N, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Iida T, Kashiwagi R, Ookubo T, Yastake K, Matsubayashi K, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. ***Sci Rep.*** 2017 Oct 11;7(1):12996. doi: 10.1038/s41598-017-13522-w. 査読有り
4. Itakura G, Kawabata S, Ando M, Nishiyama Y, Sugai K, Ozaki M, Iida T, Ookubo T, Kojima K, Kashiwagi R, Yasutake K, Nakauchi H, Miyoshi H, Nagoshi N, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Fail-Safe System against Potential Tumorigenicity after Transplantation of iPSC Derivatives. ***Stem Cell Reports***. 2017 Mar 14;8(3):673-684. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.02.003. 査読有り
5. Iida T, Iwanami A, Sanosaka T, Kohyama J, Miyoshi H, Nagoshi N, Kashiwagi R, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Whole-Genome DNA Methylation Analyses Revealed Epigenetic Instability in Tumorigenic Human iPS Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. ***Stem Cells***. 2017 May;35(5):1316-1327. doi: 10.1002/stem.2581. 査読有り
6. Ozaki M, Iwanami A, Nagoshi N, Kohyama J, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Nishiyama Y, Kawabata S, Sugai K, Iida T,

Matsubayashi K, Isoda M, Kashiwagi R, Toyama Y, Matsumoto M, Okano H, Nakamura M. Evaluation of the immunogenicity of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in vitro. ***Stem Cell Res***. 2017 Mar;19:128-138. doi: 10.1016/j.scr.2017.01.007. **査読有り**

7. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, Akamatsu W, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H. Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. ***Congenit Anom (Kyoto)***. 2017 Jul;57(4):96-103. doi: 10.1111/cga.12206. Epub 2017 Mar 22. **査読有り**
8. Yamazaki K, Fukushima K, Sugawara M, Tabata Y, Imaizumi Y, Ishihara Y, Ito M, Tsukahara K, Kohyama J, Okano H. Functional Comparison of Neuronal Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells under Different Oxygen and Medium Conditions. ***J Biomol Screen.*** 2016 Dec;21(10):1054-1064. doi: 10.1177/1087057116661291. **査読有り**
9. Okubo T, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Ozaki M, Iida T, Matsubayashi K, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Pretreatment with a γ-Secretase Inhibitor Prevents Tumor-like Overgrowth in Human iPSC-Derived Transplants for Spinal Cord Injury. ***Stem Cell Reports.*** 2016 Oct 11;7(4):649-663. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.015. Epub 2016 Sep 22. **査読有り**
10. Sugai K, Fukuzawa R, Shofuda T, Fukusumi H, Kawabata S, Nishiyama Y, Higuchi Y, Kawai K, Isoda M, Kanematsu D, Hashimoto-Tamaoki T, Kohyama J, Iwanami A, Suemizu H, Ikeda E, Matsumoto M, Kanemura Y, Nakamura M, Okano H. Pathological classification of human iPSC-derived neural stem/progenitor cells towards safety assessment of transplantation therapy for CNS diseases. ***Mol Brain***. 2016 Sep 19;9(1):85. doi: 10.1186/s13041-016-0265-8. **査読有り**
11. Isoda M, Kohyama J, Iwanami A, Sanosaka T, Sugai K, Yamaguchi R, Matsumoto T, Nakamura M, Okano H. Robust production of human neural cells by establishing neuroepithelial-like stem cells from peripheral blood mononuclear cell-derived feeder-free iPSCs under xeno-free conditions. ***Neurosci Res.*** 2016 Sep;110:18-28. doi: 10.1016/j.neures.2016.04.003. **査読有り**

〔学会発表〕（計　0　件）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究代表者

神山　淳（KOHYAMA, Jun）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授
研究者番号：30437511