

Title	iPS細胞とゲノム編集による脳発達機構の解明：重複遺伝子SRGAP2の視点から
Sub Title	In vitro brain development analysis using iPS cells and genome editing technologies
Author	石川, 充(Ishikawa, Mitsuru) 田中, 翔真(Tanaka, Shoma)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>霊長類やヒトに特異的な遺伝子・特異的コピー数を有する遺伝子について神経系への評価を行うため、ヒトiPS細胞からの神経分化誘導技術とゲノム編集技術を用いた実験方法の確立を目指した。本研究では神経分化誘導法として、二つの培養法を確立した。一つは均一種(興奮性神経)細胞を作出するものである。もう一方は、大脳皮質器官培養である。実際に対象遺伝子に変異が生じたiPS細胞株(CRISPR/Cas9法で作出)から大脳皮質培養を行うと、細胞塊の構成不全として表現型再現が出来た。本研究により、ヒト脳の種としての特異的な進化の一端を解明になるとともに、脳神経疾患の良い疾患表現型モデルとして活用できる可能性がある。</p> <p>Toward estimating characteristics of human or non-human primate-specific genes or their specific CNVs, we are investigating how the annotated genes function in neuronal development using human induced pluripotent stem cells and genome editing techniques. In this study, we have developed two efficient neural induction methods from human iPS cells. One is purification of excitatory neurons in a dish, by which biochemical analysis became to well function because of its less heterogeneity. On the other hand, generating human cerebral organoid system have been developed. Using CRISPR/Cas9 to human genome, we demonstrated that knock out of a neural development and microcephaly-related gene generated abnormal construction of human cortical layers. In summary, our studies would become a support of identifying and evaluating therapeutic strategies to ameliorate the symptoms of neurodevelopmental pathogenesis.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2014～2016 課題番号：26830018 研究分野：神経生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26830018seika

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.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830018

研究課題名(和文) iPS細胞とゲノム編集による脳発達機構の解明：重複遺伝子SRGAP2の視点から

研究課題名(英文) In vitro brain development analysis using iPS cells and genome editing technologies

研究代表者

石川 充 (Ishikawa, Mitsuru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10613995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類やヒトに特異的な遺伝子・特異的コピー数を有する遺伝子について神経系への評価を行うため、ヒトiPS細胞からの神経分化誘導技術とゲノム編集技術を用いた実験方法の確立を目指した。本研究では神経分化誘導法として、二つの培養法を確立した。一つは均一(興奮性神経)細胞を作出するものである。もう一方は、大脳皮質器官培養である。実際に対象遺伝子に変異が生じたiPS細胞株(CRISPR/Cas9法で作出)から大脳皮質培養を行うと、細胞塊の構成不全として表現型再現が出来た。本研究により、ヒト脳の種としての特異的な進化の一端を解明になるとともに、脳神経疾患の良い疾患表現型モデルとして活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Toward estimating characteristics of human or non-human primate-specific genes or their specific CNVs, we are investigating how the annotated genes function in neuronal development using human induced pluripotent stem cells and genome editing techniques. In this study, we have developed two efficient neural induction methods from human iPS cells. One is purification of excitatory neurons in a dish, by which biochemical analysis became to well function because of its less heterogeneity. On the other hand, generating human cerebral organoid system have been developed. Using CRISPR/Cas9 to human genome, we demonstrated that knock out of a neural development and microcephaly-related gene generated abnormal construction of human cortical layers. In summary, our studies would become a support of identifying and evaluating therapeutic strategies to ameliorate the symptoms of neurodevelopmental pathogenesis.

研究分野：神経生物学

キーワード：iPS細胞 ゲノム編集 大脳皮質 オルガノイド 神経発達 進化

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトのゲノムには重複領域が多数存在し、遺伝子機能解析が複雑である。近年、ヒトに固有な遺伝子やヒトに固有な CNV (Copy number variation) を有する遺伝子領域の機能が脳の進化に関与しているという可能性が多数報告されてきた。これらの遺伝子機能を詳細に解析することで、ヒトの高次脳機能の獲得機構やその破たんのメカニズムについてアプローチできると考えられていた。

(2) 申請者はヒトの体細胞から iPS 細胞への初期化技術や、多能性幹細胞からの神経系への分化誘導および神経機能解析を行う技術を有していた。そこで、本申請では、脳発達に関する遺伝子に異常が認められている患者由来の体細胞からの iPS 細胞の作出を行う。さらに、ゲノム編集によって脳機能に関連する遺伝子に変異を導入したヒト iPS 細胞を作出し、神経分化誘導を行い、神経機能を解析することとした。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではヒトに固有な脳発生・発達に関与する遺伝子やヒトに特異的な遺伝子プロモーター等の活性について解析するため、ヒトの発達障害患者由来 iPS 細胞を樹立して神経細胞への分化誘導を行う。

(2) iPS 細胞から分化誘導させる際に重要なのはその分化誘導効率と成熟性である。そのうえで、神経機能の評価が可能となる。そこで興奮性神経細胞に高効率・高純度で分化誘導させる方法の確立および、3D 培養による神経成熟を促進させる大脳皮質器官培養法を目指す。

(3) 脳発達に関連する遺伝子の変異 iPS 細胞からも神経分化誘導を行い、神経細胞の形態や細胞移動、シナプス機能について解析し、疾患表現型を明らかにするとともに脳の進化のメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

(1) 脳発達に障害のある患者由来血球系細胞から iPS 細胞を作出し、その品質管理を十分に行ったのちに、神経分化誘導可能なクローンを選定する。

(2) ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて、ヒトの脳発達に関与する遺伝子について、そのノックアウト iPS 細胞株を作出する。

(3) 興奮性神経細胞の効率的な分化誘導を

行うために、iPS 細胞において安定的なプロニューラル因子 Neurogenin2 遺伝子の強制発現系を確立させる。時期特異的な発現を制御するため、Tet-On システムを採用する。

(4) ヒト大脳皮質の構造を詳細に解析するために、3次元オルガノイド培養法を適用し、iPS 細胞からの大脳皮質の分化誘導を行う。

(5) 作出した疾患特異的神経細胞について、その表現型解析をおこなうために、網羅的転写産物解析として CAGE (Cap analysis gene expression) シーケンスを行う。

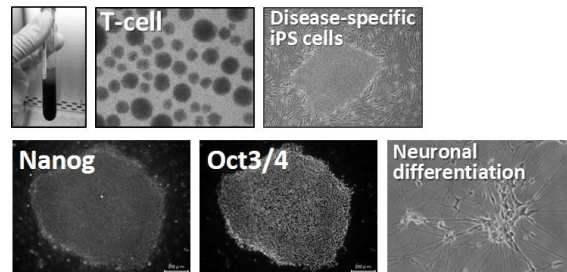
4. 研究成果

(1) 「疾患特異的 iPS 細胞の樹立」

脳発達に関する遺伝子の欠損や変異を含む患者から末梢血単核球を単離し、エピソーマルベクター (導入因子: hOct3/4, hKLF4, hSOX2, hLIN28, hL-myc, mDN-p53, EBNA1 の一過性強制発現) を用いて初期化を行った。作出した iPS 細胞はエピソーマルベクターの残存試験陰性・正常核型・三胚葉分化能・神経細胞分化能を示した。【図 1】

図 1

疾患特異的 iPS 細胞の樹立と神経分化



(2) 「CRISPR/Cas9 法の iPS 細胞への適用」

脳の進化、および脳発達に関する遺伝子群に対するヒトノックアウト細胞株を作出するためにダブルニッケース法による CRISPR/Cas9 を適用して、効率よく作出に成功した。各ノックアウト細胞株については、ヘテロ変異・ホモ変異のそれぞれを作出し Gene Dosage に対する影響を確認できるようにした。

(3) 「興奮性神経細胞への効率的な分化誘導法」

① 「神経分化誘導法の確立」

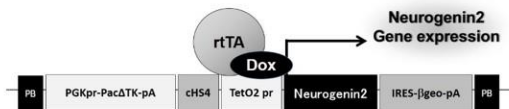
ヒト iPS 細胞に対する Neurogenin2 遺伝子の強制発現を一定期間行うために、Tet-On システムを採用した。具体的には piggyBac ベクターを用いて、安定的なトランスアクチベーター rtTA3G が発現するシステムとした。

さらに、rtTA3G 遺伝子、TetO::Neurogenin2 遺伝子「共」発現株を単離できるように、Hygromycin、Puromycin による薬剤セレクションができるよう設計した。

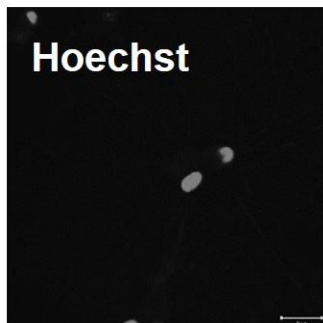
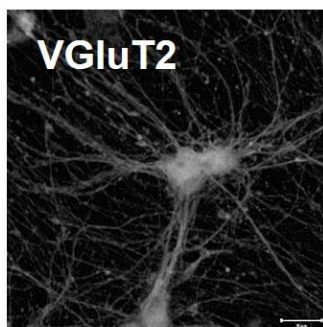
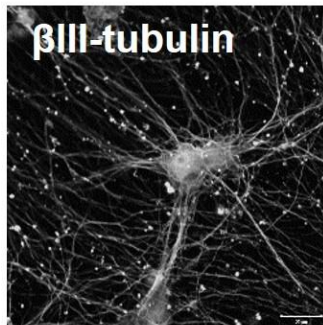
実際に iPS 細胞に Doxycycline 添加を行うと、培養 5 日で、神経細胞マーカーである β III-Tubulin 発現陽性の突起が伸展した。この誘導系を用いると、神経細胞への分化誘導効率はほとんど 100%に近い結果を示すことが明らかとなった。さらに培養 3 週間では、シナプス関連タンパク質の発現が上昇していることが明らかとなり、カルシウムイメージングや微小電極アレイシステム等で自発的な神経発火が認められた。【図 2】

図 2

遺伝子発現システム



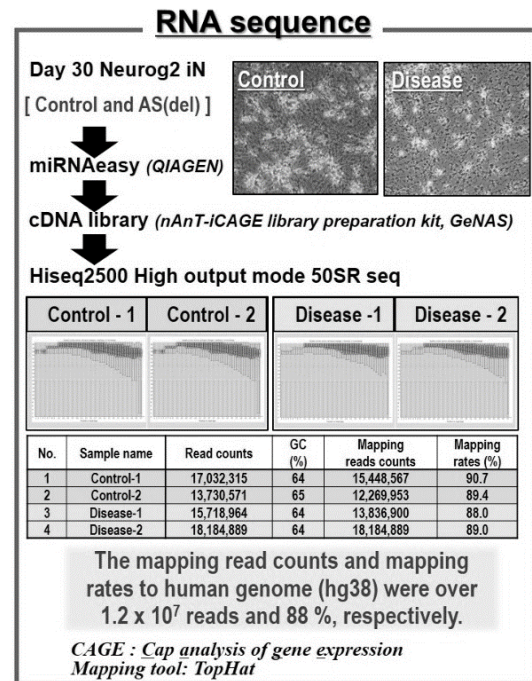
Day24 興奮性神経細胞誘導



② 「疾患特異的 iPS 細胞からの興奮性神経細胞分化誘導」

興奮性神経細胞への均一な分化誘導を行うことで、健常者由来神経細胞と疾患患者由来神経細胞との比較を生化学的に行うことができるようになった。実際に、培養 4 週間後に Total-RNA を抽出し、RT-PCR を行い網羅的な転写産物解析を行った【図 3】。

図 3



Representative functional annotation clustering

(Based on decreasing genes in the disease neurons)

Annotation Cluster	Enrichment Score	P-Value
Annotation Cluster 1	DNA-binding protein, Homeobox	2.0E-10
	Homeodomain-like	3.5E-10
	Transcription factor activity	1.4E-07
Annotation Cluster 2	Extracellular ligand-binding receptor	2.9E-13
	Glutamate receptor activity	2.9E-09
	G-protein coupled receptor	5.4E-08
Annotation Cluster 3	Positive regulation of transcription factor	1.5E-08
	Sequence specific DNA binding	3.5E-07
	Nucleus	5.9E-04

(Based on increasing genes in the disease neurons)

Annotation Cluster	Enrichment Score	P-Value
Annotation Cluster 1	DNA-binding protein, Homeobox	6.4E-11
	Homeodomain-like	9.1E-08
	Developmental protein	1.4E-07
Annotation Cluster 2	Synapse	1.6E-14
	Ion channel	2.2E-12
	Cell junction	7.3E-12
Annotation Cluster 3	Postsynaptic cell membrane	2.0E-11
	Glutamatergic synapse	4.1E-06
	PBP	4.2E-06

DIVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID, (NIH)

本研究では、特にヒトの進化や脳発達に特異的な遺伝子プロモーターの活性を評価するために、CAGE (Cap analysis gene expression)-SEQ という次世代シーケンスを適用した。この技術は、既存のメッセージャーシーケンスと異なり、プロモーターやエンハンサーの活性化として転写されるノンコーディング RNA の 5' Cap を標識させて、逆転写反応させるというものである。これによって、プロモーター活性およびエンハンサー活性の定量化が可能になった。

この結果、遺伝子発現レベルとして、発達障害患者由来神経細胞では、細胞の形態やシナプス関連の遺伝子に変動があることが明らかになった。一方、哺乳類における神経活動依的な活性化遺伝子のプロモーターのうち、ヒト特異的な活性化領域の同定することも可能であった。さらには、疾患患者由来プロモーターの活性化領域の変化を同定できた。このことから、本解析法は脳の進化のみならず、発達障害に関する遺伝子活性のパターンをより詳細に解析できるシステムであることが証明された。

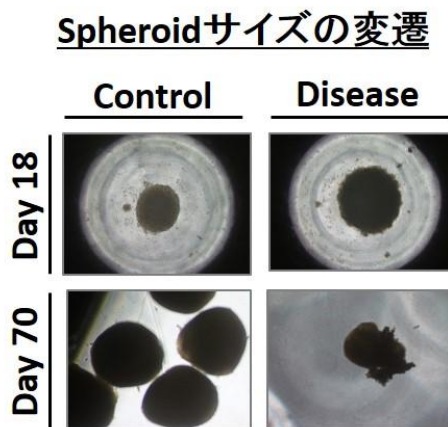
(4) 大脳皮質オルガノイドの作出

既に報告済みの大脳皮質オルガノイド作出法 (Lancaster et al, 2013, Nature) を改変し、より多検体でのオルガノイド解析を簡便に行う方法を作出した。この方法を用いて、発達障害患者由来 iPS 細胞からの大脳皮質オルガノイド分化誘導を行ったところ、最も重症と考えられていた患者由来 iPS 細胞からの大脳皮質形成は一部不全が認められ、そのオルガノイドサイズの小さいものとなった。

このことから、症状の重い患者において小頭症状が発現する、という臨床データと一致する可能性を示されデータが取得できた。

【図 4】

図 4



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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 石川充、岡野栄之

「Widespread analysis of TSSs in human iPSC-derived neurons using CAGE-SEQ」
(2016年7月20日・日本神経科学大会・パシフィコ横浜・神奈川県横浜市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 充 (ISHIKAWA Mitsuru)
慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：10613995

(2) 研究分担者 (なし)

(3) 連携研究者 (なし)

(4) 研究協力者

田中翔真 (TANAKA Shoma)