

iPS細胞から分化した小脳神経細胞の 病態モデルマウスへの移植

小脳変性疾患に対する細胞移植治療の可能性と課題

【本件のポイント】

- iPS細胞から作製した小脳オルガノイドの神経細胞を、小脳変性モデルマウスに移植した。
- 移植された細胞は、プルキンエ細胞^[1]特異的なタンパク質を発現し、神経線維は小脳核などへ伸長した。
- 移植後の過剰な増殖は、分化後期のオルガノイド、 γ -セクレターゼ阻害剤の使用、前駆細胞の純化により抑制できた。

学校法人関西医科大学（大阪府枚方市 理事長・山下敏夫、学長・木梨達雄）iPS・幹細胞応用医学講座 六車恵子教授らの研究グループは、ヒト iPS 細胞から分化誘導した小脳神経細胞を小脳変性モデルマウスに移植し、小脳に生着した細胞から軸索が伸長することを明らかにしました。また、幹細胞の過剰増殖により懸念される腫瘍化は、分化後期のオルガノイド、 γ -セクレターゼ阻害剤の使用、前駆細胞の純化により抑制できることが判明しました。細胞移植治療への一歩となることが期待されます。

中枢神経系（脳）は、一度損傷するとその機能の修復は非常に困難です。小脳は緻密な運動の制御や学習に重要な役割を果たすため、その機能が障害を受けると小脳性の運動失調が起これ、日常生活に欠かせない様々な運動機能に支障が生じます。研究グループの六車恵子教授は、これまでの研究で、多能性幹細胞^[2]から効率良く神経細胞を分化することができる「SFEBq法（無血清凝集浮遊培養法）^[3]」という3次元浮遊培養法を開発し、胚組織の発生を試験管内で再現することで小脳オルガノイド^[4]として知られる立体的な器官類似体を作成することに成功しています（注1）。さらに、ヒト多能性幹細胞から小脳の主要な神経細胞で医学的にも重要なプルキンエ細胞への分化誘導と、疾患特異的 iPS 細胞を用いた脊髄小脳変性症^[5]の病態再現にも成功しています（注2）。

今回研究グループは、健常者由来の iPS 細胞から小脳オルガノイドを作製し、この中に含まれる小脳神経前駆細胞を、プルキンエ細胞が選択的に変性する病態モデルマウスの小脳に移植することに挑みました。移植手技の最適化により、iPS 細胞から分化した小脳細胞の多くが生存（生着）することを確認

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（佐脇・両角）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

PRESS RELEASE



しました。また、これらの細胞からは、軸索様の遠心性線維が伸長し、プルキンエ細胞の標的である深部小脳核や前庭神経核に投射していました。一方、神経前駆細胞は幹細胞であるため、移植後も脳内で増殖し、腫瘍化することが懸念されます。研究グループは神経前駆細胞の調製条件を検討した結果、長期培養したオルガノイドやγ-セクレターゼ阻害剤 DAPT の前処理、プルキンエ前駆細胞の純化などにより、幹細胞の過剰増殖を抑制できることを明らかにしました。

モデルマウスは小脳性の運動失調をあらわしますが、今回の細胞移植では運動機能の回復には至りませんでした。しかしながら、運動機能障害の進行や、細胞移植による合併症（例えば、水頭症や脳ヘルニア、腫瘍化など）は認められませんでした。今回の研究成果は、従来再生医療の対象とは考えられていなかった小脳においても、長期的には細胞治療の対象となりうるための基礎的な知見を提供するものとなります。解決すべき多くの課題はありますが、移植細胞と宿主小脳の環境条件などを最適化することにより、有効性を高めることができると考えられます。

なお本研究は、理化学研究所（理研）生命機能科学研究センター、京都大学大学院生命科学研究科との共同研究として行われました。

本研究をまとめた論文が『Experimental Neurology』に日本時間 2023年8月31日（木）午後0時オンライン版に掲載されました。研究の詳しい研究概要は次ページ以降の別添資料をご参照ください。

■書誌情報

掲 載 誌	「Experimental Neurology」 (doi: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114511)
論文タイトル	Survival and process outgrowth of human iPSC-derived cells expressing Purkinje cell markers in a mouse model for spinocerebellar degenerative disease
筆 者	亀井孝昌 Takamasa Kamei, 玉田篤史 Atsushi Tamada, 木村俊哉 Toshiya Kimura, 垣塚 彰 Akira Kakizuka, 浅井昭雄 Akio Asai, 六車恵子 Keiko Muguruma

別 添 資 料

<本研究の背景>

小脳は、哺乳類の中樞神経系の中で大脳に次いで大きな領域を占めており、身体の円滑な動きを司る役割を担っています。小脳の機能が損傷を受けると、小脳性運動失調症が起こり、うまく歩けない、ふ

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（佐脇・両角）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

らつく、手が震えるといった日常生活に欠かせない運動機能に支障が生じます。これらの症状は、小脳腫瘍や小脳梗塞でも認められますが、代表的な神経難病としては脊髄小脳変性症が挙げられます。主に小脳や小脳と連絡しながら働く部位（脊髄、延髄、橋など）の神経細胞が選択的に変性し、脱落する病気で、日本には約2万人以上の患者がいると言われていています（注3）。遺伝性が約1/3を占め、多くの原因遺伝子変異が同定されていますが、発症機序の詳細は不明です。効果的な治療法の開発が求められている神経難病の一つです。

小脳には「皮質」と呼ばれる層構造があり、小脳皮質はプルキンエ細胞や顆粒細胞、ゴルジ細胞など複数の神経細胞から構成されています。その中で最も中心的な役割を果たす神経細胞がプルキンエ細胞です。小脳皮質唯一の出力細胞で、プルキンエ細胞へのシナプス入力とその調節が運動の制御・学習・記憶に重要となります。プルキンエ細胞が障害を受け、変性、脱落すると小脳性運動失調の症状を示します。

本研究では、プルキンエ細胞に特異的に発現する遺伝子 *L7/PCP2* のプロモーター制御の下、異常伸長した CAG リピート配列^[6]が発現するトランスジェニックマウス (*L7Q₆₄C Tg*) を、プルキンエ細胞が変性する病態モデルとして用いました。CAG リピートの異常伸長はタンパク質の凝集を起しやすく、その毒性により神経変性が生じます。この *L7Q₆₄C Tg* マウスは、プルキンエ細胞特異的に変性が生じることから、小脳全体が小さく、細胞体の萎縮が認められます。分子層に伸びる樹状突起^[7]も伸展が乏しく、顆粒細胞も二次的な影響を受けてその数が少なくなります（図1）。プルキンエ細胞の変性により、小脳性の運動失調があらわれ、歩行障害、バランス障害、ふらつき、震え、などが認められます。

研究グループの六車恵子教授は、2015年にヒト多能性幹細胞（ES細胞およびiPS細胞）からSFEBq法を用いて、小脳オルガノイドを作製し、プルキンエ細胞を効率よく分化誘導する方法を開発しました（注2）。本研究では、この培養技術を活用して健常者由来のiPS細胞を小脳細胞に分化し、これを、プルキンエ細胞が特異的に変性するモデルマウスの小脳に移植することに試みました。

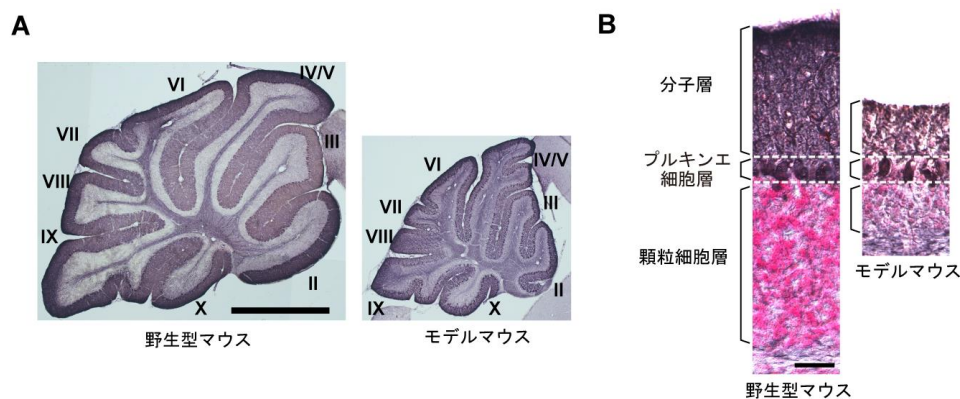


図1. モデルマウス小脳の抗体染色画像

A, B: 生後10週齢の小脳矢状断。プルキンエ細胞特異的マーカーのL7抗体の発現様式。Bの対比染色はニュートラルレッドで行った。モデルマウスの小脳は、野生型に比べて小さい。プルキンエ細胞の細胞体は萎縮し、樹状突起の伸展が乏しい。スケール: A: 1 mm, B: 50 μ m。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（佐脇・両角）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

注1) 理化学研究所プレスリリース (2015年1月30日)「ヒトES細胞から小脳神経組織への分化誘導に成功」https://www.riken.jp/press/2015/20150130_1/index.html

注2) 理化学研究所プレスリリース (2016年11月2日)「患者由来iPS細胞による脊髄小脳変性症の病態再現」https://www.riken.jp/press/2016/20161102_2/index.html

注3) 難病センターホームページより

<研究手法と成果>

1) 小脳オルガノイドに含まれる神経前駆細胞のモデルマウス小脳への移植

研究グループは、健常者から作製したiPS細胞を小脳オルガノイドに分化しました。オルガノイドでは小脳細胞に特異的なマーカーが発現に従って順に発現することを確認しました(図2)。これまでの

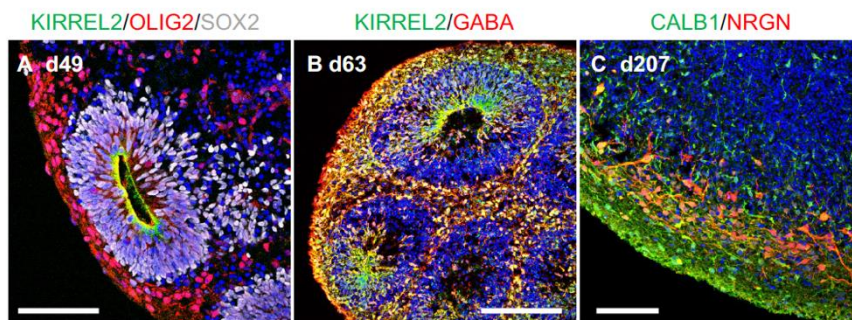


図2. iPS細胞から作製した小脳オルガノイドの抗体染色画像
A-C: 培養49日、63日、207日。SOX2: 神経上皮細胞のマーカー、KIRREL2, OLIG2: プルキンエ前駆細胞のマーカー、GABA, CALB1: プルキンエ細胞のマーカー、NRGN: ゴルジ細胞のマーカー。対比染色はDAPI(青色)。スケール: A, C: 100 μ m, B: 200 μ m。

研究から、神経細胞の移植は、成熟した神経細胞に比べ、まだ未熟な前駆細胞の方が生着やその後の成熟が良好であることが知られています。そこで研究グループは、プルキンエ細胞前駆細胞に特異的なマーカー(KIRREL2, OLIG2など)が発現し始める分化培養後42~48日のオルガノイドを用い、移植を行いました。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (佐脇・両角)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話: 072-804-2128 ファクス: 072-804-2638 メール: kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

生後 7~9 週齢の病態モデルマウスの小脳へ細胞を注入し、数週間後に解析をしたところ、宿主の小脳に iPS 細胞由来の小脳神経細胞を数多く認めました。細胞体からは軸索様の神経線維が本来の投射先である深部小脳核や前庭小脳核に伸長し、一部は未熟ながらもシナプスを形成していました(図3上段)。小脳皮質の分子層には樹状突起様の神経線維がみつめられ、プルキンエ細胞が登上線維から受ける入力神経線維を樹状突起上に受けていました(図3下段)。

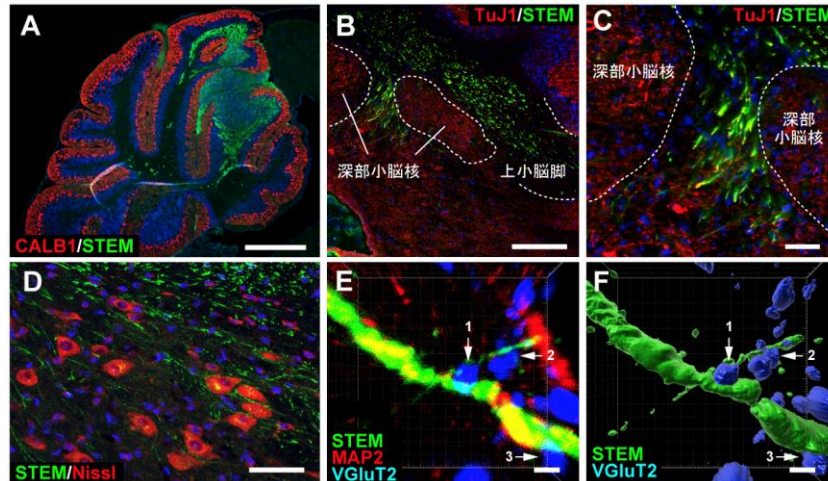


図3. 移植後のモデルマウス小脳の抗体染色画像

移植した細胞はヒト細胞特異的マーカーSTEM121により確認した。A: 移植6週後の小脳矢状断。小脳内にSTEM121陽性細胞が認められる(緑色の細胞)。B-D: 移植した細胞の軸索様線維は白質を通過して、深部小脳核に投射している。CALB1: プルキンエ細胞のマーカー、TuJ1: 神経細胞のマーカー、Nissl: 対比染色。E, F: 分子層でMAP2陽性の樹状突起様線維(赤色)が、矢印1-3で示されている部分で、宿主の登状線維(VGluT2, 青色)と接触している様子を示す。FはEの3次元レンダリング画像。

スケール: A: 500 μ m, B: 200 μ m, C, D: 50 μ m, E, F: 2 μ m。

2) 移植細胞の過剰増殖を抑制

移植に用いる神経前駆細胞はまだ未熟な幹細胞です。神経幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つ神経系の未分化な細胞なので、移植後も脳内で増殖します。細胞の状態や宿主脳の環境次第では、腫瘍化することも懸念されます。研究グループは、この問題を解決するために神経前駆細胞の調製条件を検討しました。その結果、①移植前のオルガノイドに細胞増殖を抑制する働きのある γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT を前処理する、②神経幹細胞の割合がやや少ない長期培養(86日目)オルガノイドの使用、③プルキンエ前駆細胞特異的に発現する KIRREL2 抗体で純化する、という方法により、移植後の神経幹細胞の過剰増殖を抑制できることを明らかにしました。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室(佐脇・両角)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話: 072-804-2128 ファクス: 072-804-2638 メール: kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

<今後の期待>

神経難病には原因や発症に至るメカニズムも不明なため、効果的な治療法の開発が進まないものが多くあります。iPS細胞にはこのような難病に対する研究の加速が期待されています。本研究は、これまでに開発された小脳神経細胞への分化誘導技術を、モデルマウスへの細胞移植に応用したものです。残念ながら、モデルマウスの小脳性運動失調を緩和させることはできませんでした。これは、移植細胞が宿主小脳での分化・成熟が不十分であり、本来のプルキンエ細胞の形態や機能を示すには至らなかったことが大きな原因です。しかしながら、モデルマウスへの細胞移植は初めての研究であり、生着（生存）細胞が多く見られたこと、軸索が標的に投射することは、今後の研究に有用な成果となります。今回の研究で明らかとなった課題を克服することが、今後の治療開発につながると考えられます。

本研究の手法と成果のまとめは以下（図4）の通りです。

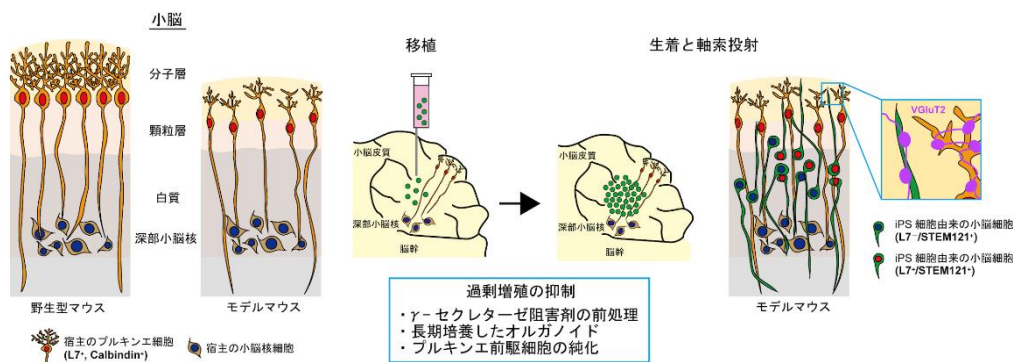


図4. 本研究の手法と成果のまとめ

<用語解説>

1. プルキンエ細胞

小脳皮質における情報処理の中心的神経細胞。脳の中でも特に大きな細胞体を持ち、広範囲に樹状突起を広げることにより、多くの神経情報を受取り、それらを統合する。小脳皮質ではプルキンエ細胞層を形成し、樹状突起は小脳表面の分子層に伸長し、軸索は白質を通過して小脳核へ投射する。樹状突起では、2種類の入力（苔状線維と登上線維）を受ける。

2. 多能性幹細胞

身体を構成するすべての種類の細胞に分化する能力（多能性）を持ち、未分化のまま培養して無限に増やすことができる細胞。再生医療の材料として期待されている。胚性幹細胞（ES細胞）が発生の初期段階である胚盤胞から作られるのに対し、人工多能性幹細胞（iPS細胞）は体細胞（血液や皮膚などの細胞）に遺伝子を導入して作製される。患者さんの体細胞から作製されたiPS細胞は「疾患特異的iPS細胞」とよばれる。疾患特異的iPS細胞は患者さんの遺伝情報（病気に関連する遺伝子も含む）を保持しているため、その病態を再現することが可能と考えられている。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（佐脇・両角）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

3. SFEBq 法（無血清凝集浮遊培養法）

SFEBq は Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregate with quick reaggregation の略。ES 細胞などを酵素により単一細胞へとバラバラに分散し、これを数千個程度の細胞の塊に再凝集させたものを分化培養の材料に用いる。この細胞凝集塊を細胞非接着性加工が施された培養容器の中で、血清など神経分化阻害効果のある成分を一切含まない特殊な培養液を用いて浮遊培養すると、数日間でほとんどの細胞を中枢神経系の細胞に分化させることができる。

4. オルガノイド

幹細胞を3次元的に培養して得られる組織構造体で、生体で見られるような組織構築や機能を保持している。ミニ臓器ともよばれ、疾患のモデリングによる創薬開発への応用や、発生・進化の研究への活用が期待されている。

5. 脊髄小脳変性症

運動失調または痙性対麻痺を主症状とする神経変性疾患の総称。現時点で根本的な治療法がない神経難病の一つ。小脳および関連する脳の機能が障害されるため、徐々にうまく歩けない、ろれつが回らない、などの症状が現れる緩徐進行性の疾患。中年期頃から発症し、遺伝性と孤発性がある。

6. CAG リピート配列

ゲノム DNA を構成する4種類の塩基、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) の配列で、同じ配列が繰返し見られるものの総称。CAG リピート配列はシトシン、アデニン、グアニンの配列からなる。CAG リピートが翻訳領域に存在するとグルタミンに翻訳されるため、グルタミン鎖（ポリグルタミン）が遺伝子産物に含まれる。この遺伝子産物の異常伸長による毒性はポリグルタミン病の発症に関与していると考えられており、脊髄小脳変性症 (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病が知られている。

7. 樹状突起

細胞体、軸索とともに神経細胞を構成する部分の一つ。細胞体から枝状に広がる複数の突起構造で、その表面は樹状突起刺と呼ばれる小さな突起で覆われ、シナプスを形成することで細胞間の情報交換を行う。中枢神経系の中でもプルキンエ細胞の樹状突起は非常に発達した特徴的な形状をもつため、その形態だけで細胞の種類を同定できる特異な神経細胞である。

<本件研究に関するお問合せ先>

学校法人関西医科大学

iPS・幹細胞応用医学講座 教授

六車 恵子

大阪府枚方市新町 2-5-1

TEL：072-804-2620

E-mail：muguruke@hirakata.kmu.ac.jp

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（佐脇・両角）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp