

研究テーマ

ヒト全能性幹細胞誘導による神経幹細胞誘導効率化に関する
検討

研究代表者

施設名 : 慶應義塾大学医学部

氏名 : 吉松 祥

研究テーマ：ヒト全能性幹細胞誘導による神経幹細胞誘導効率化に関する検討

所属先：慶應義塾大学医学部生理学教室・マサチューセッツ工科大学脳認知科学分野

氏名：吉松 祥

ヒトiPS細胞から神経幹細胞を誘導し、脊髄損傷患者に移植する再生治療戦略において、神経誘導効率には依然改善が必要である。本研究課題では、近年開発されたマウス全能性細胞誘導法をヒトに最適化し、神経分化能の検討を試みた。

申請者らは以前の研究において、ヒトiPS細胞においては、未分化状態がより初期であればあるほど、神経系細胞への分化能が向上するという極めて興味深い結果を得られている(Kisa et al., Stem Cell Reports 2016)。この研究はマウス多能性幹細胞とヒト含めた霊長類多能性幹細胞においては基底の多能性状態が異なるという知見に基づいており(Nichols and Smith, Cell Stem Cell 2009)、この違い(マウス多能性幹細胞：Naïve状態・着床前胚盤胞に近似、霊長類多能性幹細胞：Primed状態・着床後初期胚に近似)をKLF2、NANOGといったリプログラミング因子の強制発現及び培地に添加した各種阻害剤によって霊長類多能性幹細胞の多能性状態をPrimed→Naïveに変化させることに成功している(Kisa et al., Stem Cell Reports 2016; Shiozawa et al., Stem Cell Dev 2020)。

しかし、霊長類多能性幹細胞の基底状態のNaïve化に関わる一連の研究においても、依然として越えられない壁がいくつか存在していた。大まかに列挙すると、①DNAメチル化プロファイルなどの点からNaïve化が不完全である、②多能性幹細胞 - 胚盤胞キメラが完全に発生しないこと、③三杯葉分化能が依然として不安定であること、の3点である。霊長類多能性幹細胞、とくにヒトiPS細胞は、近年再生医療に用いるための細胞の供給リソースとして注目を浴びており、特に「中枢神経は再生しない」という観点からも、交通事故などで脊髄損傷を負った患者にとっては、現代医療では損傷を免れた神経細胞の機能に依存したりハビリが依然として唯一の治療法であり、神経再生療法といったものは存在しない。

本研究においては、所属先の慶應義塾大学で目下研究中の「神経幹細胞の移植による脊髄損傷の新規治療法の開発」というテーマの一環として、神経分化能が依然として不安定であるヒト多能性幹細胞の多能性状態の改善を目指し、基底多能性状態の変化による分化能への影響についての検討を行った。

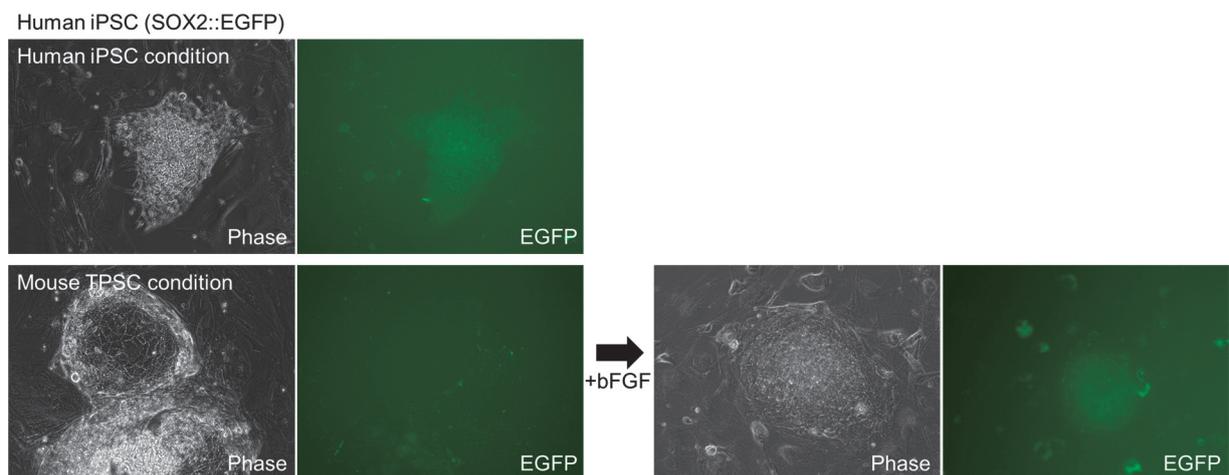
マウス多能性幹細胞からの全能性誘導論文(Hu et al., Nature 2022)を参考に、化合物添加でヒトiPS細胞から全能性誘導を試みた。マウスでは*MERV-L*という内在性レトロウイルス由来配列のプロモーターが一般的に全能性マーカーとして使用されており、特に1～8細胞期にお

いての発現が高い(Macfarlan et al., Nature 2012)。このマーカーは種差のためヒトでは配列が大きく異なるため、*MERV-L*のヒト版とされる*HERV-L*の遺伝子発現(マウスのものと同様に、1-8細胞期での発現が見られる)と、他の多能性マーカーの発現量を解析した。

申請者らは以前、健康人由来ヒトiPS細胞株201B7 (Takahashi et al., Cell 2007)にゲノム編集技術によってSOX2遺伝子座にEGFPを導入することに成功している(Yoshimatsu et al., PLoS One 2019)。SOX2遺伝子は多能性状態から神経外胚葉に分化する際に最初期因子として極めて重要であるため、本研究ではその細胞株を用いて検討を行った。

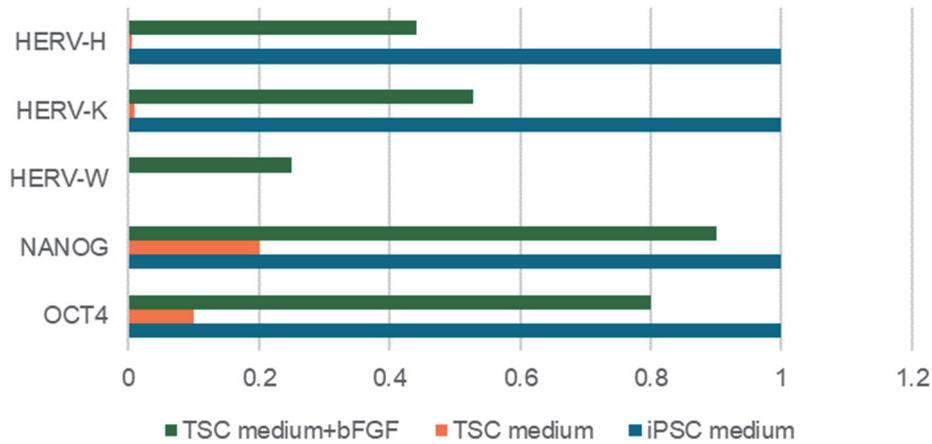
参考としたマウス全能性幹細胞の培養条件(Hu et al., Nature 2022)としては、具体的には KnockOut DMEMと5% KSRをベースとした培地に、1% N2, 1× sodium pyruvate, 55 μM 2-mercaptoethanol, 1,000 U ml⁻¹ mLIF, 50 ng ml⁻¹ sodium 1-ascorbyl-2-phosphate, 2.5 μM 1-azakenpauillone, 0.5 μM WS6, 0.2 μM TTNPBといった化合物を加えて培養を行う。ヒトを含めた霊長類の多能性幹細胞では増殖因子LIFへの反応性が非常に低いとされており、実際に参考論文通りの条件で培養を行うと、1-2継代ほどでiPS細胞コロニーの形が崩れてしまい、またSOX2::EGFPの蛍光も見られなくなり、多能性の喪失が確認された(図1左)。そこで、従来のヒト多能性幹細胞の培養で用いられる増殖因子bFGFを培地に新たに加えることで、増殖性および多能性を維持しつつ培養が可能であることが確認された(図1右)。

図1：ヒトiPS細胞(SOX2::EGFP)の全能性条件による培養



さらに、この培養条件下による多能性(OCT4, NANOG)、および全能性マーカー(ヒト内在性レトロウイルス遺伝子HERV-K, W, H)の遺伝子発現量の変化をqPCRによって解析した。その結果、図2の通り、多能性マーカーの発現には特に変動がなかったものの、ヒト細胞においては特にHERVの発現量の顕著な上昇は見られないことが分かった。これらの結果を踏まえて、現在RNA-seq解析を行っており、他の関連マーカー遺伝子の発現量を調べている。

図 2：関連遺伝子発現量の変化



さらに、これらの細胞を大脳オルガノイド誘導法(Kadoshima et al., PNAS 2015より一部改変)によって大脳組織への分化誘導を試みている。まず、分化誘導最初期において神経外胚葉マーカーとして重要であるSOX1とPAX6の発現量を解析すると、全能性状態(+bFGF)で培養したiPS細胞からの分化誘導においては、より高い神経外胚葉マーカーの発現が誘導されていることが分かった(図3)。現在、本法において作製した大脳オルガノイドの組織切片解析を行っている。

図 3：分化に伴う遺伝子発現変化（神経外胚葉マーカー）

