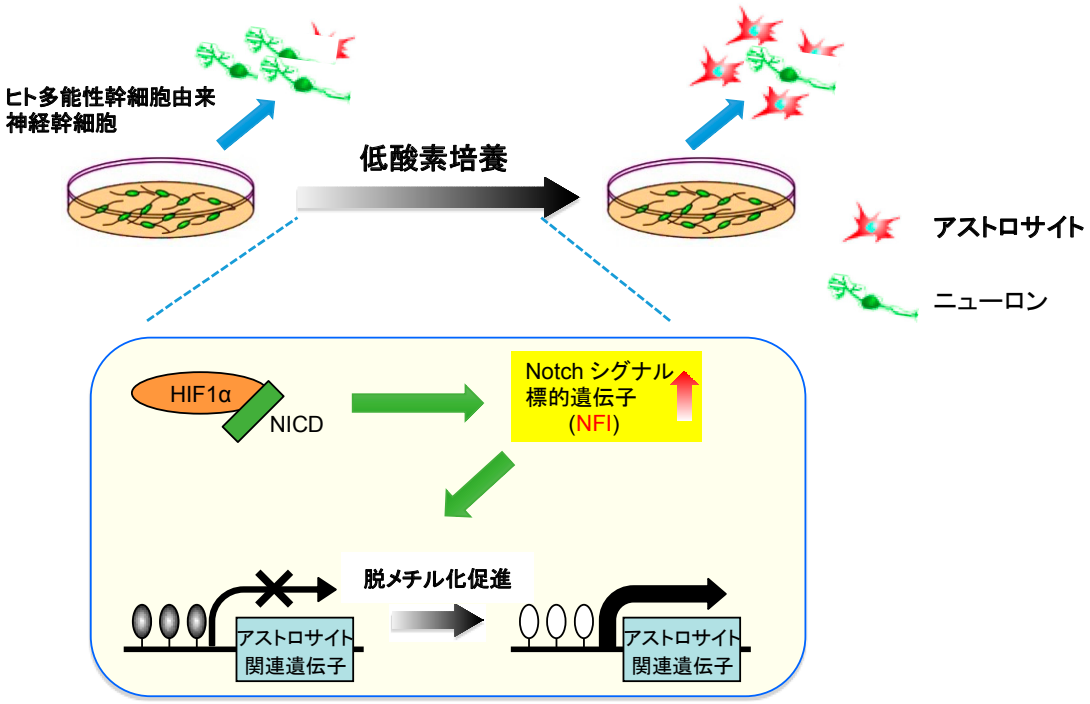
56　低酸素培養によるヒト神経幹細胞の短期分化誘導法開発	中島　欽一

【目的】ヒト多能性細胞由来神経前駆細胞は強いニューロンへの分化傾向を示し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞への高率な分化誘導には長期間の培養が必要であり、その多分化能獲得の制御機構はこれまで不明であったため、グリア細胞研究の発展の障害の一つとなってきた。

【方法】本研究グループはヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の酸素濃度による分化傾向の変化を細胞・分子生物学的に捉えることにより、低酸素誘導因子（hypoxia-inducible factor 1α：HIF1α）と Notch シグナルの協調的な働きによって、アストロサイト特異的遺伝子プロモーター領域の DNA 脱メチル化をきたし、アストロサイト分化能が獲得されることを見出した。

【結果】このエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を応用し、レット症候群患者由来ヒト神経前駆細胞の早期のアストロサイトへの分化誘導を行い、レット症候群患者由来アストロサイトがニューロンの発達を阻害することを発見した。

低酸素培養によるヒト神経幹細胞の多分化能獲得



56. 低酸素培養によるヒト神経幹細胞の短期分化誘導法開発

中島　欽一

九州大学 大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門 応用幹細胞医科学講座 基盤幹細胞学分野

Key words：ヒト神経幹細胞, ヒト神経前駆細胞, アストロサイト分化, エピジェネティクス, 低酸素, レット症候群

緒　言

哺乳類の中枢神経系は神経細胞（ニューロン）が無数のシナプスを介して複雑な神経回路を形成し、グリア細胞（オリゴデンドロサイト、アストロサイト）がこれらと密接に連携することで、高次機能を司っている。これらのニューロン・オリゴデンドロサイト・アストロサイトは多分化能と自己複製能をもった共通の神経幹細胞から産生される［1］。この神経幹細胞は、発生初期から多分化能を保持しているわけではなく、胎生中期にまずニューロンへのみの、発生段階に沿って成熟し胎生後期になるとアストロサイトへの分化能を順次獲得する。これらの中でアストロサイトは、ニューロンへの栄養供給以外にも、軸索伸展やシナプス可塑性の制御などを介して学習・記憶にも影響を与えることが明らかにされており［2］、その機能的重要性からほぼすべての神経疾患発症及び病態に関与すると考えられている。しかしながら、神経疾患患者から神経系細胞を直接採取することは困難であり、細胞レベルでの解析は殆どなされていなかった。近年の幹細胞培養技術の進歩に伴い、ヒト胚性幹細胞およびヒト人工多能性幹細胞といったヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞は in vitro で中枢神経系の発達を再現できるようになり［3〜5］、さらに様々な神経疾患モデルの解析も可能となってきた。しかしながら、ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞は 4 週間の分化誘導においては強いニューロンへの分化傾向を示し、アストロサイトへの分化は極めて少ないことが知られており、アストロサイトへの分化能の獲得には、100〜200 日といった長期間のスフェア培養が必要であることが近年の報告で明らかにされ［6］、この長期間培養は神経疾患のアストロサイト機能の解析において大きな障害となっていた。

ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞はその強いニューロンへの分化傾向から、胎生初期〜中期の神経幹細胞の性質が維持されているものと推察される。したがって、この細胞にアストロサイト分化能を獲得させるためには、培養皿上で発生段階を進めてやる必要がある。これには生体内環境の模倣が重要だと考えられるが、生体内環境におけるヒト神経幹細胞の性質変化の決定的因子は不明である。これまでに本研究グループは、胎仔内組織が低酸素状態であることに着目し、マウスの系で神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得が、低酸素下での培養により促進できることを明らかにしている。また、発生段階もしくは低酸素培養に伴うマウス神経幹細胞の性質変化に関して、メチル化されていたアストロサイト特異的遺伝子のプロモーター領域が脱メチルされることで、神経幹細胞はアストロサイトへの分化能を獲得できることも示している［7, 8］。しかし、ヒトでマウスと同様の制御機構が保存されているかは不明であった。

方　法

1. 細胞培養

ヒト iPS 細胞由来、ヒト胚性幹細胞由来、およびヒト胎児脳由来神経幹細胞を用いて各々の細胞での分化傾向を比較した。神経疾患モデルとしてレット症候群患児から樹立された同質遺伝子的かつ野生型（WT）および変異型（MT）MECP2 をそれぞれ発現するヒト多能性幹細胞から誘導されたヒト神経前駆細胞［9］を用いた。これらの細胞を通常酸素濃度（21% O2）および低酸素濃度（1〜2% O2）条件において 28 日間分化培養しその分化傾向を比較した（図 A）。さらに効率的にアストロサイト分化を誘導するために、ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を低酸素濃度（1% O2）で 14 日間分化培養し、その後 1 週間毎に 1%、5%とウシ胎児血清 fetal bovine serum（FBS）を加えた。

2. バイサルファイトシーケンス

ゲノム DNA を抽出しバイサルファイト処理をした。STAT3 結合部位および 7 つの他の CpG 部位を含むヒト *GFAP* プロモーター領域をプライマーを用いてポリメラーザ連鎖反応（PCR）で増幅し、PCR 産物をクローニングしたのち、3 サンプルより最低 15 クローンをランダムに解析した。

3. 統計分析

統計解析は、Student's t 検定（2 群間の比較）を用いて行った。すべての実験は、独立して少なくとも 3 回反復した。比較差は $P < 0.05$ で統計的有意差とした。

結　果

1. ヒト多能性幹細胞由来神経幹細胞の分化傾向と DNA メチル化

ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞とヒト胎児脳由来神経幹細胞の分化傾向を比較すると、前者はニューロンへの強い分化傾向を示す一方で、後者はアストロサイトへの多分化能を示した（図 B)。この分化傾向の差異について、各々の細胞の *GFAP* プロモーター領域の DNA メチル化を比較すると、ヒト iPS 細胞由来では高頻度にメチル化されているのに対し、ヒト胎児脳由来神経幹細胞ではほとんどメチル化がみられなかった（図 C）ことから、ヒト胎児脳由来神経幹細胞は多分化能を獲得している胎生後期神経幹細胞に相当すると考えられる一方で、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞は胎生中期神経幹細胞に相当する性質のまま止まっている可能性が示唆された。そこでマウスの神経幹細胞の結果を基に、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を低酸素条件下で培養したところ、アストロサイトへの分化が短期間（28 日）で誘導できるという結果を得た（図 A、D)。さらに、アストロサイト分化能の獲得に伴い *GFAP* プロモーター領域が脱メチル化を示した（図 E)。このヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の多分化能獲得の分子生物学的な制御機構として、低酸素濃度培養では HIF1α の発現上昇と Notch シグナルの亢進が見られた。さらに、通常酸素濃度環境で NICD と HIF1α をヒト iPS 細胞由来神経幹細胞に強制発現させたところ、NICD と HIF1α を共強制発現において相乗的に高効率にアストロサイト分化が見られ、さらに *GFAP* プロモーター領域が脱メチル化を示した。これらの結果から、HIF1α と Notch シグナルが協調的にエピジェネティックな変化を誘発し、多分化能を獲得する機構が保たれていることが示唆された。

2. ヒト疾患 iPS 細胞由来神経幹細胞への応用

自閉症スペクトラム障害の一つのレット症候群（RTT）は女児に発症する重篤な精神・ 神経発達障害であり、原因遺伝子 MECP2 の変異や発現異常は RTT を引き起こすだけでなく、種々の精神疾患の発症にも関与する。近年では RTT においてもアストロサイト機能不全が報告されている。そこで我々は 10 歳の患児から樹立された同質遺伝子的かつ野生型（WT）および変異型（MT）MECP2 をそれぞれ発現するヒト神経幹細胞を、前述の低酸素によるアストロサイト誘導機構を応用し 1%酸素濃度および FBS 条件で分化培養をおこなったところ、28 日後にどちらの神経幹細胞も 60%以上がアストロサイトへと分化した。この WT および MT MECP2 を発現するアストロサイトとの共培養および条件培養液（conditioned medium of astrocyte-enriched cells : CMA）により、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞およびマウス海馬ニューロンでは、ニューロンの細胞体サイズおよび神経突起長の成長、そしてシナプス形成が阻害されることが明らかとなった。

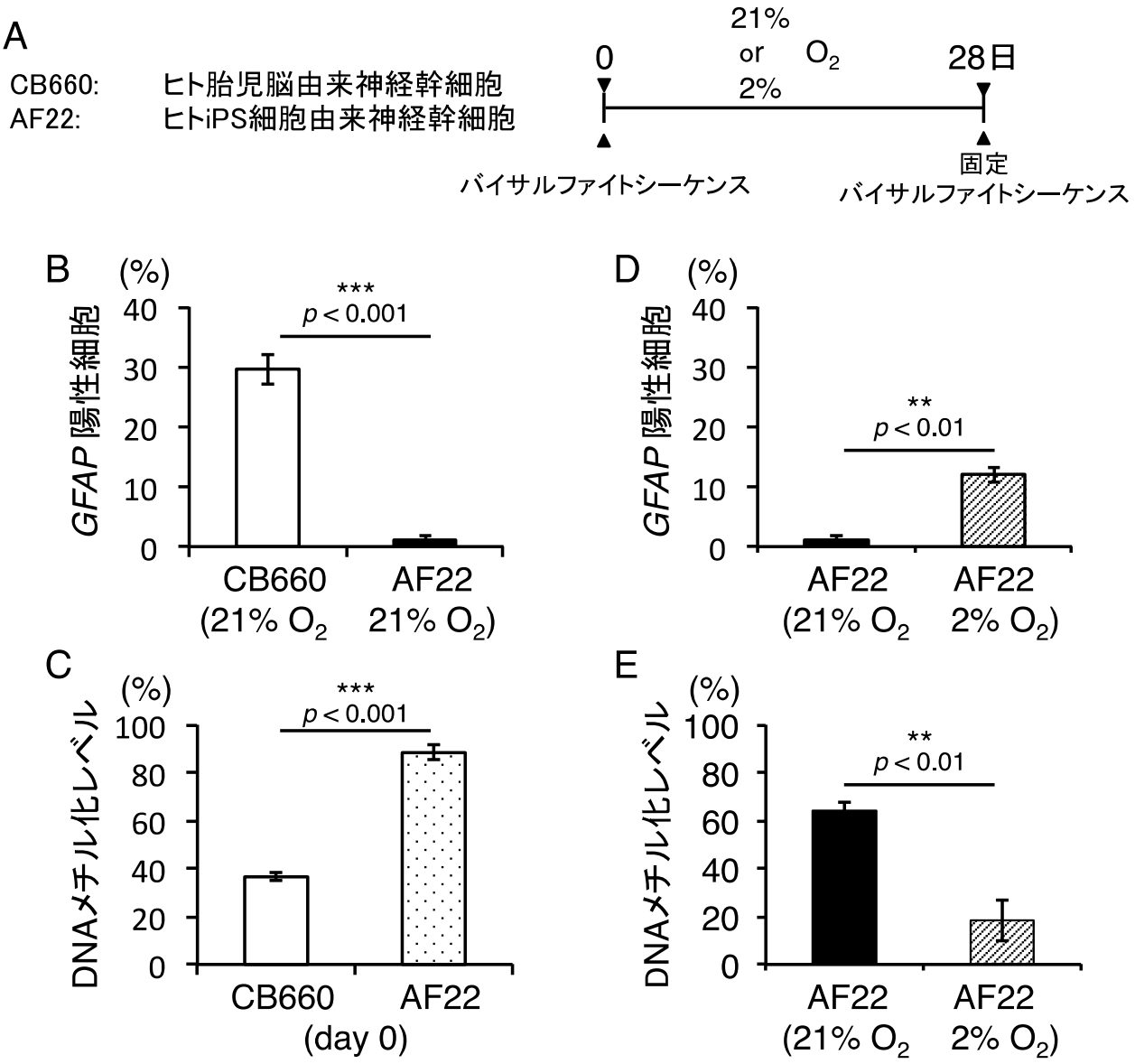


図 1. ヒト神経幹細胞の分化傾向と *GFAP* プロモーター領域のメチル化

A) ヒト胎児脳由来神経幹細胞（CB660）およびヒト iPS 細胞由来神経幹細胞（AF22）を酸素濃度条件をかえて 28 日間分化培養しその分化傾向を比較した。さらに、これらの細胞の分化培養前後でバイサルファイトシーケンスを行った。

B) CB660（白）では *GFAP* 陽性アストロサイトへの分化を示す一方、AF22（黒）ではアストロサイトへの分化は抑制されていた。

C) これらのヒト神経幹細胞を分化培養前に STAT3 結合部位を含む *GFAP* プロモーター領域のメチル化を比較すると、CB660（白）のみ高度に脱メチル化されていた。

D) AF22 を 2%酸素濃度で分化培養（斜線）したところ、21%酸素濃度条件（黒）よりも多くの *GFAP* 陽性アストロサイトを認めた。

E) この低酸素分化培養された AF22（斜線）では、STAT3 結合部位を含む *GFAP* プロモーター領域が高度に脱メチル化されていた。

考　察

本実験から酸素濃度がエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を介してヒト多能性幹細胞由来神経幹細胞のアストロサイト分化能力獲得において重要な役割を果たすことがわかった。また、この応用として、疾患 iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞の早期アストロサイト分化誘導及びその解析を報告した。今後は本方法が他のアストロサイト関連疾患の研究にも応用され、その原因解明・治療法開発が加速することを期待したい。

共同研究者・謝辞

本研究は九州大学大学院医学研究院・安井徹郎博士と共同で行われた。また、本研究に対して助成いただいた、上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1) Namihira M, Nakashima K. Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain. Curr Opin Neurobiol. 2013;23(6):921-7. doi: 10.1016/j.conb.2013.06.002. PubMed PMID: 23827784.
2) Allen Nj Fau - Barres BA, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. Nature. 2009;457(7230):675-7. DOI:10.1038/457675a.
3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019. PubMed PMID: 18035408.
4) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J Fau - Shapiro SS, Shapiro Ss Fau - Waknitz MA, Waknitz Ma Fau - Swiergiel JJ, Swiergiel Jj Fau - Marshall VS, Marshall Vs Fau - Jones JM, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282(5391):1145-7. PMID: 9804556.
5) Yu J, Vodyanik Ma Fau - Smuga-Otto K, Smuga-Otto K Fau - Antosiewicz-Bourget J, Antosiewicz-Bourget J Fau - Frane JL, Frane Jl Fau - Tian S, Tian S Fau - Nie J, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007;318(5858):1917-20. DOI:10.1126/science.1151526.
6) Edri R, Yaffe Y, Ziller MJ, Mutukula N, Volkman R, David E, et al. Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors. Nat Commun. 2015;6:6500. doi:10.1038/ncomms7500. PubMed PMID: 25799239; PubMed Central PMCID: PMC4383005.
7) Mutoh T, Sanosaka T, Ito K, Nakashima K. Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via hypoxia-inducible factor 1alpha-notch signal interaction in the developing brain. Stem Cells. 2012;30(3):561-9. doi: 10.1002/stem.1019. PubMed PMID: 22213097.
8) Takizawa T, Nakashima K Fau - Namihira M, Namihira M Fau - Ochiai W, Ochiai W Fau - Uemura A, Uemura A Fau - Yanagisawa M, Yanagisawa M Fau - Fujita N, et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. Dev Cell. 2001;1(6):749-58. PMID: 11740937.
9) Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Matsumoto T, Yamaguchi R, Sanosaka T, et al. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. Mol Brain. 2015;8:31. doi: 10.1186/s13041-015-0121-2. PubMed PMID: 26012557; PubMed Central PMCID:PMC4446051.
10) Yasui T, Uezono N, Nakashima H, Noguchi H, Matsuda T, Noda-Andoh T, et al. Hypoxia Epigenetically Confers Astrocytic Differentiation Potential on Human Pluripotent Cell-Derived Neural Precursor Cells. Stem Cell Reports. 2017;8(6):1743-56. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.001. PubMed PMID: 28591654; PubMed Central PMCID: PMCPMC5470174.