

アストロサイトの異常による ASD : ヒト iPS 細胞を用いた検証と治療薬

山形要人, 久恒智博

東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野

【研究の背景】

結節性硬化症の患者にみられる精神症状の一つとして自閉症が知られているが、その発症メカニズムは明らかにされていない。私たちは、これまで結節性硬化症の原因遺伝子 *Tsc1* を脳の各細胞で欠損したマウスを作製し、アストロサイトで *Tsc1* を欠損させると社会行動異常を起こすことを突き止めている。さらに、このマウスに低分子量 G 蛋白質 Rheb を抑制する薬物 (Rheb 阻害薬) を投与すると、行動異常が改善することを明らかにしている (申請者、未発表データ)。このため、*Tsc* 欠損によるアストロサイトの機能異常が、結節性硬化症にみられる自閉症の発症と深く関わると考え、研究を進めている。

【目 的】

Tsc2 遺伝子に変異を導入したヒト由来 iPS 細胞を樹立し、アストロサイトへ分化させた後、その形態や機能異常を明らかにする。また、*Tsc2* 変異型アストロサイトにみられた機能異常を Rheb 阻害薬により正常化できるか調べることを目的とした。

【方 法】

1) ヒト *Tsc2* 欠損型 iPS 細胞の作製

ヒト iPS 細胞 (理研バイオリソースセンターより入手) の *Tsc2* 遺伝子に、CRISPR/Cas9 法にて変異導入をおこなった。まず、エレクトロポレーション法を用いて、*Tsc2* 遺伝子のエクソン 3 に対する guide RNA と Cas9 をコードするプラスミドを ヒト iPS 細胞に導入した。その後、変異部分を含むゲノム断片を PCR 法で増幅、T7 Endonuclease 1 処理により消化し、DNA の変異を有する細胞集団を特定して、その中からクローンを樹立した。

2) アストロサイトへの分化誘導

ヒト iPS 細胞を hanging drop 法 (大腸菌プレート の 蓋 の 裏 に 細胞懸濁液をスポット後、一昼夜逆さにする) で凝集させたのち、浮遊培養法により胚様体 (Embryoid body) を形成させた。さらにできた胚様体から neural rosette を誘導し、神経前駆細胞 (neural precursor cell, NPC) へと分化させた。その後、NPC を AM 培地 (*ScienCell Research Laboratories* 社、Catalog #1801) で約 1 ヶ月培養してアストロサイトに分化させた (Julia TCW, et al., 2017, *Stem Cell Reports*)。アストロサイトの分化過程は、アストロサイトに特異的に発現するタンパク質に対する抗体 (CD44, S100 β , GFAP など) を用いた免疫染色法や qPCR (Step One Plus, Applied Biosystems) により確認をおこなった。

【結 果】

1) ヒト *Tsc2* 欠損 iPS 細胞の作製

CRISPR/Cas9 法を用いてヒト iPS 細胞に、*Tsc2* 遺伝子の変異導入をおこなった結果、*Tsc2* 遺伝子のフレームシフトを起こしたホモ変異体を 1 クローン、また、ヘテロ変異体を 4 クローン得ることに成功した。

次に、得られた iPS 細胞の TSC2 の発現をウエスタンブロット法、および免疫染色法で確認した結果、ホモ変異体では *Tsc2* の発現が欠損していることを確認できた(図 1)。

2) アストロサイトへの分化誘導

Tsc2 変異型と正常型のヒト iPS 細胞から胚様体を形成させた後、NPC へと分化させた。さらに得られた NPC を AM 培地で培養してアストロサイトへ分化誘導した結果、約 10 日後までに、未成熟なアストロサイトのマーカーである S100 β の発現を *Tsc2*^{+/+}、*Tsc2*^{+/-}、*Tsc2*^{-/-}すべての細胞に検出した。また、誘導後 30 日以内には、成熟アストロサイトのマーカーである GFAP の発現を三者の細胞において確認し、アストロサイトへの分化に成功した。興味深いことに、GFAP の発現は、*Tsc2*^{+/+}、*Tsc2*^{+/-}、*Tsc2*^{-/-}アストロサイトの順に高いことがわかった。また、*Tsc2*^{+/+}や *Tsc2*^{+/-}アストロサイトに比べ、*Tsc2*^{-/-}アストロサイトは面積が約 2 倍に増大していることを見出した。

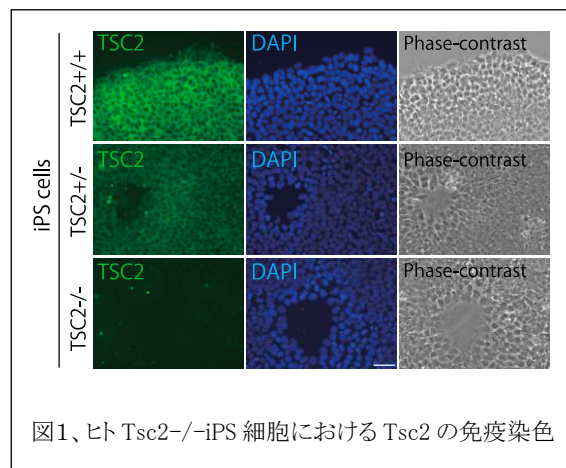


図1、ヒト *Tsc2*^{-/-}iPS 細胞における *Tsc2* の免疫染色

【考 察】

本研究において、*Tsc2* 遺伝子の変異したヒト iPS 細胞から、アストロサイトへの分化誘導に世界で初めて成功した。そして、*Tsc2*^{-/-}アストロサイトは野生型アストロサイトに比べて大きく、GFAP 発現量も増加していることを確認した。この結果は、ヒトのアストロサイトが *Tsc2* 変異により形態および機能の異常をきたし、精神疾患発症に関わる可能性を示唆している。今後は、*Tsc* 欠損がアストロサイトの機能(グルタミン酸取り込み、D-Serine 放出など)にもたらす影響を明らかにし、Rheb 阻害剤がそれを回復するかを検証していく。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

従来、アストロサイトは神経の生育をサポートするのみと考えられてきた。しかし近年、アストロサイトが神経活動を制御し、精神機能に大きな影響を及ぼすことが明らかになりつつある。今回、ヒト *Tsc* 欠損アストロサイトに形態学的異常があることを示したが、今後はアストロサイトの異常が自閉症発症にどのように関わるかを、細胞レベルで明らかにしていく。そして、Rheb 阻害薬がヒト TSC アストロサイトを正常化し、自閉症を反映する異常(例えば、共培養したニューロンの異常)を改善できるかどうかを検証していく。

【参考・引用文献】

Julia TCW, et al., 2017, *Stem Cell Reports* VOLUME 9, ISSUE 2, P600-614.