

<研究課題>

加齢による神経細胞の内在的変容の解析および抗老化因子の解明

代表研究者 慶應義塾大学医学部生理学教室 特任講師 加瀬義高

【抄録】

スーパーセンチナリアンは老化によって生じる脳の萎縮が起きづらく、100歳以降の認知機能の低下が起きづらい特徴を有している。スーパーセンチナリアンを対象とした抗老化研究がなされてきたが、グリア細胞またはグリア細胞とニューロンとの相互作用に注目した解析はなかった。そこでスーパーセンチナリアン由来の iPS 細胞からミクログリア、アストロサイトを誘導しニューロンに対してどのような働きかけを行うのか、それぞれを共培養することで解析を行うこととした。スーパーセンチナリアン由来の iPS 細胞とコントロール用の iPS 細胞を用意し、それぞれミクログリアとアストロサイトの誘導を開始した。実験を複数回施行したが、スーパーセンチナリアン株でのミクログリアの誘導は不可能であった。またアストロサイトでは細胞株によって誘導効率に大きな差が認められた。原因として、スーパーセンチナリアン由来の iPSC では epigenetic status が young adult より樹立した iPS 細胞と比べて異なる可能性が考えられた。

1. 研究の目的

まずスーパーセンチナリアンとは 110 歳まで存命する方を言う。スーパーセンチナリアンは老化によって生じる脳の萎縮が起きづらく、100 歳以降の認知機能の低下が起きづらい特徴を有している (Takao M et al, 2016)。スーパーセンチナリアンを対象とした抗老化研究がなされてきたが、グリア細胞またはグリア細胞とニューロンとの相互作用に注目した解析はなかった。そこでスーパーセンチナリアン由来の induced pluripotent stem cells (iPSC) からミクログリア、アストロサイトを誘導しニューロンに対してどのような働きかけを行うのか、それぞれを共培養することで解析を行うこととした。

2. 研究方法と経過

スーパーセンチナリアン由来の iPSC を sc-1, sc-6, sc-7, sc-8 の 4 ライン用意し、コントロール用の iPSC として 414C2 を用意し、それぞれミクログリアとアストロサイトへの誘導を行なった。

ミクログリアの誘導方法に関しては既報にあるように (Sonn et al, 2022) 各 4 ラインと 414C2 の iPSC に薬剤耐性遺伝子を Gene juice を用いてトランスフェクションするところから開始し、造血幹細胞の性質を有する細胞にまで誘導するところまでを目指した。

アストロサイトの誘導方法に関しても既報

(Kase et al, 2023) を参考にして、各 4 ラインと 414C2 の iPSC を外胚葉細胞に分化させた後 EGF、FGF を用いて神経幹細胞から神経に誘導し培養を続けて astrocyte に分化したもののみを取り出すことを行なった。

3. 研究の成果

ミクログリアの誘導では Hygromycin 処理、Puromycin 処理に耐えられる iPSC がコントロールの 414C2 以外では残らなかった。この誘導は 3 回ほど行い導入する Hygromycin、Puromycin の量を調整して変えたものの、処理の途中で耐性をもつことができずネクロシスしてしまった。よって最初の段階でおこなったトランスフェクションがうまく行われず、遺伝子の細胞導入が不完全であったと予想される。さらに、アストロサイトの誘導では sc-1, sc-6, 414C2 では Secondary Neurosphere まで分化できたが、sc-7, sc-8 は Primary Neurosphere の段階でネクロシスを起こしたため分化できなかった。これはミクログリアの誘導と同様 3 回ほど実験をおこなったものの、ネクロシスを起こすなど分化の誘導ができなかった。

4. 今後の課題

ミクログリアの誘導、アストロサイトの誘導

はどちらも繰り返し行ったものの 414C2 以外では分化が不可能であった。sc-7, sc-8 に関しては sc-1, sc-6 と比べネクロシスの度合いが高かったためコロニーの状態を観察したところ正常な iPSC コロニーと比べて不完全に分化したコロニーとなっていたことがわかった。よってスーパーセンチナリアン由来の iPSC を樹立する段階から不純な iPSC が生成できているか見直す必要があると思われる。さらに、コントロール用の 414C2 以外のラインは全て誘導不可能であったことからスーパーセンチナリアンでは特有のエピジェネティック変化が起きており、それがヘテロクロマチンを強くしているために分化誘導が起こりにくいと考えられる。よってミクログリア誘導段階での不完全なトランスフェクションやネクロシスに繋がったと予想される。

今後の展望としては、まずスーパーセンチナリアン由来の iPSC 樹立を見直し、純粋なコロニーを生成した上でミクログリア、アストロサイトの誘導を再試行する。しかし、従来の誘導法ではスーパーセンチナリアン由来の iPSC においてミクログリア、アストロサイトの誘導が上手くいかない可能性もあるため、異なる誘導方法の確立が必要となる可能性も考えられる。

5. 研究成果の公表方法

細胞誘導法の改良の後に解析結果をまとめ、論文化する予定である。

<参考文献>

・ Takao M, Hirose N, Arai Y, Mihara B, Mimura M. Neuropathology of supercentenarians – four autopsy case studies. *Acta Neuropathol Commun.* 2016 Sep 2;4(1):97. doi: 10.1186/s40478-016-0368-6. PMID: 27590044; PMCID: PMC5010697.

・ Iki Sonn, Fumiko Honda-Okazaki, Sho Yoshimatsu, Satoru Morimoto, Hirotaka Watanabe and Hideyuki Okano(2022) Single transcription factor efficiently leads human induced pluripotent stem cells to functional microglia/inflammation regeneration

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9248164/>

・ Nicolas Leventoux, Satoru Morimoto, Kent Imaizumi 1, Yuta Sato, Shinichi Takahashi, Kyoko Mashima, Mitsuru Ishikawa, Iki Sonn, Takahiro Kondo, Hirotaka Watanabe and Hideyuki Okano/ Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells/ <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/12/2680>

以上

Analysis of intrinsic neuronal transformation with aging and elucidation of anti-aging factors

Primary Researcher: Yoshitaka Kase,
Project Assistant professor, Department of Physiology
Keio University School of Medicine

Supercentenarians are characterized by their resistance to aging-induced brain atrophy and cognitive decline after the age of 100. Although anti-aging studies have been conducted on supercentenarians, no analysis has focused on the interaction between glial cells or glial cells and neurons. Therefore, we induced microglia and astrocytes from iPS cells derived from supercentenarians, and we analyzed how microglia and astrocytes interact with neurons by co-culturing each of them. We prepared supercentenarian-derived iPS cells and control iPS cells, and started induction of microglia and astrocytes, respectively. We performed the experiment several times, but were unable to induce microglia in the supercentenarian strain. In addition, the induction efficiency of astrocytes differed greatly depending on the cell line. The reason may be that the epigenetic status of iPSCs derived from supercentenarians may be different from that of iPS cells established from young adults.