

2025年5月26日

報道関係者各位

慶應義塾大学
藤田医科大学

血液から神経細胞を生み出す新技術を開発！創薬と再生医療の未来を切り拓く －NEUROD1 遺伝子を用いた部分的リプログラミングで直接転換に成功－

慶應義塾大学再生医療リサーチセンター・岡野栄之センター長/教授（藤田医科大学精神・神経病態解明センター神経再生・創薬研究部門・客員教授）、慶應義塾大学殿町先端研究教育連携スクエアの斉藤陽一特任助教、および藤田医科大学精神・神経病態解明センター神経再生・創薬研究部門・石川充講師（研究当時：慶應義塾大学医学部生理学教室・特任講師）らのグループは、血液細胞に特定の遺伝子群を導入することで、シャーレ内で神経細胞に転換させる新しい技術を開発しました。本研究は、神経分化に関わる bHLH 型の転写因子 NEUROD1^(注1)と iPS 細胞^(注2)の樹立で利用される 4 遺伝子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を末梢血 T 細胞に導入する、部分的リプログラミング^(注3)という手法を用いたものです。この結果、約 20 日という短期間でグルタミン酸作動性神経細胞^(注4)の産生が可能になりました。

これまで知られている直接的な神経細胞誘導法は、皮膚線維芽細胞を使用する方法が主であり、細胞採取のための皮膚の切開と縫合が必要でした。しかし今回の方法は、より身体への影響が少ない採血のみで細胞材料を得られることから、ドナーに対する負担を大幅に軽減できるようになりました。この技術は、iPS 細胞のように体細胞を完全に初期化させる工程を経ることなく神経疾患の病態を再現できる細胞モデルを作製できるため、再生医療にもつながる細胞を人工的に作り出す新たな方法として期待されます。

本研究成果は 2025 年 4 月 28 日（米国東部時間）に、米国科学アカデミー (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [PNAS]*) のオンライン版に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・ヒトの体細胞から、iPS 細胞への初期化を介さずに神経細胞に転換させる技術は、これまで主に線維芽細胞に対して行われていましたが、本研究では末梢血細胞からの神経細胞産生に成功しました。
- ・この直接的な神経細胞誘導は部分的リプログラミングという手法を応用したものです。これは神経細胞の誘導に重要な転写因子 NEUROD1 遺伝子に加え、iPS 細胞の樹立に利用される 4 遺伝子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を同時に細胞に導入することで、iPS 細胞のような多能性幹細胞の状態へと完全に初期化をすることなく、他の体細胞（ここでは神経細胞）に転換させる方法です。
- ・電気生理学試験や遺伝子発現解析によって、本研究で産生された神経細胞は主にグルタミン酸作動性の神経細胞であることが分かりました。
- ・1 細胞 RNA シーケンス (scRNA-seq)^(注5)、全ゲノムバイサルファイトシーケンス^(注6)、Cre-LoxP システム^(注7)による細胞系譜試験の結果から、本研究で産生された神経細胞は、iPS 細胞状態を介することなく、半直接的に血液細胞から神経細胞に転換されていたことが示されました。

- ・ 産生された神経細胞は一定の幼若（若返り）状態を示しつつも、誘導前の体細胞が保持していたエピジェネティックメモリー^(注8)の一部を保有していることが明らかになりました。

2. 研究背景

現在、脳神経系の病気の研究においては、iPS 細胞の利活用が有効な手段のひとつとなっています。これは、ヒトの脳神経への侵襲的な介入を回避できることに加え、動物モデルでは病気の再現が難しい場合に対しても有効であるからです。具体的には、患者の皮膚や血液等の体細胞に対して、実験室で初期化（リプログラミング）を施すことで iPS 細胞を作り出し、その後に神経系細胞へ分化誘導させることで、疾患感受性を持った脳神経系細胞をシャーレ内で再現できるようになります。この方法による、病気の治療法・予防法・診断法開発は、現在世界中で盛んに行われています。

一方、この方法では病態モデルの作出に時間がかかりすぎるという課題があります。実際に、ヒトの体細胞からの iPS 細胞の樹立と、その品質管理試験に 1~3 か月程度の期間を必要とします。さらにそこから、目的の神経系細胞への分化誘導にも同程度の時間がかかります。すなわちシャーレ内でヒトの神経細胞を新しく調製するには、合計で半年近い期間を必要とします。また、もうひとつの課題としては、iPS 細胞のような未分化な細胞に初期化させてしまうことが、患者が後天的に得た細胞情報（エピジェネティックメモリー）の大部分をかき消してしまい、患者の病態が保たれない可能性があることです。

このような観点から、ヒトの皮膚等の体細胞から直接的に他の種類の体細胞（ここでは神経細胞）を作り出す技術（ダイレクトリプログラミング）が検討されてきました（参考文献 1, 2）。

しかし、これらの方法のほとんどは、その起源とする最初の細胞が皮膚線維芽細胞でした。これは細胞提供者（ドナー）の皮膚を切開したあとに縫合する必要があるため、侵襲性が高く、ドナーへの配慮から実施例が限定的なものにとどまっていた。そこで我々は、よりドナーへの侵襲性の低い採血という方法によってこれが実現できないかと考え、今回その効率的な誘導技術開発を行いました。

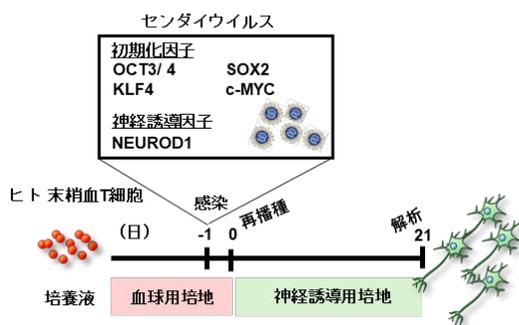
3. 研究内容・成果

(1) 部分的リプログラミング法による血液細胞からの神経細胞誘導

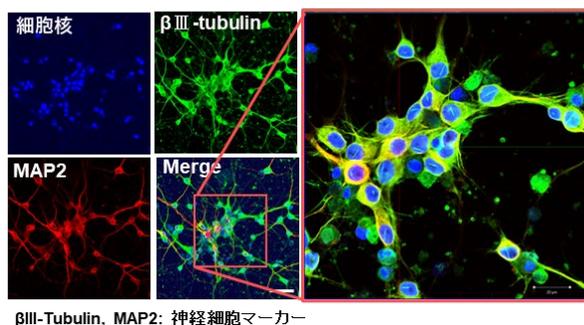
本研究では、これまで皮膚線維細胞からのダイレクトリプログラミングで神経細胞を産生する方法（参考文献 1）を利用して、NEUROD1, ASCL1, BRN2/POU3F2, ZIC1 という神経誘導に関連する 4 遺伝子をセンダイウイルス^(注 9)に搭載させて血液細胞に導入しました。しかしその結果、ほぼすべての細胞が神経細胞転換せずに死滅してしまいました。そこで我々は既に成功していた、末梢血液中の T 細胞からの iPS 細胞樹立技術を併用して、神経誘導 4 遺伝子と初期化 4 遺伝子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)の合計 8 遺伝子を導入しました。その結果、遺伝子導入後約 20 日で神経細胞が出現することを発見しました。これは細胞の初期化を完全には行わない部分的リプログラミングという方法の応用となります。さらに、細胞死による減少を極力抑える工夫をすることで、最初に利用した血液細胞数とほぼ同数の神経細胞を得ることができるようになりました。なお、本培養法の改良を続けた結果、bHLH 型転写因子である NEUROD1 遺伝子および初期化 4 遺伝子の合計 5 遺伝子のみでも神経細胞が産生できることを示すことができました。【図 1】

【図 1】

A 細胞培養のタイムコース



B 5因子誘導による
培養21日目の免疫染色画像



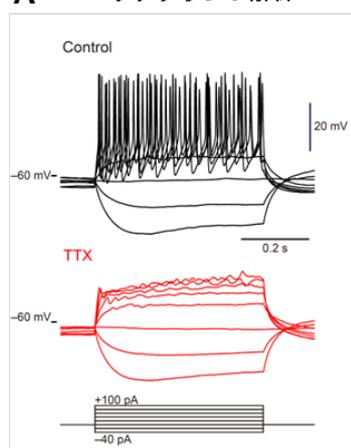
(2) グルタミン酸作動性神経細胞としての特性

産生された細胞の特徴を調べるために、電気生理的な記録としてパッチクランプ解析^(註10)を行ったところ、これらは確かに神経細胞に特有の Na^+ チャネルを介した電気活動を示すことが分かりました。また、Ca イメージング法^(註11)、および細胞外電位を多点電極アレイ^(註12)で測定したところ、神経細胞が示す電気的活動はグルタミン酸受容体の拮抗薬処理でほぼ消失することが分かりました。【図 2】

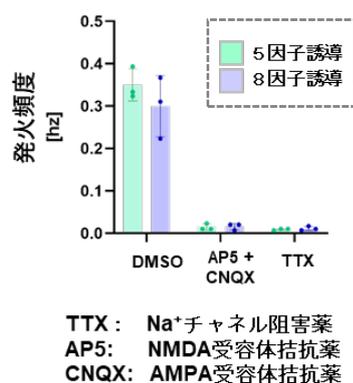
また、1細胞 RNA シーケンス (scRNA-seq) を含めた網羅的遺伝子発現解析において、グルタミン酸作動性神経細胞マーカーである VGLUT1/SLC17A7 などが高発現していることが分かりました。このことから、本研究で産生された細胞は主にグルタミン酸作動性神経細胞であることが示されました。【図 3A】

【図 2】

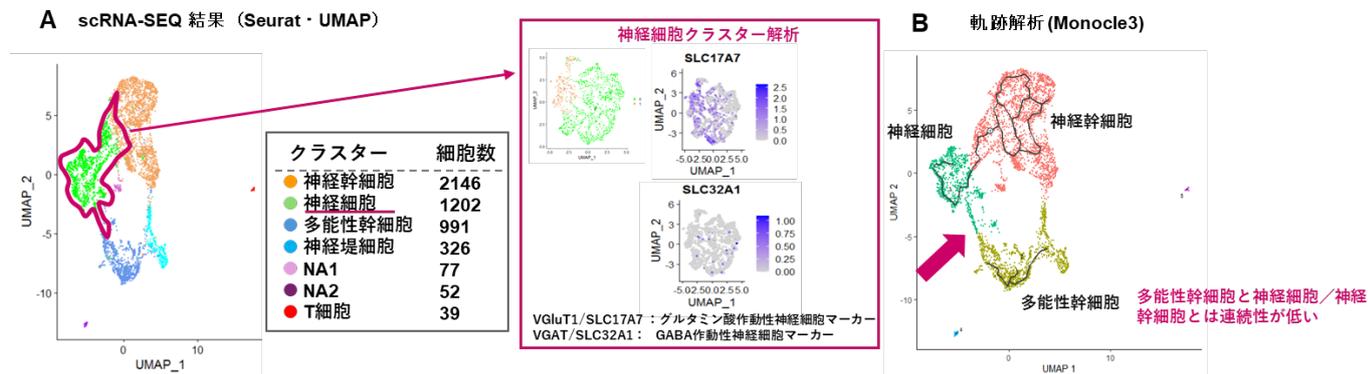
A パッチクランプ解析



B 多点電極アレイ解析



【図 3】



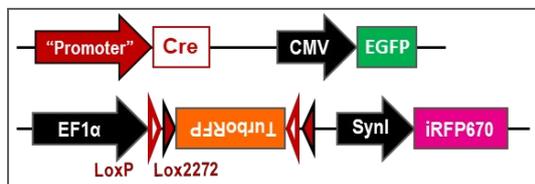
(3) 1細胞 RNA シーケンスおよび Cre-LoxP 技術による細胞系譜の解析

scRNA-seq の結果から、シャーレ内に得られた細胞は必ずしも神経細胞だけではなく、神経幹細胞あるいはより未分化な細胞も含まれることが分かりました。そこで scRNA-seq を再解析し、得られた神経細胞がどのような経路をたどって血液細胞から産生されてきたかの推定を行いました。分化軌道解析の結果、興味深いことに、シャーレに含まれていた未分化細胞は、遺伝子発現の傾向としては神経細胞や神経幹細胞との連続性が低いことが分かりました。【図 3B】 このことから、得られた神経細胞は iPS 細胞のような未分化細胞状態から神経分化したのではなく、やはり血液細胞から直接的に転換されたものと予想できました。

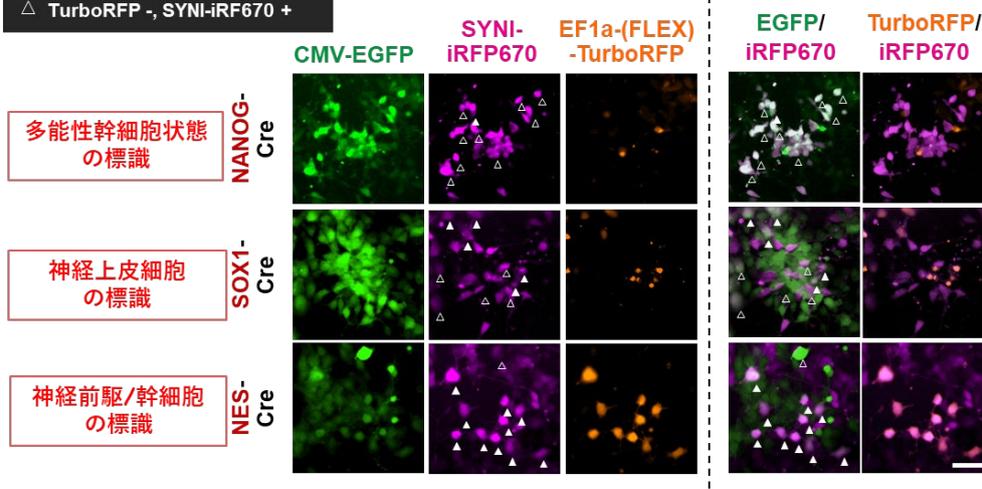
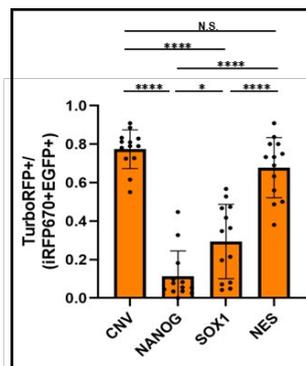
さらに我々は、神経細胞が実際に iPS 細胞状態を経由していないかどうかを実験的に実証するために、Cre-LoxP システムを用いた細胞系譜の解析を行いました。顕微鏡での観察結果から、得られた神経細胞のうち、神経幹細胞や神経前駆細胞状態を経由した細胞は多い(約 70%)ものの、より未分化な神経上皮細胞や多能性幹細胞状態を経由した細胞は少ない(それぞれ、約 30%、約 10%)ことが分かりました。このことから、本法の神経細胞の多くは初期化遺伝子を併用しているにもかかわらず、ほぼ直接的に血液細胞から神経細胞や神経幹細胞に転換されたものであると結論づけました。

【図 4】

Cre-LoxP システムによる細胞系譜解析



▲ TurboRFP +, SYNI-iRFP670 +
 △ TurboRFP -, SYNI-iRFP670 +

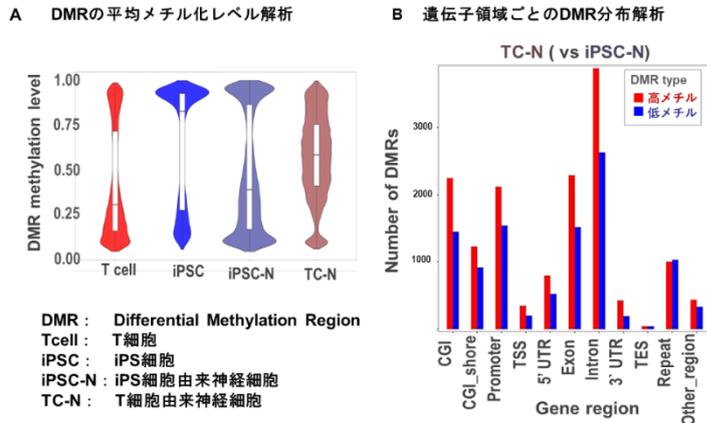


(4) DNA メチル化状態の解析によるエピジェネティックメモリーの評価

得られた神経細胞のほとんどが完全な未分化状態を経由しなかったことから、我々は、最初の体細胞が有していたエピジェネティックメモリーが消失することなく神経細胞に受け継がれているのではないかと考えました。そこで末梢血 T 細胞 (T cell) と本法によって得られた神経細胞 (TC-N)、および比較対象として、iPS 細胞 (iPSC) と iPS 細胞由来の神経細胞(iPSC-N)に対して、全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行いました。

この結果、本研究の TC-N は、iPSC-N と比較してゲノムの広範にわたって、末梢血 T 細胞と同じパターンの DNA メチル化が残存する傾向が得られました。一方、血液系細胞などで特有の免疫関連遺伝子群に関しては、TC-N よりも、iPSC-N の方で DNA メチル化が亢進していました。【図 5】 このことから、iPS 細胞由来の神経細胞とは異なり、本研究で得られた神経細胞は T 細胞が保有していたエピジェネティックメモリーを一部引き継ぐ可能性があると示されました。

【図 5】

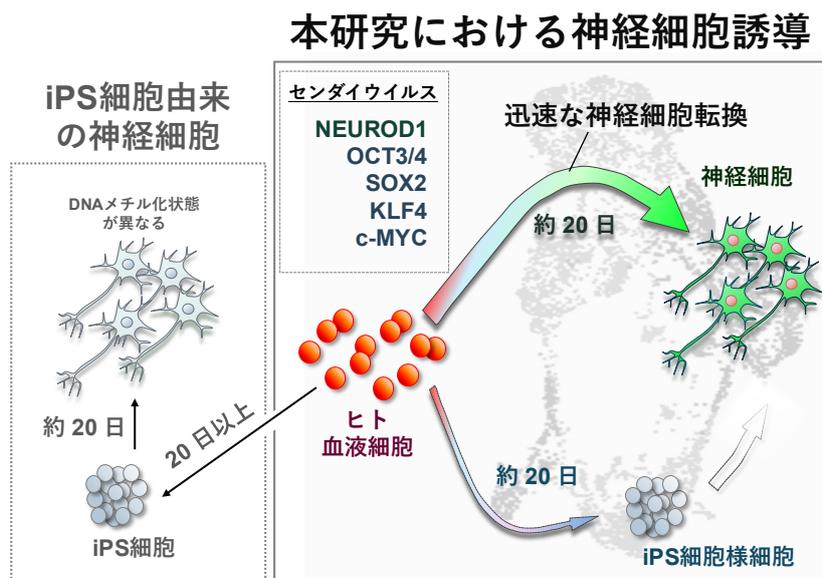


4. 今後の展開

本研究では末梢血 T 細胞に対して、bHLH 型転写因子 NEUROD1 および細胞初期化遺伝子を導入することで、機能的なグルタミン酸神経細胞を迅速かつ高効率に産生することができました。【図 6】

今回の技術を応用することで、迅速かつ簡便に、多くの神経疾患の患者さんの血液から神経細胞を作り出すことができるようになると考えられます。さらに、iPS 細胞由来の神経細胞では評価が難しかった、後天的に細胞が得たエピジェネティック状態に関与する病態についても解析ができるかもしれません。また、本法は完全には初期化させない、部分的リプログラミングという方法を応用しています。このような方法は若返りや病気の治療に応用できる可能性が示唆されています（参考文献 3）。そのためこの技術は、加齢などに伴う神経疾患に対する次世代の遺伝子治療としての側面を持ちます。このように本法は、病態解明・創薬・遺伝子治療のための新しいプラットフォームとなることが期待されます。

【図 6】



5. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）再生医療実現拠点ネットワークプログラム「神経疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解明と新規治療法の創出を目指した研究」、再生医療実用化研究事業「精神・神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬研究」、再生医療実現拠点ネットワークプログラム「小児てんかん性脳症の革新的創薬を見据えた病態解析」、再生医療実現拠点ネットワークプログラム「興奮/抑制均衡と神経変性疾患解析のための神経サブタイプ純化」、ゲノム研究を創薬等出口に繋げる研究開発プログラム「全ゲノムデータ基盤新規作用機序抗精神病薬探索プラットフォームの開発」、革新的先端研究開発支援事業「神経発達障害の病態解明を目指した革新的イメージングプラットフォーム」、再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム「造血幹細胞増幅技術を基盤とした改変造血・免疫細胞の創出と応用」、JSPS 科研費 JP26830018, JP17K10083, JP18H05435, JP20H03567, JP22K18388, JP23H02882, JP23KK0288、科学技術振興機構（JST）CREST（JPMJCR2124）、公益財団法人てんかん治療研究振興財団、公益財団法人武田科学振興財団、公益財団法人母子健康協会、理化学研究所運営交付金の助成を受けて実施されました。

<原論文情報>

英文タイトル： NEUROD1 efficiently converts peripheral blood cells into neurons with partial reprogramming by pluripotency factors

タイトル和訳： NEUROD1 は、多能性因子による部分的リプログラミングを併用することで、末梢血細胞を高効率に神経細胞へと転換させる。

著者名： Yoichi Saito^{1,2}, Mitsuru Ishikawa^{1,2,3*}, Mahito Ohkuma⁴, Jonathan Moody⁵, Yo Mabuchi⁶, Tsukasa Sanosaka², Yoshinari Ando⁵, Takayuki Yamashita^{4,7}, Chung Chau Hon^{5,8}, Jay W. Shin^{5,9,10}, Wado Akamatsu^{2,11}, Hideyuki Okano^{1,2,3*}

¹Keio University Regenerative Medicine Research Center, Kawasaki, Kanagawa 210-0821, Japan

²Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

³Division of CNS Regeneration and Drug Discovery, International Center for Brain Science (ICBS), Fujita Health University, 1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

⁴Department of Physiology, Fujita Health University School of Medicine, 1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

⁵RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

⁶Department of Clinical Regenerative Medicine, Fujita Medical Innovation Center, Fujita Health University, 1-1-4 Hanedakuko, Ota-ku, Tokyo 144-0041, Japan

⁷Division of Neurophysiology, International Center for Brain Science (ICBS), Fujita Health University, 1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

⁸Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

⁹Genome Institute of Singapore (GIS), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore 138672, Republic of Singapore

¹⁰Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Republic of Singapore

¹¹Center for Genomic and Regenerative Medicine, School of Medicine, Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, 113-8421, Japan

*Corresponding: Mitsuru Ishikawa and Hideyuki Okano

・ DOI

[10.1073/pnas.2401387122](https://doi.org/10.1073/pnas.2401387122)

<用語説明>

(注1) NEUROD1 遺伝子

神経細胞の発生・分化に関与する bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 型の転写因子のひとつ。神経幹細胞からグルタミン酸作動性神経細胞などに分化する際に細胞内で一過的に高発現することが知られている。また、マウスを用いた実験では、ミクログリア/マクロファージへの Neurod1 遺伝子導入によって神経細胞に転換させ、脳梗塞モデルマウスでの損傷後の神経機能を回復させることなどが示されている (参考文献 4)。

(注2) iPS 細胞

山中らによって 2006 年に報告された細胞 (induced-pluripotent stem cell : 人工多能性幹細胞)。体細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc などの転写因子を導入することで、多能性と自己複製能を持つ未分化状態に再プログラムされることで作成される。この細胞は、胚性幹細胞に類似した性質を持ち、さまざまな体細胞へと分化可能であることから、再生医療や疾患モデル、創薬研究への応用が期待されている。

(注3) ダイレクトリプログラミング および 部分的リプログラミング

ダイレクトリプログラミングは、体細胞に特定の転写因子などを導入して、iPS 細胞などの多能性状態を経ずに別の細胞型へ直接変換する手法。一方、部分的リプログラミングは、初期化遺伝子を一時的に導入し、多能性細胞には至らないが、細胞の分化状態を可塑的にしてから目的の細胞に誘導する方法。

(注4) グルタミン酸作動性神経細胞

中枢神経系で主に興奮性伝達を担う神経細胞で、神経伝達物質としてグルタミン酸を放出する。これらの細胞は、学習や記憶などの高次機能に関与し、NMDA 受容体や AMPA 受容体などを介してシナプス後電位を形成する。また、興奮毒性が神経疾患の一因とされ、研究対象として重要となっている。

(注5) 1 細胞 RNA シーケンス : scRNA-seq (Single-Cell RNA-sequence)

単一細胞ごとの遺伝子発現プロファイルを高解像度で解析する技術。細胞を個別に分離し、RNA を逆転写してシーケンスすることで、組織内の細胞多様性や細胞状態の変化を詳細に把握できる。発生過程の解析や病態解明、細胞系譜追跡などに広く応用されている。

(注6) バイサルファイトシーケンス

DNA のメチル化状態を高精度に解析する手法。DNA を亜硫酸水素ナトリウムで処理すると、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換され、メチル化シトシンは変換されずに残る。これを PCR 増幅しシーケンス解析することで、1 塩基レベルのメチル化マップが得られる。

(注7) Cre-LoxP システム

細胞や生物内で DNA 配列を部位特異的に切断・再構成する遺伝子操作技術のひとつ。Cre リコンビナーゼは、LoxP 配列を認識し、その間の DNA を切除・反転・挿入する。組織特異的・時期特異的な遺伝子発現やノックアウトに利用され、遺伝子機能解析において強力なツールとなっている。

(注8) エピジェネティックメモリー

DNA 配列自体の変化を伴わずに、細胞が経験した発現状態や分化の履歴を、メチル化やヒストン修飾などの形で記録・維持する仕組み。発生過程や細胞系譜の中で獲得された遺伝子発現パターンが細胞分裂後も娘細胞に受け継がれるとされている。また、加齢や環境因子、疾患状態に伴って蓄積されるエピジェネティック変化が、細胞の将来的な応答性や分化能力に影響を及ぼすと考えられている。

(注9) センダイウイルス

パラミクソウイルス科に属する一本鎖マイナス RNA ウイルス。哺乳類細胞への感染効率が高く、ウイルスベクターとして利用される。特に、ウイルスゲノムが宿主 DNA に組み込まれない「非統合型ベクター」として安全性が高く、iPS 細胞の作製に必要な初期化 4 遺伝子の導入など再生医療研究で広く活用されている。

(注10) パッチクランプ解析

細胞膜に微細な電極を密着させ、イオンチャネルを介する電流を高感度に測定する電気生理学的手法。細胞全体の電流や単一イオンチャネルの活動を解析可能で、神経細胞などの電気的特性や薬理作用の評価に用いられる。

(注11) Ca イメージング法

カルシウム感受性色素や蛍光タンパク質を用いて、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化を可視化・定量する技術。 Ca^{2+} は神経伝達や細胞内シグナル伝達などに重要で、その動態を時空間的に観察できる。特に神経細胞の活動評価において有用な手法である。

(注12) 多点電極アレイ

基板上に配置された複数の微小電極を通じて、神経細胞などの電気的活動を非侵襲的に長時間記録できる技術。細胞集団のスパイク活動、ネットワーク形成、薬物応答などをリアルタイムで解析可能で、再生医療や創薬スクリーニングに広く活用されている。

<参考文献>

1. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. 2011;476(7359):220-223.
2. Yoo AS, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*. 2011;476(7359):228-231.
3. Lu Y, et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature*. 2020;588(7836):124-129.
4. Irie T, et al. Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(42):e2307972120.

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 再生医療リサーチセンター センター長

藤田医科大学 精神・神経病態解明センター 神経再生創薬・研究部門 客員教授

岡野 栄之（おかの ひでゆき）

TEL : 044-276-2388 FAX : 044-276-2388 E-mail : hidokano@keio.jp

藤田医科大学 精神・神経病態解明センター 神経再生創薬・研究部門 講師

石川充（いしかわ みつる）

TEL : 0562-93-9573 E-mail : mitsuru.ishikawa@fujita-hu.ac.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室 向坂（さぎさか）

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640 E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp

<https://www.keio.ac.jp/>

学校法人 藤田学園(藤田医科大学) 広報部

TEL : 0562-93-2492 FAX : 0562-93-4597 E-mail : koho-pr@fujita-hu.ac.jp