

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07978

研究課題名(和文) ヒト脳オルガノイドを用いた神経変性疾患を引き起こすリピート病の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of repeat disease causing neurodegenerative disease using human brain organoids.

研究代表者

桐山 敬生 (Kiryama, Takao)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80571025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非翻訳領域のリピート延長を持つ神経変性疾患の病態は明らかになっていないことが多い。本研究ではヒト多能性幹細胞から疾患モデルとして利用を考慮できる脳幹オルガノイドを作製し、その特性とストレス下での遺伝子発現応答を明らかにした。また、ALSの原因遺伝子FUSのDNA修復タンパクとしての機能を調べ可視化するとともに、C9orf72の非翻訳領域のリピートから産生されるポリペプチドが、核内輸送受容体であるKap 2の相分離制御能を破綻させることを明らかにした。また、ポリペプチドが細胞骨格である中間径フィラメントと結合し細胞の硬さを増強し、細胞剥離を阻害し、機械的ストレス応答を悪化させることが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、非翻訳領域リピート病において毒性ポリペプチドが細胞機能障害を起こす病態メカニズムの一部が明らかとなった。また独自のプロトコールによる脳幹オルガノイドの特性を明らかにした。今後のオルガノイドの神経変性疾患モデルとして利用や、さらなる病態解明、治療法の開発へも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of neurodegenerative diseases associated with non-coding repeat expansion remains unclear. In this study, we generated brainstem organoids from human pluripotent stem cells that can be used in disease models and elucidated their characteristics and gene expression responses under stress. We also investigated and visualized the function of FUS, the causative gene of ALS, as a DNA repair protein. We also showed that polypeptides produced from non-coding repeat expansion of C9orf72 disrupt the phase separation regulatory ability of Kap 2, a nuclear transport receptor. In addition, we found that polypeptides bind to intermediate filaments and enhance cell stiffness, inhibit cell detachment, and exacerbate the mechanical stress response.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 非翻訳領域リピート病 筋萎縮性側索硬化症 脳オルガノイド FUS C9orf72

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患のなかでも非翻訳領域のリピート延長を持つ疾患の病態メカニズムはまだ明らかでないことが多い。前頭側頭型認知症を合併する筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因となる *C9orf72* 遺伝子では非翻訳領域であるイントロン内の繰返し配列 ((GGGGCC)*n*) の延長が明らかになっている。また、*NOP56* 遺伝子のイントロン内にも 6 塩基の繰返し配列の延長が原因となる SCA36 では小脳失調症状のほか ALS に似た症状を引き起こすことが分かっている。また ALS の原因遺伝子である *FUS* は RNA 結合タンパク質であり、低複雑性 (LC: low-complexity) ドメインを持ち、相分離して細胞内の膜のないオルガネラにおいて機能している。繰返し配列による遺伝子変異はこの相分離を破綻させることが推測されている。これらの病態の関連はまだ不明な点が多く、病態を再現するオルガノイドを用いた研究はまだ十分になされていない。

2. 研究の目的

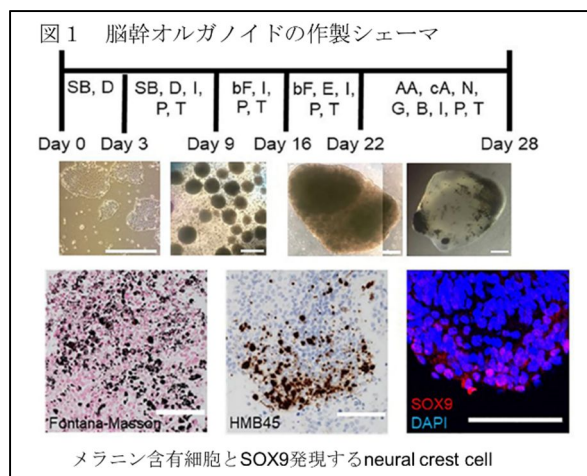
疾患モデルとなる脳幹オルガノイドの作製し、その特性を明らかにするとともに、ALS などの神経変性疾患の分子病態メカニズムにおいて、*FUS* と *C9orf72* の遺伝子非翻訳領域のリピートがどのように病気を引き起こすかを解明するために研究を行った。

3. 研究の方法

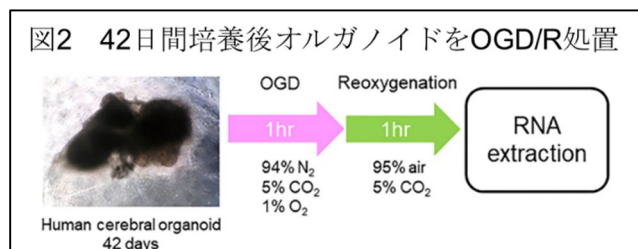
ヒト多能性幹細胞由来の脳幹オルガノイドの作製とその特性を免疫組織染色、qPCR、RNA-seq、トランスクリプトミクス解析を行い、脳オルガノイドを低酸素・低栄養状態 (oxygen glucose deprivation / reoxygenation : OGD/R) におけるストレス下での変化をトランスクリプトーム解析、qPCR 法による遺伝子発現解析を行った。また、ALS の原因遺伝子であり RNA 結合タンパクの機能をもつ *FUS* の DNA 修復タンパクとしての機能と *C9orf72* の非翻訳領域の繰返し配列から産生されるポリペプチドに注目し、相分離制御機能を持つシャペロンとの関係や、細胞骨格への影響を、生化学的解析や生物物理学的解析を用いて分野横断的に解析を行った。

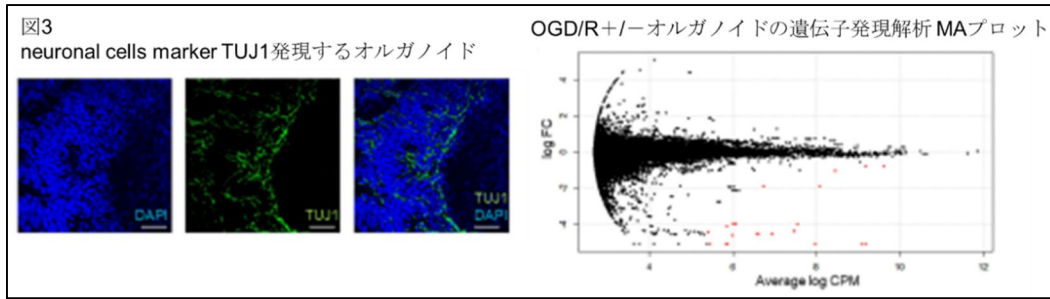
4. 研究成果

ヒト多能性幹細胞から大脳皮質オルガノイドを作製するプロトコールに bFGF、EGF を添加するなど幾つかの変更点を加え、黒色のオルガノイドを作製しその特性を解析した。免疫組織染色にて脳幹への発生過程における神経堤細胞に重要な SOX9 の発現、中脳を含む前脳構造の発達に重要な神経幹/前駆細胞マーカーである SOX2、ASCL1、SLC1A3、OTX2 の発現、ドーパミン作動性ニューロンへの分化に関連する FOXA2、NR4A2、SOX6 の発現、メラノサイトの発現を確認し、qPCR、RNA シーケンスの結果から中脳、後脳前駆細胞を含むヒト脳幹の細胞集団と類似していることを明らかにした。パーキンソン病などの脳幹に病変を含む変性疾患のモデルにつながると思われた。(図 1)



ヒト多能性幹細胞由来の脳オルガノイドを用い、OGD/R におけるストレス下での遺伝子発現変化を解析し MA プロットで示した。(図 2、3) TTR、AHSG、FGG、FTL などの遺伝子発現が低下し、ピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) が上昇していた。また、脳オルガノイドで脂肪酸にも関連する PPAR シグナル伝達経路の遺伝子発現が低下し、OGD/R に対する影響を強くうける重要なマーカーであることが明らかになった。脳虚血や低栄養ストレス下でのオルガノイドの遺伝子発現の変化を捉えることができた。





C9orf72 遺伝子異常の家族性 ALS では、遺伝子の非翻訳領域のリピートにおいて、リピート関連 ATG 非依存性 (RAN) 翻訳が生じ毒性ポリペプチドが生じ、病気の原因となっている考えられているが、同じく遺伝性 ALS の原因遺伝子 *FUS* との関係については不明な点が多い。そこで、まず、laser micro-irradiation 法を用いて、GFP 融合 *FUS* の発現した細胞の核内に DNA 損傷を起こし、経時的な GFP 融合 *FUS* の DNA 損傷部位への集積の変化を可視化する方法を確立した。(図 4) また 3D 画像でその集積の様子を捉えた。(図 5) DNA 損傷後の *FUS* の集積は 3 分以内に始まり、6~25 分で GFP 融合 *FUS* は褪色していくものが多いが、一部の細胞では 1 時間以上集積が続くものも見られた。(図 6) 照射後 3 時間経過すると核内に *FUS* を含んだ凝集体が見られる細胞もあった。また、*C9orf72* 遺伝子の RAN 翻訳により産生される毒性 PR ポリペプチドを培養液に加え、ポリペプチド存在下でも同様の DNA 損傷とその修復が起こるかも検討したが、細胞周期から考えると考えられる集積の差など不確定要素も多くあり優位な変化を確認できなかったが、さらに複数の条件を調整して調べる必要があると考えられた。また、患者由来の線維芽細胞、iPS 細胞を取得できたため、それらを用いることで *FUS* の DNA 修復の機構と PR ポリペプチドの関連を明らかにすることにつながるのではないかと考えられた。

図 4 DNA 損傷時の *FUS* の修復機能の可視化
laser micro-irradiation 法による DNA 損傷部位への *FUS* の集積

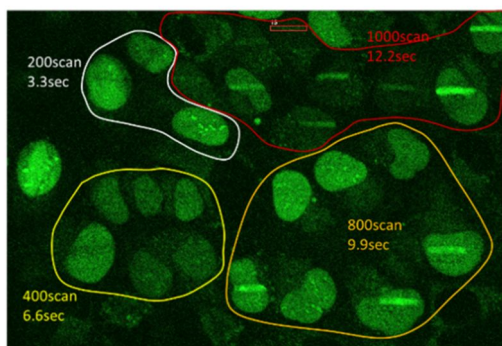


図 5 *FUS* の集積の 3D 動画

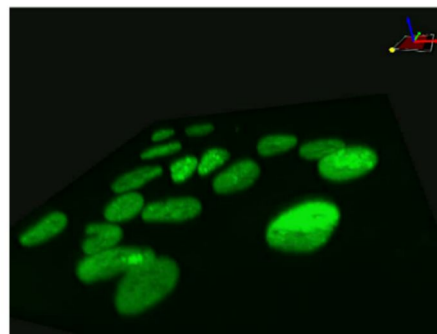
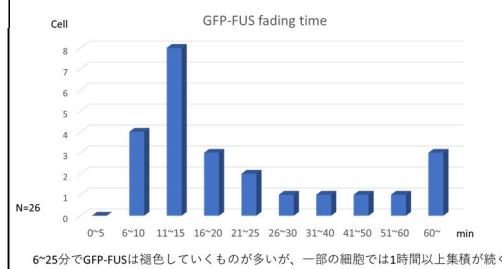
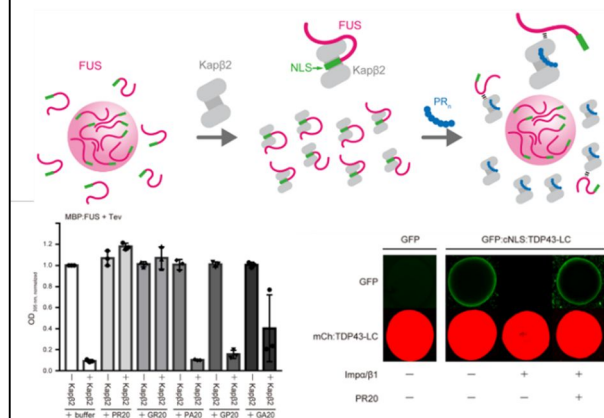


図 6 micro irradiation 後の GFP-*FUS* の集積時間

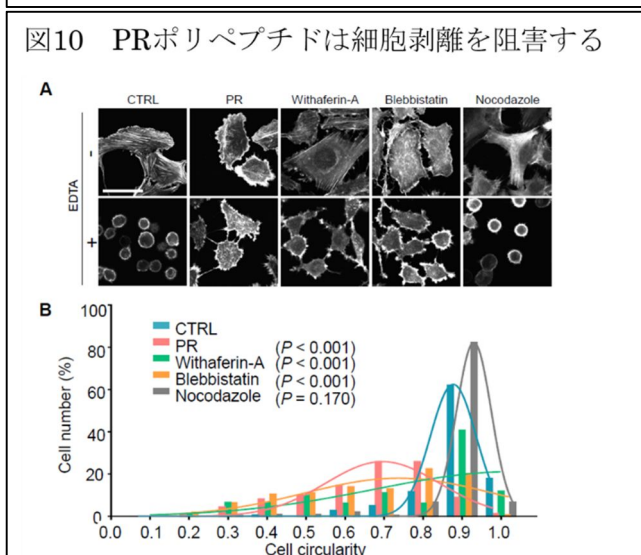
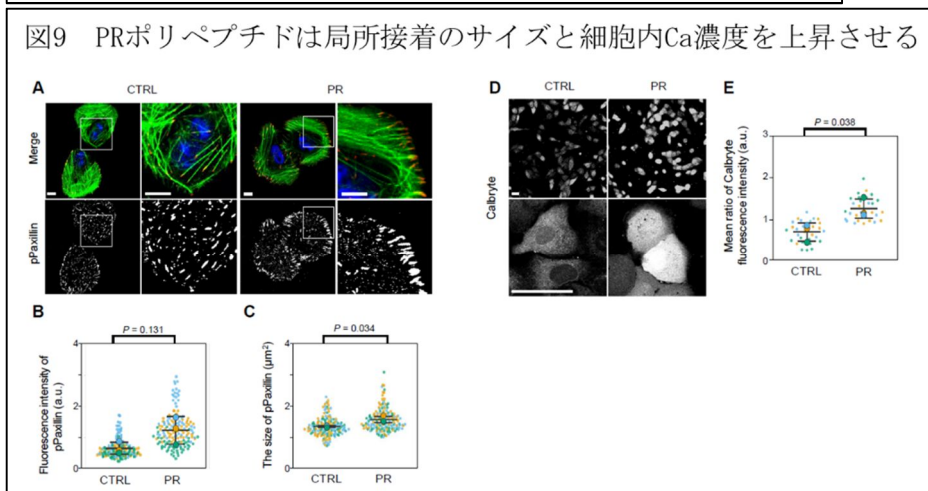
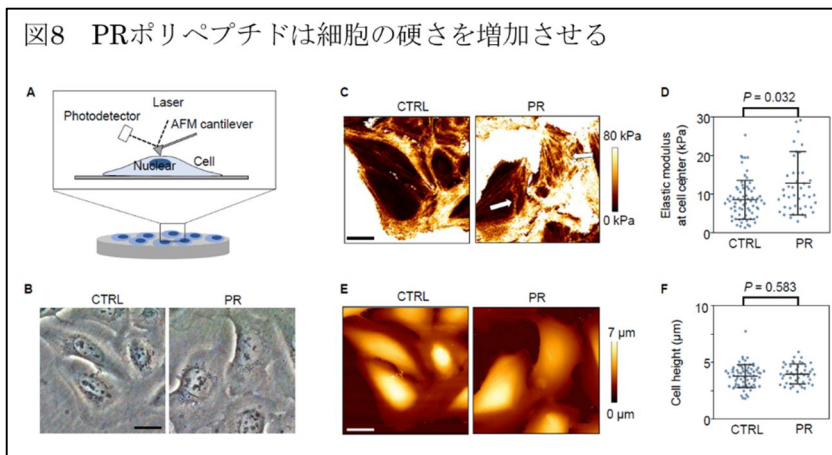


また、*C9orf72* 遺伝子の (GGGGCC)_n から RAN 翻訳によって産生される毒性ポリペプチドが核内輸送受容体に結合して核-細胞質間の物質輸送を阻害する詳細なメカニズムを解析した。5 種類の毒性ポリペプチドが核内輸送受容体である Karyopherin 2 (Kap 2) の相分離制御能に与える影響を解析した。精製タンパク質を用いた濁度評価やヒドロゲル結合法等により、アルギニンを多く含む毒性ポリペプチドである GR_n および PR_n が、Kap 2 の相分離能を阻害することが明らかになった。(図 7)

図 7 毒性ペプチドによる相分離シャペロンの機能阻害



C9orf72 由来の PR ポリペプチドが細胞骨格と局所接着に及ぼす影響と機械的特性やストレス応答に当影響するかを調べた。PR ポリペプチドは中間径フィラメントと結合しメッシュネットワーク構造を促進し、細胞の硬さを増強していることが明らかになった。(図 8) また、局所接着のサイズと細胞内 Ca 濃度を増加させ、細胞剥離を阻害することで、細胞の機械的ストレスへの応答が悪化することが明らかになった。(図 9、10)



本研究から ALS をはじめとする神経変性疾患の病態解明、治療法の開発につながる事が期待される。今後、患者由来の iPS 細胞を用いたオルガノイドの解析も加えて研究進展することが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Eura Nobuyuki, Matsui Takeshi K., Luginbuhl Joachim, Matsubayashi Masaya, Nanaura Hitoki, Shiota Tomo, Kinugawa Kaoru, Iguchi Naohiko, Kiriyama Takao, Zheng Canbin, Shin Jay W., Sugie Kazuma, Mori Eiichiro et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Brainstem Organoids From Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa Naoki, Matsui Takeshi K., Iguchi Naohiko, Kinugawa Kaoru, Morikawa Naritaka, Kiriyama Takao, Mori Eiichiro, Sugie Kazuma et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Gene Expression Profiles of Human Cerebral Organoids Identify PPAR Pathway and PKM2 as Key Markers for Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.605030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano, Uehara Takeru, Aiba Yuichiro, Kiriyama Takao, Sugie Kazuma, Saio Tomohide, Yoshizawa Takuya, Mori Eiichiro et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Isozumi Noriyoshi, Kiriyama Takao, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 C9orf72-Derived Proline:Arginine Poly-Dipeptides Modulate Cytoskeleton and Mechanical Stress Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.750829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桐山敬生、井口直彦、江浦信之、杉江和馬 奈良県立医科大学 脳神経内科学
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症 III型患者のヌシネルセン治療における多種項目による治療効果判定
3. 学会等名 第37回神経治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉江 和馬 (Sugie Kazuma) (60347549)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	松井 健 (Matsui Ken) (90528605)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・特任講師 (15201)	
研究分担者	七浦 仁紀 (Nanaura Hitoki) (00827909)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	
研究分担者	塩田 智 (Shiota Tomo) (70837062)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	井口 直彦 (Iguchi Naohiko) (50838232)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------