

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16606

研究課題名（和文）ヒト脳オルガノイドを用いた難治性中枢神経疾患の病態解明

研究課題名（英文）Investigation of pathology of intractable central nervous disorders using human brain organoids

研究代表者

江浦 信之（Eura, Nobuyuki）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30745360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ZEB2遺伝子欠損により生じるMowat-Wilson症候群は、難治性てんかん、小脳症、精神発達遅滞、腎低形成、Hirschsprung病など、多彩な症状をきたす。病態機序解明・治療法開発に向けて、脳オルガノイドを用いた疾患モデルを作成、その表現型を解析することを目的とした。申請者はCRISPR/Cas9を用いてZEB2ノックアウト（KO）ヒトES細胞を作製し、それを用いて大脳皮質オルガノイド（CO）、脳幹オルガノイド（BSO）を樹立。定量PCR、免疫組織化学、一細胞RNA sequencingを行い、野生型とZEB2ノックアウトCO/BSOの比較を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の鍵となる実験技術は、ヒト脳オルガノイドとCRISPR/Cas9によるゲノム編集である。2013年に初めて脳オルガノイドが樹立されて以降、その樹立手法を改良した論文は数多くあるが、脳オルガノイドを用いて中枢神経難病の発症メカニズムを詳細に解明した報告はない。特に、本研究のように、脳幹オルガノイドを用いた研究はない。脳オルガノイドを用いてZEB2欠損によるMowat-Wilson症候群（MWS）の病態を明らかにすることにより、その治療法の開発が期待できるだけでなく、大脳皮質オルガノイド、脳幹オルガノイドの疾患モデルとしての有用性が示され、他の中枢神経難病の研究に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mowat-Wilson syndrome (MWS), caused by ZEB2 gene deficiency, has a variety of symptoms including refractory epilepsy, microencephaly, mental retardation, renal hypoplasia, and Hirschsprung's disease. The purpose of this study is to generate a disease model using brain organoids and analyze its phenotype in order to elucidate the pathomechanism and develop a treatment for MWS. We generated ZEB2 knockout (KO) human ES cells using CRISPR/Cas9 technology and established cortical organoids (CO) and brainstem organoids (BSO). Quantitative PCR, immunohistochemistry, and single-cell RNA sequencing were performed to compare wild-type and ZEB2 knockout CO/BSO.

研究分野：神経発生学

キーワード：オルガノイド Mowat-Wilson症候群 ZEB2 シングルセル解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性のてんかんや精神発達遅滞を来す疾患の一つである Mowat-Wilson 症候群は、出生直後より精神発達遅滞やてんかん、脳・腎臓の形成不全、低身長や腸管の運動障害など、多岐にわたる症状を呈する。原因遺伝子である ZEB2 (Zinc finger E-boxbinding homeobox 2) 遺伝子は 1 胎生期ヒト大脳において発現が確認されており、本遺伝子の機能喪失型変異によって Mowat-Wilson 症候群が生じる。

これまでヒト脳の発生過程を再現可能な実験系が存在しなかったため、本疾患の発生機序について、ヒト細胞を用いて行われた研究報告はほぼ皆無であった。最近、試験管内でヒト ES 細胞からヒト大脳皮質や中脳の構造を再現した細胞塊(オルガノイド)を樹立できることが報告され、さらに CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、特定遺伝子をノックアウトしたヒト ES 細胞を得ることも可能になった。これらの技術を用いて、特定の遺伝子をノックアウトした ES 細胞からオルガノイドを樹立することで、特定の疾患モデルを作製することが可能となっている。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集で得た ZEB2 ノックアウトヒト ES 細胞からヒト大脳皮質/脳幹オルガノイドを樹立し、ZEB2 遺伝子欠損患者の脳発生の過程を試験管内で再現することにより、Mowat-Wilson 症候群の病態機序解明を試みる。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 を用いて ZEB2 ノックアウト (KO) ES 細胞を作製した。既報告の手法を用いて大脳皮質オルガノイド (CO) を作製、また、Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)、Glial cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) などの growth factor を加えることにより、脳幹オルガノイド (BSO) を作製し、それぞれ 1 か月間培養した。また、野生型 (WT) CO、BSO を作製し、1 か月間培養した。

作製した WT-CO と ZEB2KO-CO、および WT-BSO と ZEB2KO-BSO の形質を比較するため、表現型の観察、単一細胞 RNA シークエンス (scRNA-seq)、定量的 PCR、免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

ZEBKO-CO は WT-CO と比較してオルガノイド径が有意に小さかった。また WT-CO では突起を有するなど不整な形態を示すのに対し、ZEB2KO-CO は平滑な円形を呈していた。ZEB2KO-CO の免疫組織化学では、activated caspase-3 陽性 apoptotic cells が WT-CO に比較して有意に増加していた。

一方 WT-BSO には黒色斑がみられることを 2020 年に論文報告した (Eura N et al., Front Neurosci 2020) が、ZEB2KO-BSO では WT-BSO と比較してある特異なフェノタイプが観察された。scRNA-seq の結果、ZEB2-KO BSO では、pluripotency や、神経堤細胞の移動に関連する遺伝子群の発現が WT-BSO と比較して低下していた。また、表現型として見られた特異的な所見を反映する遺伝子発現の低下も確認された。

これらの結果から ZEB2KO オルガノイドは WT オルガノイドと比較して明瞭なフェノタイプを有していた。ZEB2 遺伝子の多機能性を反映したこれらの結果は、Mowat-Wilson 症候群の病態を理解するうえで重要な所見と考えられた。

5. 主な発表論文

Eura N, Matsui TK, Luginbühl J, Matsubayashi M, Nanaura H, Shiota T, Kinugawa K, Iguchi N, Kiriya T, Zheng C, Kouno T, Lan YJ, Kongpracha P, Wiriyasermkul P, Sakaguchi YM, Nagata R, Komeda T, Morikawa N, Kitayoshi F, Jong M, Kobashigawa S, Nakanishi M, Hasegawa M, Saito Y, Shiromizu T, Nishimura Y, Kasai T, Takeda M, Kobayashi H, Inagaki Y, Tanaka Y, Makinodan M, Kishimoto T, Kuniyasu H, Nagamori S, Muotri AR, Shin JW, Sugie K, Mori E. Brainstem organoids from human pluripotent cells. Front Neurosci 2020 Jun 26. doi: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00538>

Brainstem organoids from human pluripotent stem cells accommodate multiple types of cell population.

Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Kaoru Kinugawa, Naohiko Iguchi, Takao Kiriyaama, Eiichiro Mori, Kazuma Sugie. 第 61 回日本神経学会学術大会 , 岡山市 (岡山コンベンションセンター) , 8.31-9.2 , 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eura N, Matsui T, Luginbuhl J 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 538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00538. eCollection 2020.	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 該当する

〔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 Nobuyuki Eura, Takeshi Matsui, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Kaoru Kinugawa, Naohiko Iguchi, Takao Kiriyama, Eiichiro Mori, Kazuma Sugie
2. 発表標題 Brainstem organoids from human pluripotent stem cells accommodate multiple types of cell population
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------