

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15297

研究課題名（和文）ヒト血液脳関門のモデル構築を基礎にしたゴーシェ病神経機能障害の病態解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of Gaucher disease neurological dysfunction on the basis of the construction of a model of the human blood-brain barrier

研究代表者

白井 玲美奈（Shirai, Remina）

東京薬科大学・生命科学部・嘱託助教

研究者番号：40870754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ゴーシェ病はグルコセレブロシドが全身の組織に蓄積し中枢神経障害を起こす。既存の酵素補充薬は血液脳関門により通過が困難であり、神経症状に対する効果は期待できない。本研究ではヒト細胞から血液脳関門モデルを構築し、ゴーシェ病の機能障害を解明した。まず健康者およびゴーシェ病由来iPS細胞から血管内皮細胞、神経細胞、ミクログリアを誘導した。神経幹細胞とミクログリアを共培養しviabilityを検討したところ、ゴーシェ病由来神経幹細胞の生存数が有意に減少していた。またヒト初代培養ペリサイトをCRISPR mRNAの導入によりゴーシェ病様ペリサイトを樹立し、ペリサイトマーカーの発現に差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに動物細胞を用いた血液脳関門モデルが開発されたが、血液脳関門トランスポータータンパク質発現量がヒトと動物で異なる、という難点がある。本研究はこれらの問題点を克服すべく、全ての血液脳関門モデル細胞をヒト細胞から樹立すべく立案された。またゴーシェ病様神経細胞、ミクログリア、ペリサイトを用いてゴーシェ病の障害機能解明を行った。本研究によりゴーシェ病の根治療法の開発が進展することは非常に意義が高く、これまで血液脳関門の存在により治療が困難だった神経疾患の治療法開発という点でも社会劇意義は特に大きい。

研究成果の概要（英文）：In Gaucher's disease, glucocerebroside accumulates in tissues throughout the body and causes central nervous system damage. Existing enzyme replacement drugs have difficulty in passing through the blood-brain barrier and are unlikely to be effective against the neurological symptoms. In this study, a blood-brain barrier model was constructed from human cells to elucidate the dysfunction of Gaucher disease.

First, vascular endothelial cells, neurons and microglia were induced from healthy subjects and Gaucher disease-derived iPS cells. When neural stem cells and microglia were co-cultured and their viability was examined, the number of surviving neural stem cells derived from Gaucher's disease was significantly reduced. Gaucher disease-like pericytes were also established by transfection of primary cultured human pericytes with CRISPR mRNA, and there was no difference in the expression of pericyte markers.

研究分野：神経科学

キーワード：ゴーシェ病 iPS細胞 血液脳関門 CRISPR

1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病は数万人に一人の割合で発症し、β-グルコシダーゼ (GBA) 変異により糖脂質のグルコセレブロシドが全身の組織に蓄積し中枢神経系に障害が起こる難病である。本邦では乳幼児期から小脳失調や痙攣といった中枢神経症状を呈する神経型が3分の2を占めている。ゴーシェ病の治療には主に酵素補充療法が行われるが、酵素が血液脳関門 (Blood Brain Barrier; BBB) を通過できないため、神経症状に対する効果が乏しいことが問題である。

BBBは末梢から中枢への異常な物質透過を抑制する役割を担っており、500 Da以上の分子の100%、それ以下の低分子でもその98%を透過させない。BBBは脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトで構成され、さらにその周囲の神経細胞、ミクログリアなどの細胞間相互作用により中枢神経の機能が維持されている。近年、これらを統合した神経血管ユニットの概念を理解することが、中枢神経疾患の解明につながると考えられているが、これまでの中枢神経疾患の治療には、神経細胞のみに着目し、これを標的とするものがほとんどであった。

これまで動物細胞を用いた *in vitro* BBB モデルが開発されているが、ヒトと動物では BBB トランスポーター蛋白質発現量が著しく異なり、この差が有用な治療薬等の開発の足枷になっているのが現状である。このように現存する *in vitro* BBB モデルはヒトモデルとしては不十分で、化合物の BBB 透過予測が不確実であり、これが中枢神経治療薬の上市率が低いことの原因となっていると思われる。

2. 研究の目的

本研究は、全ての BBB ユニットのヒト細胞で作製するモデルを構築するため立案された。ゴーシェ病における治療において酵素が BBB を通過できないことは問題であるが、そもそも、中枢神経系の機能の異常においても不明な点が多い。新規治療薬の候補は、それが BBB を透過し、かつ中枢神経細胞の機能を改善することが求められる。そこで本研究では、ヒト由来 *in vitro* BBB モデルの構築と、ゴーシェ病の中枢神経障害機能解明を目指した。

3. 研究の方法

まず、ヒト由来血液脳関門モデルを構築した。健康者由来またはゴーシェ病由来 iPS 細胞から血管内皮細胞をそれぞれ 1 クローンずつ誘導した。iPS 細胞を内皮細胞の誘導因子 (BMP4, basic-FGF) 存在下で 6 日間培養し、内皮細胞マーカーの PECAM-1 と VE-cadherin ポジティブな分画をソートした。血管内皮細胞に誘導後、蛍光免疫染色によって PECAM-1 と VE-cadherin の発現を確認した。次に、ゴーシェ病はライソゾーム内の GBA の異常によって引き起こされるため、ライソゾームマーカーである Lysotracker で蛍光染色し、その area と intensity を測定した。また、ゴーシェ病の病態と関連すると想定される中枢神経機能解析のために、iPS 細胞から神経細胞とミクログリアを誘導した。iPS 細胞から神経幹細胞を誘導し、神経細胞とミクログリアへの分化誘導を行った。神経細胞は分化後 10% KnockOut Serum Replacement /DMEM 下で維持培養した。ミクログリアは iPS 細胞から胚様体の形成後、マクロファージ前駆細胞を経て、IL-4、GM-CSF 存在下で誘導した。より成熟したミクログリアを維持するため、健康者由来神経細胞との共培養を試みた。

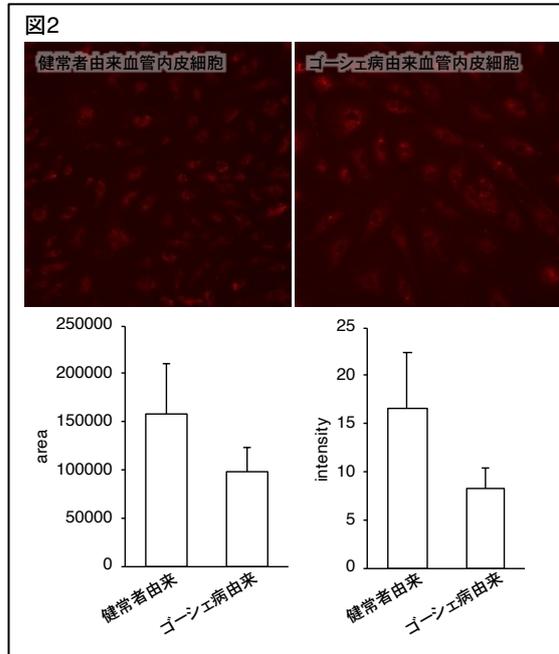
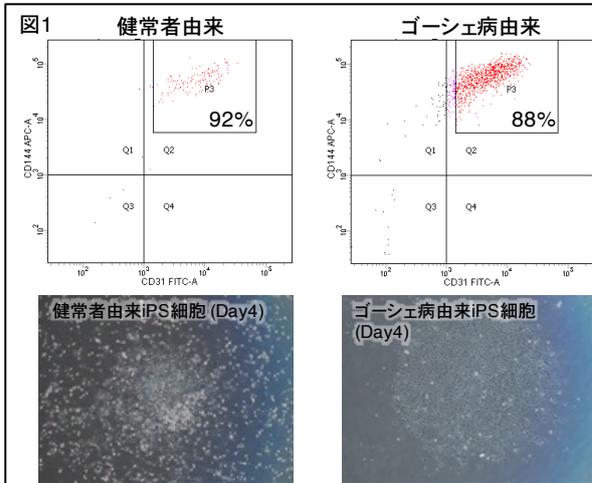
次に、ヒト初代培養神経細胞やペリサイトにおいて、CRISPR-CasRx を用いた GBA のノックダウンを行った。ヒト GBA の mRNA 情報を NCBI からダウンロードし、CRISPR mRNA を設計した。mRNA の設計には ApE を使い、ガイド RNA を付加した 2 種類の CRISPR mRNA を作製した (表 1)。

ghGBA1-81 sense	gatccGCACCCGTGCAAAAATGCAGGGGTCTAAAACattgcttctactcaggcagtgTTTTTat
ghGBA1-81 antis	cgatAAAAAAcactgcctgaagtagaagcaatGTTTTAGACCCCTGCATTTTTGCACGGGTGCg
ghGBA1-129 sense	gatccGCACCCGTGCAAAAATGCAGGGGTCTAAAACcatcctaagctcggtctacTTTTTat
ghGBA1-129 antisense	cgatAAAAAAgtagccgaagcttttagggatGTTTTAGACCCCTGCATTTTTGCACGGGTGCg

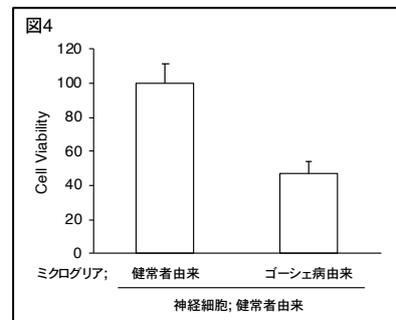
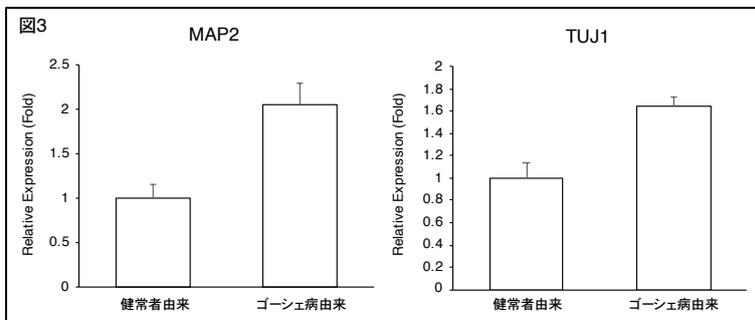
続いてヒト初代培養ペリサイトに 2 種類の CRISPR mRNA を遺伝子導入し RT-PCR 法でノックダウン効率を確認した。どちらでも GBA の発現が減少していたことから CRISPR mRNA の樹立に成功した。またペリサイトにおけるヒト GBA の発現を qRT-PCR 法で検討した。さらに蛍光免疫染色でペリサイトマーカーである α-smooth muscle の発現を確認した。

4. 研究成果

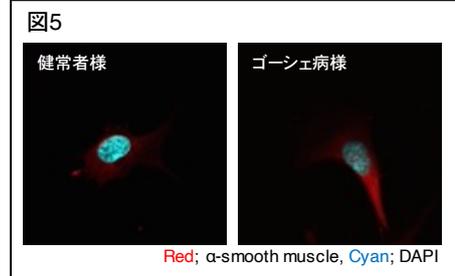
健常者由来またはゴーシェ病由来 iPS 細胞から分取した健常者またはゴーシェ病由来血管内皮細胞において、それぞれ 92%、88%の誘導効率がそれぞれ得られた (図 1)。蛍光免疫染色によって内皮細胞マーカーである PECAM-1 と VE-cadherin の発現を確認したところ、その発現には差は見られなかった。次に Lysotracker で蛍光染色したところ、ゴーシェ病由来血管内皮細胞は、健常者由来と比較して、area と intensity がともに有意に減少していたことから、疾患細胞内におけるライソゾームの減少が示唆された。これは、他のライソゾーム病であるファブリー病由来血管内皮細胞でも同様の結果であった (図 2)。



得られたミクログリアにおける神経幹細胞マーカーや神経細胞マーカーの発現を qRT-PCR で検討したところ、健常者由来と比較してゴーシェ病由来ミクログリアでは MAP2 と TUJ1 の mRNA 発現が有意に増加していた (図 3)。次に、WST-8 アッセイによって細胞の viability を検討した。健常者由来と比較してゴーシェ病由来ミクログリアとの共存により、神経幹細胞の生存数が有意に減少していた (図 4)。



最後に初代培養ペリサイトにおけるヒト GBA の発現を qRT-PCR 法で検討したところ 2 種類の CRISPER mRNA を導入したペリサイトでは GBA の発現が減少しており、ゴーシェ病様ヒトペリサイトの作製に成功したことを確認した。さらに蛍光免疫染色でペリサイトマーカーである α -smooth muscle の発現に変化がなかったことから GBA の遺伝子導入によるペリサイトには影響がないことを確認した (図 5)。



本研究によりゴーシェ病由来 iPS 細胞から神経細胞・ミクログリア・血管内皮細胞の誘導に成功し、ゴーシェ病由来では血管内皮細胞におけるライソゾームの機能障害とミクログリアにおける機能異常が示唆された。また、ヒト初代培養ペリサイトへの遺伝子導入によりゴーシェ病様ペリサイトの樹立に成功し、ペリサイトマーカーに異常がないことが明らかとなった。今後、トランスウェルを使用した共培養による BBB モデルの構築と、更なる機能解明を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------