

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02781

研究課題名(和文)患者神経幹・前駆細胞由来ミニブレインによる脳形成異常の病態解明と治療分子標的探索

研究課題名(英文)Elucidation of molecular pathomechanisms and the search for therapeutic targets of brain malformations, by employing cerebral organoids generated from patients-derived neural stem/progenitor cells

研究代表者

伊東 恭子 (Itoh, Kyoko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：変異FGFR3を導入したヒト神経幹・前駆細胞(NSPCs)亜株群から脳オルガノイドを構築し、脳形成異常の分子機序・シグナル伝達経路を顕在化させる研究を続行してきたが、in vitroヒト脳モデルとして限界があった。そのため、二次元培養モデルで、NSPCsの一次繊毛に着目した制御動態(Ciliopathy)と脳形成異常の関連を明らかにする研究に切り替えた。変異FGFR3導入、LIF作用により、NSPCsの一次繊毛の有意な短縮化が生じ、さらにJAK-STAT3経路が関与することを見いだした。今後、STAT3によって発現変動が誘導される繊毛関連遺伝子群、STAT3と微小管の直接作用を解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異FGFR3を導入したヒト神経幹・前駆細胞(NSPCs)から脳オルガノイドを構築し、脳形成異常の分子機序を顕在化させる研究は、in vitroヒト脳モデルとして限界があった。そこで、NSPCsの一次繊毛の制御動態(Ciliopathy)が脳形成異常の基盤にあると仮説を立て、二次元培養モデルで、変異FGFR3導入、白血病阻害因子(LIF)作用により、NSPCsの一次繊毛の有意な短縮化が生じ、さらにJAK-STAT3経路が関与することを見いだした。今後、STAT3によって発現変動が誘導される繊毛関連遺伝子群、STAT3と微小管の直接作用を解析することで、繊毛病としての脳形成異常の本態に迫る。

研究成果の概要(英文)：We generated cerebral organoids from human fetus-derived neuronal stem/progenitor cells (NSPCs) which were transfected by mutated FGFR3 genes and evaluated molecular pathogenesis of abnormal brain development, however; this in vitro model has not worked well. We, then, started to analyze function and regulation of primary cilia of NSPCs, because cilia are assumed to be involved in abnormal brain development (ciliopathy). The NSPCs transfected by mutated FGFR3 showed significantly shorter in the length of cilia as compared to those transfected with normal FGFR3. In addition, LIF (Leukemia inhibitory factor) treatment induced a significant shortening of primary cilia of normal NSPCs, being regulated by JAK-STAT3 pathway. We plan to evaluate expression level of cilia-related genes and spatiotemporal STAT3 expression under LIF treatment in order to evaluate functional relationship between microtubules and STAT3 protein.

研究分野：発生神経生物学、神経病理学

キーワード：胎児医学 脳形成異常 神経幹・前駆細胞 脳オルガノイド 一次繊毛 繊毛病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 先進諸国で希子超高齢化が進む中、胎児期から始まる脳形成異常の早期発見と治療介入は喫緊の課題である。そのためには、脳発達異常の正確な神経病理学的解析を基盤に置きつつ、分子レベルでの病態メカニズムの解明を進める必要があると考えられる<sup>(1,2,3)</sup>。従来、ヒトの脳形成異常のメカニズム解明に関しては、モデル動物や患者から作製した iPSC 由来神経組織が用いられてきたが、いずれにも限界があり治療への展開には至っていない。

(2) 我々は、患者脳から樹立した神経幹・前駆細胞 (Neural Stem-Progenitor Cells: NSPCs) を用いて、*in vitro* の系でブレインモデルを作製する方法を考案した<sup>(4)</sup>。NSPCs は中枢神経系組織への分化を運命づけられた前駆細胞であり、特殊な培養微小環境によりヒト神経疾患モデルとなり、治療戦略の構築を可能とする。本研究では、遺伝子異常を明らかにしたヒト NSPCs を用いて疾患モデルを構築し、胎児脳形成異常の分子病態メカニズム解明を進めると共に、創薬スクリーニングを含めた治療戦略の探索に挑むことを企図する。

(3) 一次繊毛は外的機械刺激の受容、細胞周期の制御、細胞シグナル伝達など多くの機能を有しており、その構造異常、機能異常は様々な疾患の発症や病態に関与することから、繊毛病 (Ciliopathy) という概念が注目されている。そこで、一次繊毛の制御動態から脳形成異常の病態を探究することを着想した。

## 2. 研究の目的

(1) 胎児脳形成異常の分子病態メカニズム解明と治療戦略の探索のために、ヒト NSPCs の 3D 構築による脳オルガノイドを用いて、形態学的、分子生物学的、生化学的手法など多方面からの切り口で総合的に解析する。2 次元 (2D) の培養系では見えてこない組織構築に加えて、関連分子の発現やシグナル伝達経路などの時空間的変動を顕在化する。

(2) NSPCs の一次繊毛の制御動態 (Ciliopathy) に着目して、脳形成異常メカニズムを解明するために、脳形成異常責任遺伝子を導入したヒト NSPCs を用いた二次元培養モデルで、NSPCs の一次繊毛の動態を形態学的、分子生物学的に解析し、脳形成異常との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 胎児前脳からの神経幹・前駆細胞 (NSPCs) 樹立

胎児前脳から樹立した NSPCs のうち、正常胎児由来 NSPCs (n=2)、*FGFR3* 遺伝子異常 (K650E、R248C、X807G) を有するタナトフォリック骨異形成症 (TD) 由来 NSPCs (n=3) を用いた。

(2) 患者由来 NSPCs を用いた脳オルガノイドの構築・機能解析

増殖メディウムで単一ニューロスフェアを形成、次にオリジナルメディウム<sup>(1)</sup>で 7 日間、先述のものとは異なるオリジナルメディウム<sup>(2)</sup>で、ガス交換可能な遠沈管型振盪培養を用いた特殊微小環境下で 14-28 日間培養し、脳オルガノイドを形成した。脳オルガノイド組織で、未分化幹細胞、神経細胞・グリア細胞への分化、遊走、層形成、細胞外基質の形成、神経突起伸長、シナプス形成などを詳細に検索した。

(3) NSPCs の一次繊毛の動態解析

NSPCs の不死化と亜株の樹立

遺伝背景に関連した個体差や NSPCs 樹立時期の違いなどが実験結果に影響することを懸念し、正常由来 NSPCs にエピソードベクターを利用して、Human *C-MYC*、野生型 *FGFR3* 遺伝子、*FGFR3* 遺伝子点変異体 (K650E、R248C) を安定発現する亜株の樹立を行なった。これら亜株を用いて上述の 3D 増殖・分化培養系での脳オルガノイドの形態変化の再現性を確認すると共に、一次繊毛の解析を行なった。

TD-NSPCs における一次繊毛機能の解析

*C-MYC* 導入正常 NSPCs に *FGFR3*-WT、*FGFR*-mutation (K650E、R248C) を安定的導入した細胞株を用いて、一次繊毛と FGF シグナルパスウェイの相違を形態学的、生化学的、分子生物学的に比較検討した。FGF シグナル伝達阻害剤 (NVP-BGJ398) 等を *FGFR*-mutation 導入 NSPCs に作用させることで、一次繊毛や細胞の表現系が正常化するかを検討した。一次繊毛の解析は蛍光免疫染色 (ARL13B、 $\gamma$ -tubulin) と共焦点レーザー顕微鏡を用いた。網羅的リン酸化解析法により、変異型 *FGFR3* が惹起する病的なリン酸化シグナルカスケードの同定を行った。

白血病阻害因子 (LIF) によるNSPCsにおける一次繊毛の制御  
インターロイキン 6 ファミリーに属するサイトカインである LIF が、NSPCs の一次繊毛に及ぼす影響を検討した。C-MYC 遺伝子を導入した不死化 NSPCs を用いて、2 と同様の方法で一次繊毛の動態を解析した。rhLIF( Oriental yeast Co. NIB47076000 )は 10ng/mL の濃度で作用させた。

LIF による一次繊毛制御のシグナル伝達経路の解析  
ウェスタンブロット、免疫組織化学等を用いて、各種リン酸化シグナルカスケード蛋白の発現変動、リアルタイム定量 PCR による一次繊毛関連遺伝子発現解析を行なった。

#### 4 . 研究成果

##### 1) NSPCsの3Dでの形態解析

FGFR3遺伝子異常症例のうち、K650E、R248Cでは、脳オルガノイド表面に瘤状隆起が多数形成され、*in vivo*の脳形成異常に類似した表現型が再現された (図1)。

組織学的に、瘤状隆起は分裂終了直後の未熟な神経細胞胞巣 (Tuj1、DCX陽性) よりなり、脳オルガノイド深部にGFAP(+), ビメンチン(+)の放射状グリア胞巣が形成され、ラミニン、テネイシン等の細胞外基質の沈着がみとめられた (図2)。

*In vitro*の系で、*in vivo*の脳に類似したモデルが形成されたと判断した。FGFシグナルの恒常的活性化によるNSPCsの増殖・分化・細胞移動等の異常が示唆された。しかし、脳オルガノイドでは大脳皮質構築形成は誘導されず、オルガノイド構築細胞の多様性には、ヒト発生途上の胎児脳のそれとは隔たりがあり、*in vitro*ヒト脳モデルとして限界があると考えられた。

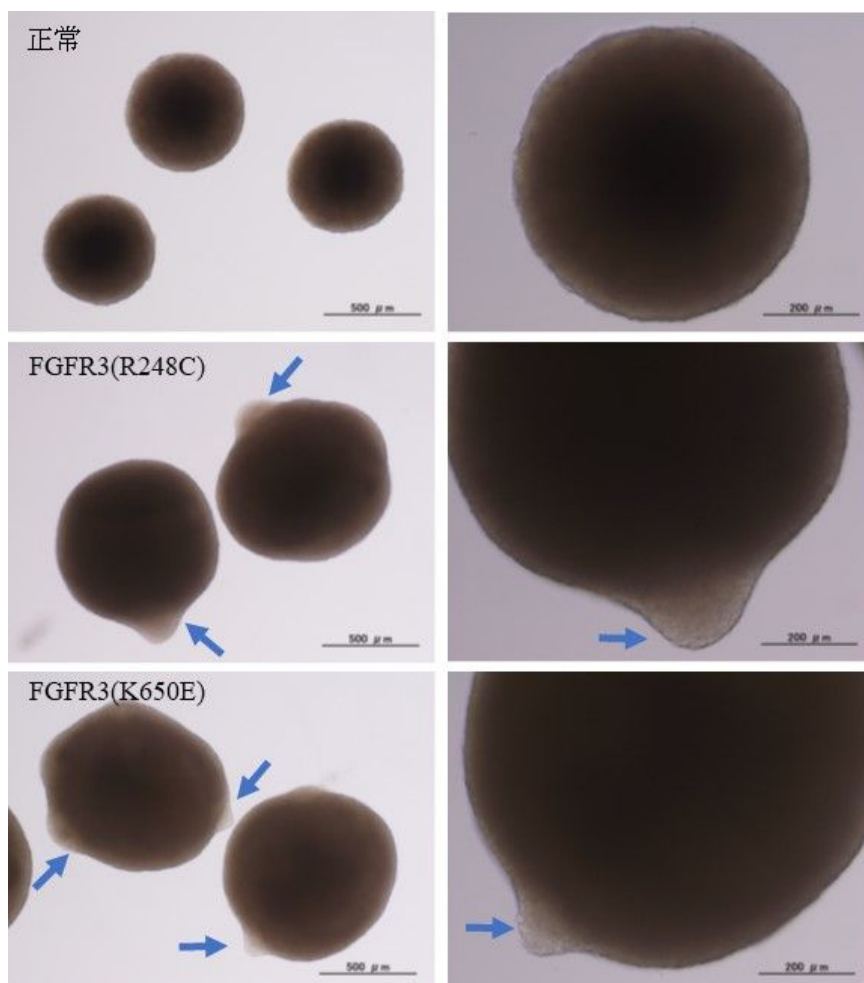
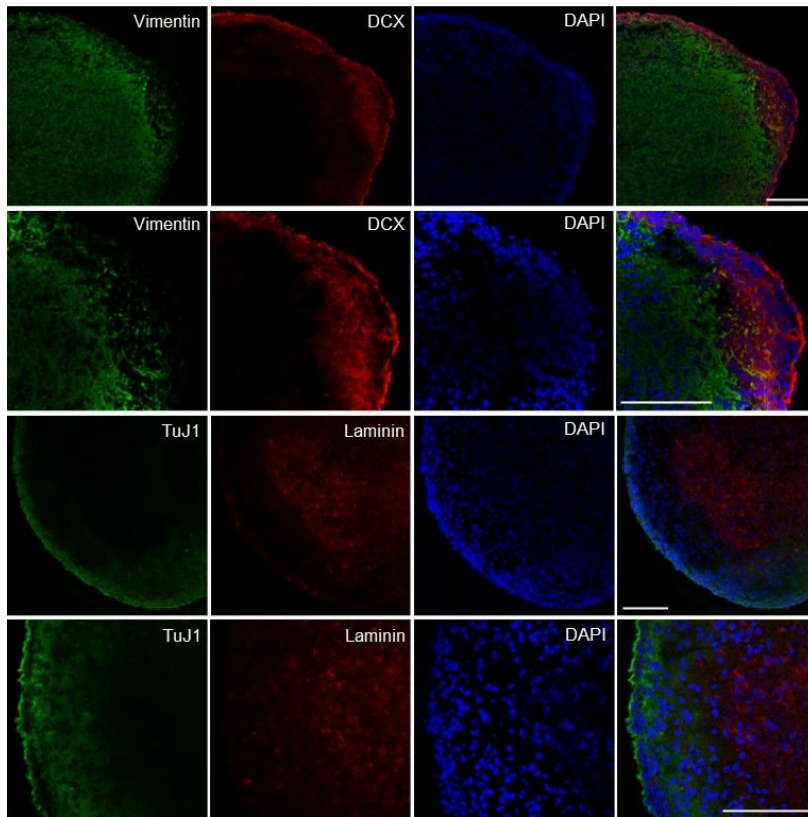


図1. 脳オルガノイドの形態異常

正常NSPCs由来、TD-NSPCs: FGFR3遺伝子異常 (R248C、K650E) 由来脳オルガノイドを示す。TD-NSPCs脳オルガノイドでは、オルガノイド表面に瘤状隆起が多数形成されている (➡)。



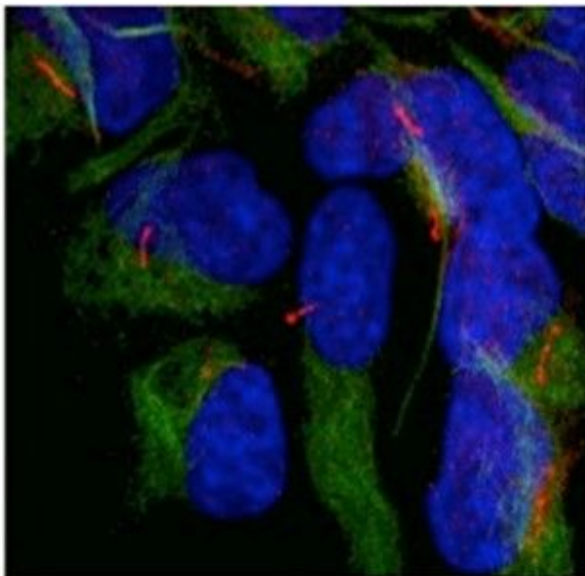
**図2. TD-NSPCs脳オルガノイドの組織形態学的解析**

瘤状隆起は分裂終了直後の未熟な神経細胞胞巣（DCX陽性）よりなる。その胞巣に接してビメンチン陽性の放射状グリア胞巣が形成されている。未熟な神経細胞胞巣（TuJ1陽性）の周辺に、細胞外基質（ラミニン）の沈着がみとめられる。

## 2) NSPCs の一次繊毛の動態解析

### TD-NSPCsにおける一次繊毛機能の解析

NSPCsの一次繊毛は、蛍光免疫染色により明瞭に認識された（図3）。



**図3. NSPCsの一次繊毛**

蛍光免疫染色（ARL13B、赤色）により1細胞に1本の一次繊毛をみとめる。共焦点レーザー顕微鏡で撮像（Zスタック画像）。

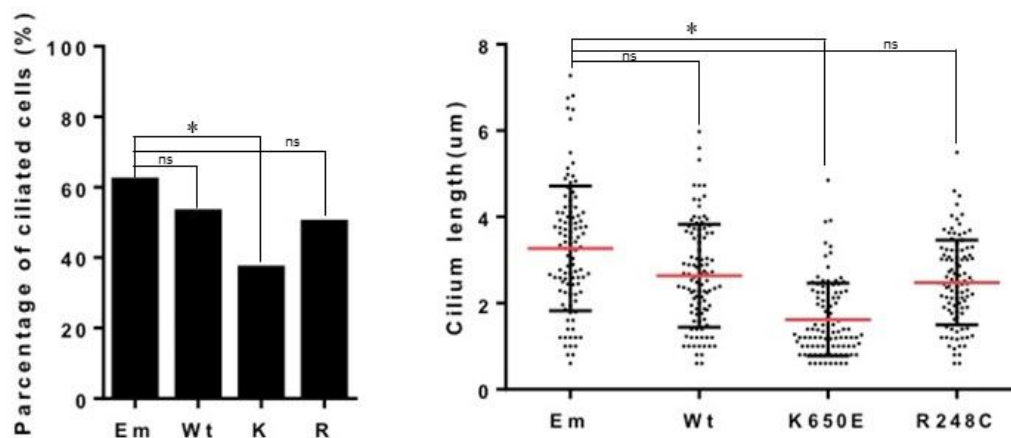


図4. NSPCsの一次繊毛の出現率と繊毛長

FGFR3恒常性活性化変異 (K650E) 導入NSPCsでは、一次繊毛の出現率の有意な低下 (左)、長さの有意な短縮がみられた。\*: <0.05

Em: empty vector

Wt: wild type *FGFR3*

K: *FGFR3* K650E mutation

R: *FGFR3* R248C mutation

恒常活性化型変異*FGFR3*を安定発現させたNSPCsでは一次繊毛の出現率の低下 (図4左)、繊毛長の短縮を認めた (図4右)。

また網羅的リン酸化解析法を用いて、変異型*FGFR3*が引き起こす病的なリン酸化シグナルカスケードの同定を行い、一次繊毛形成異常との関連を検討したが、有意に変動するシグナル伝達経路は明らかにされなかった。変異型*FGFR3*がNSPCsの一次繊毛に異常を引き起こしその結果生じたNSPCsの分化制御異常がTDの脳形成異常の病態に關与する可能性が示された。

#### 白血病阻害因子(LIF)によるヒトNSPCsの一次繊毛の制御

ヒト正常 NSPCs に LIF を作用させた際に、一次繊毛の短縮が誘導されることを見いだした。さらに各種阻害剤を用いた検討で、LIF の誘導する既知のシグナルカスケードのうち繊毛の形態変化に関する経路が、JAK-STAT3 経路であることを明らかにした。これらの結果から、LIF は一次繊毛の長さを調節する機能を有し、それに伴う繊毛依存的なシグナル伝達経路の変化が起きている可能性が考えられた。Ciliome database に公開された一次繊毛に關与する分子群から、プロモーター領域に STAT3 の結合モチーフを有する遺伝子を選出した<sup>(5,6)</sup>。これら遺伝子群について、LIF、STAT3 阻害剤の非投与時と投与時で mRNA 発現量変動を定量 RT-PCR で解析したが、LIF 投与により有意に発現量が変動した繊毛關連遺伝子群は同定されなかった。

#### 参考文献

- Itoh K, Fushiki S et al. Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed sylvian sulcus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 685-688.
- Itoh K, Fushiki S et al. Hypoplasia of the spinal cord in a case of foetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39: 441-444
- Itoh K, Fushiki S et al. Brain malformation with loss of normal *FGFR3* expression in thanatophoric dysplasia type I. *Neuropathology* 2013; doi:10.1111/neup.12036
- Kanemura Y et al. Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res* 2002; 69: 869-879.
- [http://www.sfu.ca/~leroux/ciliome\\_database.htm](http://www.sfu.ca/~leroux/ciliome_database.htm)
- <https://meme-suite.org/meme/>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyoko Itoh
2. 発表標題 1. Neural development 2. Neuropathology of developing brain
3. 学会等名 14th Asia Pacific Congress in Maternal Fetal Medicine (APCMFM) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyoko Itoh
2. 発表標題 Pathology of brain malformation
3. 学会等名 15th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (招待講演) (国際学会)
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	藤本 崇宏 (Fujimoto Takahiro) (10446114)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  (24303)	
研究分担者	伏木 信次 (Fushiki Shinji) (80150572)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授  (24303)	

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