

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670513

研究課題名(和文) タナトフォリック骨異形成症の胎児脳より樹立した神経幹細胞を用いた分子病態解明

研究課題名(英文) Pathological mechanism of abnormal brain development in thanatophoric dysplasia evaluated by using human fetal brain-derived neural stem 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タナトフォリック骨異形成症(以下TD)は、FGFR3遺伝子変異が原因で、四肢短縮などの骨形成異常とともに、中枢神経系では後頭葉・側頭葉に過形成性の過剰な脳回様構造、海馬異形成を伴う。今回我々は、ヒト胎児脳から樹立した神経幹細胞(以下NSCs)に、ヒトのTDで既報告のFGFR3遺伝子変異：FGFR3-K650E、FGFR3-R248Cの各々を導入したNSCsラインを樹立した。さらに、独自の培養液組成と培養環境条件下で、in vitroの系で3次元構築を有するミニブレイン様構造物の作製に至った。今後、TDミニブレインモデルを構築し、脳形成異常のメカニズム解明、レスキュー実験へと展開する。

研究成果の概要(英文)：Thanatophoric dysplasia (TD) is a lethal form of chondrodysplastic dwarfism caused by mutations of the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3), in which the cerebral cortex displays a temporal overgrowth and hippocampal dysplasia. In order to investigate the molecular and morphological mechanisms of abnormal brain development, we established human neural stem cells (NSCs) which stably expressed FGFR mutations such as FGFR3-K650E, and FGFR3-R248C, as previously reported in human TD. On the other hand, we constructed the three-dimensional (3D) organoids, microscopically mimicking brain (called as minibrain) from the NSCs in vitro culture system by original culture medium and culture environment. Now we are going to construct TD-minibrain model to investigate the pathological mechanisms and develop the molecular targeted therapy in the future.

研究分野：発生神経生物学、神経病理学

キーワード：先天異常学 タナトフォリック骨異形成症 脳形成異常 神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

タナトフォリック骨異形成症(以下 TD)は、四肢短縮などの骨形成異常とともに、中枢神経系では後頭葉・側頭葉に過形成性の過剰な脳回様構造、海馬異形成を伴う。頭蓋骨、大腿骨の性状により TD1(TD type 1)、TD2(TD type 2)に分類されるが、脳の形態学的異常は類似する。*FGFR3* 遺伝子変異が原因で、TD2 では K650E 変異により持続的にチロシンキナーゼ活性化が生じ過剰な神経細胞増生を招くことが考えられているが、TD1 に多いとされる R248C 変異ではそのメカニズムが不明な点も多い。ヒトの *FGFR3*-K650E 変異に相当する K644E 変異を中枢神経系特異的に導入したトランスジェニックマウスでは、大脳壁肥厚、大脳の非対称性、神経細胞のヘテロトピア、海馬の異形成、小脳小葉構築の単純化などの表現型を示すとの報告がされている。しかし、マウスと異なりヒトの TD では尾側方の脳形成異常が表現型としてみられることから、ヒト細胞での解析の重要性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

近年我々は、TD1 と TD2 の剖検症例のヒト胎児脳から神経幹細胞(以下 NSC)を単離し、*in vitro* で維持培養する系を樹立した。そこで本研究では、当該 NSC を特殊培養条件下にて培養することで大脳様オルガノイド(ミニブレイン)を造りだす手法を確立し、*in vitro* にて脳形成の一端を再現する実験系、ひいては TD 病態モデルを構築することを第一に目指した。さらに、その系にて *FGFR3* 変異が脳形成に及ぼす影響をシグナル伝達や細胞増殖・分化の観点から解析することで、TD 病態の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### FGFR3 遺伝子安定発現 NSC の樹立

正常ヒト由来の NSC に点変異を持つ *FGFR3* 遺伝子を導入することで TD モデル

細胞の樹立を試みた。正常由来 NSC、*FGFR3*-K650E 変異を持つ NSC、*FGFR3*-R248C 変異を持つ NSC の 3 種類の細胞より、それぞれ *FGFR3*-wild、*FGFR3*-K650E、*FGFR3*-R248C の cDNA クローニングを行い、発現ベクターを構築した。第一にインテグラーゼと共導入することで NSC ゲノム内に *FGFR3* 遺伝子を挿入する方法を試みたが、NSC ゲノム内への挿入効率が悪く現実的でなかったため、レンチウイルスベクターによる発現に切り替えた。ZsGreen 蛍光蛋白発現を指標として遺伝子導入細胞をセルソーターで分取することで正常 NSC に空ベクター、*FGFR3*-wild、*FGFR3*-K650E、*FGFR3*-R248C の各々を導入したラインを樹立した。導入された *FGFR3* の発現および活性化状態を調べるために、HA タグ抗体、*FGFR3* シグナリング下流蛋白のリン酸化抗体を用いたウェスタン法で解析した。

### NSC 由来 *in vitro* 大脳様オルガノイド(ミニブレイン) 作製法の樹立

神経幹培養細胞からミニブレインを作製する方法を樹立すべく、培養液組成と培養環境の条件を試行錯誤した。正常由来 NSC を材料に複数の表面加工状態の異なるフラスコやプレートを用いてシングルスフェアの形成を試みた。最も状態・再現性が良いと判断した材質を選択し、続いて、分化方法・ミニブレイン作製法の検討に移行した。培養液組成や支持体の有無、そして培養容器の形状・環境をそれぞれ複数種組み合わせで試した。これら条件の設定は、神経幹細胞を材料にミニブレインを作製する前例がなかったため、ES 細胞または iPS 細胞を用いて行われた研究報告の情報を取り入れて行った

(参考文献 Nature. 2014 Dec 18;516(7531):400-4.doi:10.1038/nature13863. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 10;110(50):20284-9.doi:10.1073/pnas.13157

10110.)。評価方法としてミニプレインをPFA固定後、切片作製し、神経細胞分化マーカーやグリア細胞分化マーカー、細胞増殖マーカー、細胞外マトリックス蛋白など複数の抗体染色を行い、ミニプレインの出来不出来や内部構造の状態の把握・細胞の分化状態の理解に努めた。

#### in vitro TD モデルの作製への試み

方法にて樹立した4種の細胞すなわち正常NSCに空ベクター、*FGFR3*-wild、*FGFR3*-K650E、*FGFR3*-R248Cの各々を導入したラインを材料として、方法にて樹立した作製法に準じてミニプレインの構築を試みた。

#### 4. 研究成果

##### *FGFR3* 遺伝子安定発現 NSC の樹立

クローニングした *FGFR3* 遺伝子が野生型、K650E 変異型、R248C 変異型であることはDNAシーケンサーで確認された(図1)。

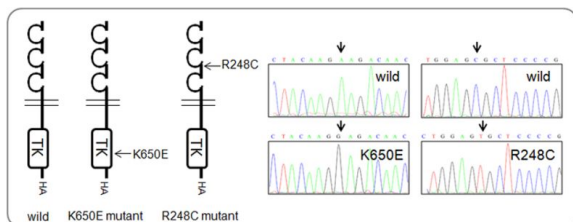


図1:*FGFR3* 蛋白は膜一回貫通型受容体蛋白であり細胞外に3つの免疫グロブリン様ドメインを、細胞内にチロシンキナーゼ(TK)ドメインをもつ。K650E 変異はTKドメイン内に、R248C 変異は第2、第3免疫グロブリン様ドメインの間に位置する。クローニングされた変異型遺伝子はそれぞれ1塩基置換されていることが野生型(wild)の配列との比較で確認された。

また、発現ベクターによる哺乳類細胞内での蛋白発現はウェスタン法と蛍光免疫細胞染色で確認された。HEK293T細胞内における *FGFR3* 蛋白の存在状態の特徴として、K650E 変異体は顕著な自己リン酸化状態に

あることが観察された。一方、R248C 変異体は顕著な二量体形成が観察された。すなわち、これらTD1タイプとTD2タイプでみられる *FGFR3* の変異部位の違いは、*FGFR3* 受容体の活性化状態や細胞内での存在様式の違いとして異なる分子病態をもたらすことが示唆された。

初年度では、インテグラーゼと共導入することでNSCゲノム内への *FGFR3* 遺伝子導入を試みた。エレクトロポレーションの使用によりNSCへのベクターの導入は高効率で達成されたが、ゲノム内への挿入やその後の細胞増殖能の維持の観点から問題が生じた。そこでレンチウイルスによる遺伝子発現法に変更し、実施期間2年目の前期において遺伝子発現細胞は、ZsGreen 蛍光蛋白標識を指標にセルソーターにて分取され、*FGFR3* 安定発現NSCラインが樹立された(図2)。

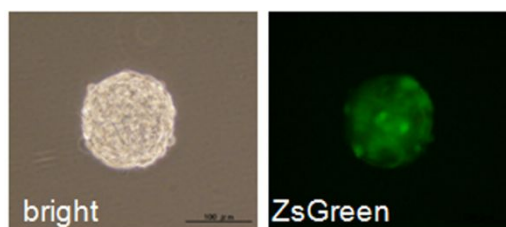


図2: 樹立された *FGFR3*&ZsGreen 安定発現NSCラインは浮遊系にてスフェアとして維持培養される。

NSCに導入された *FGFR3* の発現および活性化状態を調べるために、HAタグ抗体、*FGFR3* シグナリング下流蛋白のリン酸化抗体を用いたウェスタン法で解析した結果、*FGFR3* 野生型および変異型蛋白の発現レベルは同等であった。興味深いことに *FGFR3* シグナリングの下流シグナル分子のリン酸化状態にライン間で差異を認めた(未発表)。この結果はTDで観察される遺伝子変異が神経幹細胞レベルで細胞内シグナル伝達の変調をもたらすことを意味し、このシグナル経路の神経幹細胞における生物学的意義のさらなる解明が幹細胞の制御機構の理解や細

胞運命の決定機構の理解などに通じるものと考えられる。また、変異の種類によって当該シグナル経路の活性化状態が異なることから、TD1 と TD2 の病態の違いをもたらす分子機序の解明のためのモデル細胞として有用と考える。

### NSC 由来 *in vitro* 大脳様オルガノイド(ミニブレイン) 作製法の樹立

他の研究グループから既に論文発表されていた ES 細胞または iPS 細胞を材料にミニブレインを作製する方法を参考にした。しかし、我々が材料に用いている NSC は多能性幹細胞と比較して既にステージが進んでいるため、培養液組成、細胞外基質、培養環境の全てにおいて改良を加える必要があった。未発表のため詳細は示さないが、特殊環境下にて NSC からミニブレイン様の構造体を作製するに至った(図3)。

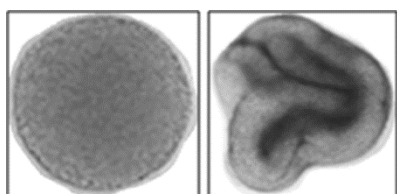


図3：神経幹細胞からなる未分化状態のフェア(左)と本研究にて樹立した特殊環境下における培養法で作製したミニブレイン様構造体(右)

内部構造の状態を把握するために切片作製後の免疫染色で細胞マーカーを検討した結果、神経細胞に分化した層とグリア細胞に分化した層がある規則性をもって区画化された状態で自発的に構造体を造り上げている様子が捉えられた。また、細胞体を豊富に含む領域と細胞外成分で満たされた領域が存在した。神経幹細胞というごく限られた細胞種を材料にした分化培養にて、環境を整えることで、それに細胞が応答し、自発的あるいは細胞間で相互作用し合い、互いの分化方向が決まっていく様は、胎児脳内で起こるダイ

ナミックな細胞の動態を一部でも反映したもののように考えられる。しかし、このたび作製に至ったミニブレイン様の構造体が必ずしも *in vitro* で構築される最終産物であるとは判断できない。2年間という限られた研究期間と研究費の制限内で挑戦的萌芽研究として試作された産物と捉えるべきであり、今後の発展研究においてさらなる改良を加えることでより良い方法論の確立と疾患病態モデルの作製に至ると考えられる。

### *in vitro* TD モデルの作製への試み

で述べた *FGFR3* 遺伝子安定発現 NSC の樹立と、で述べた NSC 由来 *in vitro* ミニブレイン作製法の樹立のための研究が同時並行で行われたため、*FGFR3* 遺伝子安定発現 NSC を用いてミニブレインを作製することで、*in vitro* TD モデルを構築する本項目が研究期間の終盤にて開始された。ヒト神経幹細胞の倍加スピードが遅いことも相まって複数回の施行には至っておらず、有意義な再現性のある結果を本報告書に記載することはできない。コントロール群として設定した空ベクターや *FGFR3-wild* を発現させた NSC ラインをもとにと作製したミニブレインは、で述べた正常由来 NSC をもとに作製したミニブレインと大差のない構造体であると思われる。将来的な発展研究として、変異型 *FGFR3* を発現させた NSC から作製したミニブレインに関して、遺伝子発現解析や細胞分化マーカーによる性質決定を行うことで、TD 病態の理解に繋がるものと考えられる。

### 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〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 恭子 (ITO, Kyoko)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80243301