

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06996

研究課題名(和文) ヒト大脳皮質様オルガノイドを用いた脳疾患の病態解明

研究課題名(英文) Investigation of cellular/molecular pathophysiology of brain disorders using human brain organoids established from iPSCs

研究代表者

沼川 忠広 (Numakawa, Tadahiro)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：40425690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞であるiPS細胞より、2次元分散ニューロンおよび立体的構造を有する大脳皮質様オルガノイドを作成し、それらヒトニューロンを用いて、メープルシロップ尿症、副腎白質ジストロフィー、およびプロピオン酸血症など、発達障害・精神発達遅延などがみられる疾患病態の解析を試みた。メープルシロップ尿症やプロピオン酸血症のiPS細胞より神経分化させたケースでは、健常ニューロンに比べ、著しい神経伝達物質放出機能の低下など、病態と関連するであろう知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの脳研究では、生きたヒト脳を使用することは極めて困難であったため、動物個体レベルもしくは動物脳より分散させた初代培養ニューロンを用いたアプローチが主であった。本研究では、これまでの動物を用いた研究の弱点を克服するiPS細胞由来のヒトニューロンを用いて、メープルシロップ尿症、副腎白質ジストロフィー、およびプロピオン酸血症などの有効な治療法がみつからない疾患において、細胞・分子レベルでの病態解析に成功した。特に、メープルシロップ尿症やプロピオン酸血症では、機能的ニューロンにおいて、それぞれ固有の脆弱性を発見し、これが今後の病態解明および新規薬剤スクリーニングに役立つ可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Although studies using neurons obtained from animals including rats or mice are very useful to examine the cellular/molecular basis of brain disorders, models using human neurons established from iPSCs are much more suitable for investigating the pathophysiology of brain disease. In this study, dissociated human neurons and brain organoids made using iPSCs (healthy, maple syrup urine disease, propionic academia, and adrenoleukodystrophy) were established. Interestingly, disease human neurons (from iPSC of maple syrup urine disease or propionic academia) showed a significant decrease in the system of neurotransmitter release. Furthermore, it was revealed that brain organoids of maple syrup urine disease exhibited an immaturity in the neuronal differentiation.

研究分野：神経科学

キーワード：iPS細胞 大脳皮質 脳疾患 神経細胞 オルガノイド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞である iPS 細胞を用いたヒトニューロンの作成方法の樹立は、これまで動物由来の神経系を用いた研究の限界を克服する画期的な進展であった。本研究開始当初、2次元に分散させた状態で分化誘導したヒトニューロンの解析に加えて、ヒト大脳皮質に類似した3次元構造を有するオルガノイドの作成の成功が報告されるようになっていた (Lancaster et al, Nature 2013 など)。しかし、動物脳由来の初代培養ニューロンとは異なるこれらヒトニューロンの特性に着目した研究や、さらには特定の脳疾患の発症メカニズムにアプローチする研究において、ヒトニューロンを疾患モデルとして利用し、疾患の分子病態を明らかにしようとする試みは、まだまだ初歩的な段階であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、健常者および疾患患者より樹立した iPS 細胞を用いて、大脳皮質様オルガノイドを作成し、疾患病態を細胞・分子レベルで詳細に解析することを目的とした。また、分化・成熟させたヒトニューロンを用いて、疾患特異的な機能変化の精査を実践する際に、分散させた神経幹細胞を介する、2次元での分化誘導システムを利用して得たニューロンも併せて解析に用いた。これらの2次元および3次元で培養維持したヒトニューロンを用いて、これまで発症メカニズムがほとんど不明であった、メープルシロップ尿症、副腎白質ジストロフィー、およびプロピオン酸血症では、疾患に関連していかなる神経機能変化、および分子病態が生じているのかを解明することを目標とした。

### 3. 研究の方法

健常者、および疾患 (メープルシロップ尿症、副腎白質ジストロフィー、およびプロピオン酸血症) 患者由来の iPS 細胞を用いて、胚葉体を経た大脳皮質様オルガノイド、および神経幹細胞 (Neural stem cells, NSCs) を介する2次元分散培養ニューロンの分化誘導を行った。これらの疾患では、乳児期などの発達段階に脳神経系の機能異常等がみられるため、神経分化のそれぞれの段階において、以下の解析を実施した。

#### 神経分化ステージの解析

様々な分化の段階にある大脳皮質様オルガノイド、および2次元分散培養ニューロンの分化・成熟の解析では、q-PCR 法や免疫染色法を用いた生化学的な手法により、神経幹細胞 (PAX6 や nestin など) および神経細胞マーカー (DCX、MAP2 や TUJ1 など) の発現量に着目した。また、ニューロンの構造的特性を確認するため、抗 MAP2 抗体での染色後、IN Cell Analyzer を用いた、神経突起伸展の定量解析を行った。

#### 神経細胞死

メープルシロップ尿症では分岐鎖アミノ酸が、プロピオン酸血症ではプロピオン酸の蓄積が、それぞれ神経症状の原因である可能性があるため、ニューロンに対してこれら蓄積物を曝露し、その神経生存率を測定した。解析には、細胞におけるミトコンドリアの活性 (細胞生存の指標となる) に関連した呈色変化の生じる WST-8 を負荷し、その後、プレートリーダーを用いた比色分析を行った。

#### シナプス機能

成熟ニューロンにおける開口放出 (エキソサイトosis) の機能を定量するために、細胞に色素 FM 1-43 を負荷し、高カリウム (50mM) 刺激で引き起こされる脱分極依存的なエキソサイトosis 活性を、蛍光顕微鏡下でリアルタイムでモニターした。エキソサイトosis 効率は、FM1-43 の蛍光強度の減少として計測できる。また、長期維持したニューロンを用いて、機能的なシナプス結合、および自発的な神経伝達の指標として用いられるカルシウムオシレーションの計測を、カルシウム指示薬 Fluo-4 を用いて実施した。

#### 大脳皮質様オルガノイド内におけるアミノ酸濃度

メープルシロップ尿症では、分岐鎖アミノ酸であるロイシン、イソロイシンおよびバリンの細胞内での蓄積が、シナプス機能低下などの原因であることを想定した解析を行った。そのため、大脳皮質様オルガノイドをホモジェナイズしたのち、細胞・組織内に含まれるアミノ酸量の定量を行った。このアミノ酸定量では、o-フタルアルデヒドによる誘導体化を行った後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分離・測定を行った。

### 4. 研究成果

#### プロピオン酸血症

常染色体劣性遺伝型の先天性代謝異常症のプロピオン酸血症では、新生児から乳児期において、ケトーシス、アシドーシス、および高アンモニア血症の症状が出現する。そして、昏睡などの急性脳症の症状もみられ、予後はよくなく、精神発達の遅れがみられる。これには、プロピオニオニル CoA カルボキシラーゼの活性が減少していることで、プロピオン酸など有機酸の異常

蓄積が原因となっている可能性が示唆されているが、脳の機能低下との関連における詳細はわかっていない。このプロピオン酸血症に関し、まず、健常者、および疾患 iPS 細胞由来のヒト NSCs を作成し、その誘導効率を観察した。その結果、コントロール (健常 iPS 細胞由来) と比較して、Nestin 陽性を呈する NSCs の誘導効率 (分化誘導の 7 日目) に違いは見られなかった。さらに、分化誘導開始後、28 日維持した幼若ニューロンに着目した。その結果、ニューロンマーカーである TUJ1 の陽性率においても、コントロールおよび疾患群において、分化効率の差が観察されなかった。次に、NSCs および幼若ニューロンを用いて、疾患における神経障害を引き起こす原因であると仮定した、プロピオン酸を曝露し、その細胞生存率を測定した。まず、神経分化 4 日目に (10、100、1000  $\mu$ M) のプロピオン酸ナトリウム曝露を行い、7 日目に細胞生存率測定を WST assay にて行った。予想に反し、各濃度において、コントロールおよび疾患 NSCs における顕著な細胞死は観察されなかった。さらに、神経分化 15 日目においてプロピオン酸ナトリウム曝露を行い、その 3 日後に細胞生存率を計測したところ、やはりプロピオン酸ナトリウム曝露における神経細胞死は観察されなかった。しかし興味深いことに、コントロールニューロンに比べて、疾患ニューロンでは明らかに細胞の生存率が低下していた。これは、疾患幼若ニューロンでは、外からのプロピオン酸濃度における感受性は低いものの、内在的にその生存における脆弱性を有している可能性がある。

次に、より分化成熟させたニューロンを用いて、エキソサイトーシスにおける疾患病態の解析を試みた。神経分化開始 77 日目において、コントロールニューロンでは、FM1 - 43 の蛍光強度の減少が脱分極による刺激で顕著に引き起こされた。これは神経分化 77 日目では、十分な神経伝達物質放出機能がヒトニューロンで備わってくることを示している。ところが、疾患ニューロンでは、このエキソサイトーシス能力が有意に減少していた。この培養系では、外からプロピオン酸ナトリウム曝露は行っていない。すなわち、プロピオン酸血症における分化ニューロンでは、細胞外のプロピオン酸濃度には関係なく、むしろ内在的に神経伝達物質放出メカニズムに異常が生じている可能性を示している。

### **副腎白質ジストロフィー**

小児大脳型の副腎白質ジストロフィーでは、2 から 10 歳において発症し、知的退行や精神症状がみられる。中枢神経系での脱髄が特徴的な遺伝子疾患で、極長鎖脂肪酸のペルオキシソームへの取り込み機能が阻害されている。このため、極長鎖脂肪酸の細胞内蓄積が引き起こされるが、細胞レベルでのニューロンの機能障害には不明な点が多い。そこで、この病気由来の iPS 細胞より NSCs を作成し、ニューロンへの分化を誘導した。しかし、得られたニューロンにおいて、コントロール群と比較した場合における細胞生存率に違いは見られなかった。また、成熟ニューロンマーカーである MAP2 で免疫染色を行い、その陽性神経突起の長さを定量解析したが、やはりコントロールニューロンとの違いは観察されなかった。

### **メーブルシロップ尿症 (MSUD)**

分岐鎖ケト酸脱水素酵素の活性低下によりバリン、ロイシン、イソロイシンが蓄積することが病態と関係するとされる MSUD においても、その疾患発症後に発達障害や、精神運動発達遅延が見られるが、その詳細がわかっていない。まず、コントロールおよび MSUD 疾患 iPS 細胞からニューロン誘導率 (分化誘導 77 日目) を定量したところ、ともに 80% 以上の効率で、MAP2 陽性ニューロンが得られ、神経分化において疾患特異的な表現型は得られなかった。同時に、神経物質放出に密接に寄与するシナプスマーカー-synapsinI の発現を免疫染色法にて検出した。その結果、MSUD 疾患においてもコントロールニューロンと変わらないシナプス形成が見られた。

次に、疾患患者の血中におけるバリン、ロイシン、イソロイシンの濃度と、神経症状が相関するとの報告をふまえて、ニューロンに対して、高濃度曝露を行った。興味深いことに、バリン、ロイシン、イソロイシンの高濃度曝露による神経細胞死が観察されたが、コントロールおよび疾患群での有意な差が見いだされなかった。これは、高濃度バリン、ロイシン、イソロイシンはニューロンに対して毒性を示しうるが、疾患特異的な細胞レベルでの病態が生じるためには、さらに別の要因が関与する可能性があることを想起させた。一方で、興味深いことに、培養 77 日目において、エキソサイトーシスを測定すると、MSUD ニューロンにおいて著しい活性の低下が観察された。この神経情報伝達機能に必須であるエキソサイトーシス機能の障害は、神経分化 304 日目、および 608 日目の非常に長期的な維持のあとにも観察された。これに一致して、自発的なカルシウムオシレーション (興奮性伝達物質であるグルタミン酸が介在する反応) による機能的なシナプス結合の成立を解析すると、長期培養後において、コントロールにくらべて明らかに低レベルのカルシウム動態が、MSUD ニューロンで観察された。

さらに、コントロール iPS 細胞、および MSUD の iPS 細胞からそれぞれ大脳皮質様のオルガノイドを作成し、オルガノイド組織内におけるバリン、ロイシン、イソロイシンの濃度を測定した。驚くべきことに、着目した胚葉体形成から 21 日目では、MSUD 大脳皮質様オルガノイドにおけるバリン、ロイシン、イソロイシンの濃度がコントロールの大脳皮質様オルガノイドに比べ、高い値を示す結果は得られなかった。この結果は、大脳皮質様のオルガノイドを作成前の iPS 細胞でも同様の結果であった。ところが興味深いことに、同一サンプル内において、興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸の量は、MSUD 大脳皮質様オルガノイドにおいて減少

している傾向が見いだされた。さらに、グルタミン酸と同様に、大脳皮質ニューロンにおいての主要な神経伝達物質である GABA の量は、MSUD 大脳皮質様オルガノイドにおいて有意に低下していた。これらの結果は、大脳皮質様オルガノイド内において、患者個体レベルでの病態であるバリン、ロイシン、イソロイシンの蓄積は観察されないが、神経伝達物質であるグルタミン酸および GABA の量が減少しており、神経系の機能的な発達の遅れが生じている可能性が示唆された。そこで、さらに分子病態の解明のため、MSUD 大脳皮質様オルガノイドの神経マーカーの発現量を定量した。その結果、大脳皮質のニューロンマーカーである Foxg1 および Ctip2、前出のシナプスマーカー synapsinI の遺伝子発現には変化がなかった。一方で、幼若ニューロンマーカーである DCX は MSUD 大脳皮質様オルガノイドでその発現が高く、成熟ニューロンのマーカーである MAP2 発現はコントロールの大脳皮質様オルガノイドにおいて、有意に高発現が確認できた。これは、MSUD 疾患大脳皮質様オルガノイドにおいて、機能的な神経発達の低形成、もしくは遅延が引き起こされている可能性を示す。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Numakawa T, Odaka H, Adachi N, Chiba S, Ooshima Y, Matsuno H, Nakajima S, Yoshimura A, Fumimoto K, Hirai Y, Kunugi H., Basic fibroblast growth factor increased glucocorticoid receptors in cortical neurons through MAP kinase pathway, *Neurochem Int.*, 査読有, 118巻, 2018, 217-224  
DOI: 10.1016/j.neuint.2018.06.009.

Numakawa T\*, Odaka H, Adachi N., Actions of Brain-Derived Neurotrophin Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases, *International Journal of Molecular Sciences.*, 査読有, 19巻, 2018, E3650,  
DOI: 10.3390/ijms19113650

Yoshimura A., Adachi N., Matsuno H., Kawamata M., Yoshioka Y., Kikuchi H., Odaka H., Numakawa T., Kunugi H., Ochiya T. & Tamai Y., The Sox2 promoter-driven CD63-GFP transgenic rat model allows tracking of neural stem cell-derived extracellular vesicles., *Disease Models & Mechanisms*, 査読有, 11巻, 2018, dmm028779,  
DOI: 10.1242/dmm.028779.

Numakawa T\*, Odaka H. & Adachi N., Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis., *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 18 巻, 2017, E2312  
DOI: 10.3390/ijms18112312.

Odaka H., Adachi N. & Numakawa T. Impact of glucocorticoid on neurogenesis. *Neural Regeneration Research* 査読有, 12 巻, 2017, 1028-1035  
DOI: 10.4103/1673-5374.211174.

Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y., Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Scientific Reports*, 査読有,6巻, 2016, 311720,  
DOI:10.1038/srep31172.

Odaka H, Numakawa T\*, Yoshimura A, Nakajima S, Adachi N, Ooshima Y, Inoue T, Kunugi H. Chronic glucocorticoid exposure suppressed the differentiation and survival of embryonic neural stem/progenitor cells: Possible involvement of ERK and PI3K/Akt signaling in the neuronal differentiation., *Neuroscience Research*, 査読有, 113巻, 2016, 28-36,  
DOI: 10.1016/j.neures.2016.07.002.

Yoshimura A, Numakawa T\*, Odaka H, Adachi N, Tamai Y, Kunugi H. Negative regulation of microRNA-132 in expression of synaptic proteins in neuronal differentiation of embryonic neural stem cells., *Neurochemistry International*, 査読有, 97巻, 2016, 26-33  
DOI: 10.1016/j.neuint.2016.04.013.

〔学会発表〕(計 3 件)

Haruki Odaka, Tadahiro Numakawa, Minami Soga, Jun Kido, Ryutaro Kajihara, Toshika Okumiya, Hirokazu Furuya, Takafumi Inoue, Takumi Era 「SIALIDOSIS NEURONS FROM PATIENT-DERIVED INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL EXHIBIT SYNAPTIC DYSFUNCTION」, ISSCR 2018 - The International Society of Stem Cell Research Annual Meeting (国際学会), 2018

城戸 淳、沼川 忠広、松本 志郎、小高 陽樹、曾我 美南、梶原 隆太郎、遠藤 文夫、中村 公俊、江良 択実 「ゴーシェー病 II 型患者由来の iPS 細胞を使用した薬剤スクリーニングシステムの開発」, 第 59 回日本先天性代謝異常学会総会, 2017

小高 陽樹、沼川 忠広、曾我 美南、城戸 淳、梶原 隆太郎、奥宮 敏可、古谷博和、井上 貴文、江良 択実 「シアリドーシス患者 iPS 細胞を用いた神経障害の病理学的解析」, 第 59 回日本先天性代謝異常学会総会, 2017

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小高 陽樹

ローマ字氏名：ODAKA HARUKI

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、研究者個人に帰属されます。