

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17044

研究課題名（和文）Danon病のヒト病態モデルを用いた解析

研究課題名（英文）Analysis of Danon disease using a human pathological model

研究代表者

井口 直彦（Iguchi, Naohiko）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：50838232

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）：ヒト多能性幹細胞から脳オルガノイドを作製し、低酸素条件下でのストレス下での遺伝子発現応答を明らかにした。大脳皮質モデルとされる脳オルガノイドとは異なる、脳幹オルガノイドの作製法を樹立しその特性を明らかにした。ALSの原因遺伝子であるC9orf72の非翻訳領域のリピートから産生されるポリペプチドが、核内輸送受容体であるKap-2の相分離制御機能を破綻させることを明らかにした。また、Danon病の原因遺伝子であるLAMP-2がオートファジー破綻にどう関与しているかは不明な点も多く、相互作用解析を通してLAMP-2機能の研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、神経筋疾患のモデルとなり得る脳オルガノイドについて、低酸素ストレス下での反応を検討し、また脳幹オルガノイドの作製法を樹立し、特性を明らかにした。今後の脳オルガノイドの神経筋疾患モデルとしての利用や、ストレス下での反応の検討を含めた病態解明、治療法の開発へ寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the characteristics of brain organoids that could be considered for use as disease models. We generated brain organoids from human pluripotent stem cells and characterized their gene expression responses under hypoxic conditions of stress. We established a method to produce brain stem organoids, which are different from brain organoids that are considered to be models of the cerebral cortex, and clarified their characteristics. We found that a polypeptide produced from repeat sequences of the untranslated region of C9orf72, the causative gene of ALS, disrupts the phase-separation regulatory function of Kap-2, a nuclear transport receptor. In addition, it is still unclear how LAMP-2, the causative gene of Danon disease, is involved in the autophagy disruption, and we studied LAMP-2 function through interaction analysis.

研究分野：神経内科学

キーワード：Danon病 オートファジー 神経変性疾患 脳オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年の難病制度改訂により、複数の希少難治性筋疾患が指定難病として認定されたが、依然、病因不明の疾患は多い。中でも「自己貪食空胞性ミオパチー」の一つである Danon 病は、未だ根治療法のない致死性疾患で、身体障害度は重度である。この疾患の病態としては、生体防御の機構として注目されるオートファジー分子機構の関与が疑われ、病理学的に極めて特徴的な自己貪食空胞を有する。オートファジーには未解明の部分が多く、特に筋組織での研究は進んでいない。近年では、生物学的な相分離の制御破綻が筋萎縮性側索硬化症を始めとした神経筋疾患の背景として注目され、オートファジーとの関連も示唆されている。これらの病態は依然不明な点が多く、脳オルガノイドを用いた病態研究や、生物学的な相分離の制御についての研究はまだ十分にされていない。

2. 研究の目的

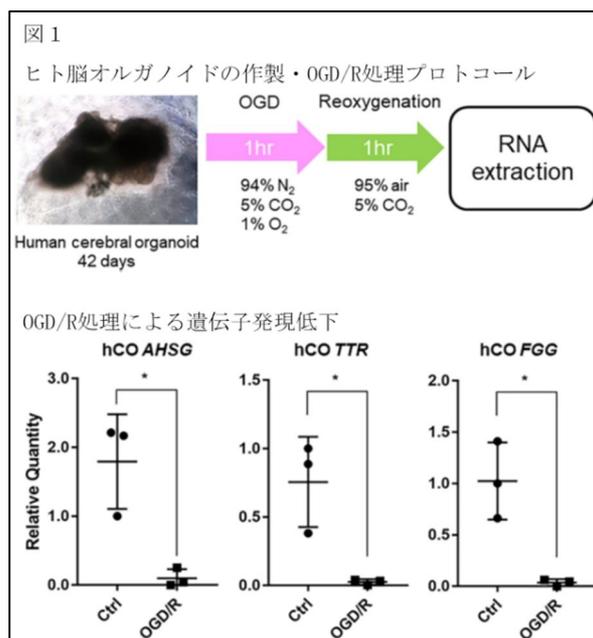
本研究では、これまでの研究や症例の集積をもとに、ヒト iPS 細胞から樹立されたヒト脳オルガノイドの低酸素ストレス応答の研究を行った。また疾患モデルとなる脳幹オルガノイドの作製を行い、その特性を明らかにした。同時に神経筋疾患の病態と関連していると考えられる生物学的な相分離の制御機構についての解明を行った。

3. 研究の方法

脳オルガノイドを作製し、脳オルガノイドの低酸素・低栄養、再酸素化状態 (oxygen glucose deprivation / reoxygenation : OGD/R) におけるストレス下での変化を、トランスクリプトーム解析や qPCR を用いた発現変動遺伝子解析を行った。ヒト多能性幹細胞由来の脳幹オルガノイドの作製方法の樹立を行い、その特性を single cell RNA sequence、qPCR、免疫組織染色によって解析を行った。ALS の原因遺伝子である C9orf72 の非翻訳領域の繰り返し配列から産生されるポリペプチドの、相分離機能制御を持つシャペロンとの関係性について、生化学的手法、物理化学的手法、核磁気共鳴解析などを用いて、解析を行った。

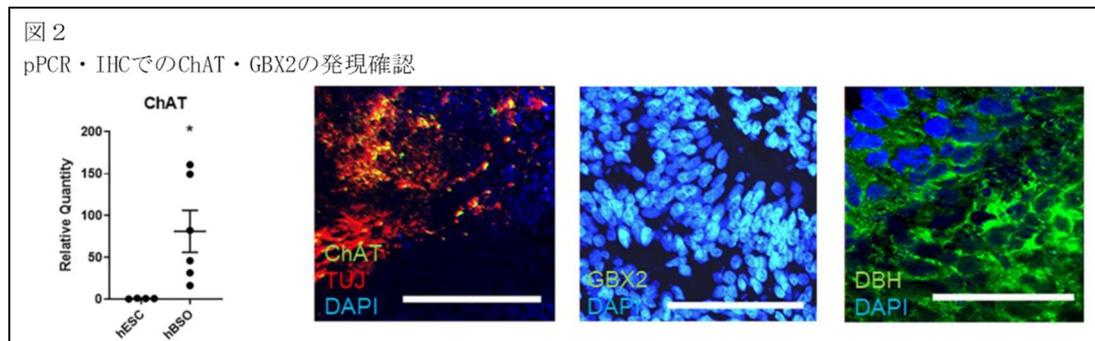
4. 研究成果

脳オルガノイドを作製し、神経細胞マーカーである TUJ1 と DAPI による免疫組織化学染色を行い、本オルガノイドモデルに神経細胞が存在することを確認した。胚葉体形成から 6 週時点の脳オルガノイドに対して OGD/R を行った。OGD/R 処理は 1 時間の低酸素、低栄養状態と 1 時間の再酸素化を行い、その後 RNA を抽出した。OGD/R 処理を行っていない脳オルガノイドとの発現変動遺伝子解析では、TTR、FTL、AHSG、FGG などの遺伝子の発現低下が見られた (図 1)。ジーンオントロジー解析では、脳オルガノイドに対する OGD/R 処理で脂質代謝と血液凝固が誘導されることが示され、パスウェイ解析では、ビタミンの消化・吸収、脂肪の消化・吸収、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) シグナル経路、補体・凝固カスケードとの関連性が示された。他の細胞種での OGD/R 結果との解析では、脂肪酸に関連する PPAR シグナル伝達経路とピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) が脳オルガノイドの OGD/R に反応する神経細胞の重要なマーカーであることが明らかになった。

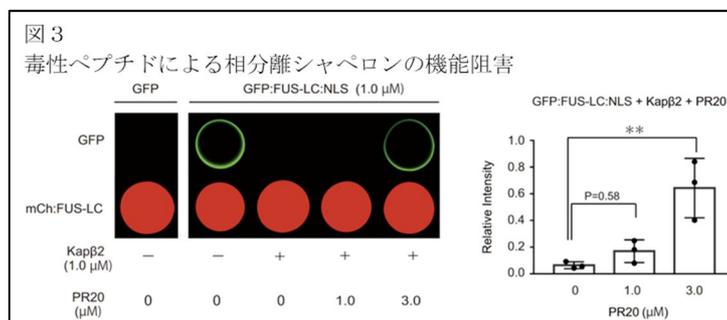


ヒト多能性幹細胞から大脳オルガノイドを作製するプロトコールに加えて、神経幹細胞/前駆細胞の初期増殖には EGF/bFGF、その後のドーパミン作動性ニューロンと神経堤細胞の分化には BDNF、GDNF、NT-3 など複数の成長因子を組み合わせるなどの点を変更し、プロトコールを作製した。作製したオルガノイドは黒色であり、免疫組織染色によりメラニン含有細胞を有することや、神経堤細胞に関わる SOX9 の発現が確認された。qPCR 解析では中脳を含む前脳構造の発達に必要な神経幹/前駆細胞マーカー SOX2、ASCL1、SLC1A3、OTX2 を検出した。qPCR と IHC

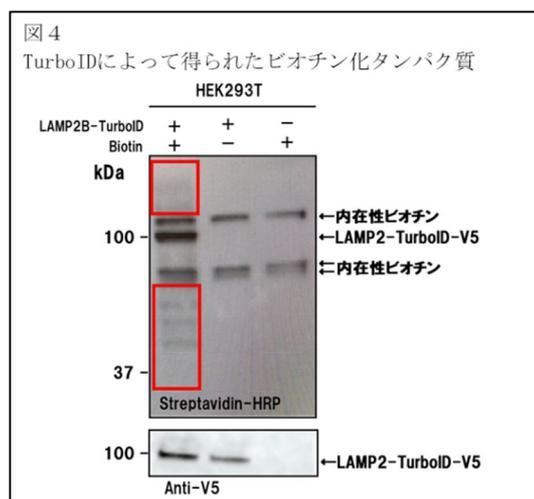
で ChAT や GBX2 の発現も確認され、コリン作動性ニューロンのマーカーである ChAT の検出からは、髄質集団の存在が示唆され、GBX2 の検出からは、中脳と後脳の集団を含むことが示唆された(図2)。RNA シークエンスの結果からも、中脳や後脳前駆細胞に関する遺伝子が検出され、脳幹成分を有すると考えられた。脳幹オルガノイドの樹立により、神経筋疾患における脳幹モデルでの検討に繋がると考えられた。



ALS の原因遺伝子の一つである C9orf72 においては、遺伝子の非翻訳領域のリピートにより、リピート関連 ATG 非依存性(RAN)翻訳が生じ毒性ポリペプチドが生み出され、疾患の原因となると考えられている。C9orf72 遺伝子の非翻訳領域のリピート配列から RAN 翻訳によって産生されるプロリン・アルギニン(PR)ポリペプチドが、RNA 結合タンパク質の相分離制御を行う核内輸送受容体の機能を阻害することを明らかにした。精製した RNA 結合タンパク質を用いた液滴評価やヒドロゲル結合法により、PR ポリペプチドが核内輸送受容体である karyopherin-2 (Kap2) の相分離制御能を阻害することが確認された(図3)。PR ポリペプチドは Kap2 と 1:1 の割合で強く結合し、核磁気共鳴解析により PR ポリペプチドが Kap2 の核局在化シグナル結合部位を標的とすることが示唆された。C9orf72 に関連する神経変性について新たな知見を得ることができた。



Danon 病の原因遺伝子として知られている LAMP-2 は、G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding proteins 1) を介して、オートファジーの重要なレギュレーターである mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) の制御に関与することが知られている。プルダウンアッセイや共免疫沈降法を用いて、LAMP-2 と G3BP1 の分子間相互作用を生化学的に評価したが、直接的な相互作用は確認できなかった。このことから、LAMP-2 のオートファジーへの関与には、他因子の存在が示唆された。そこで、LAMP-2 と相互作用するオートファジー関連タンパク質を検索するため、TurboID を用いた LAMP-2 の近接依存性標識法を確立した。HEK293T 細胞で LAMP-2 に近接するビオチン化タンパク質を確認し、この中にオートファジー制御に関与する因子が含まれていると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwasa Naoki, Matsui Takeshi K., Iguchi Naohiko, Kinugawa Kaoru, Shiota Tomo, Eura Nobuyuki, Kiriyama Takao, Izumi Tesseki, Saito Kozue, Kataoka Hiroshi, Mori Eiichiro, Sugie Kazuma, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Gene Expression Profiles of Human Cerebral Organoids Identify PPAR Pathway and PKM2 as Key Markers for Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2021.605030	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 -

1. 著者名 Eura Nobuyuki, Matsui Takeshi K., Nanaura Hitoki, Shiota Tomo, Kinugawa Kaoru, Iguchi Naohiko, Kiriyama Takao, Sugie Kazuma, Mori Eiichiro, 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 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00538	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 -

1. 著者名 Nanaura Hitoki, Shiota Tomo, Iguchi Naohiko, Kiriyama Takao, Sugie Kazuma, Saio Tomohide, Yoshizawa Takuya, Mori Eiichiro, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25560-0	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 -

〔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
---------	---------