

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23952

研究課題名（和文）ヒト大脳・中脳オルガノイドを用いた小児難治性てんかんの病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of the pediatric intractable epilepsy using human cerebral and midbrain organoids

研究代表者

絹川 薫 (Kaoru, Kinugawa)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：90846677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、ヒト多能性幹細胞からin vitroに3次元培養を行うことで、ヒト脳と類似した構造を有する脳オルガノイドの樹立法が確立された。脳オルガノイド技術は、てんかんなどの小児神経疾患の研究に有用と考えられている。本研究は、大脳・脳幹オルガノイドを用いて小児難治性てんかんの一つであるMWSの病態解明を行うことを目的とした。脳幹オルガノイドの作成法を樹立し、免疫染色や1細胞遺伝子発現解析を行い、脳幹成分を含むことを確認した。ZEB2欠損大脳・脳幹オルガノイドを樹立し、形態評価や定量的PCRなどを行った。脳オルガノイドは小児神経疾患の病態解明に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児難治性てんかんなどの小児神経疾患は、胎生期中枢神経系の異常によって生じる。その多くは発生メカニズムが十分に解明されておらず、故に根本的な治療法がなく、病態解明が早急に必要とされていた。ヒト脳疾患の研究には、げっ歯類が用いられてきたが、ヒト脳との構造の違いから、疾患の病態解明を行うのは困難であった。本研究ではヒト多能性幹細胞、CRISPER/Cas9によるゲノム編集で得たZEB2欠損ヒト多能性幹細胞から、ヒト脳幹オルガノイド及びZEB2欠損ヒト脳幹オルガノイドを樹立した。これら脳オルガノイドは、小児の中枢神経疾患の発生過程の再現や病態解明に有用なツールとなりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Recently, three-dimensional in vitro human brain models derived from human pluripotent stem cells, brain organoids, have been developed. Brain organoids technologies are thought to be useful for research on pediatric neurological disorders, such as epilepsy. The aim of this study was to elucidate the pathogenesis of Mowat-Wilson Syndrome using human brain organoids of cerebrum and brainstem. MWS is one of the pediatric intractable epilepsy due to deficits of ZEB2 (zinc finger E-box-binding homeobox 2) gene. We established a method to induce brainstem organoids. Various methods, such as immunohistochemistry and single-cell RNA-sequencing, suggested that brainstem organoids mimic the structure of human brainstem. We developed the ZEB2 knock-out human brain organoids of cerebrum and brainstem, and performed morphological analysis and quantitative PCR. These results suggested that brain organoids might be useful model to elucidate the pathogenesis of the pediatric neurological disorders.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：脳幹オルガノイド 中脳オルガノイド 1細胞遺伝子発現解析 小児難治性てんかん ZEB2遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児難治性てんかんなどの小児神経疾患は多くが胎生期の中枢神経系の異常によって生じる。その多くが発生機序に未解明な点が多く、病態解明及び治療法開発が望まれている。小児難治性てんかんの1つである Mowat-Wilson 症候群は、出生直後より、精神発達遅滞やてんかん、小脳症など、様々な中枢神経症状を呈する重篤な遺伝病であり、ZEB2 (zinc-finger E-box-binding homeobox 2) 遺伝子の欠損によって生じることが知られている。これらヒト脳疾患の研究に、ヒト生体の脳を用いて侵襲的な研究を行うことは倫理面から不可能であり、ヒト中枢神経系の発生過程を再現可能な実験系が存在せず、疾患の詳細な病態解明は困難であった。近年、試験管内の培養条件下でヒト多能性幹細胞から、ヒト脳と類似した構造を持つ臓器様組織 (脳オルガノイド) の樹立が報告され [Lancaster MA, et al. Nature 2013]、中枢神経疾患研究への有用性が期待されている。

2. 研究の目的

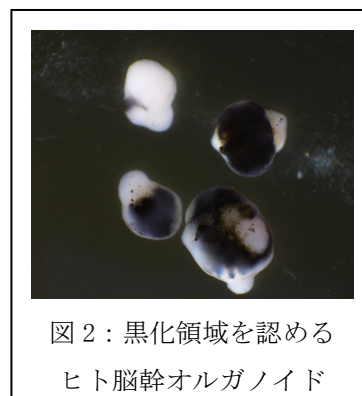
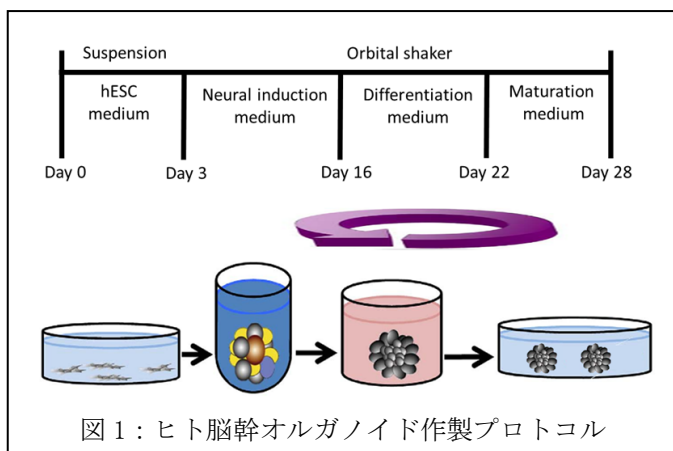
ヒト脳オルガノイドを用いて、中枢神経の発生過程を明らかにし、小児難治性てんかんをはじめとする小児神経疾患がどのような過程で生じうるか明らかにすることを目的に、本研究を行った。

3. 研究の方法

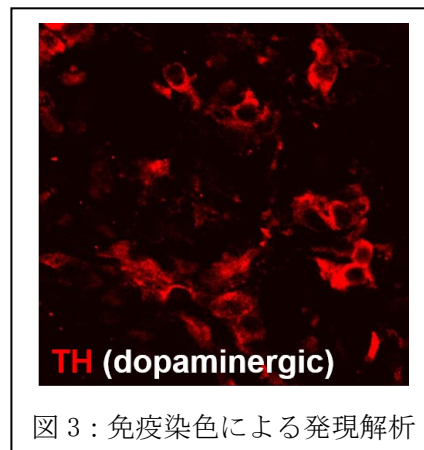
ヒト多能性幹細胞から脳幹オルガノイドを分化誘導し、免疫染色や定量的 PCR、single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) による遺伝子発現解析などで、脳幹成分を含んだヒト脳オルガノイドの評価を行った。中脳オルガノイドを樹立し、scRNA-seq 解析を行うとともに、脳幹オルガノイドとの比較解析を行った。また、CRISPR/Cas-9 を用いたゲノム編集により ZEB2 欠損ヒト脳幹オルガノイドを樹立し、MWS 患者における中枢神経発生の過程の再現を試みた。

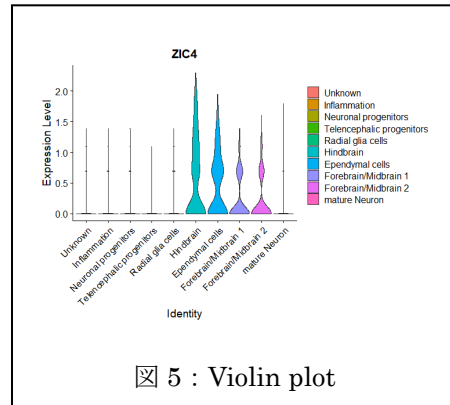
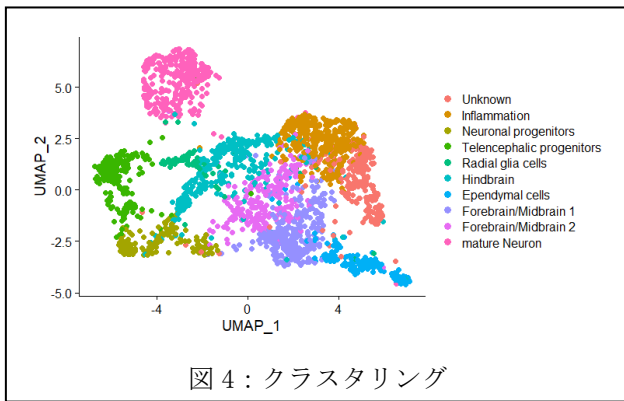
4. 研究成果

(1) ヒト多能性幹細胞を、種々の成長因子を加えた Neural induction medium で分化誘導し、シェイカー上で1か月間培養を行い (図1)、黒化領域を含んだヒト脳幹オルガノイドを得た (図2)。

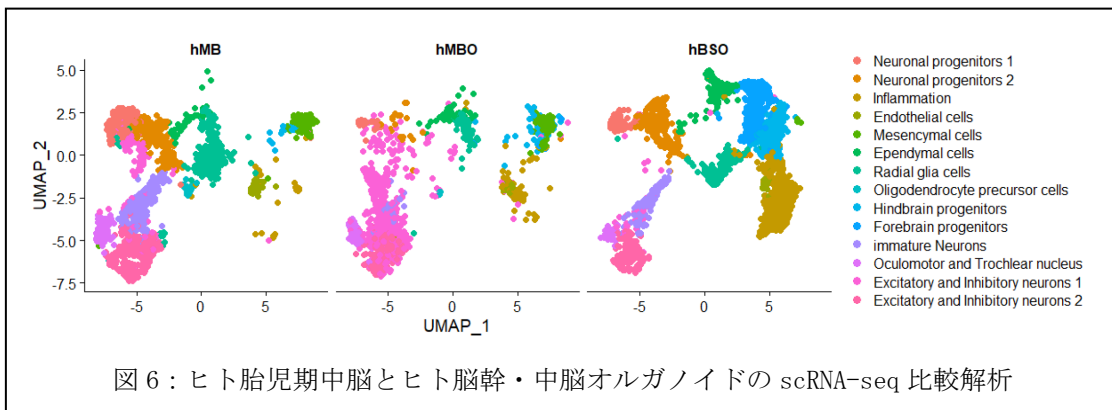


黒化領域を含む脳幹オルガノイドについて、免疫染色では中脳のドーパミン作動性神経細胞マーカーである TH (tyrosin hydroxylase)、延髄や橋のコリン作動性神経細胞マーカーである ChAT (cholineacetyltransferase)、ノルアドレナリン作動性神経細胞マーカーである DBH (Dopamine β -hydroxylase) の発現を確認した。定量的 PCR でもこれらの神経細胞マーカーの発現を確認した (図3)。脳幹オルガノイド内の黒色素に関しては、Fontana-Masson 染色を行い、メラノサイトであることを確認した。ScRNA-seq による網羅的解析では、脳幹オルガノイドには、中脳成分の他に、後脳の分化に関与する ZIC1 (Zic Family Member 1) や ZIC4 を発現する細胞集団を含むことが明らかとなった (図4・5)。

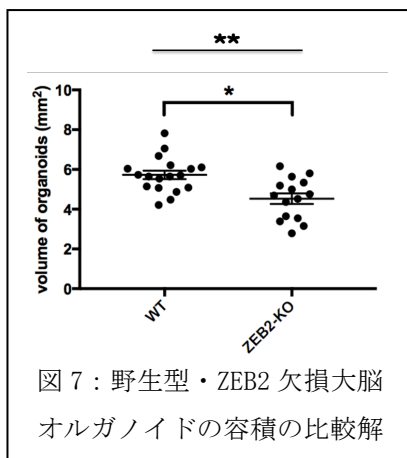




(2) 中脳オルガノイドを樹立、scRNA-seq 解析を行うとともに、脳幹オルガノイドとの比較解析を行った。中脳オルガノイドは間葉系細胞のマーカである COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain) を発現する細胞集団、脳幹オルガノイドは炎症・免疫細胞のマーカである AIF1 (Allograft Inflammatory Factor 1) を発現する細胞集団をそれぞれ含んでいた。このように、2つの脳オルガノイドは神経成分の他に中胚葉由来の成分も含むことが、網羅的解析で明らかとなった。また過去に報告されたヒト胎児期中脳の scRNA-seq 解析 [Manno, et al. Cell 2016] との比較では、これら 2つのオルガノイドがヒト中脳と同じ神経細胞集団を含んでいることが証明された (図 6)。



(3) CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 システムによるゲノム編集により ZEB2 欠損ヒト ES 細胞を作成、ZEB2 欠損大脳・脳幹オルガノイドを樹立した。ZEB2 欠損大脳オルガノイドでは、野生型と比べて容積の低下を認めており (図 7)、このことは MWS 患者で見られる小脳症、てんかん発作との関与が示唆された。ヒト中脳に neuromelanin 顆粒を有するドパミン作動性神経細胞が分布し、中脳黒質を形成する。ZEB2 欠損脳幹オルガノイドは、野生型で見られる黒化領域が欠けており (図 8)、ZEB2 発現を欠いた MWS 患者において、中脳黒質の発生過程で異常が生じていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Joachim Luginbuhl, Masaya Matsubayashi, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Kaoru Kinugawa, Naohiko Iguchi, Takao Kiriya, Canbin Zheng, Tsukasa Kouno, Yan Jun Lan, Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Yoshihiko M. Sakaguchi, Riko Nagata, Tomoya Komeda, Naritaka Morikawa, et al.	4. 巻 -
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 -
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 該当する
1. 著者名 Lisa M. Smits, Stefano Magni, Kaoru Kinugawa, Kamil Grzyb, Joachim Luginbuhl, Sonia Sabate-Soler, Silvia Bolognin, Jay W. Shin, Eiichiro Mori, Alexander Skupin, Jens C. Schwamborn	4. 巻 382
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics reveals multiple neuronal cell types in human midbrain-specific organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 463 - 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03249-y	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 該当する
1. 著者名 Naoki Iwasa, Takeshi K. Matsui, Naohiko Iguchi, Kaoru Kinugawa, Naritaka Morikawa, Yoshihiko M. Sakaguchi, Tomo Shiota, Shinko Kobashigawa 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 -
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 該当する
1. 著者名 Kaoru Kinugawa, Joachim Luginbuhl, Takeshi K. Matsui, Nobuyuki Eura, Yoshihiko M. Sakaguchi, Jay W. Shin, Kazuma Sugie, Jens C. Schwamborn, Eiichiro Mori	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative analysis of human brain organoids of brainstem and midbrain at single-cell resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.09.02.279380	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Eiichiro Mori, Kazuma Sugie
2. 発表標題 A human cerebral organoid model for ZEB2-deficient Mowat-Wilson syndrome
3. 学会等名 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaoru Kinugawa, Kazuma Sugie, Eiichiro Mori
2. 発表標題 Single cell RNA sequencing analysis on human brainstem organoids
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Human InformatiX
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaoru Kinugawa, Takeshi K. Matsui, Nobuyuki Eura, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Naohiko Iguchi, Takao Kiriya, Eiichiro Mori, Kazuma Sugie
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequencing analysis on human brainstem organoids
3. 学会等名 61th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaoru Kinugawa, Nobuyuki Eura, Eiichiro mori, Kazuma Sugie
2. 発表標題 Comparative analysis of human brain organoids of brainstem and midbrain at single-cell resolution
3. 学会等名 62th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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