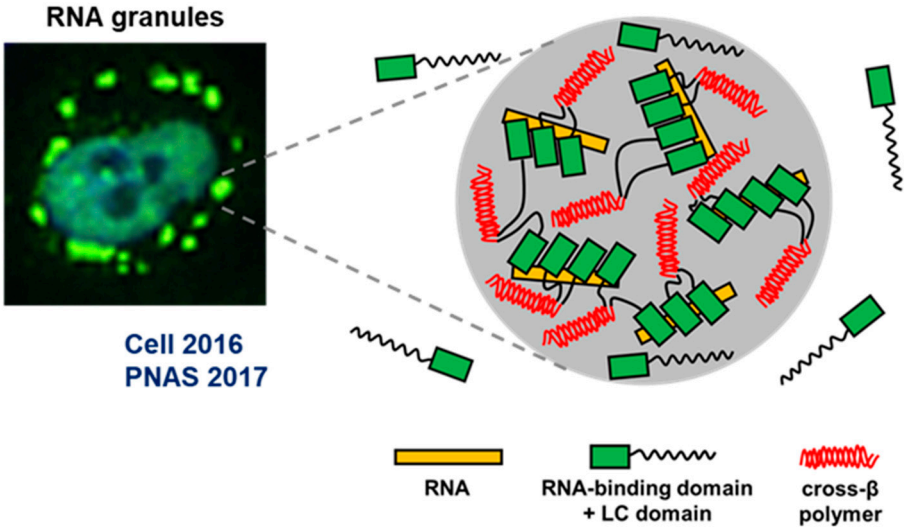
180　ヒト脳オーガノイドを用いた*C9orf72*関連ALS/FTDの研究	森　英一朗

【目的】神経難病の代表疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭型認知症（FTD）は、その原因遺伝子が多岐に渡ることから、分子生物学的な病態解明が遅れていた。しかしながら、近年、ALS／FTD に共通した病態を有する遺伝子異常として、*C9orf72*遺伝子のイントロンにおける異常な繰返し配列（GGGGCC）が報告された［Neuron 2011］。この *C9orf72*遺伝子異常は、ALS／FTD 発症の最も頻度の高い原因である。また、本遺伝子異常を伴う患者由来細胞では、スタートコドン（ATG）に依存しない翻訳によって、病的なポリペプチドを産生することが明らかになった［Science 2013］。これまでの研究から、*C9orf72*遺伝子の異常な繰返し配列から産生される PR（プロリン・アルギニン）ポリペプチドが病態発症の本態であること［Science 2014］、PR ポリペプチドが cross-βポリマーを形成する LC ドメインタンパク質に結合することに起因すること［Cell 2016］、PR ポリペプチドが核膜孔の FG ドメイン（LC ドメイン）と結合することで、核・細胞質間の物質輸送を阻害していること［PNAS 2017］が明らかになってきた。本研究では、ヒト脳組織における影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト ES 細胞から作製する脳オーガノイドにさらに改良を加え、ヒト脳組織レベルでの PR ポリペプチドの影響を調べた。

【結果】ヒト脳オーガノイドの成熟度の向上に成功した。また、PR ペプチドを発現する病態モデルの確立にも成功した。

PR ポリペプチドによる機能阻害の標的となる RNA 顆粒の形成機構



180. ヒト脳オーガノイドを用いた *C9orf72* 関連 ALS／FTD の研究

森　英一朗

奈良県立医科大学 医学部 未来基礎医学教室

Key words：筋萎縮性側索硬化症（ALS），*C9orf72*，PR ポリペプチド，RNA 顆粒，ヒト脳オーガノイド

緒　言

神経難病の代表疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭型認知症（FTD）は、その原因遺伝子が多岐に渡ることから、分子生物学的な病態解明が遅れていた。しかしながら、近年、ALS／FTD に共通した病態を有する遺伝子異常として、*C9orf72* 遺伝子のイントロンにおける異常な繰返し配列（GGGGCC）が報告された。この *C9orf72* 遺伝子異常は、ALS／FTD 発症の最も頻度の高い原因である。また、本遺伝子異常を伴う患者由来細胞では、スタートコドン（ATG）に依存しない翻訳によって、病的なポリペプチドを産生することが明らかになった。これは、従来考えられてきたセントラルドグマの概念を覆す興味深い知見である。

共同研究者の Steven McKnight らは、病的な cross-β ポリマーとして知られているアミロイドやプリオン等とは異なり、RNA 結合タンパク質（ALS 患者で変異が見つかっている FUS、TDP43、hnRNPs など）の LC ドメインからなる cross-β ポリマーは、動的かつ可逆的であることを明らかにした。また、RNA 結合タンパク質の LC ドメインからなる cross-β ポリマーの形成が、転写や、RNA スプライシングにおいて重要であることを明らかにした（図 1）。

また、Steven McKnight らは、*C9orf72* 遺伝子の異常な繰返し配列から産生される PR（プロリン・アルギニン）ポリペプチドが病態発症の本態であることを示した［1］。我々は Steven McKnight と共に、ALS/FTD の発症機序が、*C9orf72* の遺伝子異常によって発現する PR ポリペプチドが、cross-β ポリマーを形成する LC ドメインタンパク質に結合することに起因することを明らかにした［2］。さらに、我々は、PR ポリペプチドが核膜孔の FG ドメイン（LC ドメイン）と結合することで、核・細胞質間の物質輸送を阻害していることを明らかにした［3］。

我々は、これまでの研究で分子レベルでの病態発生機序を明らかにしてきた。次のステップでは、神経細胞や脳の組織レベルでの病態生理を詳細に検討することを目指す。また、組織レベルの研究の多くは、マウスなどの実験動物を用いた研究である。しかしながら、ヒト大脳皮質はより多くの層に分かれており、マウス大脳皮質と比較して著しく複雑な構造をもつことが知られている。そのため、ヒトの脳神経系の疾患の理解を深めるためには、ヒトの脳組織の試験管内での作製が求められていた。近年、培養条件下でヒト脳の構造を再現したヒト脳オーガノイドの樹立を複数のグループが報告している。なお、我々は、これまでにヒト iPS／ES 細胞からヒト脳オーガノイドを樹立する実験系の確立に成功している。本研究では、近年開発された、ヒト ES 細胞から作製する脳オーガノイドを用いて、組織レベルでの PR ポリペプチドの影響を調べ、ALS／FTD の病態解明、さらには神経難病の治療法確立につなげることを目的とする。

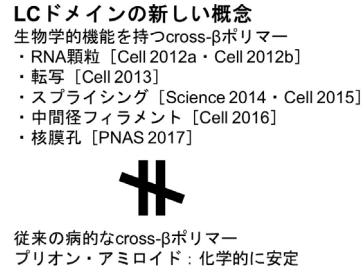


図 1. LC ドメインの新しい概念

従来の病的なもののみならず、LC ドメインの生物学的役割が近年明らかになってきた。

方法および結果

1.　ヒト脳オーガノイドの作製と長期培養

ヒト多能性幹細胞（hESC／hiPSC）から、Embryoid bodies（EBs）を介した、脳オーガノイドの作製方法。マトリゲルに埋め込んだのち、シェイカー上で浸透しながら培養を行った（図 2）。これまでの報告では、2〜3 ヶ月までの長期培養に関する成果しか報告が無かったが、6 ヶ月までの長期的維持培養を試みた［4］。

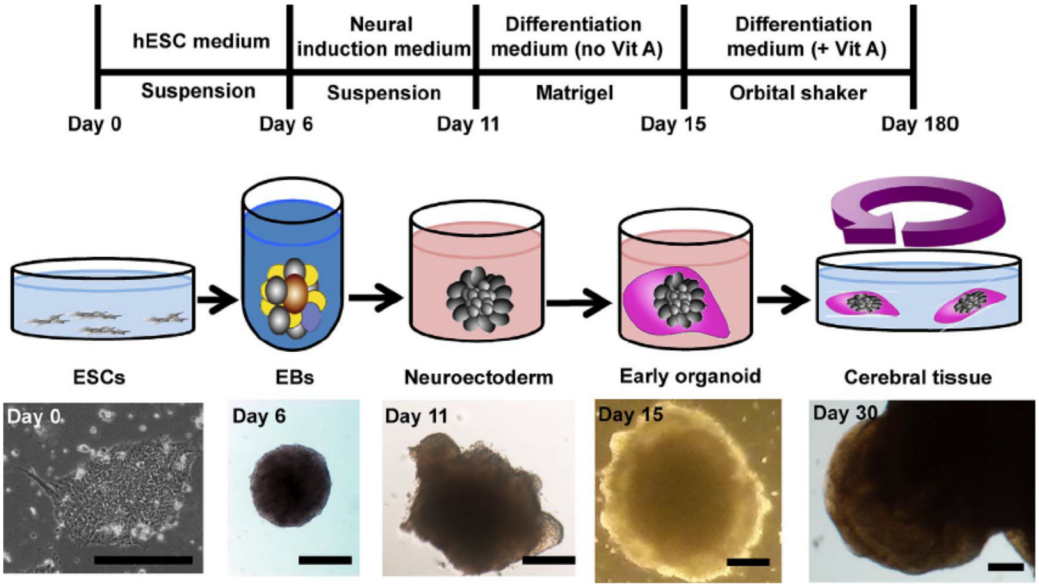


図 2.　ヒト脳オーガノイドの作製プロトコール

ヒト多能性幹細胞（hESC／hiPSC）から、Embryoid bodies（EBs）を介した、脳オーガノイドの作製方法。マトリゲルに埋め込んだのち、シェイカー上で浸透しながら培養を行う。

スケールバー：250 μm

2.　長期培養によるヒト脳オーガノイドの成熟化

6 ヶ月間の長期培養によって、ヒト脳オーガノイドにおいて組織学的に神経鞘での発現が認められる MBP の発現を神経細胞（TUJ1 陽性細胞）に認めた（図 3）［4］。また、その他に、抑制性神経（GAD67 陽性）および興奮性神経（VGLUT1 陽性）の存在も確認した［4］。

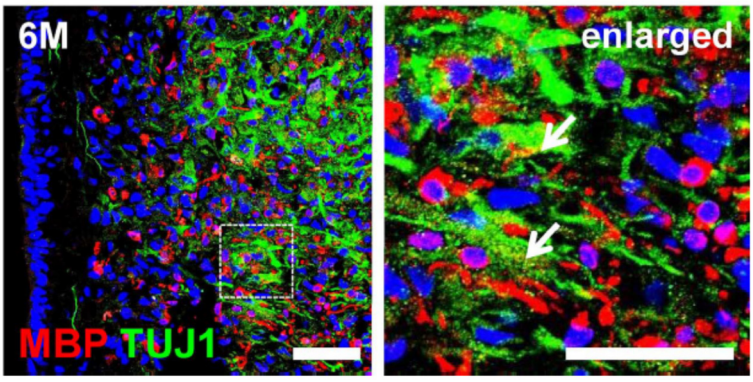


図 3.　ヒト脳オーガノイドの成熟化

神経鞘での発現が認められる MBP の発現を神経細胞（TUJ1 陽性細胞）に認めた。

スケールバー：100 μm

3. ミクログリアによって神経幹細胞が維持される

また、神経幹細胞の維持と成長には、様々な因子が関与していることが知られているが、詳細な機序は明らかになっていなかった。M2（抗炎症性）状態のミクログリアによって神経幹細胞の成長と幹細胞性が維持されていることを明らかにした［5］。

4. PR ポリペプチドによる脳神経組織への影響

PR によるヒト脳組織の評価のため、既に樹立済みであるヒト脳オーガノイド［4］を用いて評価を行った。これまでの試験管内や細胞での知見［2，3］と同様に、原子レベルでは LC ドメインによる cross-beta ポリマー化を凝集の方向へとシフトさせ、液-液相分離や RNA 顆粒の形成を阻害し、脳神経組織の機能障害へと繋げていることが明らかになった（図 4）［未発表］。

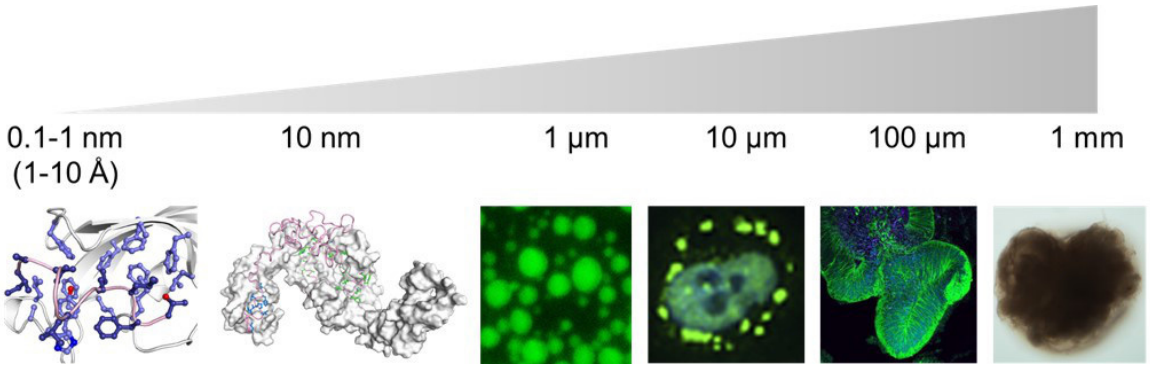


図 4. 原子レベルでの障害が及ぼす脳組織における障害のモデル
PR ポリペプチドは、原子レベルでは LC ドメインによる cross-beta ポリマー化を凝集の方向へとシフトさせ、液-液相分離や RNA 顆粒の形成を阻害し、脳神経組織の機能障害へと繋げていることが明らかになってきた。

考　察

本研究を通じて、ヒト脳オーガノイドの成熟化に成功し［4］、ミクログリアの神経幹細胞への影響を明らかにした［5］。ヒト脳組織における PR ポリペプチドの機能についても明らかにした。しかしながら、図 4 で示した様な全体像を得るまでには、まだまだ詳細な原子レベルでの構造学的検討や、試験管内での相分離制御の詳細な定量的評価、さらには脳組織レベルにおける様々な生物学的機能評価が必要となる。引き続き、ALS および FTD を含む多くの脳神経変性疾患の病態解明につながる研究の発展が望まれる。

共同研究者・謝辞

本研究は、米国テキサス大学 Southwestern Medical Center の Steven L. McKnight 教授、奈良県立医科大学脳神経内科学講座の杉江和馬教授と松井健助教、及び多くの関係者の支援によって実現した。

文　献

1) Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, Kim J, Yun J, Xie Y, McKnight SL. Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. Science. 2014 Sep 5; 345(6201): 1139-1145. doi: 10.1126/science.1254917.

2) Lin Y, Mori E, Kato M, Xiang S, Wu L, Kwon I, McKnight SL. Toxic PR Poly-Dipeptides Encoded by the C9orf72 Repeat Expansion Target LC Domain Polymers. Cell. 2016 Oct 20; 167(3): 789-802. e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.003.

3) Shi KY, Mori E, Nizami ZF, Lin Y, Kato M, Xiang S, Wu LC, Ding M, Yu Y, Gall JG, McKnight SL. Toxic PRn poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion block nuclear import and export. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Feb 14; 114(7): E1111-E1117. doi: 10.1073/pnas.1620293114.

4) Matsui TK, Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Hayashi RK, Zheng C, Sugie K, Hasegawa M, Nakagawa T, Mori E. Six-month cultured cerebral organoids from human ES cells contain matured neural cells. Neurosci Lett. 2018 Mar 23; 670: 75-82. doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.040.

5) Matsui TK, Mori E. Microglia support neural stem cell maintenance and growth. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Sep 10; 503(3): 1880-1884. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.130.