

多領域性脳オルガノイドを用いたシヌクレイノパチー分子病態の解明

西村周泰

同志社大学研究開発推進機構

【研究の背景】

パーキンソン病(PD)は、黒質から線条体に投射するドパミン神経の選択的な脱落・変性によって引き起こされる神経変性疾患である。患者の多くは65歳以上の高齢者であり、日本には約16万人の患者がいるとされている。現行の治療法は薬物療法が主流であり、症状の改善には一定の効果を示すが症状の進行を抑制することはできない。従って、発症を予防する実質的な方法を開発することが望まれている。

PDの発症要因の一つとして、 α -シヌクレインの凝集やプリオン様脳内伝播によって引き起こされる神経変性(シヌクレイノパチー)とそれに起因する神経細胞死が誘発されることが知られているが(Braak *et al.*, *Neurobiol. Aging*, 1997)、現状では死後の病理解剖による確定診断によって現象が観察できるのみである。従って、シヌクレイノパチーの病態を正確に理解し、その根拠に基づいた予防法・治療法を確立するためには、分子レベルで変化する病因タンパク質の脳内伝播および物性変化の過程を解明できるヒト脳モデルの構築が必要であると考えられる。

【目 的】

複数領域にわたって起こる病因タンパク質の脳内伝播を *in vitro* 実験系を用いて再現するため、ヒト多能性幹細胞(iPS細胞)から三次元構造を持つ中脳-線条体オルガノイドを作製し、 α -シヌクレインの脳内伝播および病変を再現し、病態を詳細に理解するための脳モデルを作製することを目的とした。

【方 法】

ヒト iPS 細胞から線条体ニューロスフェアおよび中脳ニューロスフェアの誘導を行った。用いたプロトコールは自身の研究室で独自に開発したプロトコールを用いた(Amimoto *et al.*, *Stem Cell Res.*, 2021; Nishimura *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2023)。誘導したニューロスフェアの特性解析として脳領域特異的なマーカーを用いた免疫染色および PCR による遺伝子発現解析を行った。 α -シヌクレインを標的とした病態解析を進めるために、 α -シヌクレインを誘導的に発現するヒト iPS 細胞と α -シヌクレイン欠損ヒト iPS 細胞の樹立を行った。 α -シヌクレイン誘導性発現ヒト iPS 細胞は、piggyBac システムを用いて当該遺伝子をゲノム DNA に挿入した。また α -シヌクレイン欠損ヒト iPS 細胞は CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。

【結 果】

研究成果 1:ヒト iPS 細胞から中脳-線条体オルガノイドの作製

本研究では、三次元培養法を用いてヒト iPS 細胞から線条体ニューロスフェアおよび中脳ニューロスフェアの作製法の確立を行った。また両ニューロスフェアを融合させた後、長期間培養をした時に両ニューロスフェアのサイズが同等になるように、スフェアを作製する際の細胞数の検討を行い、適切なサイズになる細胞数をそれぞれ決定した。次に、両ニューロスフェアの特性を明らかにするべく、免疫染色および遺伝子発現解析を行なった。その結果、線条体ニューロスフェアでは DARPP32 陽性神経細胞が多数観察され、中脳ニューロスフェアでは TH 陽性神経細胞が多数観察され、両ニューロスフェ

アを正確に作製できることが明らかとなった。

研究成果2:線条体-中脳オルガノイドを用いたシヌクレイノパチーの分子病態の可視化

線条体-中脳オルガノイドを用いて、脳の領域を越えて伝播する α -シヌクレインの挙動を解析できるモデルシステムを構築するため、 α -シヌクレイン欠損ヒト iPS 細胞および α -シヌクレイン誘導発現ヒト iPS 細胞の樹立を行なった。 α -シヌクレイン欠損ヒト iPS 細胞の作製は、CRISPR/Cas9 法を用いて行なった。 α -シヌクレイン遺伝子の exon3 に gRNA を設計することで、 α -シヌクレイン遺伝子の両アレルにインデルを挿入し、両アレル共にフレームシフトによるナンセンス変異を導入することに成功した。またこの細胞からドパミン神経を誘導し、 α -シヌクレインタンパク質の発現を検討したところ、野生型では α -シヌクレインの発現が観察されたが、 α -シヌクレイン欠損細胞では、 α -シヌクレインタンパク質の発現が観察されなかった。また α -シヌクレインの欠損は、ドパミン神経への誘導効率自体には影響を与えないことが明らかとなった (Inoue and Nishimura *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 2023)。

次に、 α -シヌクレイン誘導発現ヒト iPS 細胞の作製を行なった。細胞の樹立には *piggyBac* トランスポゾンを用いて Tet-On システムによって α -シヌクレインの発現を誘導できるシステムを採用した。遺伝子導入後、薬剤選択を行い、 α -シヌクレイン誘導発現ヒト iPS 細胞株を 2 株樹立した。これらの細胞について、未分化時における α -シヌクレインの誘導割合を検証したところ、大多数の細胞で α -シヌクレインが発現することを確認した。また神経誘導後においてもおよそ 50% の細胞が α -シヌクレインを発現することも確認できた。今後は、それぞれの細胞から中脳ニューロスフェアおよび線条体ニューロスフェアを作製し、 α -シヌクレインの挙動を観察する予定である。

【考 察】

本研究では、ヒト iPS 細胞から線条体ニューロスフェアおよび中脳ニューロスフェアをそれぞれ誘導し、お互いを融合させることで、線条体と中脳の 2 領域を有するニューロスフェアの作製に成功した。この線条体-中脳ニューロスフェア内では、中脳側から線条体側へのドパミン神経の投射が確認できたことから、部分的にはあるが脳の構造を模倣した形態を有していることが明らかとなった。さらにこの 2 領域を持つニューロスフェアを用いて α -シヌクレインの領域間伝播を再現するため、 α -シヌクレイン誘導性発現ヒト iPS 細胞と α -シヌクレイン欠損ヒト iPS 細胞の作製に成功し、解析に必要なリソースを確立することができた。今後は、これらのリソースを活用して、脳領域を越えて伝播する α -シヌクレインの挙動を解析できる脳モデルの作製を進める予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

神経変性を伴うシヌクレイノパチーは、一度発症すると有効な治療がないのが現状であるため、有効的な予防法の開発が求められている。本研究課題で得られた線条体-中脳ニューロスフェアを用いてシヌクレイノパチーの病態が再現でき、さらにそれを抑制する予防的創薬のコンセプトを確立することができれば、PD の発症リスクの軽減へと繋がることが期待される。さらに PD 発症者数の増加を抑制できれば医療資源や医療費の圧迫も抑制でき、臨床への貢献度は大きいと考えている。

【参考・引用文献】

Heiko Braak, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A I de Vos, Ernst N H Jansen Steur, Eva Braak. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, **24** (2), 197-211 (2003).

Naoya Amimoto, Kaneyasu Nishimura, Shun Shimohama and Kazuyuki Takata. Generation of striatal neurons from human induced pluripotent stem cells by controlling extrinsic signals with small molecules. *Stem Cell Res.*, **55**, 102486 (2021).

Kaneyasu Nishimura, Shanzheng Yang, Ka Wai Lee, Emilía Sif Ásgrímsdóttir, Kasra Nikouei, Wojciech Paslawski, Sabine Gnodde, Guochang Lyu, Lijuan Hu, Carmen Saltó, Per Svenningsson, Jens Hjerling-Leffler, Sten Linnarsson and Ernest Arenas. Single-cell transcriptomics reveals correct developmental dynamics and high-quality midbrain cell types by improved

hESC differentiation. *Stem Cell Reports*, **18** (1), 337–353 (2023).

Shizen Inoue, Kaneyasu Nishimura, Serina Gima, Mai Nakano and Kazuyuki Takata. CRISPR–Cas9–edited *SNCA* knockout human induced pluripotent stem cell–derived dopaminergic neurons and their vulnerability to neurotoxicity. *Biol. Pharm. Bull.*, **46** (3), 517–522 (2023).