

脳オルガノイド技術により挑む精神疾患小脳病態の解明

奥村啓樹

名古屋大学医学部附属病院 薬剤部
名古屋大学大学院医学系研究科 精神疾患病態解明学

【研究の背景】

大規模ゲノム解析により、精神疾患横断的に患者で同定される発症リスクバリエントの存在が明らかとなってきた¹⁾。その一つが ASTN2 欠失である。ASTN2 にはヒト特有のエクソンが存在し、そのエクソンを包含する領域に患者で同定されるバリエントが集積することから、ヒト細胞・組織を用いた解析の重要性が示唆されている^{2,3)}。

これまでに我々は ASTN2 欠失患者 iPS 細胞を用いた解析を進めてきた。その結果、ASTN2 欠失患者 iPS 細胞から誘導した neurosphere において、神経発達異常およびマイトファジー亢進が生じることを明らかにし、その分子メカニズムとしてヒト特異的に発現する遺伝子 ZNF558 の発現低下を介した、SPATA18 の発現増加を同定した⁴⁾。一方で、従来の誘導法では脳の細胞多様性や細胞間相互作用、脳領域特異性を再現することが難しく、ASTN2 欠失による細胞種・脳領域特異的な脆弱性を評価できないという課題が残されていた。

近年、脳オルガノイド誘導法を用いて、生体に類似した三次元組織を脳領域特異的に誘導することが可能となり、大脳皮質、海馬、視床、線条体、小脳⁵⁻⁹⁾など多様な脳領域オルガノイドが報告されている。ASTN2 は脳全体に発現するが、特に小脳において高発現することが知られている¹⁰⁾。加えて、小脳は運動機能のみならず脳の高次機能や精神疾患との関連が示唆されている¹¹⁻¹⁴⁾。そこで本研究では、ASTN2 欠失患者 iPS 細胞からヒト小脳オルガノイドを作製・解析することで、精神疾患を担うヒト小脳の分子・細胞機序を明らかにできるのではないかと着想した。

【目 的】

本研究の目的は、精神疾患の発症・病態解明を目指し、①精神疾患に共通したリスクバリエントでありヒト特有の機能が示唆される ASTN2、②様々な精神疾患で異常が報告される小脳に着目し、精神疾患を担うヒト小脳の分子・細胞機序を明らかにすることである。iPS 細胞から脳領域特異的な三次元組織を誘導可能な脳オルガノイド技術を活用し、ASTN2 欠失患者小脳における分子・機能変化を解析する。

【方 法】

健常者 3 例、ASTN2 欠失患者 1 例(統合失調症例)由来 iPS 細胞 2 株、およびゲノム編集により作製した ASTN2 欠失 iPS 細胞1株の計 6 種類の iPS 細胞から、小脳オルガノイドを誘導し、免疫染色、形態解析、シングルセル(sc)RNA-seq 解析を行った。本研究は名古屋大学生命倫理審査委員会の承認を得て実施した。

【結 果】

誘導したオルガノイドでは、免疫染色によりプルキンエ細胞前駆マーカー CALB1、KIRREL2、顆粒細胞マーカー ATOH1 の発現が確認され、小脳領域への領域化が示唆された。形態解析では、ASTN2 欠失群に共通して円形度に変化は認められなかった一方、面積及び周囲長は有意に低下していた。scRNA-seq 解析による構成細胞比率の比較では、ASTN2 欠失

群において放射状グリアの有意な減少が認められた。放射状グリアクラスターの gene ontology 解析では、ASTN2 欠失群で発現低下遺伝子が cell cycle (KEGG) および ATP-dependent activity, acting on DNA (MF) に最も有意に集積していた。さらに細胞周期解析から増殖期細胞の有意な減少、あわせて増殖細胞マーカーである MKI67 陽性細胞率の低下が確認された。加えて、放射状グリアクラスターに限局して、ZNF558 の発現低下および SPATA18 の有意な発現増加が同時に認められ、ATP 合成酵素構成遺伝子群の発現低下傾向も確認された。

【考 察】

ASTN2 欠失群では小脳オルガノイドサイズの低下とともに放射状グリアの減少および増殖期細胞の減少が観察された。発生期における放射状グリアの増殖能の変化は脳容積に強く影響することが知られ、本研究で観察された放射状グリアの増殖低下は小脳オルガノイドサイズ低下の主要因である可能性が高い。さらに本研究では、放射状グリアにおいて ATP 合成関連遺伝子群の発現低下やミトコンドリア機能異常を示唆する分子変化が認められた。発達期小脳では、放射状グリアにおけるミトコンドリア機能低下が増殖不全を引き起こすことが既報から示されており、ASTN2 欠失によって生じた ATP 産生低下およびミトコンドリア機能異常が、放射状グリアの増殖能低下を誘導した可能性が考えられる¹⁵⁾。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で確立した ASTN2 欠失小脳オルガノイドモデルは、精神疾患患者で報告されている小脳容積低下を反映する可能性のあるヒトモデルとして位置づけられる。本モデルを用いることで、小脳発生過程における細胞種特異的脆弱性を分子レベルで解析することが可能となり、精神疾患の病態理解に資するとともに、将来的な治療標的探索やスクリーニング系構築など創薬研究への応用、さらには病態に基づく診断・治療戦略検討への基盤となることが期待される。

【参考・引用文献】

1. Kushima, I, Nakatochi M, Aleksic B, Okada T, Kimura H, Kato H *et al.* Cross-Disorder Analysis of Genic and Regulatory Copy Number Variations in Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry* 2022; 92: 362-374.
2. Lionel, AC, Tammimies K, Vaags AK, Rosenfeld JA, Ahn JW, Merico D *et al.* Disruption of the ASTN2/TRIM32 locus at 9q33.1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2752-2768.
3. Mao, Y, Harvey WT, Porubsky D, Munson KM, Hoekzema K, Lewis AP *et al.* Structurally divergent and recurrently mutated regions of primate genomes. *Cell* 2024; 187: 1547-1562.e1513.
4. Hayashi, Y, Okumura H, Arioka Y, Kushima I, Mori D, Lo T *et al.* Analysis of human neuronal cells carrying ASTN2 deletion associated with psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 2024; 14: 236.
5. Chen, X, Saiyin H, Liu Y, Wang Y, Li X, Ji R *et al.* Human striatal organoids derived from pluripotent stem cells recapitulate striatal development and compartments. *PLoS Biol* 2022; 20: e3001868.
6. Kadoshima, T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M *et al.* Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: 20284-20289.
7. Muguruma, K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K & Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep* 2015; 10: 537-550.
8. Sakaguchi, H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M *et al.* Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nature Communications* 2015; 6: 8896.
9. Xiang, Y, Tanaka Y, Cakir B, Patterson B, Kim KY, Sun P *et al.* hESC-Derived Thalamic Organoids Form Reciprocal

- Projections When Fused with Cortical Organoids. *Cell Stem Cell* 2019; 24: 487–497.e487.
10. Wilson, PM, Fryer RH, Fang Y & Hatten ME. *Astn2*, a novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. *J Neurosci* 2010; 30: 8529–8540.
 11. Crucitti, J, Hyde C, Enticott PG & Stokes MA. Are Vermal Lobules VI–VII Smaller in Autism Spectrum Disorder? *Cerebellum* 2020; 19: 617–628.
 12. Moberget, T, Doan NT, Alnæs D, Kaufmann T, Córdova-Palomera A, Lagerberg TV *et al.* Cerebellar volume and cerebellocerebral structural covariance in schizophrenia: a multisite mega-analysis of 983 patients and 1349 healthy controls. *Mol Psychiatry* 2018; 23: 1512–1520.
 13. Tai, H, Kandeel N, Menon M, Ibrahim A, Choo B, Santana R *et al.* Role of the Cerebellum in Bipolar Disorder: A Systematic Literature Review. *Cureus* 2024; 16: e56044.
 14. Wang, SS, Kloth AD & Badura A. The cerebellum, sensitive periods, and autism. *Neuron* 2014; 83: 518–532.
 15. Zheng, H, Yu WM, Shen J, Kang S, Hambardzumyan D, Li JY *et al.* Mitochondrial oxidation of the carbohydrate fuel is required for neural precursor/stem cell function and postnatal cerebellar development. *Sci Adv* 2018; 4: eaat2681.