

Title	脳オルガノイドを用いたCHARGE症候群における神経発達遅滞の病態解明
Sub Title	Unraveling mechanism of pathogenesis in CHARGE syndrome using iPSC-derived brain organoid
Author	神山, 淳(Kohyama, Jun)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、CHD7が中枢神経系の神経前駆細胞におけるエンハンサー制御に重要であることを解明するため、CHARGE症候群患者由来のiPS細胞を用いた脳オルガノイドモデルを使用し、エピゲノム制御機構を解析した。具体的にはCHD7の標的遺伝子とエピゲノムの状態を調査し、CHD7が組織特異的なpioneer因子と結合してエンハンサー活性を調節するメカニズムや、グリア細胞の成熟異常を発見しました。また、新規因子XがCHD7と共役し、核内で液滴を形成して転写活性化に関与することを見出し、この機能の阻害がCHARGE症候群患者の表現型を再現することを確認しました。 Using iPS cells derived from CHARGE syndrome patients, the research involved brain organoid models to investigate the epigenomic regulatory mechanisms of CHD7's target genes. Methods included histological examination and single-cell level RNA-Seq analyses to explore the target genes and epigenomic states influenced by CHD7. The study found that CHD7 binds with tissue-specific pioneer factors to regulate enhancer activation and identified abnormalities in glial cell maturation. Additionally, a novel factor, Factor X, was discovered to interact with CHD7, forming droplets in the nucleus, particularly in neural progenitor cells, concentrating transcriptional activators and positively regulating CHD7 activity. Inhibition of this droplet formation in Factor X resulted in phenotypes similar to those of CHARGE syndrome patients' iPS cells, suggesting new mechanisms in CHD7 function.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2019～2023 課題番号：19H03623 研究分野：分子生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19H03623seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H03623

研究課題名（和文）脳オルガノイドを用いたCHARGE症候群における神経発達遅滞の病態解明

研究課題名（英文）Unraveling mechanism of pathogenesis in CHARGE syndrome using iPSC-derived brain organoid

研究代表者

神山 淳（KOHYAMA, JUN）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：30437511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CHD7が中枢神経系の神経前駆細胞におけるエンハンサー制御に重要であることを解明するため、CHARGE症候群患者由来のiPS細胞を用いた脳オルガノイドモデルを使用し、エピゲノム制御機構を解析した。具体的にはCHD7の標的遺伝子とエピゲノムの状態を調査し、CHD7が組織特異的なpioneer因子と結合してエンハンサー活性を調節するメカニズムや、グリア細胞の成熟異常を発見しました。また、新規因子XがCHD7と共役し、核内で液滴を形成して転写活性化に関与することを見出し、この機能の障害がCHARGE症候群患者の表現型を再現することを確認しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHD7遺伝子と関連因子の機能解明により、早期診断や適切な治療法の開発が進むことで、患者の生活の質向上や医療費削減が期待される。また、遺伝的リスクを抱える家族への正確な情報提供や、エピゲノム制御と転写調節の新たな知見の提供を通じて、他の神経発生障害の理解や治療法開発にも寄与する可能性がある。これにより、CHARGE症候群患者やその家族が病気を理解し、対処するための支援が強化され、社会全体の理解が深まることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using iPSC cells derived from CHARGE syndrome patients, the research involved brain organoid models to investigate the epigenomic regulatory mechanisms of CHD7's target genes. Methods included histological examination and single-cell level RNA-Seq analyses to explore the target genes and epigenomic states influenced by CHD7. The study found that CHD7 binds with tissue-specific pioneer factors to regulate enhancer activation and identified abnormalities in glial cell maturation. Additionally, a novel factor, Factor X, was discovered to interact with CHD7, forming droplets in the nucleus, particularly in neural progenitor cells, concentrating transcriptional activators and positively regulating CHD7 activity. Inhibition of this droplet formation in Factor X resulted in phenotypes similar to those of CHARGE syndrome patients' iPSC cells, suggesting new mechanisms in CHD7 function.

研究分野：分子生物学

キーワード：CHARGE症候群 脳オルガノイド

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性小児神経疾患はてんかんや精神発達遅滞などの神経症状と同時に多臓器にわたる奇形や障害などを併発することがあり、長期間にわたる QOL の低下や医学的サポートを必要とする。しかし、患者数の希少性や適切なモデル動物が存在しないなどの理由により根本的な治療法が存在していない。このような疾患の一つである CHARGE 症候群は CHD7 遺伝子の変異により生じる疾患である。CHD7 はクロマチンリモデリング因子としてエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わると考えられている。

近年、遺伝子発現における遺伝子配列の変化を伴わない、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の重要性が明らかとなりつつある。この制御に関わる因子は標的遺伝子の転写量の微調整や、転写のタイミングを決定している。CHARGE 症候群のみならず、小児の神経発生異常や神経発達遅滞をきたす疾患においてエピジェネティックな遺伝子発現制御を司る因子の異常が見出されていることはヒトにおけるこの機構の重要性を示唆する。

エピジェネティックな遺伝子発現制御機構において『領域特異的なエピジェネティック修飾の分化や発達における意義』は大きな謎である。特にエピジェネティックな遺伝子発現制御機構のうちエンハンサー制御機構は遺伝子の時間空間的な発現制御を規定する重要な機構として知られる。エンハンサー領域は一般に転写共役因子 p300 の結合状態やヒストンのアセチル化修飾状態等で定義されるが、その活性制御メカニズムは明らかではない。

一方、ヒト iPS 細胞樹立法が確立され、ヒト検体に対する実験的な介入が可能となっている。さらに、中枢神経系においては iPS 細胞から大脳皮質構造を模した脳オルガノイドの作成法が報告され、高度な疾患モデル系の構築はもちろんのこと、ヒト神経発生を模倣する強力なツールとして注目されている。このことは、脳の構造異常を呈する患者由来の iPS 細胞を利用することにより「疾患の病態解明」と同時に「疾患をモデルとした、ヒトに対する神経発生学的アプローチ」が可能となることを意味する。

2. 研究の目的

本研究では CHARGE 症候群における中枢神経系症状や脳オルガノイドにおける表現型に着目し、ヒト中枢神経系発生で神経前駆細胞において確立されたエピゲノム状態が分化過程や脳形成過程においてどのように形成されるのかを明らかにする。特に、①神経前駆細胞に一過性発現する CHD7 により確立されたエンハンサー領域のエピゲノム状態が分化過程において維持されるメカニズムを明らかにする。すなわち、一度獲得されたエンハンサー領域におけるエピジェネティックメモリー認識機構を明らかにする。本研究では脳オルガノイドをモデルとして脳形成過程におけるエピゲノム修飾の意義、またその破綻による脳構造異常の病態解明、さらに革新的治療法確立に向けた基盤を確立する。これは病態の理解はもちろんのことヒト中枢神経系における基本原理の理解にもつながる知見となる。

3. 研究の方法

- (1) 脳オルガノイドの作成及び解析：健常人及び CHARGE 症候群由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作成し、免疫組織学的解析を行なった。
- (2) 脳オルガノイド作成方法の最適化：より多くの細胞種が含まれる脳オルガノイドを作成するためにオルガノイドの作成方法を改良し、より迅速に分化誘導かつ、均一な脳オルガノイドを作成する手法開発を試みた。
- (3) ChIP-seq によるエピゲノム解析：健常人及び CHARGE 症候群由来の脳オルガノイド、神経前

駆細胞、神経堤細胞を対象とし、CHD7 や各種ヒストン修飾マーカーに対する抗体を用いて ChIP-Seq を行った。

(4)CHD7 共役因子の同定 : ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org/>) のデータを元にし、CHD7 共役因子の候補を選定し、Co-IP により結合を確認した。

(5)CHD7 共役因子の生化学的解析及び iPS 細胞を用いた解析

4. 研究成果

(1) CHARGE 症候群由来脳オルガノイドの表現型解析

iPS 細胞から脳オルガノイドを作成する手法を用いて解析したところ、CHARGE 症候群由来 iPS 細胞より脳オルガノイドを分化誘導したところ、神経管構造の構造異常が見出された。また、CHARGE 症候群由来脳オルガノイドにおいては神経堤細胞様の細胞集団が見出された。一方、本手法で作成された脳オルガノイドは主に神経細胞と神経前駆細胞が含まれる細胞集団しか出現せず、より成熟した神経細胞やグリア細胞の出現は限定的であった。

(2) 成熟脳オルガノイドの作成方法の開発

脳オルガノイドの成熟を促進するために液性因子の最適化を行い、また、均一なオルガノイドを作成するために iPSC のマイクロパターンニングによって付着系の実験系を構築した。この手法ではアストロサイトやオリゴデンドロサイトを含む、空間的に組織化された神経オルガノイドを作成可能であることがわかった。オルガノイドのサイズは均一であり、1 細胞 RNA-Seq によってオルガノイドには非神経誘導体がほとんど含まれておらず、ミエリン構造が存在することを見出した。この手法を用いて CHARGE 症候群由来 iPS 細胞からオルガノイドを作成することによりグリア細胞における表現型が見出された。

(3) 神経堤細胞における CHD7 の役割

CHD7 の神経堤細胞(hCC)における役割を解析した。ゲノム全体の ChIP-Seq データを分析し、hNCC 特異的な CHD7 結合プロファイルを同定することにより、hNCC の CHD7 によって支配されるシス制御要素の特徴づけを実施した。特に、hNCC における CHD7 結合の包括的な特性を決定するために、ヒト人工多能性幹細胞やヒト神経上皮細胞などの細胞型間で CHD7 結合領域を比較したところ、hNCC 特異的な CHD7 結合領域の分析により、hNCC における細胞型特異的な転写プログラムを促進する潜在的な補因子として転写因子 AP-2 α を明らかとした。CHD7 は活性エンハンサー領域と強く関連しており、hNCC 特異的な遺伝子の発現を可能にして hNCC の機能を維持することが示唆された。

(4) 新規 CHD7 共役因子の同定と解析

CHD7の分子機構の解明を目的とする研究課題を遂行する中で見出した新規転写共役因子Xを見出した。この因子Xに関してはiPS細胞由来神経前駆細胞においてノックダウンすることによりCHARGE症候群と同様の表現型を示した。また、表現型解析の過程で核内局在が相分離により規定される可能性を見出した。特に因子Xは転写活性化に関わる因子を液滴形成を介して濃縮し、CHD7などの転写活性に関して正の制御を担っていることを見出した。因子Xの核内における液滴形成は特に神経前駆細胞において増強されていた。因子Xに関してこの液滴形成に関わる機能を阻害することによりCHARGE症候群患者由来iPS細胞と同様の表現型を示すことが明らかとなり、CHD7の動作機構に関して新たな機構が存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sanosaka Tsukasa, Okuno Hironobu, Mizota Noriko, Andoh-Noda Tomoko, Sato Miki, Tomooka Ryo, Banno Satoe, Kohyama Jun, Okano Hideyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Chromatin remodeler CHD7 targets active enhancer region to regulate cell type-specific gene expression in human neural crest cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-27293-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Mitsuhiro, Yamaguchi Ryo, He Ching Chi Jimmy, Ikeda Atsushi, Okano Hideyuki, Kohyama Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 Current status and prospects of regenerative medicine for spinal cord injury using human induced pluripotent stem cells: a review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Investigation	6. 最初と最後の頁 6～6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/sci-2022-037	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ideno Hirotsato, Imaizumi Kent, Shimada Hiroko, Sanosaka Tsukasa, Nemoto Akisa, Kohyama Jun, Okano Hideyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Human PSCs determine the competency of cerebral organoid differentiation via FGF signaling and epigenetic mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105140～105140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105140	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ago K, Nagoshi N, Imaizumi K, Kitagawa T, Kawai M, Kajikawa K, Shibata R, Kamata Y, Kojima K, Shinozaki M, Kondo T, Iwano S, Miyawaki A, Ohtsuka M, Bito H, Kobayashi K, Shibata S, Shindo T, Kohyama J, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H	4. 巻 5
2. 論文標題 A non-invasive system to monitor in vivo neural graft activity after spinal cord injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03736-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Tomoko, Iga Takahito, Sugiura Yuki, Kusumoto Dai, Sanosaka Tsukasa, Tai-Nagara Ikue, Takeda Norihiko, Fong Guo-Hua, Ito Kosei, Ema Masatsugu, Okano Hideyuki, Kohyama Jun, Suematsu Makoto, Kubota Yoshiaki	4. 巻 219
2. 論文標題 Coupling of angiogenesis and odontogenesis orchestrates tooth mineralization in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211789	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Reo, Nagoshi Narihito, Kajikawa Keita, Ito Shuhei, Shibata Shinsuke, Shindo Tomoko, Khazaei Mohamad, Nori Satoshi, Kohyama Jun, Fehlings Michael G., Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Administration of C5a Receptor Antagonist Improves the Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in the Acute Phase of Spinal Cord Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 667 ~ 682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2021.0225	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa Takahiro, Nagoshi Narihito, Kamata Yasuhiro, Kawai Momotaro, Ago Kentaro, Kajikawa Keita, Shibata Reo, Sato Yuta, Imaizumi Kent, Shindo Tomoko, Shinozaki Munehisa, Kohyama Jun, Shibata Shinsuke, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Modulation by DREADD reveals the therapeutic effect of human iPSC-derived neuronal activity on functional recovery after spinal cord injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 127 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.12.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamata Yasuhiro, Isoda Miho, Sanosaka Tsukasa, Shibata Reo, Ito Shuhei, Okubo Toshiki, Shinozaki Munehisa, Inoue Mitsuhiro, Koya Ikuko, Shibata Shinsuke, Shindo Tomoko, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki, Nagoshi Narihito, Kohyama Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 A robust culture system to generate neural progenitors with gliogenic competence from clinically relevant induced pluripotent stem cells for treatment of spinal cord injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 398 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.20-0269	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------	---------