

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16558

研究課題名（和文）発生ダイナミズムを応用した大脳オルガノイド神経上皮組織による大脳皮質再生法の開発

研究課題名（英文）Regeneration of cerebral cortex using pluripotent stem cell-derived cerebral organoids.

研究代表者

馬場 庸平（BAMBA, YOHEI）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20577465

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：多能性幹細胞由来大脳オルガノイドを三次元培養担体上で形成することで、大脳皮質神経細胞層をシート状に形成することに成功した。ロバストなスキャフォールドは、試験管内培養系での細胞の過密を低減し、より良い細胞生育環境を実現し、従来の大脳オルガノイド法に比較してより厚い神経細胞層を形成できることを示した。自己組織化に頼っていた大脳オルガノイドの形成を、スキャフォールドを組み合わせることで、その形態をコントロールすることを可能とした。今後、ヒト大脳皮質発生の試験管内モデルや中枢神経作動薬の薬剤スクリーニング、将来的には損傷大脳皮質の再生医療などに応用が期待できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞から大脳オルガノイドを誘導する技術により試験管内でヒト大脳皮質を形成することが可能となったが、その皮質神経細胞層のサイズは非常に小さい。これは血管系が内在しないことなどの培養系であることの影響もあると思われる。我々は、今回、三次元培養担体による頑強な足場を、大脳オルガノイドに組み合わせることにより、その大脳皮質細胞層を従来法よりも大幅に厚く、シート状に形成することに成功した。従来自己組織化に頼っていた大脳オルガノイドの形成に、足場を使用することによりその形態をコントロールするという新たなアプローチは、今後ヒト脳研究や薬剤開発、大脳皮質の再生医療などへの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We successfully developed the novel method to generate the cerebral organoids from induced pluripotent stem cells using the three-dimensional scaffolds. In our methods, robust scaffold provided the appropriate intercellular spaces and robust frameworks, which permit the cortical neurons migrating from cerebral organoids form the sheet-like neuronal layer. This sheet-like cortical neuronal layer showed the primitive inside-out structure that observed in the the developing human cerebral cortex. Surprisingly, this sheet-like neuronal layer could be enlarged dependent on the scaffolds thickness, and we succeeded in generating the thicker cortical neuronal layer than that of the cerebral organoids alone. Our approach would be the unprecedented approach to enlarge the cortical neuronal layer of the cerebral organoids, and our sheet-like cerebral cortex would be applicable in the investigation of the human corticogenesis or regenerative medicine.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：人工多能性幹細胞 大脳オルガノイド 三次元培養単体 大脳皮質神経 神経細胞シート

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト大脳皮質は脳血管障害や外傷などで損傷を受けると、その部位の大脳皮質ニューロンが担っていた機能が大きく損なわれる。大脳皮質を機能的・形態学的に再生することで、これまでにない中枢神経再生技術の開発につながると考えられる。その技術開発の基礎として、我々は大脳オルガノイドに着目した。

近年の多能性幹細胞分化技術の進歩により、試験管内で三次元的に自己組織化のプロセスを経て、ヒト大脳皮質に類似した組織である、大脳オルガノイドを誘導することが可能となった。大脳オルガノイドは中心部に神経上皮細胞が存在し、そこから分化する神経細胞が表層に積層した構造になっている。神経細胞はより後に生まれたものが、表層へと配置される in-side out パターンを示し、これはヒト胎児大脳皮質の原始的な構造を模していると考えられている。これまでは小頭症などの疾患モデリングなどへ応用されてきたが、近年になり再生医療などへの応用も模索されている。しかしながら、大脳オルガノイドの分化誘導技術は発達半ばであり、多能性幹細胞から自己組織化により自律的に誘導されたものは、その大きさは小さく、球形であり、形態的にヒト大脳皮質を再生するには必ずしも適したものではない。また、試験管内の誘導環境では血管系・循環系をはじめとする構造が欠損することもあり、オルガノイド内部への栄養供給・酸素供給を促進する必要から、バイオリアクターなどによる振盪培養法や高酸素培養などが考案されているが、そういった手法を用いても、単純に自律的に大きく成長させることには限界があった。今後のさまざまな臨床分野へ応用するには、大脳皮質オルガノイドの形態を移植などのアプリケーションに応じて、外的にコントロールする手法が必要とされているのが現状である。多能性幹細胞を用いた心筋や角膜といった他領域の再生医療では細胞をシート状に加工し、組織修復に用いる手法が開発されているが、中枢神経は間葉組織や上皮組織と異なり細胞間接着が強固ではないことや、神経細胞がサブタイプに応じて三次元的・機能的に配置される複雑な構造をしていることなどから、温度感受性培養皿を用いるなどの単層培養系でシート状に加工することは困難である。しかしながら、より生体に近い組織学的構造を有する大脳オルガノイドの大脳皮質細胞層をシート状に加工・成形技術することができれば、将来的な再生医療への応用が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト大脳皮質においてその機能は地理的に分業され、それらが互いに神経投射を介して連携することにより複雑な高次機能を担う。疾病などで損傷が不可逆的に生じた際、その部分の機能は欠損し、機能障害を後遺することになる。したがって、再生医療的アプローチで大脳皮質を修復するには、損傷部位局所で周囲との組織学的連続性を保った再生が最も望ましいと考えられる。大脳オルガノイドに内在するヒト胎児の原始的な脳構造を自律的に形成する能力や神経細胞の高いシナプス可塑性を最大限利用して、これまでにはない理想的な大脳皮質再生法の樹立を目指し、そのプラットフォームをなす基礎的研究として、大脳オルガノイドの形態を外的にコントロール、特に大脳皮質神経細胞をシート状に加工する技術の開発を第一の目的とした。

3. 研究の方法

多能性幹細胞には理化学研究所バイオリソースセンターより入手した iPS 細胞標準株 201B7 を用いることとした。iPS 細胞を分散解離後、低吸着培養容器に一定数の細胞を移し、細胞塊を形成した。翌日より培養液に、SMAD 阻害剤(LDN193189, SB431542)および Wnt 阻害剤(IWR1e)を添加し、前脳領域選択的な分化誘導を開始した。この細胞塊を規定数シート状の培養担体上に移し、分化誘導を継続した。培養担体としては、複数の生体吸収性素材や非吸収性素材をパイロットスタディーで検討し、細胞の接着性や培養安定性から検討可能と判断したシリカファイバー不織布を用いることとした。誘導 10 日目に、マトリゲルに包埋し、培養液を B27, N2 などを含み、Vitamin A を含まない Expansion medium に変更し、インキュベーター内に設置した rotary-shaker を用いて 40rpm で振盪培養を開始した。誘導 15 日目に Vitamin A を含有する differentiation medium に変更し、その後培養を継続した。

評価としては、主に培養後 70 日のサンプルを用いて、(1) 定量的 RT-PCR 法での未分化細胞マーカー(OCT4) 領域特異的神経幹細胞マーカー(FOXP1, PAX6, SOX1), 皮質神経マーカー(SATB2, TBR1, CTIP2, VGLUT1 など)の発現量を定量、(2) 免疫組織染色法での PAX6, FOXP1, TBR1, SATB2 などの評価・分化効率の定量を行った。さらに、3 次元的な構造を多光子顕微鏡(A1 MP+, Nikon)を用いて観察、NeuN で染色される培養担体内での神経細胞の形態の観察をおこなった。インキュベーター顕微鏡(IX83, Olympus)を用いて、培養担体から伸展する神経突起の様子を位相差タイムラプスイメージを用いて観察し、伸展速度を定量した。培養担体内の大脳皮質神経細胞の活動を評価するために、Fluo4AM を用いたカルシウムイメージングを行い、多光子顕微鏡(A1 MP+)でのライブイメージングで観察・解析を行なった。移植実験についても検討を行い、培養 42 日目にラット脳損傷モデル(F344/NJcl-rnu/rnu, male, 7 weeks old)に対して移植を行った。

4. 研究成果

シリカファイバー不織布シート(SiF)上で大脳オルガノイドを誘導する手法の開発に成功した。神経上皮様の構造(神経ロゼット)は誘導後3週間で光学顕微鏡で明確に視認しうるサイズに成長した。SiFは振盪培養期間において安定して形態を保持していた。RT-PCRで各種マーカー遺伝子の発現を定量すると、未分化マーカーであるOCT4は誘導2日目より大きく減少し、70日目にはほぼ検出されないレベルまで低下した。一方で、SOX1やPAX6といった神経幹細胞(神経上皮細胞)のマーカーは42日目には大きく上昇し、さらに前脳領域マーカーであるFOXP1も42日目には高い発現を示す様になっていた。また、42日目以降、下層ニューロンのマーカーであるTBR1、CTIP2や上層ニューロンのマーカーであるSATB2の発現レベルは上昇し、neurogenesisが進んでいることが示唆された。さらに70日目にはグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーであるVGLUT1の高発現を認める様になり、神経細胞の成熟が進んでいることが示唆された。このSiF上で形成した大脳オルガノイド(COSF)を固定し、免疫染色で評価すると、驚くべきことにPAX6陽性細胞の構成する

神経ロゼットはほぼSiFシート外に止まり、3-Tubulin陽性神経細胞がSiFシート内に生着していることが明らかとなった。また神経幹/前駆細胞のマーカーであるNestinを染色すると、神経ロゼットからSiFシート内にNestin陽性線維が伸展していることが観察された。この線維は通常の大脳オルガノイドでも観察されることが知られており、胎生期の放射状グリアに相当する構造である可能性が考えられた。これらデータからSiFシート上においても大脳オルガノイドの形成は進み、特に皮質神経細胞がSiFシート内に集積することが明らかとなった。さらにシート内の解析を進めると、胎生期の脳と類似した、in-side outパターンも、原始的ではあるものが見られることがわかった。さらにシリカマイクロファイバーが形成する高空隙構造により、細胞間隙が通常の大脳オルガノイドに比べて大きくなり、アポトーシスのマーカーであるcleaved caspase3陽性細胞は、従来法に比べて減少していることが明らかとなった。さらに、SiFシートの厚みを約3.5倍にすると、シート内に形成される大脳皮質神経細胞層も厚く成長し、大脳オルガノイドに由来する大脳皮質神経細胞層を従来手法に比べ3倍以上に厚くすることに成功した。従来、大脳オルガノイドをヒトの胎児脳相当に大きく成長させることは、in vitro培養系での限界と考えられてきたが、ロバスタなスキャフォールドを用いて、その大きさをさらに拡大できることが示された。

さらにシート内の神経細胞の形態を三次元的に観察するため、神経細胞特異的にNeuNで染色し、多光子顕微鏡で観察すると各神経細胞は多数の神経突起を有し、シート内でネットワークを形成している可能性が示唆された。さらに、位相差顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行うとこれら神経突起は活発な伸展能を有することが示された。これは、この大脳皮質神経細胞シートが外部の神経細胞と有機的にネットワークを形成する能力を有する可能性を示している。また、これら神経細胞の機能的な成熟を確認するため、シート内の神経細胞の自発的な活動を、カルシウムイメージング(Fluo4AM)を用いて観察した。神経細胞の自発的な発火は培養期間70日目で観察され、培養期間100日に至ると、sharpな発火となり、頻度も増加して観察された。またこれらカルシウムサージの頻度は、グルタミン酸刺激で増加し、TTX投与で抑制された。このことから、シート内の大脳皮質神経細胞は機能的に成熟していることが明らかとなった。しかしながらこれら発火には同期性は認めず、シナプス形成は未熟な段階であることが示唆された。

ラット脳損傷モデルへの移植実験も検討したが、我々の使用したSiFシートは厚く、脳表に置いたSiFを頭蓋骨内に留置することが難しく安定した皮質再生実験系の樹立には至ることはできなかった。しかしながら、SiFシートを移植したラット脳の免疫染色を行うと、一部損傷脳に接した生着した部分からはヒト特異抗体で染色されるグラフトに由来する軸索がラット脳へ伸展することが観察された。In vitroで観察した軸索進展能は、in vivoにおいても備わっており、我々の誘導した大脳オルガノイドに外部との神経回路を形成する能力が存在する可能性が考えられた。本研究では、移植実験系の限界から、皮質再生実験には至ることができなかったが、今後大型動物モデルでの検討が必要という課題が明らかとなった。

本研究では、多能性幹細胞由来大脳オルガノイドをロバスタなスキャフォールド上で培養することにより、その皮質神経細胞層をより拡大することに成功、さらにシート状に成形することに成功した。我々の手法で作成された大脳皮質神経細胞層は原始的な胎児の構造を保持し、その厚さは従来の大脳オルガノイド法よりも厚く、ヒト大脳皮質により近づいたものとなった。今後の課題として、大脳皮質再生に向けて大型動物モデルの検討や培養担体素材の生体適合性の検討など、克服すべき課題が明らかとなっているが、大脳オルガノイドにロバスタなスキャフォールドを組み合わせることでその形態形成をコントロールできる可能性を示せた本研究の意義は大きいと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺田 栄作, 馬場 庸平, 高垣 匡寿, 中村 元, 西田 武生, 井筒 伸之, 竹中 朋文, 川端 修平, 松井 雄一, 山田 修平, 中川 僚太, 貴島 晴彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳皮質オルガノイドを用いた皮質再生法の開発
3. 学会等名 第80回脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田栄作、馬場庸平、高垣匡寿、中村元、西田武生、中川僚太、福田竜丸、川端修平、松井雄一、山田修平、竹中朋文、井筒伸之、貴島晴彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドを用いた皮質再生法の開発
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	寺田 栄作 (TERADA Eisaku)	大阪大学・医学系研究科・脳神経外科学 (14401)	
研究協力者	高垣 匡寿 (Takagaki Masatoshi)	大阪大学・医学系研究科・脳神経外科学 (14401)	

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