

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23613

研究課題名（和文）ティッシュエンジニアリング技術による3次元大脳組織の作製

研究課題名（英文）Fabrication of three-dimensional cerebral tissue using tissue engineering techniques

研究代表者

赤木 祐香（Akagi, Yuka）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50849544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、組織の成り立ちや構造までも再現したヒト大脳組織の作製を目的として行った。そのため、ヒトiPS細胞からの大脳組織の誘導技術と三次元デバイスを用いたティッシュエンジニアリング技術を複合した研究を行った。まず、ヒトiPS細胞から大脳組織へ誘導する手法を確立した。次に、組織構築に必要なハイドロゲルの条件検討を行った。見出した分化誘導手法およびゲル条件に基づき、灌流型デバイスによる秩序ある組織構築を試みた。しかし、ゲルの収縮や流路の縮小により長期培養は困難であり、大脳組織特有の構造形成は確認できなかった。長期培養に適したハイドロゲルの検討と、デバイスの再設計が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、三次元デバイスによる秩序ある大脳組織の構築を行った。三次元デバイスを用いることで、従来の自己組織化によるオルガノイドと異なり、灌流により組織内に栄養素や酸素の濃度差が生じ、細胞の分裂速度や移動方向を制御できる。そのため、本技術により大脳に限らず中脳や小脳などにおいても、秩序ある組織の作製を可能にする。加えて、肺や膵臓など様々な組織への適応が期待できる。したがって、本研究により作製された組織モデルは発生原理や構造的意義の理解、創薬や再生医療へ用いることで、組織構造に異常をきたす発達障害や先天性疾患の解明、オーダーメイド医療も期待できるなど、基礎医学に資する新たな研究ツールとなる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to create cerebral tissue that reproduced even the origins and structure of the tissue. To achieve this goal, we conducted a combined study of induction technology of cerebral tissue from human iPS cells and tissue engineering technology using a three-dimensional device. First, an induction method from human iPS cells to cerebral tissue was established. Next, hydrogel conditions necessary for tissue construction were examined. Based on the differentiation method and gel conditions, we attempted to construct ordered tissues using a three-dimensional device that can be perfused. However, long-term culture was difficult due to shrinkage of the gel and flow paths, and the formation of structures unique to cerebral tissue could not be confirmed. Investigation of hydrogel suitable for long-term culture and redesign of the device are future issues.

研究分野：人間医工学

キーワード：細胞工学 幹細胞 神経

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞である Embryonic Stem (ES) 細胞 (Martin G., 1981) や induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞 (Yamanaka S., 2006) の樹立方法の確立や、*in vitro*での分化培養法の改良により、ヒト脳組織片を模倣した細胞塊を生体外で誘導することが可能となった。やがて、幹細胞由来の自己増殖能や分化能を有し、自己組織化によって作製されるオルガノイドが開発された (Lancaster MA., 2014)。現在では脳だけでなく様々な臓器や腫瘍などのオルガノイドが簡便に作られるようになり、オルガノイドを用いた発生過程の理解や、疾患 iPS 細胞を使った疾患オルガノイドによって病態を再現することが期待されている。更に近年では、誘導されたヒト脳オルガノイドにおいて、ヒト脳に見られるいくつかの層構造を形成することが報告された (Qian X., 2016)。しかし、自由な空間において作製されるオルガノイドはその強力な自己組織化により、出来上がる組織構造は無秩序なものとなる。そのため、本来のヒト脳とかけ離れた腫瘍のような歪な構造体を示し、これは脳発生の理解や再生医療、創薬への応用を妨げており、まさにオルガノイドの課題と考えられる。このような問題意識から、本研究では秩序ある脳組織の作製に挑戦する。

2. 研究の目的

無秩序な自己組織化によって作られるオルガノイドは、軸や方向性を持たず、様々な成熟度の分化組織が混在するため、各オルガノイドを均一に作製することは困難であった。*in vitro*で作製する脳組織において、細胞の分裂速度や移動方向に規則性を与えることができれば、脳の軸や領域化が誘導され、発生機構の解明や再生医療に向けた研究ツールとして革新的なものになる。そこで本研究では申請者の有する灌流型デバイス構築技術を基に、構造制御された大脳組織を作製することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、まずヒト iPS 細胞からの大脳組織の誘導技術を確立し、次に三次元デバイスを用いた組織作製を行った。

(1) ヒト iPS 細胞由来の大脳組織誘導法

本研究で主要となるヒト iPS 細胞 (201B7 株) から層構造をもつ大脳組織を安定的に作製する技術が必要である。そこで、従来の大脳オルガノイド作製法を基に、4つのステップ(胚様体の形成、原始神経上皮の誘導、神経上皮組織の誘導、脳組織の成熟)により培地組成や低分子化合物の濃度やタイミングなどを最適化し、ヒト iPS 細胞から大脳組織を作製する手法を確立した。誘導された細胞や組織から RNA を抽出し、定量 PCR 法により中枢神経系マーカー遺伝子(PAX6, MAP2)また、大脳皮質神経マーカー遺伝子(BRN2(第 2-5 層), STAB2(第 2-5 層), TBR1(第 6 層))の発現を評価した。また組織学的解析のため、大脳組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィリンブロックを作製した。HE 染色や蛍光免疫染色により神経上皮様構造や神経幹細胞マーカー(SOX2), 神経マーカー(TUJ1)のたんぱく質発現を評価した。

(2) 灌流型デバイスを用いた組織構築

皮膚や肝臓の組織モデルの作製に用いられた三次元デバイス(Mori N., 2020)を用いて大脳組織構築を試みた。細胞をハイドロゲルで懸濁し、三次元デバイス内に充填し、シリンジ針をゲル内に貫通させることで、空洞の流路を形成させた。これにより、ゲル内の空洞に培養液を灌流することができる。細胞懸濁に用いるハイドロゲルはマトリゲルとコラーゲンの混合ゲルを用いた。混合ゲルで懸濁したヒト iPS 細胞または中枢神経前駆細胞を三次元デバイス内で培養し、大脳組織への分化誘導を行った。誘導された組織は遺伝子発現やたんぱく質発現から大脳組織への分化を検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞由来大脳組織の作製方法の開発

大脳オルガノイド作製法や中枢神経系の発生経路にかかわるシグナルを基に、誘導に必要な低分子化合物を選択した。低分子化合物群の添加タイミングや濃度を最適化し、ヒト iPS 細胞から段階的に大脳組織を誘導した。誘導 4~5 週間後には、中枢神経系マーカー遺伝子(PAX6, MAP2)および大脳皮質神経マーカー遺伝子(BRN2(第 2-5 層), STAB2(第 2-5 層), TBR1(第 6 層))の発現量は増加を示した(図 1a)。また、組織学的解析により、神経上皮様構造が観察され(図 1b)、神経幹細胞マーカー(SOX2), 神経マーカー(TUJ1)陽性細胞を確認した(図 1c)。

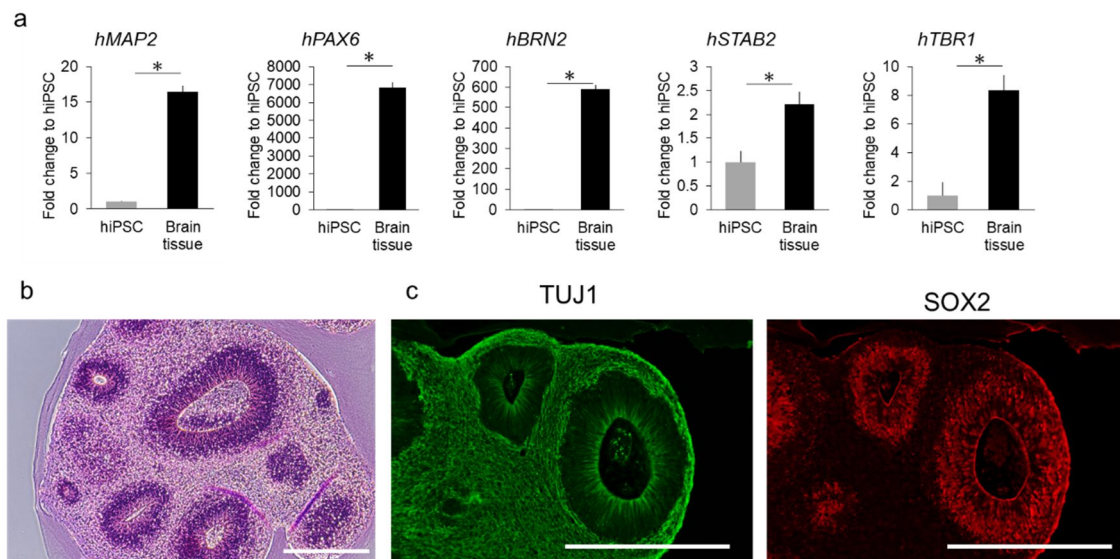


図 1. ヒト iPS 細胞由来大脳組織は大脳皮質神経マーカー遺伝子の発現と神経上皮様構造を示した。a. ヒト iPS 細胞(201B7 株)と大脳組織(誘導 51 日目)における定量 PCR 法を用いた大脳皮質神経マーカー遺伝子の発現検証 (*: $P < 0.05$ vs ヒト iPS 細胞 (hiPSC), $n = 3$, student- t)。b. 大脳組織の HE 染色図 (scale bar: 1 mm)。c. 大脳組織の蛍光免疫染色図 (scale bar: 1 mm)。

(2) 灌流型デバイスを用いた組織構築の検証

誘導された大脳組織は従来法と同様、直径 1-3mm の球体であり、組織内は無秩序な構造を示した。また、長期培養により細胞塊内部は酸素や栄養素が十分に浸透せず、細胞死を示す領域も確認された。そこで、灌流型デバイス内で大脳組織を分化誘導および成熟させることで組織内に流路を形成し、培地を灌流させることができる。培地を送液することで、組織全体に栄養素を行き渡らせること、さらに細胞の分裂速度や移動方向を制御することが可能であると考えた。

まずデバイス内で細胞を培養するためには、ヒト iPS 細胞や神経前駆細胞を 1 細胞へ分散させ、ハイドロゲルで懸濁した細胞液をデバイス内へ充填する。そのため、神経分化に適したハイドロゲルの条件検討を行った。その結果、マトリゲルとコラーゲンを混合したゲルでヒト iPS 細胞を懸濁し、大脳組織へ分化誘導を行うことにより、上記[1]同様な神経上皮様構造を示す組織が作製可能であることを確認した。

次に、これらの条件を基にハイドロゲルで懸濁したヒト iPS 細胞を三次元デバイスに充填し培地をゲル内部に灌流しながら分化誘導を行った。その結果、誘導 8 日目には神経マーカー (MAP2) や大脳皮質神経マーカー (BRN2, PAX6) の遺伝子発現量は増加を示した。また、灌流を行わなかった組織と比べ、灌流培養を行った組織では BRN2 や PAX6 遺伝子発現量が増加した。

しかし、今回検証した灌流型デバイスではゲルの収縮や流路の縮小により長期培養は困難であり、大脳組織特有の層構造形成は確認できなかった。長期培養に適したハイドロゲルの再最適化と、新たなデバイスの再設計が今後の課題である。

< 引用文献 >

- Martin GR., (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, Proc Natl Acad Sci USA, 78, 7634-7638.
- Takahashi K. and Yamanaka S., (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, Cell, 126, 663-676.
- Lancaster MA. and Knoblich JA., (2014): Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells, Nat Protoc., 9, 2329-2340.
- Qian X., et al., (2016): Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure, Cell, 165, 1238-1254.
- Mori N., et al., (2020): Fabrication of Perfusable Vascular Channels and Capillaries in 3D Liver-like Tissue, Sci Rep., 10, 5646.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuka Akagi, Nobuhito Mori, Teruhisa Kawamura, Yuzo Takayama, Yasuyuki S Kida	4. 巻 11
2. 論文標題 Non-invasive cell classification using the Paint Raman Express Spectroscopy System (PRESS)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 8818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88056-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤木祐香, 木田泰之
2. 発表標題 Paint式ラマン分光顕微鏡によるヒトT細胞分画法の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木祐香, 森宣仁, 高山祐三, 木田泰之
2. 発表標題 細胞選別のためのラマン分光法の応用
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木 祐香, 高山 祐三, 木田 泰之
2. 発表標題 末梢神経系による腓 細胞の機能制御システムの構築
3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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