

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03812

研究課題名(和文) 多能性幹細胞の自己組織化能の促進とアセンブルによる小脳オルガノイドモデルの創出

研究課題名(英文) Ontogeny-recapitulating generation of human pluripotent stem cell-derived cerebellar organoids

研究代表者

六車 恵子(MUGURUMA, Keiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳オルガノイドは多能性幹細胞が自己組織的に三次元構造化した多細胞集団であり、発生過程を模倣した脳組織モデルとして発生・進化など学術研究や、再生医療や病態研究など応用研究に広く活用されている。大脳オルガノイドでは発生で見られる一連の素過程が再現されるのに対し、小脳オルガノイドにおいては未だ組織構造の形成・成熟が不十分であり、既報の培養技術では胚子期後期相当の組織構築の再現にとどまる。本課題では、多能性幹細胞の自己組織化能の誘導・促進と細胞のアセンブルを組合せ、より高度な小脳オルガノイドモデルを創出することを目的とし、ヒト小脳研究の新規モデルに寄与することを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳オルガノイドはiPS細胞など多能性幹細胞が自己組織的に三次元構造を形成した細胞の塊であり、ヒト脳の研究や再生医療・創薬研究のin vitroヒト脳モデルとして有用である。小脳は発生過程が複雑で、ヒト小脳の形成には未解明な部分が多く、あらたなヒト小脳モデルの開発が求められている。また、脊髄小脳変性症や多系統萎縮症など小脳の神経細胞が特異的に変性する疾患も多く、病態解明・創薬・治療法開発のためにもヒト小脳を再現したオルガノイドの分化誘導法の開発は極めて重要であり、本研究はこれら課題に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Brain organoids are self-organised 3D structures of pluripotent stem cells, and are widely used in academic research on development and evolution as brain tissue models that mimic early neural development, and in applied research such as regenerative medicine and pathological research. While a series of elementary processes seen in development can be reproduced in cerebral organoids, the formation and maturation of tissue structures are still insufficient in cerebellar organoids, and the previously reported culture techniques can only reproduce tissue construction equivalent to the late embryonic stage in human. The aim of this project was to create a more advanced cerebellar organoid model by combining the induction and promotion of the self-assembly capacity of pluripotent stem cells with cell assembly, and to contribute to a novel model for human cerebellar research.

研究分野：神経発生学、幹細胞生物学

キーワード：オルガノイド 小脳 自己組織化 プルキンエ細胞 多能性幹細胞 三次元培養 タイムラプスイメージング 神経分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまで、ヒト脳の発生原理を解明することを目的として、ヒト多能性幹細胞から神経細胞への選択的な分化を誘導するシステムの開発を進めてきた。一連の研究の中で、とりわけ分化誘導が困難であるとされた小脳オルガノイドの分化誘導に成功し、電気生理学的および形態学的にも成熟した小脳プルキンエ細胞も分化されることを示した (Muguruma et al., Nature Neurosci. 2010, Muguruma et al., Cell Report 2015)。本オルガノイド作成技術は脊髄小脳変性症 (SCA) 患者の体細胞から作製した人工多能性幹細胞 (iPSC) に応用することで病態モデル化が可能であることも示した (Morino et al., Mol Brain 2015, Ishida et al., Cell Report 2016)。

脳オルガノイドは、iPS 細胞など多能性幹細胞が自己組織的に三次元構造化した多細胞集団であり、発生過程を模倣した脳組織モデルとして、発生・進化などの学術研究から再生医療や病態研究などの応用研究まで幅広く活用されている。例えば、大脳オルガノイドでは神経発生で見られる神経上皮の形成、細胞分裂、細胞周期に伴う核移動 (エレベーター運動)、inside-out 様式の細胞移動、層特異的な分子マーカーの発現など、一連の経時的な素過程が再現され、大脳皮質特有の明瞭な層構造が再現される。しかしながら、小脳オルガノイドにおいてはそのような明瞭な層構造・組織形成がまだ不十分であり、現在の培養技術で再現できる組織構造は、胚学期後期相当の組織構築に留まり、小脳皮質形成の複雑な発生過程を十分に再現するには至らない。この大きな要因のひとつは層構造の形成過程が大脳と小脳では全く異なることに起因している。大脳皮質では組織構築に関わるほぼ全ての神経細胞が脳室帯から産生されるのに対し、小脳では異なる二つの胚芽領域から生み出され、複雑な細胞移動を経て層構造が形成される。また、皮質内外には非神経細胞を含むニッチ細胞が多く存在することも精密な組織構築には必要であると考えられる。本課題では、多能性幹細胞の自己組織化能の誘導と非神経細胞のアセンブルにより、より高度な小脳オルガノイドモデルを創出することを目的とし、これによりヒト小脳研究の新規 *in vitro* モデルとして、神経回路形成、組織破綻、機能不全とその修復機能の解明に寄与することを目指した。

### 2. 研究の目的

多能性幹細胞の自己組織化能の誘導と非神経細胞のアセンブルにより、より高度な小脳オルガノイドモデルを創出することを目的とし、これによりヒト小脳研究の新規 *in vitro* モデルとして、神経回路形成、組織破綻、機能不全とその修復機能の解明に寄与することを目指した。

### 3. 研究の方法

小脳皮質の大多数を占める顆粒細胞の小脳オルガノイドにおける高効率な分化誘導を、i) BMP シグナルの一時的な活性化、ii) BMP シグナルの活性化とそれに引き続く SHH シグナルの制御による過剰な BMP シグナルの解放、iii) Notch シグナル制御の組合せによる前駆細胞分裂の促進を検討する。ATOH1-tdTomato *ki/wt* iPS 細胞株をゲノム編集により作成し、分化誘導の可否を効率的に解析する。同時に、脳室帯由来細胞 (プルキンエ細胞など GABA 作動性神経細胞) の誘導効率についても、KIRREL2, SKOR2, LHX1/5, PAX2 などの発現レベルにより評価しながら、自己組織的な小脳オルガノイド作成を促す。

前駆細胞や非神経細胞のアセンブルによる小脳組織構造の高度化は、1つのオルガノイドから特化した細胞集団、例えば菱脳唇由来の細胞のみ、あるいは脳室帯由来の前駆細胞のみをそれぞれ

れ効率的に分化誘導する。次いでこれらをシート化する方法を開発し、さらにこれらを重層することで再配置（アセンブル）し、足場タンパクやケモカインで細胞移動を促進する。オルガノイド技術を究極的な組織構築モデルとするのではなく、効率的な分化培養法として活用し、神経発生学で汎用される器官培養を模した再配置技術と生体医工学のノウハウを活用した組織シート化とそのアセンブルを駆使し、高度な組織構築を有する小脳モデルを開発する。

本研究課題で新たに開発した分化誘導技術を用い、健常由来 iPS 細胞株から作成した小脳オルガノイド由来のプルキンエ前駆細胞を調製する。小脳プルキンエ細胞特異的に変性する病態モデルマウス小脳へ移植し、in vivo におけるヒト由来移植細胞の生着や機能発現を組織学および行動学的に評価する。

#### 4 . 研究成果

分化条件の精緻化によりプルキンエ細胞に代表される脳室帯由来細胞の分化効率を既報の 3 倍以上に高めることに成功した。非神経細胞を別途作成し、これらをアセンブルすることでより複雑な組織構築を伴う小脳オルガノイドを作成した。さらに共焦点顕微鏡によるオルガノイドのライブイメージングシステムと、レポーター遺伝子（*ATOH1*-tdTomato, *KIRREL2*-Venus）ノックイン iPS 細胞の利用により、個々の細胞の挙動を定量的に解析した。改良型小脳オルガノイド由来のプルキンエ細胞は小脳失調モデルマウス小脳に半数以上が生着し、軸索伸長、樹状突起伸展、シナプス形成、標的細胞への投射などがみとめられた。ヒト iPS 細胞由来の小脳神経細胞が病態モデルマウスに移植後生着した初めての成果として論文及び学会発表をおこなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tamada Atsushi, Muguruma Keiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Recapitulation and investigation of human brain development with neural organoids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 IBRO Neuroscience Reports	6. 最初と最後の頁 106 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibneur.2023.12.006	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 -
1. 著者名 Shaji Maneesha, Tamada Atsushi, Fujimoto Kazuya, Muguruma Keiko, Karsten Stanislav L., Yokokawa Ryuji	4. 巻 24
2. 論文標題 Deciphering potential vascularization factors of on-chip co-cultured hiPSC-derived cerebral organoids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 680 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3lc00930k	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 該当する
1. 著者名 Kamei Takamasa, Tamada Atsushi, Kimura Toshiya, Kakizuka Akira, Asai Akio, Muguruma Keiko	4. 巻 369
2. 論文標題 Survival and process outgrowth of human iPSC-derived cells expressing Purkinje cell markers in a mouse model for spinocerebellar degenerative disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114511 ~ 114511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2023.114511	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 -
1. 著者名 Kume Kodai, Kurashige Takashi, Muguruma Keiko, (24 persons), Izumi Yuishin, Aoki Masashi, Kawakami Hideshi	4. 巻 110
2. 論文標題 CGG repeat expansion in LRP12 in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1086 ~ 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2023.05.014	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 -

1. 著者名 1.Ozaki H, Suga H, Sakakibara M, Soen M, Miyake N, Miwata T, Taga S, Nagai T, Kano M, Mitsumoto K, Miyata T, Kobayashi T, Sugiyama M, Onoue T, Takagi H, Hagiwara D, Iwama S, Banno R, Iguchi G, Takahashi Y, Tamada A, Muguruma K, Inoue H, Arima H	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Differentiation of human induced pluripotent stem cells into hypothalamic vasopressin neurons with minimal exogenous signals and partial conversion to the naive state	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22405-8	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 -

1. 著者名 木村俊哉, 六車恵子	4. 巻 158
2. 論文標題 神経疾患の克服に向けたiPS細胞技術	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.22084	査読の有無 有
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 六車恵子	4. 巻 3492
2. 論文標題 オルガノイドで解き明かすヒト脳の神秘	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 週刊医学界新聞	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 玉田篤史, 木村俊哉, 次山ルシラ絵美子, 六車恵子	4. 巻 73(4)
2. 論文標題 脳オルガノイドを用いたヒト脳の発生・疾患の理解	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 343-347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Taniguchi-Ikeda Mariko, Koyanagi-Aoi Michiyo, Maruyama Tatsuo, Takaori Toru, Hosoya Akiko, Tezuka Hiroyuki, Nagase Shotaro, Ishihara Takuma, Kadoshima Taisuke, Muguruma Keiko, Ishigaki Keiko, Sakurai Hidetoshi, Mizoguchi Akira, Novitch Bennett G., Toda Tatsushi, Watanabe Momoko, Aoi Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Restoration of the defect in radial glial fiber migration and cortical plate organization in a brain organoid model of Fukuyama muscular dystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103140 ~ 103140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103140	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 該当する

1. 著者名 Tamada Atsushi, Muguruma Keiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Modeling of Human Cerebellar Development and Diseases with Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebellum as a CNS Hub	6. 最初と最後の頁 61 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-75817-2_3	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9件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 亀井孝昌、玉田篤史、木村俊哉、六車恵子
2. 発表標題 ヒト iPS細胞由来小脳前駆細胞の小脳変性疾患モデルマウスへの 移植
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 iPS細胞を用いた神経疾患研究
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 多能性幹細胞由来の神経オルガノイドを用いたヒトの発生と疾患のモデル化
3. 学会等名 第16回ナノメディシン国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 中枢神経系のオルガノイドの作製とその応用
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会 日本学術会議シンポジウム（市民公開講座）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた脳発生・神経疾患研究
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 iPS細胞研究から見た運動失調治療の可能性
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Muguruma
2. 発表標題 Modeling of human cerebellar development and diseases with iPSC-derived brain organoids
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 1st CTK International Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 iPS細胞を用いた神経疾患研究
3. 学会等名 第117回日本精神神経学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Muguruma
2. 発表標題 Construction of brain tissues from human pluripotent stem cells for investigating of neurological disease and brain development
3. 学会等名 The 95th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (招待講演)
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
---------------------------	-----------------------	----

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