

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15659

研究課題名（和文）ヒト海馬オルガノイドによる、海馬硬化を伴う内側側頭葉てんかんの疾患モデリング

研究課題名（英文）Modeling mesial temporal lobe epilepsy using hippocampal organoids

研究代表者

坂口 秀哉（Sakaguchi, Hideya）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：30779153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、当初疾患モデリングを試みたが、その基盤検討の過程で海馬オルガノイドの分散培養における機能獲得とグリア細胞新生について検討できることがわかり、その点について中心的に評価する方向とした。

海馬オルガノイドの分散培養系でのライブイメージングでは、分散後3日くらいよりグリア細胞が産生されることが観察され、分散7日前後がグリア新生のピークであった。カルシウムイメージングで、分散後2週目ごろより散発的な自発発火を、分散後4週目ごろより部分的に同期を伴う自発発火を確認した。産生されたグリア細胞は、GFAPやS100 およびvimentinといったアストロサイトのマーカーが陽性であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬オルガノイドによってヒト細胞由来の海馬組織を創ることが可能になったが、そこから得られる細胞の組成にグリア細胞が含まれていることはこれまで十分には示せていなかったが、本研究成果でその足場を固めることができた。神経組織は神経細胞とグリア細胞からなり、これまでグリア細胞の機能にはあまり注目が集まらなかったが、近年、ただの支持組織ではなく栄養の供給やシグナル伝達の仲介など、積極的な機能をグリア細胞が持つことが示唆されている。これをヒトのモデルで示すことができれば、ヒトグリア細胞における病態評価といった、これまででできなかった疾患研究が可能となるため学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：We first aimed to create disease modeling, but through the progress, we found the evaluation of gliogenesis from dissociated hippocampal organoid was feasible, thus, we focused on the topic to establish functional analysis of dissociated neural organoids. Through live imaging of dissociated hippocampal organoids, gliogenesis started from 3days after dissociation and came to the peak around day7 after dissociation. The calcium imaging revealed the individual sparse activities started around 2 weeks after dissociation, and partial synchronized activities was found at 4weeks after dissociation. The immunohistochemistry revealed that the generated glia cells expressed GFAP/S100 beta/vimentin, which are known as astrocyte markers, suggesting the generation of hippocampal astrocytes from organoids.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：神経オルガノイド 海馬オルガノイド カルシウムイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経オルガノイドは多能性幹細胞由来の三次元神経組織で対象の神経領域の構造や機能を模倣したものである。ヒト多能性幹細胞を用いてヒトの神経組織を創ることが可能となったことで、構造的な異常をきたす疾患や病理像が明らかな疾患のモデリング研究の報告が見られるようになってきたが、機能異常を伴う神経疾患のモデリングは十分とはいえなかった。その理由として、作成した神経オルガノイドで機能獲得までを再現することが困難であることが挙げられる。

研究代表者はこれまでに、神経オルガノイドの分散培養によって、機能的なヒト神経ネットワークを形成・評価する基盤を固めてきた。今回この手法を用いて、海馬の機能異常に迫る研究基盤の構築を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞からの3次元海馬組織の分化誘導(海馬オルガノイド)の技術をもとに、海馬硬化の病理組織構築の達成を経て、てんかん原性をもつ神経組織を誘導し、「海馬硬化を伴う内側側頭葉てんかん」に対して病的アプローチおよび神経機能的アプローチが取れる疾患モデルを構築することを研究開始当初の目的とした。

3. 研究の方法

神経分化誘導法として確立されている無血清凝集浮遊培養法(Sakaguchi et al. Nature Communications. 2015)を用いて、ヒト多能性幹細胞から海馬オルガノイドの分化誘導を行った。

分化誘導条件の最適化に関して、本研究を遂行する上での具体的な工夫として、発生を元にしたストラテジーを取る。海馬は神経発生過程において神経管の前方に位置する終脳の背内側に位置する。このことをもとに、分化誘導の初期には後方化因子である Wnt の阻害剤を加えることで終脳組織を誘導し、その後適切なタイミングで背側化因子を加えることで背内側終脳組織を誘導し、これが海馬オルガノイドとなる。これを元に、健常者・患者由来 iPS 細胞から海馬オルガノイドを分化誘導し、構築した海馬オルガノイドにおける海馬硬化症の病理像を確認する。ここでは海馬オルガノイドにおける神経脱落やシナプス形成不全、グリア細胞の増生の有無などに着目して、健常者由来・患者由来 iPS 細胞のそれぞれから作成した海馬オルガノイドを解析する。オルガノイドの分散培養によるネットワーク形成を評価し、カルシウムイメージングによってネットワークとしての神経活動の評価を行う。これらを総合することで、病理像・病態像と機能評価を合わせた新しい疾患モデルの確立を行う。

上記が当初の予定計画である。

4. 研究成果

初年度は海馬オルガノイドの作成および、その分散培養による神経ネットワークの形成と、その機能の有無についての評価を行った。海馬オルガノイドの作成の開始時はヒト ES 細胞をもとに行なった。海馬オルガノイドは過去の報告に基づいて分化誘導を行い、脈絡叢-内側周辺部-内側外套を含む背内側終脳領域を3次元で誘導したことを免疫染色によって確認しており、海馬オルガノイドの形成は達成した。神経ネットワークの形成を海馬オルガノイドの分散培養によって行い、綺麗な神経ネットワークが形成されることも再現できた。ここで、神経ネットワー

クの機能評価としてカルシウムイメージングを行っている際、広い範囲での同期発火を計測することができた。一般的にてんかんモデルとして報告されている文献において見られる発火動態に近いと考えられたので疾患 iPS 細胞の系に進むのではなく、この広範囲な発火がどのような細胞動態とリンクしているのか、さらに検討することに方針を変更した。

次年度に海馬オルガノイドの分散培養の最初の 7 日間にライブイメージングを行うことで、海馬オルガノイドの作成時におけるグリア細胞新生について検討することができることがわかったため、まずはグリア細胞についての評価を進めた。海馬オルガノイドの分散培養系でのライブイメージングでは、分散後 3 日くらいよりグリア細胞が観察され、およそ 10 日でコンフルエントとなった。この間、神経細胞は自発的に凝集塊を作り、グリア細胞が牽引する形で凝集塊が動きながら、隣接する細胞塊と接着・離脱を繰り返す中で、神経ネットワークが強固に形成された。ネットワーク形成が確立した後に、グリア細胞が培養皿の底面を覆う形でコンフルエントになることがわかり、オルガノイドの系を用いても、神経新生からグリア新生へのスイッチングが観察できることがわかった。このようにして誘導した海馬オルガノイド由来の神経ネットワークを用いたカルシウムイメージングでは、分散後 2 週目ごろより散発的な自発発火を確認することができ、分散後 4 週目ごろより同期を伴う自発発火が見られるようになった。このネットワークにおけるグリア細胞の検討としてまずは免疫染色を行い、GFAP や S100 および vimentin といったアストロサイトに発現するマーカーが陽性の細胞が神経ネットワークに沿って見られることが確認でき、海馬オルガノイドでアストロサイトのグリア新生が見られ、その後の神経機能獲得に寄与していることが示唆された。

2 年の研究では海馬オルガノイドにおける広範囲の同期発火の計測と、アストロサイト新生までが確認できた成果である。短い期間での観察であるので不十分な点はあるが、ヒト海馬組織におけるアストロサイト新生は新規事項でもあり、自身の過去の論文でも十分には検討できていなかったため、グリア新生の動態計測と機能評価へのリンクという足場の形成という意味で、十分な成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------