

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19932

研究課題名（和文）ヒトの脳機能解明を目指した人工脳組織の作製・解析技術の開発

研究課題名（英文）Construction and analysis of in vitro brain tissues for elucidation of human brain functions

研究代表者

玉田 篤史（TAMADA, Atsushi）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60270576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト脳の動作原理を解明し、背後にある神経・精神機能に関する示唆を得ることを目指している。まず、多能性幹細胞の自己組織的分化誘導技術（オルガノイド技術）を駆使して、培養下で人工的なヒト脳組織ネットワークを作製する技術を開発した。さらに、作製した培養脳組織における組織構造と神経活動の解析を行う技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳科学の目標の1つは、知性や精神の座であるヒトの脳を科学的に理解し、知見を神経・精神疾患の克服に役立てることにあるが、ヒト脳そのものを対象とした実証的な研究は倫理的・技術的制約により実施困難であった。本課題では、現状を打破するために、培養脳組織を活用することに特徴がある。本課題で開発した人工的なヒト脳組織ネットワークを構築する技術、および、組織構造と神経活動の計測・解析・操作を行う技術は、ヒト脳の動作原理を明らかにして脳機能を理解するために貢献できるものと予想される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the functional principles of the human brain and to obtain insights into the underlying neural functions. First, we developed a technology to construct human brain tissue networks in culture by utilizing the self-organized differentiation technology of pluripotent stem cells (organoid technology). Furthermore, we developed a technology to analyze tissue structure and neuronal activity in the constructed brain tissue.

研究分野：神経科学

キーワード：多能性幹細胞 脳オルガノイド 多次元イメージング 画像解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

脳科学の目標の1つは、知性や精神の座であるヒトの脳を科学的に理解し、知見を神経・精神疾患の克服に役立てることにある。しかし、ヒト脳そのものを対象とした実証的な研究は倫理的・技術的制約により困難である。実証的脳研究にブレイクスルーをもたらすために、幹細胞から自己組織的に脳組織を形成するオルガノイド技術を活用することを、我々は提案する。脳オルガノイド技術は分担者の前任地である理化学研究所の故笹井芳樹博士のグループが SFEBq 法として世界に先駆けて開発し、その後、国内外でより成熟した脳組織を再現するための研究開発が繰り返されている。現在、脳オルガノイド技術を活用してヒト脳の発生原理を解明しようとする機運が高まっている。我々はその先を見据え、未だ着目されていないが実施可能な重要課題として、脳の最大の特徴である神経・精神機能の解明をゴールに設定する。ヒトの知性の根源である脳がどのように動作するのか？脳がどのようにして自律的に様々な機能を獲得するのか？という問いに答えようとするものである。本課題は、生きたヒト由来の多細胞からなる組織再構成系を用い、分子・細胞・組織の階層横断的な手法と定量的解析技術により実証的に解明することを目指すものであり、独自の方向性とアプローチをとる。本課題はヒト脳機能の実証的研究という新たな学問領域の開拓につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、多能性幹細胞の自己組織的分化誘導技術（オルガノイド技術）を駆使してヒト脳組織を人工的に作製し、その構造と機能を解析する技術を開発することを目的とする。これにより、ヒト脳の動作原理を解明し、脳機能の理解に貢献することを目指す。具体的には、脳組織の作製、解析、操作の3項目を設定して研究開発を実施した。

3. 研究の方法

(a) 脳組織の作製技術の開発

ヒト ES/iPS 細胞よりオルガノイドを形成して脳組織を作製した。まず、無血清凝集浮遊培養法（SFEBq 法）を用いて、大脳皮質等の脳組織を作製した。さらに、ヒト脳の個体発生を模倣するように SFEBq 法を改良して、高効率かつ高再現性でできるだけ成熟した脳組織を作製する方法を探索した。

(b) 脳組織の解析技術の開発

作製した脳組織の細胞形態および組織構造を 3D イメージングにより計測して解析する技術開発に取り組んだ。また、神経活動を解析するために、カルシウムセンサーを発現する iPS 細胞を作製し、そこから形成したオルガノイドにおいてカルシウムイメージングを実施した。

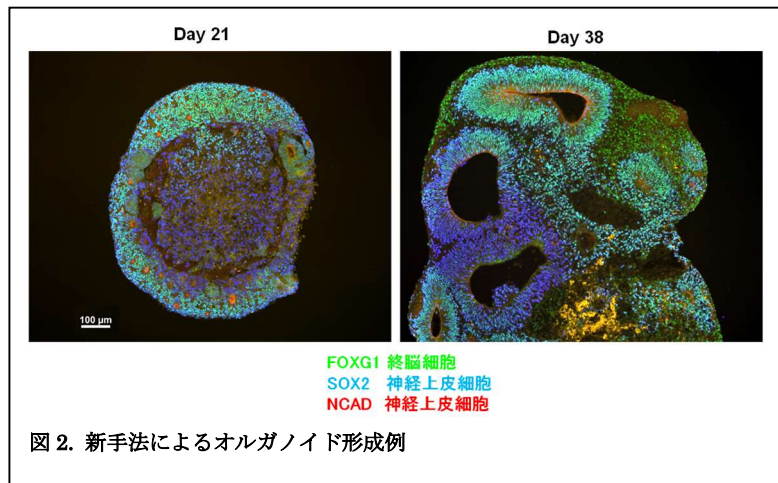
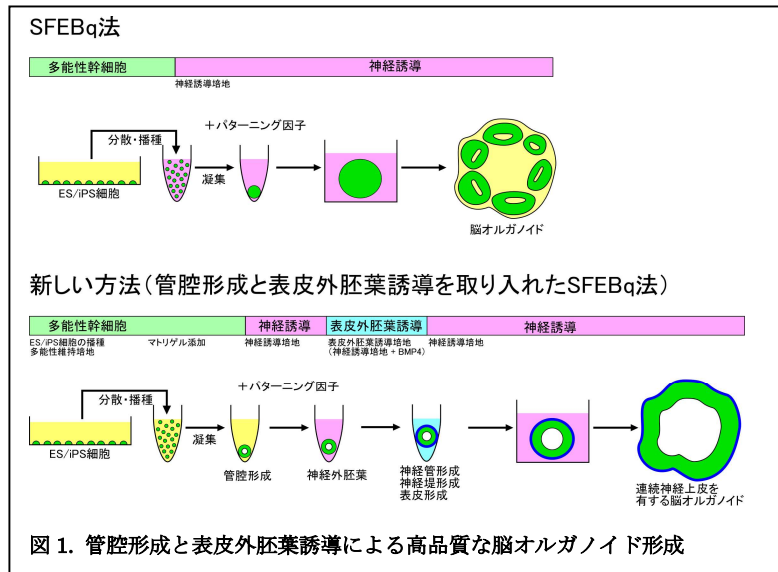
(c) 脳組織の操作技術の開発

脳機能に関する予想される分子について、ゲノム編集技術を適用し、改変 iPS 細胞から脳組織を作製して表現型を計測・解析することで、機能検証を実施する手法の開発に取り組んだ。

4. 研究成果

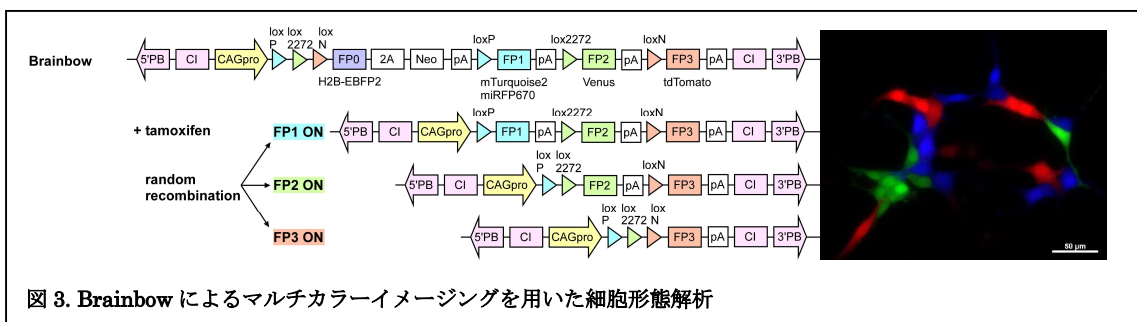
(a) 脳組織の作製技術の開発

現有の SFEBq 法では、生体で見られるような連続的な脳組織を形成することが困難であり、多数の小さな神経上皮構造を形成してしまうという欠点を有し、これがオルガノイドの成熟化の障害となっていると考えられる。そこで、SFEBq 法に管腔形成と表皮外胚葉誘導のステップを加えることで連続的で大きな神経上皮構造を形成できるかどうか試した (図 1)。その結果、従来法に比べて、大きな連続神経上皮構造を再現性よくに形成することに成功した (図 2)。新手法を用いることでより成熟した高品質な脳組織の作製ができるものと期待できる。



(b) 脳組織の解析技術の開発

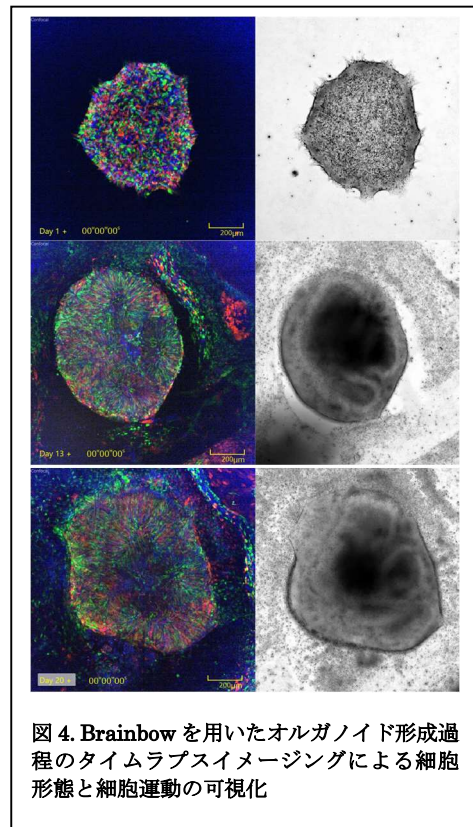
脳オルガノイド内の細胞形態および組織構造を 3D イメージングにより計測して解析する技術開発に取り組んだ。無染色標本には代表者が開発した Riesz 変換微分干渉顕微鏡を用い、蛍光と等価な 3D 輝度画像を取得して立体像を構築した。また、piggyBac トランスポゾン系と Cre-loxP 系を組み合わせた安定的遺伝子導入法、あるいはゲノム編集によるノックイン法により、特定の細胞種、任意のタイミングで蛍光レポーターを発現する細胞株の作製に成功した。そのうち、Brainbow システムによるマルチカラー標識 (図 3) を導入することで、オルガノイド形成過程において個々の細胞の形と動きを可視化することに成功した (図 4)。



また、脳機能に関する情報を得るために、オルガノイドの神経活動を計測する技術を確立した。カルシウムセンサーを発現する iPS 細胞を作製し、そこから形成したオルガノイドにおいてカルシウムシグナルを検出する手法を確立した。

(c) 脳組織の操作技術の開発

iPS 細胞に対して、Crisper-Cas9 系と piggyBac トランスポゾン系を用いたシームレスなゲノム編集技術を導入し、確立を行った。確立した手法を用いて、脳機能に関する予想される分子複数に関して、遺伝子改変 iPS 細胞を作製した。これらの改変 iPS 細胞から脳オルガノイドを作製した。現在、作製した脳オルガノイドに対して、細胞形態解析および機能解析を実施し、表現型を明らかにすることで、分子の機能検証を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

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 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 玉田 篤史、木村 俊哉、次山ルシラ 絵美子、六車 恵子	4. 巻 73
2. 論文標題 特集 形態形成の統合的理解 .再構成系による理解 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） 10.11477/mf.2425201533	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
研究分担者	六車 恵子 (MUGURUMA Keiko) (30209978)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

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