

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05786

研究課題名（和文）柔軟な神経らしさを作り出すパラメトリック翻訳制御の解明

研究課題名（英文）Understanding parametric translation regulation underlying neuronal functions

研究代表者

池内 与志穂（Ikeuchi, Yoshiho）

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：30740097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 29,300,000円

研究成果の概要（和文）：大脳オルガノイドを2つ軸索束を介して接続した大脳コネクトイドの回路構造が、どのように神経活動を変化させるのかを知るために、タンパク質合成に着目して細胞の内部状態の変化を調べた。その結果、大脳オルガノイドを2つ直接密着させたアセンブロイドに比べてコネクトイドでは軸索の状態を制御する膜タンパク質の量が増えていることが明らかになった。このタンパク質がコネクトイドの内部ネットワーク状態を制御する鍵になると考え、アゴニストとアンタゴニストで活性を調節したところ、オルガノイド間の神経活動のやりとりを制御できる手法として活用できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路構造を変化させることで神経活動が変化するが、それに伴って遺伝子発現も変化することを示した。この遺伝子発現が神経活動の制御を行っており、神経回路の構造、活動、遺伝子発現のそれぞれが密接に絡み合っている様子を試験管内で観察することができた。この知見を実際の脳内の回路に当てはめて検討することによって脳の機能の基盤的機構を調べることができるだろう。また、オルガノイド間の神経活動のやりとりを調節することができたため、同様の手法で脳内の活動を変化させ、領域間の機能的な関連や協調について調べるために役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To understand how the circuit structure of the cerebral connectoid, which connects two cerebral organoids via an axonal bundle, changes neuronal activity, we investigated changes in the internal cellular state focusing on protein synthesis. As a result, we found that the amount of membrane proteins that control axons is increased in connectoids compared to assemblebroids which are two cerebral organoids directly attached to each other. Given that this protein could be the key to controlling the state of the internal network of connectoids, they regulated its activity with agonists and antagonists, and found that it could be used as a method to control the exchange of neural activity between organoids.

研究分野：神経科学

キーワード：オルガノイド リボソーム タンパク質合成 神経

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経回路構造は、脳の高次機能の根源である。回路構造が変われば、神経ネットワークの活動がダイナミックに変化し、それとともなって細胞内での遺伝子発現も変化すると考えられ、神経の回路構造、活動、内部状態の詳しい関係性は明らかになっていない。これらの関係性を定量的に理解し、鍵となる分子を知ることによって、神経回路の活動パターンを変化させられれば、神経ネットワークを自在に操れるようになると考えられる。一方で近年、ヒト iPS 細胞の三次元培養によって神経系の一部分を自発的に模倣した神経(あるいは脳)オルガノイドと呼ばれる培養組織の研究が進んでいる。二つ以上の神経オルガノイドを融合させることで神経系内部の機能的領域間のつながりを模倣した研究も盛んに行われている(アセンブロイド)。しかし、大脳の左右半球の繋がり(脳梁)のような、離れた脳部位のつながりは模倣できなかった。我々の先行研究(Kawada et al Stem Cell Reports 2017, Kirihara et al iScience 2019 他)において開発した培養マイクロデバイスを用いて神経オルガノイドの間を軸索でついでところ(コネクトイド、図1)、神経活動が全体的に増加し、複雑かつ特徴的な低周波オシレーション活動を示した。コネクトイドの *in silico* モデルを作成すると、実際のコネクトイドのような特徴的な神経活動パターンが生成された(図2)。このことからオルガノイド間の結合の仕方によって神経活動を積魚できることが示された。そこで、アセンブロイドとコネクトイドを用いることで、神経回路構造の違いによって引き起こされる細胞内部のタンパク質合成の状態を明らかにできると考えた。

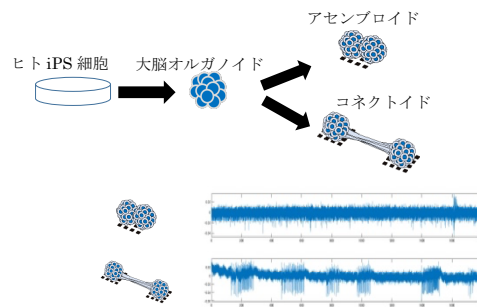


図1 コネクトイドの活発な神経活動

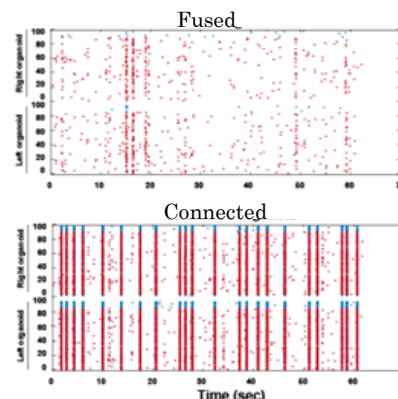


図2 アセンブロイドとコネクトイドの神経活動 *in silico* モデル

2. 研究の目的

本研究では柔軟な神経らしさを作り出すパラメトリック翻訳制御の解明を目指した。申請者らがマイクロデバイスを用いてヒト iPS 細胞から作製する手法を開発した神経組織「コネクトイド」を用いることによって、神経組織の回路構造に依存して引き起こされるネットワークの活動パターンの変化とそれに伴う神経細胞にあの翻訳速度の局所的变化を解析し、神経機能の基盤となる翻訳制御の実態と機構を明らかにすることを目指した。コネクトイドによって初めてわかる神経細胞の局所翻訳制御の本質を、領域内で開発される新技术をフル活用することによって生体脳機能へ演繹することにより、記憶の強弱などの柔軟な脳機能を支えるパラメトリックな翻訳制御機構を解明することを目的とした。また、本領域のテクノロジーハブの要となる技術としてコネクトイドを各班に提供し、睡眠覚醒(土居)、リボソーム渋滞(岩崎)、温度による局所翻訳制御(原田・岡部)の解明に貢献し、当該学術領域を変革することを目指した。

3. 研究の方法

「複雑な神経活動によって柔軟に変化する神経細胞内では、翻訳がどのように調節されるのか。」本研究ではこの問いの解決を、翻訳の速度制御を基盤として行い、脳や神経細胞が高次機能を生み出すための分子機構を理解することを目指した。神経回路の構造の変化に伴う神経活動の変化と、その背後にあるタンパク質量の変化を調べた。このために、オルガノイドとコネクトイドを、mRNA シーケンス、リボソームプロファイリング、プロテオミクス解析のそれぞれで比較し、神経組織の回路構造のちがいで引き起こされる細胞内の変化を調べ、神経活動と比較した。これらの解析によって得られた知見をもとに、神経ネットワーク活動を制御する鍵となるタンパク質を同定し、そのタンパク質を用いて神経ネットワーク全体の挙動を変化させられるようにすることを目指した。

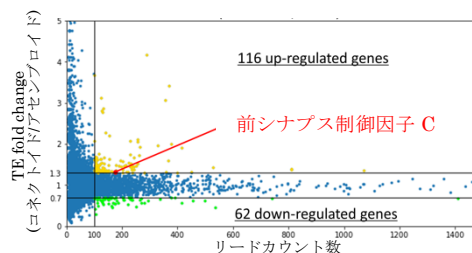


図3 リボソームプロファイリングの例

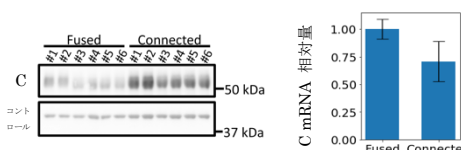


図4 コネクトイドでタンパク質 C が増加

そのタンパク質を用いて神経ネットワーク全体の挙動を変化させられるようにすることを目指した。

#### 4. 研究成果

回路構造による遺伝子発現変化を調べるため、コネクトイドおよびアセンブロイドの RNA 発現量とタンパク質翻訳効率を RNA-seq とリボソームプロファイリングにより解析した(図 3)。アセンブロイドとの比較によって、コネクトイドでは細胞外基質、軸索誘導、神経幹細胞増殖関係の遺伝子の翻訳が促進されていた。この結果から、神経の回路構造や結合の仕方による神経活動の変化に伴い、転写や翻訳も変動することが示唆された。変化した遺伝子群の中から特に、シナプス結合の強度を制御する前シナプス制御因子 C に着目した。コネクトイドとアセンブロイドにおける前シナプス制御因子 C の発現量をウェスタンブロッティングにより比較したところ(図 4)、コネクトイドにおいて前シナプス制御因子 C の発現量が増加していた。そこで、前シナプス制御因子 C がコネクトイドにおける特徴的な神経活動を制御しているのではないかと考えた。前シナプス制御因子 C を制御すると長期抑制(LTD)を引き起こすことが知られている。コネクトイドの特徴的な神経活動は連続的に低周波神経活動を示す期間とあまり活動しない期間を交互に繰り返す。そこで、前シナプス制御因子 C が神経伝達物質の放出を制御することで複雑な活動パターンを生み出しているという仮説を立てた。

まず前シナプス制御因子 C のアゴニスト、アンタゴニストをオルガノイドに添加し神経活動の変化を計測した(図 5)。アゴニストを添加してもスパイクの頻度は変化しなかったが、アンタゴニストを添加したところスパイクの頻度が上昇した。この結果から大脳オルガノイドでは前シナプス制御因子 C が定常的に活性化していて、神経活動を強く抑制していることが示された。次に、培養された神経細胞である大脳オルガノイドにおいて前シナプス制御因子 C による神経可塑性の制御を調べた。まず、マウスの脳スライスで LTD を解析する際に一般的に指標とされるフィールド興奮性シナプス後電位(fEPSP)のような活動を測定することを試みた。コネクトイドの片方のオルガノイドを電気刺激し 20ms 以内の電位の変化を測定した。刺激された電極周辺では神経細胞由来のシグナルと見られるピークが観察された一方で、電気刺激されていない方のオルガノイドではこのようなピークが観察されなかった。この結果からコネクトイドにおいて 20ms 以内に観察される電位の変化はシナプス結合を介さない個々の神経細胞の活動電位であると推測される。そのためこのシグナルは神経回路の可塑性の指標としては不十分であることが示唆された。さらに長い時間観察すると、コネクトイドにおいて電気刺激を加えた時に、刺激を加えた方、加えていない方どちらのオルガノイドにおいても低周波神経活動であるバーストが観察された。電気刺激を加えていない方のオルガノイドでもバーストが観察できるということから、電気刺激を加えたオルガノイドからシナプス結合を介してシグナルが伝搬していると考えられる。そのため我々はバーストをシナプス結合の強度の指標として用いることができるのではないかと考えた。そこでバーストの特徴量のうち特に”バーストの振幅”について定量を行った(図 6)。

コネクトイドにおいてアゴニストを添加し、前シナプス制御因子 C を活性化した時にどのようにバーストが変化するかを観察した。アゴニストを添加することで電気刺激を行った方のオルガノイドではバーストの振幅があまり変化しないにもかかわらず、電気刺激を行った反対側のオルガノイドでは振幅が減少しその効果がアゴニストを除去してからも 30 分間は継続していた。このことから 1) 電気刺激を行ったオルガノイド内では直接電気刺激された神経細胞がバーストを引き起こしているためアゴニストの影響をあまり受けないということ、2) アゴニストの添加による前シナプス制御因子 C の活性化が前シナプスにおいて神経伝達物質の放出を阻害したことで、電気刺激を受けたオルガノイドからのシグナルがシナプス結合を介して電気刺激を受けた方とは反対側のオルガノイドに伝わりにくくなったことが示唆された。神経回路構造を変化させるだけで神経活動が変化するだけではなく遺伝子発現も変化する。こうした遺伝子の中でも前シナプス制御因子 C はコネクトイド間の結合を弱めて特徴的な神経活動を引き起こしている。本研究では大脳モデルにおいて前シナプス制御因子 C が神経活動を制御していることが示された。実際の大脳内でも前シナプス制御因子 C が神経回路の結合を調整して、機能的な神経活動を創り出している可能性がある。

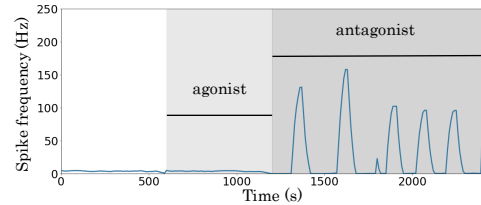


図 5 C 阻害で神経活動が活発化

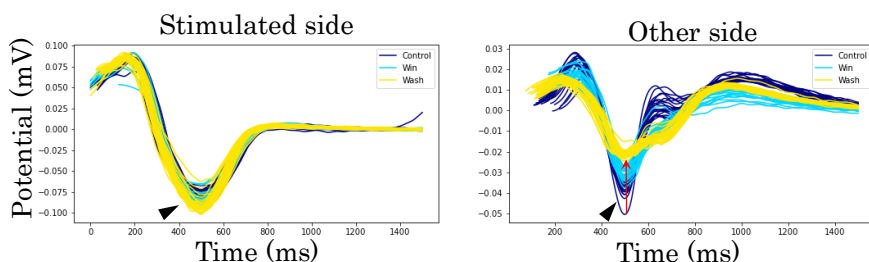


図 6 電気刺激によって両側のオルガノイドでバーストが観察された(黒矢頭)。アゴニストを添加すると電気刺激を行っていないオルガノイドでのみバーストの振幅が減少した

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 2件）

1. 著者名 Misawa Ryuji, Ikeuchi Yoshiho	4. 巻 0
2. 論文標題 Light-Induced Differentiation of Forebrain Organoids by NVOC-SAG	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 185 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1701-4_16	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 Kashiwagi Kazuhiro, Shichino Yuichi, Osaki Tatsuya, Sakamoto Ayako, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Mito Mari, Weber Friedemann, Ikeuchi Yoshiho, Iwasaki Shintaro, Ito Takuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 eIF2B-capturing viral protein NSs suppresses the integrated stress response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27337-x	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 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shiota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Osana S, Nakagawa T, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M	4. 巻 16
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1527 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.04.021	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 Wu Xiaobin, Park Jongho, Chow Siu Yu A., Kasuya Maria Carmelita Z., Ikeuchi Yoshiho, Kim Beomjoon	4. 巻 13
2. 論文標題 Localised light delivery on melanoma cells using optical microneedles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.450456	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 Osaki Tatsuya, Chow Siu Yu A., Nakanishi Yui, Hernandez Joel, Kawada Jiro, Fujii Teruo, Ikeuchi Yoshiho	4. 巻 163
2. 論文標題 Three-Dimensional Motor Nerve Organoid Generation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61544	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 該当する

1. 著者名 Nakayama Kazuki, Sassa Shoko, Sugiyama Maki, Kurosumi Motonori, Nishikori Shu, Chow Siu Yu A., Suzuki Tamio, Ikeuchi Yoshiho	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-dimensional imaging of the hyperpigmented skin of senile lentigo reveals underlying higher density intracutaneous nerve fibers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.01.010	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 Nagayoshi Y., Chujo T., Hirata S., Nakatsuka H., Chen C.-W., Takakura M., Miyauchi K., Ikeuchi Y., Carlyle B. C., Kitchen R. R., Suzuki T., Katsuoka F., Yamamoto M., Goto Y., Tanaka M., Natsume K., Nairn A. C., Suzuki T., Tomizawa K., Wei F.-Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of Ftsj1 perturbs codon-specific translation efficiency in the brain and is associated with X-linked intellectual disability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf3072	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 該当する

1. 著者名 Misawa Ryuji, Minami Tsuyoshi, Okamoto Akimitsu, Ikeuchi Yoshiho	4. 巻 38
2. 論文標題 Light-inducible control of cellular proliferation and differentiation by a Hedgehog signaling inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116144 ~ 116144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116144	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 Shaik Faruk Azam、Ihida Satoshi、Ikeuchi Yoshiho、Tixier-Mita Agn?s、Toshiyoshi Hiroshi	4. 巻 169
2. 論文標題 TFT sensor array for real-time cellular characterization, stimulation, impedance measurement and optical imaging of in-vitro neural cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112546 ~ 112546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2020.112546	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 Organoids-on-a-chip models for understanding neuronal circuits and underlying protein synthesis regulations
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 Organoids-on-a-chip models for understanding neuronal circuits and underlying protein synthesis regulations
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Osaki, Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 Advanced Complexity and Plasticity of Neural Activity in Reciprocally Connected Human Cerebral Organoids
3. 学会等名 ISSCR (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Osaki, Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 Advanced Complexity and Plasticity of Neural Activity in Reciprocally Connected Human Cerebral Organoids
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Osaki, Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 Advanced Complexity and Plasticity of Neural Activity in Reciprocally Connected Human Cerebral Organoids
3. 学会等名 日本神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 An Organoid-on-a-chip Approach for Modeling Macroscopic Neural Circuits in vitro
3. 学会等名 The 1st China-Japan-Korea International Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------