

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15046

研究課題名(和文) 多能性幹細胞を用いたin vitroでの皮質脊髄路の構築

研究課題名(英文) in vitro generation of cortico-spinal tract using human pluripotent stem cells

研究代表者

坂口 秀哉 (Sakaguchi, Hideya)

京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：30779153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脳と脊髄からなる皮質脊髄路を、ヒトの体のどの細胞にも分化できるポテンシャルを持つ多能性幹細胞から文化誘導した脳と脊髄を用いて再現しようと試みたものである。最終的な皮質脊髄路の構築はできなかったが、脳と脊髄の3次元組織はそれぞれ達成された。また脳に関しては詳細な機能評価を行うことで、実際の生体で見られるような同期発火を含む複雑な機能を有した脳組織が分化誘導できていることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の3次元組織分化誘導は2008年以降さまざまなラボによって再現が取られてきているが、脊髄の3次元組織分化誘導は既報がなく、本研究でなされた成果が世界で初めての報告となった。脊髄は3次元組織として分化する過程で、さまざまな種類の神経細胞を生み出し、その相互ネットワークによって運動や知覚の伝達を行なっていて、単純な神経細胞の分化だけでは疾患モデリングには不十分と考えられてきている。このため、本研究は脊髄疾患治療にむけての新たな基盤を提供できるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The neural organoids, which are three-dimensional (3D) neural tissues generated from pluripotent or tissue stem cells, are attractive models of human neural development. Using the pioneering method for the induction of neural organoids called SFEBq (serum-free floating culture of embryoid body like aggregates with quick reaggregation), we have investigated organoids of several neural regions such as cerebral cortex and spinal cord, by modulating the culture conditions based on the developmental information of each region. And using cerebral organoids, we investigated self-organized and complex human neural network activities that include synchronized and non-synchronized patterns.

Thus, by providing several types of human neural tissues and detailed analysis method for human neural activities, our research achievement will contribute for furthering future regenerative medicine and drug discovery for complexed neural disorders.

研究分野：神経分化誘導

キーワード：オルガノイド 神経分化誘導 脳皮質 脊髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多能性幹細胞から目的の細胞に分化誘導する技術が進歩したことにより、3次元での生体と同じような構造を保った組織への分化誘導が可能となっており、このような組織はオルガノイドと呼ばれる。3次元の構造を保った状態での分化誘導手法は、これまでの比較的単純な条件による分化誘導では達成できなかった複雑な領域の分化誘導を可能とすると考えられ、次世代の再生医療のトピックの一つとして注目されている。神経組織においては、大脳、神経網膜、海馬、脈絡叢、小脳、視床下部、下垂体などが3次元組織として分化誘導できることが報告されている。しかし脊髄に関してはこれまで、3次元の組織としての分化誘導は全くなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞から3次元での大脳新皮質への分化誘導研究成果を基礎に、ヒト多能性幹細胞から大脳皮質組織と腹側脊髄組織をそれぞれ3次元で分化誘導し、それら2つの組織間での上位・下位運動ニューロンからなる神経回路再構築を達成することで、ヒト由来の皮質脊髄路を *in vitro* で確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、上記の背景およびこれまでの業績を元にして、未だ達成されていないヒト多能性幹細胞由来の皮質脊髄路を再現し、臨床応用に展開する基盤となる研究を行うために、

1) 3次元での脊髄組織の誘導に必要な培養条件の確立

下位運動ニューロンが産生される腹側脊髄の3次元分化誘導のため、発生学的な知識をもとに無血清浮遊凝集培養法の培地成分を適宜修正し、発生過程で見られるようなパターンングを持った3次元腹側脊髄組織を分化誘導する。

2) 大脳皮質組織と脊髄組織間における神経回路の再構成による皮質脊髄路の確立と機能評価

大脳組織は3次元で分化誘導可能なため、1)で作った脊髄組織と大脳組織を組み合わせることで、皮質脊髄路を *in vitro* で構築し、できればカルシウムイメージングでその機能評価まで行う。

4. 研究成果

1) ヒト iPS/ES 細胞からの背側脊髄の3次元分化誘導条件の確立

これまでに報告されている脊髄運動ニューロンの分化誘導条件と、マウスおよびヒトの多能性幹細胞から中枢神経系を3次元で効率よく誘導する方法として知られる無血清立体浮遊培養法 (SFEBq法) を組み合わせ、発生学的な脊髄の分化を *in vitro* で再現するという戦略で、3次元脊髄分化誘導法の創出に取り組んだ。脊髄運動ニューロンの分化誘導条件には多くのシグナル調整因子が含まれていることから、いくつかの因子を除去することで、脊髄運動ニューロンに限局しない広い領域の分化誘導が可能となるのではとの仮説を元に新たな分化誘導条件を模索し、3次元での背側脊髄のマーカーを発現する神経組織を分化誘導する培養条件を同定した (図1)。この条件で誘導された組織には、培養15日目に Pax6⁺/Pax7⁺ の背側脊髄に存在する前駆細胞の神経上皮が見られ、その中にはより背側領域に相当する Pax6⁺/Pax7⁺/Olig3⁺ の pd1-3 を分化誘導する領域とより腹側に位置する Pax6⁺/Pax7⁺/Olig3⁺ の領域を認めた。さらに Pax6⁺/Pax7⁺/Olig3⁺ の上皮に連続して、Lmx1a⁺ の roof plate と呼ばれる背側領域のオーガナイザーに相当する領域を認めた。これらの領域は連続上皮の中に生体と同じような順序で形成されており、今回設定した分化誘導条件では、背側脊髄領域が生体に近い形で分化誘導されていることが示唆され、この分化誘導条件を 3-DiSC (3 dimensional spinal cord induction) 法と名付けた。

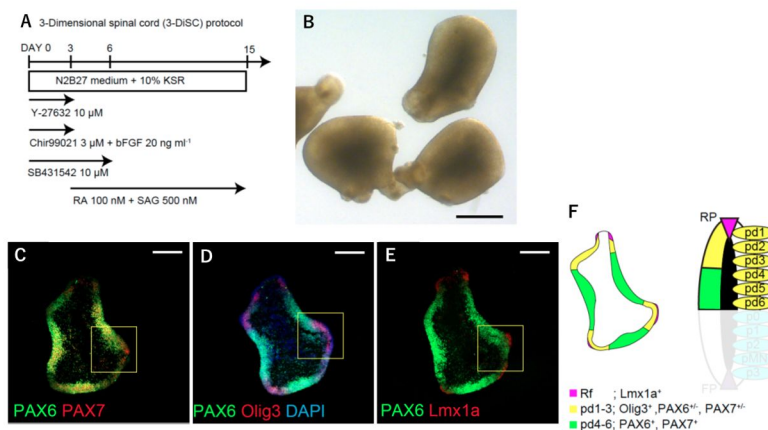


図1: 背側脊髄組織の分化誘導

A: 背側脊髄組織を分化誘導するプロトコール(3-DiSC法)。B: 3-DiSC法で分化誘導された組織の位相差顕微鏡像。C-E: 3-DiSC法で分化誘導された組織の免疫染色像。Lmx1a⁺の roof plate 領域、PAX6⁺/PAX7⁺/Olig3⁺の pd1-3 領域、PAX6⁺/PAX7⁺/Olig3⁺の pd4-6 領域を含む背側脊髄領域が3次元で分化誘導されている。F: C-E の模式図。図中のスケールバーは B: 500 μm、C-E: 200 μm。

発生過程においては腹側にも floor plate と呼ばれるオーガナイザーが存在し、Sonic hedgehog のシグナルを分泌することで腹側の領域を決定している。3-DiSC 法で誘導した組織は背側領域のみが形成されていたが、より背側もしくは腹側の分化誘導ができないかと考え、次に、背側化因子である BMP4 や腹側化因子である Sonic hedgehog のシグナルを適切な時期に添加することで、背側・中間・腹側の脊髄を分化誘導できる条件を探った(図2)。3-DiSC 法で分化誘導した脊髄組織からは、脊髄介在ニューロンの dl1-4 に相当する神経のマーカ発現が広く見られ、これは背側脊髄の広い領域が分化誘導されていることを示した。しかし、培養 15 日目より BMP4 を添加して培養を続けると、dl1 の割合が有意に上昇し、dl3-4 については 3-DiSC 法よりも有意に減少しており、脊髄神経前駆細胞を背側化因子で処理することで、誘導された神経領域がより背側化されていることを示していた。

次に、腹側化因子の Sonic hedgehog シグナルを増強する SAG という化合物を培養 3 日目より添加して、3-DiSC 法で分化誘導した背側脊髄組織を腹側化することを試みた。腹側化の指標として、背側・中間・腹側脊髄領域に発現するマーカーを qPCR にて定量評価した結果、SAG を 50 nM の濃度で添加した時には中間脊髄領域に発現が見られる Dbx1/Dbx2 の発現が有意に上昇していたが、腹側脊髄に発現するマーカーである Nkx6.1 や Olig2、FOXA2 の発現上昇は認められなかった一方で、SAG を 500 nM の高濃度で添加すると、Dbx1/Dbx2 の発現上昇は認められない代わりに、Nkx6.1/Olig2/FOXA2 の有意な発現上昇が認められた。これらのマーカー発現について、免疫染色にて詳細に評価したところ、SAG 50 nM 添加群では中間領域の 3 次元脊髄組織が分化誘導され、SAG 500 nM 添加群では、腹側領域の 3 次元腹側脊髄組織が生体と同じような構造を持って分化誘導されていることがわかった。これらの結果は 3-DiSC 法で分化誘導した背側脊髄組織が濃度依存的に Sonic hedgehog シグナルによって腹側化されることを示していた。

以上の結果より、3-DiSC 法で分化誘導した背側脊髄組織は、背側化因子・腹側化因子によってそれぞれ、背側・腹側への領域化が可能で、これまでに報告されている脊髄の分化誘導方法とは異なり、生体の脊髄発生過程まで再現していることが示された。

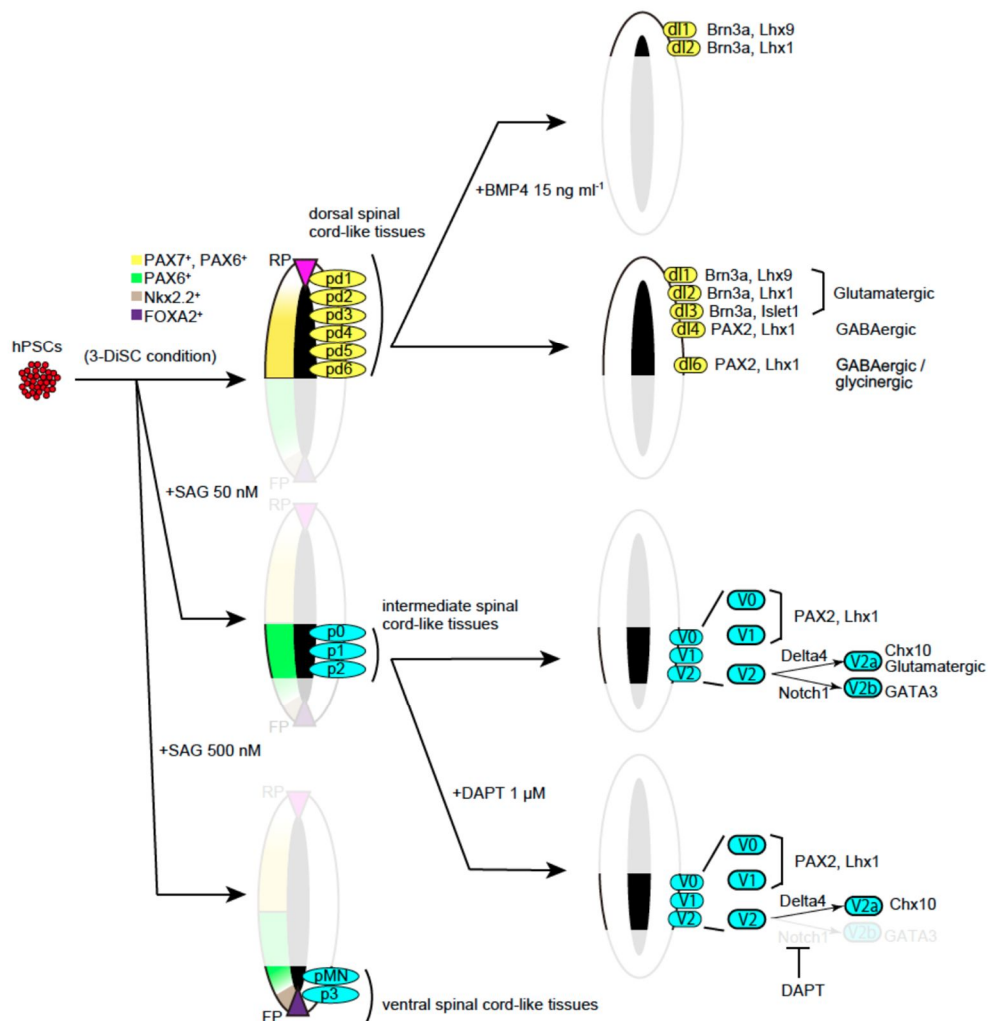


図2：背側・中間・腹側脊髄の分化誘導条件のまとめ

3-DiSC 法では dl1-6 を含む広い背側脊髄組織が誘導されるが、BMP4 添加によって背側化されると dl1-2 が主に誘導される。SAG 50 nM のによる腹側化は p0-2 の中間脊髄領域を誘導し、そこに

DAPT を添加すると V2a ニューロンが主に誘導される。SAG 500 nM による強い腹側化は floor plate-p3-pMN の腹側脊髄領域を誘導する。

最後に、得られた神経細胞の単細胞でのマーカー発現解析を行うために 3-DiSC 法、3-DiSC 法+SAG 50 nM、3-DiSC 法+SAG 500 nM の 3 つの条件のサンプルを分散培養し、免疫染色による評価を行った (図 3)。この結果、3-DiSC 法のサンプルからは Vglut2⁺/Islet1⁺ の dl1-2、Vglut2⁺/Islet1⁺/Brn3a⁺ の dl3、GABA⁺/Pax2⁺ の dl4 または dl6 に相当する神経細胞が、3-DiSC 法+SAG 50 nM からは、Vglut2⁺/Chx10⁺ の V2a interneuron、Calbindin⁺/MafB⁺ の V1 Renshaw interneuron、GABA⁺/Foxp2⁺ の non-Renshaw V1 interneuron が、そして 3-DiSC 法+SAG 500 nM からは、ChAT⁺/Islet1⁺/Hb9⁺ の脊髄運動ニューロンが産生されていることを、各ニューロンのマーカー発現パターンから示した。これらの結果から、今回分化誘導した脊髄組織からは、それぞれの分化誘導領域に応じて、相当する脊髄神経が産生されることが示された。

2) 大脳皮質組織と脊髄組織間における神経回路の再構成による皮質脊髄路の確立と機能評価

この後分化誘導した大脳組織と腹側脊髄組織の融合も考えていたが、実際には大脳組織の分化誘導でうまくいっていた神経機能評価について、学会発表で競合相手がいることがわかったため、大脳組織を用いた機能評価単体で論文発表を急ぐこととした。これは独立した論文として、Stem Cell Reports 誌に発表された (Stem Cell Reports. 2019 10;13:458-473)。

上記成果について、ヒト多能性幹細胞由来の脊髄組織 3 次元分化誘導は世界初の報告となったほか、大脳組織の機能評価手法はヒト神経活動の新規評価手法として広く企業に導入されるなど実用面で評価されており、関連する研究業界や産業分野にとって十分にインパクトのある仕事となった。将来的には、脊髄に関連した疾患モデリングの基盤になるなど、将来的な発展も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogura Takenori, Sakaguchi Hideya, Miyamoto Susumu, Takahashi Jun	4. 巻 145
2. 論文標題 Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 162214-162214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.162214	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 Sakaguchi Hideya, Ozaki Yuki, Ashida Tomoka, Matsubara Takayoshi, Oishi Naotaka, Kihara Shunsuke, Takahashi Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 Self-organized synchronous calcium transients in a cultured human neural network derived from cerebral organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 458-473
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 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7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sakaguchi Hideya and Takahashi Jun
2. 発表標題 Self-Organized synchronous calcium transients in a cultured human neural network derived from cerebral organoids
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakaguchi Hideya and Takahashi Jun
2. 発表標題 Self-organized synchronization in human neuronal network activity derived from cerebral organoids.
3. 学会等名 Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaguchi Hideya and Takahashi Jun
2. 発表標題 Self-organized synchronization in human neuronal network activity derived from cerebral organoid.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の海馬、脊髄、大脳皮質組織とその神経活動へのアプローチ
3. 学会等名 奈良先端科学技術大学院大学 研究科セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の海馬、大脳皮質、および脊髄組織
3. 学会等名 金沢大学 脳神経医学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の大脳オルガノイド ~イメージングによる多面的評価と新しいアプローチ~
3. 学会等名 Sartoriusフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の3次元大脳組織とそれに由来する神経ネットワークにおける神経活動の評価
3. 学会等名 第2回横河電機ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 俊朗、武部 貴則、永樂 元次	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 368
3. 書名 決定版 オルガノイド実験スタンダード	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ヒト多能性幹細胞から3次元脊髄組織の分化誘導に成功 https://www.ci.ra.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/180807-100000.html</p>

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