

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19903

研究課題名（和文）大脳領域間の機能的相互作用を再現する試験管内モデル

研究課題名（英文）In vitro model tissue of interregional cortical connections

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題によって、ヒトiPS細胞から作製した大脳オルガノイドを軸索束組織を介してつなぎ合わせる技術を開発することができた。微細流路の両端に小さな部屋をもつ培養チップに2つの大脳オルガノイドを入れると、部屋の中のオルガノイドから伸長した軸索が流路内に入り、集まって束になる。軸索の先端は流路の逆側のオルガノイドにたどり着き、シナプスを形成してつながる。つなぎ合わされたオルガノイド間で神経活動がやり取りされることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳は領域（領野）ごとに機能が異なる局所構造（回路）をもち、それらが互いに巨視的に繋がり合うことで機能することができる。本研究ではこの基本の回路構造を模倣することを目指した。本研究で開発した方法によって、局所的な神経回路と巨視的な神経回路の両方を同時に持たせた人工組織内を作ることができるようになった。今後さらに発展させることによって脳に似た神経回路を構築し、機能解析などを行うために活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This research project successfully developed a method to connect two or more cerebral organoids through axon bundles spontaneously extended from them and assembled. We confirmed that neuronal activities are exchanged between the organoids. This method could open up new studies to model neuronal circuits in the brain because the tissue bears both local and distant neuronal connections.

研究分野：神経科学

キーワード：神経 脳 iPS細胞 オルガノイド 軸索

1. 研究開始当初の背景

近年、多能性幹細胞を三次元培養で分化することによって、臓器に似た内部構造を持った組織(オルガノイド)を作る研究が盛んに行われている。一般的に、臓器の内部に繰り返しあらわれる微細構造ユニットはすべて機能的にほぼ同一であるため、その構造的特徴を有するオルガノイドは臓器全体を模倣しているといえる。一方で、脳においては部位ごとに機能が異なるという特徴がある。さらに、部位間で巨視的につながって連絡し合うことで初めて正常に機能することができる。例えば、ある入力情報を脳内の複数の領域で段階的に処理する場合には、ある領域内部の局所的(微視的)な神経回路で処理された情報が、軸索を介して別の領域に伝わる、というプロセスを繰り返すことが必須である。このような脳の構造のおよび機能的な特徴のため、通常のオルガノイドによって脳の機能を模倣することは難しいことが容易に考えられる。通常の方法でオルガノイドを作製すると、脳内のさまざまな局所的な部位を真似できるようになってきた。しかし、脳内の巨視的ネットワークを再現できないので、脳全体の機能を模倣できない。オルガノイドを二つ密着して結合させる「アセンブロイド」も報告されているが、二つのオルガノイドの境界はあいまいになり、最終的には融合してしまう上、三つ以上のオルガノイドを思う様に配置させて結合することも難しいため、体外で巨視的な回路を作るのに最適な方法ではない。そこで、局所的(微視的)な回路をもつオルガノイドをつなげて、脳内の巨視的な回路を模倣する組織を作成する手法が求められていた。

また、大脳の異なる機能領域、あるいは左右の2つの半球は自律的に活動を調節し合い、情報を統合することで脳の高次機能を発揮しており、その機構を知ることは脳の働きを理解するためにとても重要である。これまでにヒトの脳の活動を計測することなどによって脳の働きのしくみを理解する試みが多くなされ、脳波として広範囲に観測される周期的な神経活動や、大脳半球間で互いに抑制し合う仕組みなどが脳の統合的な働きに重要であることが示されている。しかし、試験管内で複数の大脳領域を模した構造を接続した神経ネットワークを構築し、その活動パターンを再現しようとする試みはほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

脳内では、たくさんの神経領域が互いに軸索を伸ばし合い、束状に集まりながら接続しあっている。そこで、そのような構造を作らせ、神経組織をつなぎ合わせた組織をつくり出す手法を開発することを目的とした。神経組織が軸索によってつなぎ合わせ、神経活動をやり取りさせることを目指した。また、試験管内で作製した三次元状の神経ネットワークを用いて大脳の自律的な活動調節を再現することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、長距離領域間のネットワークに特徴的で、脳の統合的な活動に重要な、周期性の神経活動パターンに注目する。この最も基本的な大脳の神経活動パターンを再現できる三次元神経ネットワークを試験管内で構築することを目指して研究を行う。

以上の研究を行うために、下の5段階に大別される項目の開発と検討を行う(図3)。

- 1) ヒト iPS 細胞を用いた大脳オルガノイドの作製
- 2) 長い軸索束による大脳オルガノイド間の接続
- 3) 抑制性神経細胞の誘導
- 4) 軸索束で接続した大脳オルガノイドの電気活動計測
- 5) 周期的活動の観測と活動周期の解析

周期的な神経活動を再現できた場合には、それぞれの大脳オルガノイドを異なる周波数で刺激し、どのように互いに影響を及ぼし合うかを調べる。これにより、脳内の異なる領域の神経活動が統合される過程を調べるようになるのではないかと考えた。

4. 研究成果

1) ヒト iPS 細胞を用いた大脳オルガノイドの作製

大脳オルガノイドの作製については、先行論文を参考にした。いくつかのプロトコルでヒト iPS 細胞(409B2株)から大脳オルガノイドを作製できることを確認した。プロトコルごとに得られる大脳オルガノイドの性質が異なる部分が多々あることを経験した。

2) 長い軸索束による大脳オルガノイド間の接続

本研究開始以前、微細加工とマイクロ流体技術を用いて運動神経の軸索を束状に組織化させ、運動神経の人工組織を作成する手法を開発することに成功していた(Kawada et al Stem Cell Reports 2017)。この手法によって、神経組織が微小通路内部に多数の軸索を伸長させると、通路内で互いに接近した軸索同士は側面同士で寄り添うように接着し、束状の組織を形成する。

この手法を応用し、シリコーンゴム(PDMS)で作製したマイクロ培養チップ内で2つの大脳オルガノイドを培養した。オルガノイド間に配置したチップ内の細い通り道(微細流路)に軸索を誘導すると、大脳オルガノイド同士が互いに軸索を伸ばす。軸索同士は束のように集まる。最終的には軸索の末端は反対側のオルガノイドに到達し、シナプスを形成して接続すること

を確認した。

2つ以上の大脳オルガノイドから互いに軸索を伸ばし、接続させて最もシンプルな巨視的な大脳神経回路ユニットを作製する手法を開発した。この方法は、局所的な回路と巨視的な回路の両方を組織内に持つことが特徴であり、脳内の神経回路のモデルを作るのに適した手法である。

3) 抑制性神経細胞の誘導

オルガノイド内に抑制性神経細胞を作り出すために、神経オルガノイドの作製時に腹側への分化誘導を行なった。ヘッジホッグシグナリングを活性化するために SAG (Smoothed Agonist) を用いた。オルガノイド分化誘導過程で、NKX2.1 などの腹側前脳幹細胞の出現を確認した。抑制性神経細胞については、GAD などのマーカー遺伝子の発現を確認した。

局所的に腹側誘導を行い、抑制性神経細胞を生み出すために、ケージド SAG を開発した。この化合物はヘッジホッグシグナリングを活性化しないが、紫外光によってアンケージすると NVOC 保護基が外れて SAG が生まれてヘッジホッグシグナリングを活性化する。これを用いることで、光を当てたオルガノイドに NKX2.1 陽性の抑制性神経細胞前駆細胞を生み出すことができた。また、光依存的にヘッジホッグシグナリングを抑制するケージド SANT も開発することに成功した。

4) 軸索束で接続した大脳オルガノイドの電気活動計測

多電極アレイ (MEA) の上で軸索束を介して接続した大脳オルガノイドを作製し、活動を計測した。大脳オルガノイド単体、及び二つを結合させたものにくらべ、軸索束を介して接続した大脳オルガノイドは強く、複雑な活動を示した。

オルガノイド全体が発火するバースト活動が頻繁にみられたが、接続したオルガノイドの片方のバースト活動は、少し (100ms 程度) 遅れてもう片方にも伝搬することがわかった。軸索束を切断すると、バースト活動が両方のオルガノイドで同時に計測されることはなくなり、軸索束を介してオルガノイド間でコミュニケーションをすることにより、接続されたオルガノイドは全体として複雑な活動を生み出すことが明らかになった。

5) 周期的活動の観測と活動周期の解析

MEA で得られた神経活動パターンを周波数帯に分割して解析すると、大脳オルガノイド単体、及び二つを結合させたものにくらべ、軸索束を介して接続した大脳オルガノイドは EEG においては「デルタ」や「シータ」と呼ばれる帯域と同じ周波数帯においてより強い活動を示した。したがって、オルガノイドをつなげて巨視的な回路構造を作ることによって神経活動パターンが顕著に変化し、周期的活動を生み出すことができたと言える。

当初は、活動電位が軸索を伝わる伝導時間が「遅れ時間」となって周期的活動を生み出すと予想していた。しかし実際には、軸索の長さを変化させた組織を作製して実験しても周期的な活動に変化は見られなかった。つながった2つのオルガノイド間のバースト活動の時間差にも変化はなかった。これに加え、バースト活動自体が 100ms 程度継続することから、オルガノイド内のバースト活動が広がるために必要な多数のシナプス伝達が行われ、オルガノイド間をつなぐ軸索を持つ神経細胞が十分な数発火してもう片側のオルガノイドにバースト活動を引き起こすためにかかる時間が低周波成分として観測される神経活動を生み出すと考えられる。

以上により、本研究によって体外で巨視的な神経回路を再現することによって、神経回路の構造に応じて神経活動を変化させられることが明らかになった。機能と構造の関連性について、脳領域間の巨視的な接続が必要であるという根本的な原理の一端を体外で模倣することに成功したと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kirihara T, Luo Z, Chow SYA, Misawa R, Kawada J, Shibata S, Khoystatee F, Vollette CA, Volz V, Levi T, Fujii T, Ikeuchi Y	4. 巻 14
2. 論文標題 A Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Tissue Model of a Cerebral Tract Connecting Two Cortical Regions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 301-311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.03.012	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 Misawa Ryuji, Minami Tsuyoshi, Okamoto Akimitsu, Ikeuchi Yoshiho	4. 巻 1
2. 論文標題 A Light-Inducible Hedgehog Signaling Activator Modulates Proliferation and Differentiation of Neural Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.0c00195	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takaaki Kirihara, Jiro Kawada, Zhongyue Luo, Angela Chow, Ryuji Misawa, Farad Khoystatee, Timothee Levi, Teruo Fujii, Yoshiho Ikeuchi
2. 発表標題 A three-dimensional in vitro model of interconnected cerebral regions
3. 学会等名 第37回 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2018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
---------	---------