

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2023

課題番号：18KK0443

研究課題名（和文）神経疾患創薬を志向した大脳オルガノイドの開発とそれを利用した多検体解析技術の構築

研究課題名（英文）Development of Cerebral Organoids and Multi-Sample Analysis Technology for Drug Discovery of Neurological Diseases

研究代表者

平野 和己（hirano, Kazumi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40707709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

渡航期間：0.1ヶ月

研究成果の概要（和文）：本申請課題では基課題で確立した大脳オルガノイド誘導技術を発展させ神経疾患創薬を志向した新たな大脳オルガノイドの作成を目的とする。脳オルガノイド誘導技術の課題である培養期間の短縮とオルガノイド内部の均一性の向上を目指し、創薬スクリーニングに資する、多検体解析かつハイスループットな解析が可能な脳オルガノイドの開発を行った。サイズをコントロールすることで、内部構造が均一で、誘導期間が短いシングルロゼット脳オルガノイドに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、脳オルガノイドの多検体解析が可能になることで創薬における産業利用への貢献が想定される。これまでの培養法では解析が困難であった表現型評価や、コスト面での改善が見込まれる。また、発達神経毒性評価などの分野における動物実験代替法として利用にも貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to create new cerebral organoids for drug discovery for neurological diseases. We aimed to shorten the culture period and improve the internal homogeneity of organoids, which are challenges for brain organoid induction technology, and developed brain organoids that can be analyzed by multiple samples and high-throughput analysis for drug discovery screening. By controlling the size, we succeeded in producing a single rosette brain organoid with uniform internal structure and short induction period.

研究分野：神経発生学

キーワード：脳オルガノイド 神経幹細胞 神経疾患 創薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

近年、3次元大脳発生モデル「大脳オルガノイド」が報告されたが、ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS) 細胞に起因する課題 (長い誘導期間、高い培養コスト、神経系以外のジャンク細胞の存在) が山積しており、多検体をハイスループットに解析する創薬スクリーニングへの利用には適していない。神経活動を評価する技術として、カルシウムイメージングを用いた大脳オルガノイドの神経活動観察に国内外で焦点が当てられているが、大脳オルガノイドの中心部はカルシウム濃度の高い死細胞を多く含む為、カルシウムイメージングだけでは正確な神経活動を捉える事は難しい。また、電気生理学的手法を用いた神経活動の測定は、オルガノイド切片の作成等の作業が加わる為、スクリーニングなどの多検体解析には適切ではない。一方で、マルチ電極アレイ (MEA) システムを用いたハイスループットな大脳オルガノイド神経活動計測技術が知られているが、このシステムにも従来の大脳オルガノイドに起因する内部の均一性の課題がある。従来のオルガノイドはマルチロゼット構造を有しその内部は複雑でオルガノイド間での個体差が大きい。オルガノイドの周囲の神経細胞の分布にもばらつきがあり、神経細胞が露出している箇所が MEA の電極が接着する事で初めて神経活動の測定が可能となり、それ以外の領域と接しても測定はできない。通常、ヒト iPS 細胞から数ヶ月かけて誘導した大脳オルガノイドをランダムに電極上に接着させており、オルガノイドの接着する配向に依存した計測しかできず、多検体解析の効率が悪い。そのため、表面全体が神経細胞で覆われており、確実な MEA 測定の実施が可能なシングルロゼット構造を有した脳オルガノイドの開発が求められている。

2. 研究の目的

本申請課題では基課題で確立した大脳オルガノイド誘導技術を発展させ神経疾患創薬を志向した新たな大脳オルガノイドの作成を目的とする。具体的には、脳オルガノイド誘導技術の課題である培養期間の短縮とオルガノイド内部の均一性の向上を目指し、創薬スクリーニングに資する、多検体解析かつハイスループットな解析が可能な脳オルガノイドを開発する。また、各種神経疾患のモデル細胞を作成し、創薬に資する培養系の構築も行う。

3. 研究の方法

(1) シングルロゼット構造を有するオルガノイドの開発

通常の大脳オルガノイドの内部には複数のロゼット構造が含まれており (マルチロゼット)、オルガノイドの均一性を妨げる要因となっている。そこで、内部が均一なシングルロゼット構造を有する大脳オルガノイドの開発に取り組みさらに、誘導の短縮化を目指した培養法を検討した。

(2) 各種神経疾患・関連疾患研究への応用

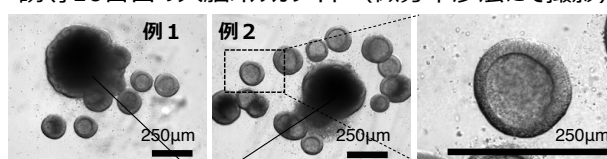
てんかん、アルツハイマー病 (AD)、自閉症スペクトラム (ASD)、睡眠障害などの神経疾患に関わる原因因子を脳オルガノイドに導入し、その病態の再現と詳細な分子機構、シグナル伝達機構の解析を行った。

4. 研究成果

(1) シングルロゼット構造を有するオルガノイドの開発

通常の大脳オルガノイドでは大脳構造の最小ユニットであるロゼットを内部に複数持つマルチロゼット構造という複雑かつ未統制な構造を有しており不均一性の原因となっている。内部構造が単純かつ統制の取れたシングルロゼット構造の構築が不均一性解決の重要な要因となる。直径が $250\mu\text{m}$ 以下の脳オルガノイドにおいて、シングルロゼット構造を有することが報告されており (Elife. 2018 7 e37549)、サイズコントロールの重要性が認識された。そこで本課題では、まずヒト iPS 細胞を用いて $200\mu\text{m}$ 程度の大きさとシングルロゼット構造を有したミニマム脳オルガノイドを作成し、培養期間の短縮にも成功した (図1)。さらに従来では神経幹細胞の誘導期間に 25 日間要していたが、10 日へと誘導期間を短縮できた。しかし、誘導したミニマム脳オルガノイドはオルガノイド間の融合が起こり、それを解消する技術が求められる。今後、作成誘導したオルガノイドを個別に成熟させる技術の確立を行い、多検体解析のための MEA での計測を実施する。

誘導10日目の大脳オルガノイド (微分干渉法にて撮影)



大きな細胞塊
図1 ミニマム脳オルガノイド

また、多様な脳領域オルガノイド及びアストロサイトスフェアの誘導を実施した（図2）。これらの基盤技術をもとに各種疾患解析へと研究を展開した。特にアストロサイトスフェアでは高効率に GFAP 陽性アストロサイトの誘導に成功し、その細胞膜上には AQP4 の発現を確認することが出来た。アストロサイトはシナプス形成や海馬発生にとって重要な役割を担っており、今後この培養系を用いた新規培養技術の開発も期待できる。

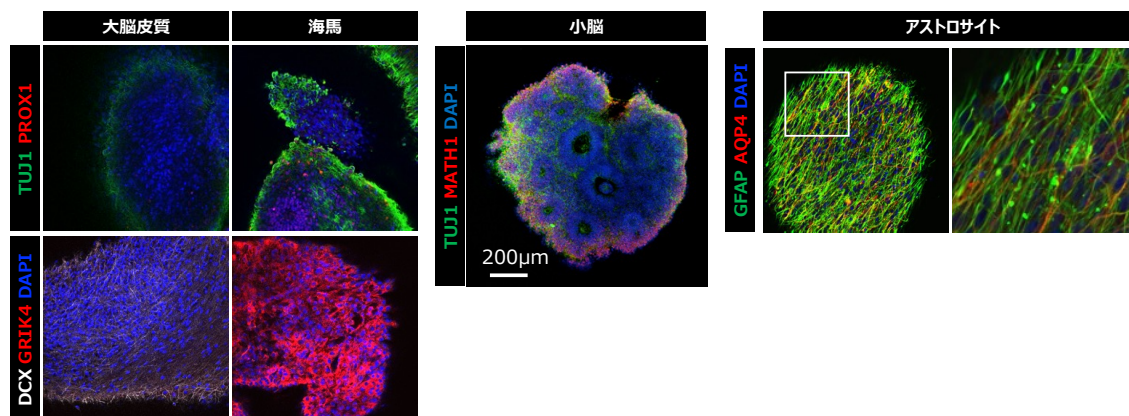


図2 各脳領域オルガノイド及びアストロサイトスフェアへの誘導

(2) 各種神経疾患研究への応用

AD や ASD 様、睡眠障害の原因因子を導入した各種オルガノイドの表現型を検証した。今後これらの神経疾患に関連して開発した技術に関して、知財化を進めていく。

AD と血管疾患（動脈硬化）のリスク因子（高血圧、喫煙、高血糖、加齢など）は重複しており、その関連性が強く指摘されている。また近年、脳オルガノイドに血管を導入する研究も盛んに行われており、神経-血管の相互作用も注目されている。血管を構成する血管平滑筋細胞の分化・脱分化は動脈硬化性疾患の一因となる血管リモデリングの特徴である。その分化・脱分化に糖脂質であるガングリオシドが関わっていることを明らかにし、その制御を担う GM3 合成酵素の発現調整をポリコーム複合体2が担っていることを明らかにした (Front Cell Dev Biol. 2022)。今後、血管構成細胞の細胞表面状態（糖鎖修飾）の神経細胞に与える影響を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Sasaki Norihiko、Hirano Kazumi、Shichi Yuuki、Itakura Yoko、Ishiwata Toshiyuki、Toyoda Masashi	4. 巻 10
2. 論文標題 PRC2-dependent regulation of ganglioside expression during dedifferentiation contributes to the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental 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） 10.3389/fcell.2022.1003349	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 -

〔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
シー ジェニー (Hsieh Jenny)	テキサス大学サンアントニオ校・Department of Neuroscience・Professor	

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		
米国	テキサス大学サンアントニオ校		