

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04458

研究課題名（和文）ヒト脳オルガノイドの成熟化誘導技術と自動解析技術の開発

研究課題名（英文）Development of methods for construction and automated analysis of human brain organoids

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト多能性幹細胞の分化誘導技術（オルガノイド技術）とイメージング・画像解析技術を融合させることで、ヒトの脳組織を人工的に創り出して構造と機能を計測して解析するに至るまでの一連の技術を開発することを目的とした。ヒトES・iPS細胞からの成熟脳オルガノイド作製およびオルガノイドの多次元イメージングと定量的画像解析技術を開発した。本成果は、ヒトの脳に関する実証研究を行うための基盤となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳科学の最終目標の1つは、ヒトの脳を科学的に理解し、その知見を精神・神経疾患やの克服に活用することにあるが、これまでヒト脳に関する研究は、倫理的・技術的な制約を受けてきた。これに対し、本課題で開発した、ES・iPS細胞から脳組織を形成するオルガノイド技術およびその関連技術は、ヒトの脳に関する実証研究を行うための標準プラットフォームの構築に貢献すると期待される。本研究の成果により、研究者がヒトの脳組織を研究材料として自由に使用して解析できる環境が整い、ヒト脳に関する知見が加速度的に増大するものと予想される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop methods for constructing human brain organoids from pluripotent stem cells and analyzing the structure and functions of the organoids. We succeeded in efficient generation of mature brain tissues and development of techniques for multidimensional imaging and image analysis of brain organoids. These achievements will provide a platform for experimental investigation of human brain.

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

ES・iPS 細胞などの多能性幹細胞から自己組織的に多様な組織を形成するオルガノイド技術は、ヒトの脳機能解明、神経疾患の病態解析や創薬開発の有用なツールになると期待されている。しかし、オルガノイド技術が実際にヒト脳の研究に有効に活用されるためには、脳オルガノイドがヒトの脳の構造と機能を忠実に再現できることが必須条件となる。特にアルツハイマー病、脊髄小脳変性症等の遅発性神経疾患の研究に応用するためには、成熟したヒト脳組織の再現が極めて重要となってくる。成熟した広範囲の脳組織を作製する技術を開発することは喫緊の課題である。

一方、オルガノイドは、一般的な 2D 分散培養とは異なり、細胞が密に分布する 3D 構造を取ることから、内部構造をそのまま観察することが難しいという本質的な問題点を抱えている。そこで、作製した 3D 脳オルガノイドの内部構造や活動状態を可視化するイメージング技術が重要となる。さらに、イメージングで得られる大量の 3D 画像、および、時間変化を含めた 4D 画像を客観的かつ定量的に解析する技術が必須となってくる。特に、病態の表現型解析や創薬スクリーニングの際には、健常者と患者由来のオルガノイドをハイスループットで比較解析することが求められる。ところが、オルガノイドが標本ごとに不均一な立体構造をとっていることもあり、多様な標本を統一的に扱えるイメージングと画像解析に関する標準化解析技術が存在しないのが現状である。

### 2. 研究の目的

以上の背景のもとに、本研究では、ヒト多能性幹細胞の分化誘導技術(オルガノイド技術)とイメージング・画像解析技術を融合させることで、ヒトの脳組織を人工的に創り出して構造と機能を計測して解析するに至るまでの一連の技術を開発することを目的とする。これにより、これまで技術的・倫理的に不可能であったヒトの脳に関する実証研究を行うための標準プラットフォームを構築する。具体的項目は、(1)ヒト ES・iPS 細胞からの成熟脳オルガノイド作製、(2)オルガノイドの多次元イメージング、(3)オルガノイドの内部構造・活動状態の定量的自動画像解析の3つである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト ES・iPS 細胞からの成熟脳オルガノイド作製

ヒト ES・iPS 細胞から大脳皮質や小脳などの各組織を分化誘導する SFEBq 法は確立済であるが、妊娠第 2 期前半(12-20 週)相当の組織よりも成熟させることには成功していない。そこでここでは、より成熟した脳組織の作製が可能な技術の開発を行う。

#### (2) オルガノイドの多次元イメージング

オルガノイドは 3D 構造をとることから、静止像の取得には 3D、ライブ動態の計測には時間軸を追加した 3D タイムラプス(4D)イメージング技術が必要となる。また、オルガノイドの内部構造と活動状態を明らかにするためには、神経細胞の形態、神経回路の構造、神経活動の時空間特性等を可視化する必要がある。最適な蛍光プローブを用い細胞および電気活動を計測する技術を開発する。

### (3) オルガノイドの内部構造・活動状態の定量的自動解析

ここでは、上記項目で得られるオルガノイドの 3D・4D 画像を定量的に自動解析する技術を開発する。コンピュータービジョン技術および機械学習技術を導入・改良することで、オルガノイドの構造と機能の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト ES・iPS 細胞からの成熟脳オルガノイド作製

既存の SFEBq 法では、生体脳組織で見られる連続的で大きな神経上皮構造を形成することが難しく、中心に管腔を持つ局所的な神経上皮構造（ロゼット構造）を複数形成することが多く、これがその後の組織の成熟が進まない原因の 1 つである可能性が考えられた。そこで、オルガノイドの形成初期に単一管腔構造を形成するような培養過程を加えたところ、連続した神経上皮構造の形成が効率よく形成され、より生体に近い脳組織が作製できることが明らかとなった。この手法をさらに改良すれば、成熟した組織の作製が可能になると期待できる。

### (2) オルガノイドの多次元イメージング

オルガノイドを細胞種特異的に可視化するために有用な種々の細胞株を作製した。piggyBac トランスポゾン系を用い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。細胞形態の解析用には、Brainbow 法を導入し、オルガノイド内の細胞をマルチカラーでランダム標識し、スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて 3D タイムラプス（4D）イメージングすることに成功した。また、神経活動の時空間特性の可視化のために、カルシウムセンサーを全細胞あるいは特定の細胞種に発現する細胞株を作製して、カルシウムイメージングを実施し、オルガノイドのカルシウム動態を可視化することに成功した。

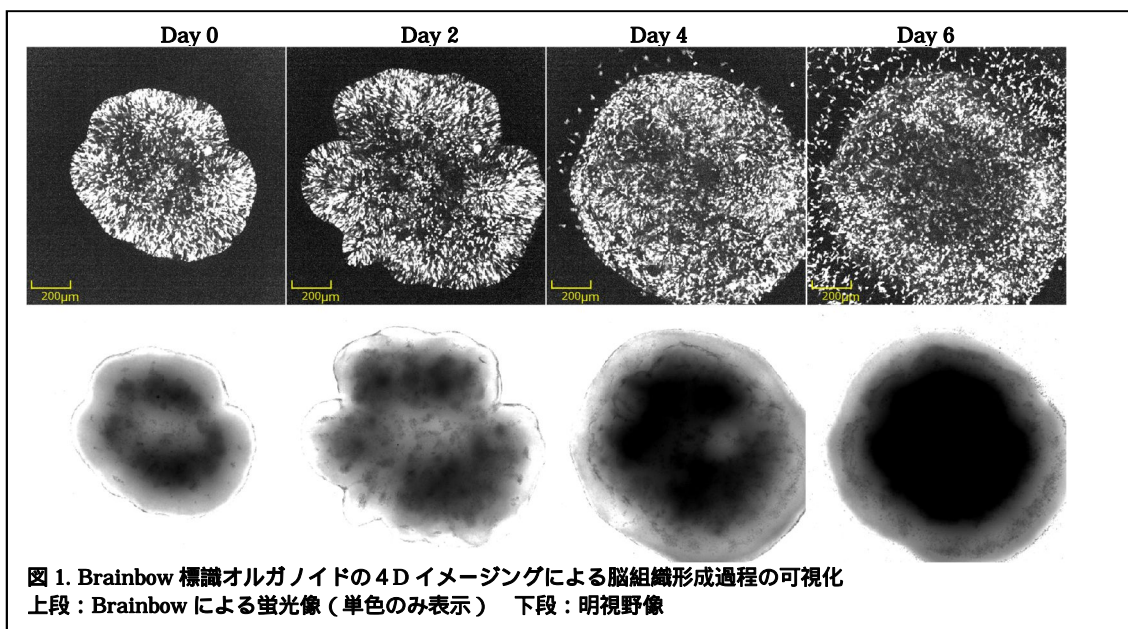


図 1. Brainbow 標識オルガノイドの 4D イメージングによる脳組織形成過程の可視化  
上段：Brainbow による蛍光像（単色のみ表示） 下段：明視野像

### (3) オルガノイドの内部構造・活動状態の定量的自動解析

オルガノイドのイメージングによって得られる 3D・4D 画像を定量的に自動解析する技術の開発に取り組んだ。コンピュータービジョン・機械学習の技術を駆使しながら技術開発を実施した。

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 1件）

1. 著者名 Tamada Atsushi, Watanabe Shoji, Muguruma Keiko	4. 巻 107
2. 論文標題 Investigating developmental and disease mechanisms of the cerebellum with pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103530 ~ 103530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcn.2020.103530	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tamada, A., Muguruma, K.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer, Cham	5. 総ページ数 16
3. 書名 Modeling of Human Cerebellar Development and Diseases with Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Organoids. In: Mizusawa, H., Kakei, S. (eds) Cerebellum as a CNS Hub.	

〔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
---------	---------