

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：19K16263
研究課題名（和文）ヒト脳スフェロイド内のグリア挙動に着目したストレスに起因する発達障害病態の解明

研究課題名（英文）Evaluation of in vitro prenatal stress hormone exposure model using microglia-containing cerebral spheroids.

研究代表者
小高 陽樹（Odaka, Haruki）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40831243
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞から作製され、脳の立体組織構造を有する球状オルガノイド（ヒト脳スフェロイド）がヒト脳の発生モデルとして注目されている。しかし、従来の脳スフェロイドにはミクログリアが含まれておらず、ミクログリアの役割が見過ごされていた。本研究では、ミクログリアを含む大脳スフェロイドを作製し、ストレスホルモンによる神経発生異常をミクログリア動態に着目し解明することを目指した。ミクログリアを添加した大脳スフェロイドでは、ミクログリアが分散して存在し、成熟することが確認された。また、ストレスホルモンの曝露によりミクログリアの活性低下と、神経分化障害が生じることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胎生期におけるミクログリアの発生過程をin vitroで再現することで、ミクログリアを含有する脳スフェロイドの評価系を構築した。また、本系を用いることで、神経発達障害の環境因子として知られる胎生期ストレスホルモン曝露の影響を解析し、ミクログリアの活性および生存が障害され、神経分化が抑制されることを示した。本スフェロイド培養系は、脳内免疫系の異常が関与する様々な神経・精神疾患、発達障害の研究に利用でき、ミクログリアが関与する病態の解明や治療標的の探索、薬剤候補の薬効評価スクリーニングに有用である。

研究成果の概要（英文）：Research has shown that human iPSC-derived cerebral spheroids can serve as an effective model for studying brain development. However, conventional cerebral spheroids lack the presence of microglia, which play a crucial role in brain development. To address this gap, our study focused on generating human cerebral spheroids with microglia and investigating the impact of stress hormones on neurodevelopment, especially focusing on microglial dynamics. Our findings revealed that microglia in cerebral spheroids dispersed and matured as expected. Furthermore, exposure to stress hormones resulted in reduced microglial activity and impaired neuronal differentiation.

研究分野：神経科学 / 幹細胞工学

キーワード：iPS細胞 ミクログリア 脳オルガノイド グルココルチコイド 神経発達障害

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト iPS 細胞から作製した脳の立体組織構造を有する球状オルガノイド (以下ヒト脳スフェロイド) が多数報告されており、ヒト発生の新たなモデル系として注目されている。ヒト脳スフェロイドは、その内部に脳室様の空洞とそれを取り囲む神経幹細胞層と神経細胞層を形成し、特に大脳皮質層の発生過程をよく再現している。また、その層構造体中にヒト固有の神経幹細胞が含まれているなど、ヒト特有の神経発生過程が再現できる点で極めて画期的である (Xuyu et al., Cell. 2016)。精神疾患や神経発達障害が、ヒトの高度な知性と精神活動の上で成立する疾患であることを考えると、ヒト脳スフェロイドによりこうした疾患のモデルを作製・解析することは意義深い。

一方で、既存の手法で作製された脳スフェロイドには、脳内免疫を司るミクログリアが存在しないという重大な欠点がある。ミクログリアは、脳の常在性マクロファージであり、脳内唯一の免疫細胞である。その前駆細胞は卵黄嚢を起源とし、血流を介して発生初期の脳に浸潤・定着しミクログリアへと分化する。こうした発生起源の違いのため、iPS 細胞から脳スフェロイドへの分化誘導過程では、ミクログリアは含まれず、ヒト脳の発生におけるミクログリアの役割は見逃されてきた。しかし、近年の動物脳を使った研究により、ミクログリアが発生初期の神経発生やシナプス動態に重要な生理的役割を持つことが明らかとなり、これらの破綻が神経発達障害の一因となる可能性が注目されている。(Ueno et al., Nat Neurosci. 2013; Paolicelli et al., Science. 2011; Miyamoto et al., Nat Commun. 2016)。そのため、ヒト脳においてこの可能性を検証するためにも、ミクログリアを含有する脳スフェロイドの作製手法の確立が重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本課題では、ヒト iPS 細胞から分化誘導したヒト脳スフェロイドとミクログリアを用いて、ミクログリアを内包する脳スフェロイド (ミクログリア-脳スフェロイド) を作製し、ヒト大脳皮質の発生においてミクログリアの果たす役割を解明する。さらに、神経発生の障害が生じるような病的状況下において、ミクログリアの異常が障害の原因となる可能性を検証する。本課題では、こうした病的状況として特に、グルココルチコイドの胎生曝露を想定する。妊娠中の母体への精神的・身体的ストレスは、子の将来的な精神疾患や発達障害の発症リスクを上昇させるが、これの生物学的要因の一つと考えられているのが、ストレスに応答して血中へ放出されるグルココルチコイドの胎生曝露である。グルココルチコイドは、免疫細胞に対し抗炎症作用を示すことで知られるため、ミクログリアに対しても何らかの作用を示す可能性が高いが、胎生期ミクログリアの生理的機能に対する影響は不明であり、グルココルチコイドによる神経発生障害との関連も検討されていない。そこで、グルココルチコイド曝露によるミクログリア-脳スフェロイドへの影響を解析することで、ストレス誘発性の神経発達障害におけるミクログリア障害の寄与を考察する。

3. 研究の方法

- (1) ヒト iPS 細胞からミクログリア前駆細胞および脳スフェロイドの分化誘導を行い、共培養によりミクログリア-脳スフェロイドを作製する手法を確立する。
- (2) グルココルチコイドの曝露をミクログリア-ヒト脳スフェロイドに対して行う。ミクログリアと神経系細胞に起こる表現型異常を解析する。

4. 研究成果

(1) ミクログリア-脳スフェロイド作製法の確立

上述の通り、ミクログリアは、前駆細胞の状態では発生初期の脳内に浸潤し分化することで脳内に定着する。この発生過程を再現するため、iPS 細胞から分化誘導した造血前駆細胞を脳スフェロイドと共培養することで浸潤させ、スフェロイド中でミクログリアへ分化誘導する系の構築を行った。まず、ヒト iPS 細胞株 (201B7) から STEMdiff Hematopoietic Kit (STEMCELL Technologies) による分化誘導を行い、CD43 陽性の造血前駆細胞を得た。続いて神経系へのパターンニングが完了した初期の脳スフェロイド (Day6) に対して $0.3\text{-}3 \times 10^4$ 個の造血前駆細胞を添加し、ミクログリアへの分化誘導条件下で培養を行った (図 1a)。スフェロイドの脳室様構造形成が完了する Day25 時点において、Myeloid 系細胞のマーカーである CD45 のフローサイトメトリー解析を行ったところ、スフェロイド中の 0.038-0.93% が CD45 陽性細胞であることが確認された (図 1b)。胎児脳のミクログリア含有率はおおむね 1%程度であることから、以降の実験では 3×10^4 個の添加条件で実験を行った。

続いて免疫染色によりミクログリア形態および分布を解析した。Day25 と Day43 のミクログリア-脳スフェロイドに対し、ミクログリアマーカーである IBA1 と神経細胞マーカーである TUJ1 による免疫染色を行った。IBA1 陽性ミクログリアは脳スフェロイドの内部に分散して分布してい

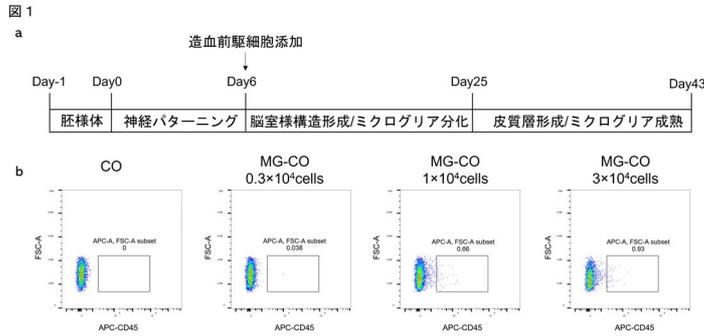


図 1. (a) ミクログリア-脳スフェロイドの分化誘導スキーム (b) Day25 時点での CD45 フローサイトメトリー解析。CO : 通常の脳スフェロイド、MG-CO : ミクログリア-脳スフェロイド

ることが確認された (図 2a)。さらに、Day25 においてミクログリアは球状のアメポイド様形態を示すのに対し、Day43 時点では突起が伸展した形態に変化していた (図 2b)。このことから、ミクログリアの成熟が進行していることが示唆された。さらにミクログリア-脳スフェロイドを特徴付けるために、ミクログリアマーカー、ミクログリア由来分泌因子 (サイトカイン、成長因子)、神経細胞マーカー、シナプスマーカーについて定量 PCR による遺伝子発現解析を行った。ミクログリアマーカーおよびミクログリア由来分泌因子は、通常の脳スフェロイドではほとんど発現しておらず、ミクログリア-脳スフェロイドで特異的な発現が確認された。また Day25 に比べ Day43 のミクログリア-脳スフェロイドでは、恒常性ミクログリアに発現する *P2RY12* は発現が上昇した一方、活性化ミクログリアに発現する遺伝子群は減少しており、Day43 においてミクログリアの成熟が進行していることが裏付けられた。また、神経細胞・シナプスマーカーの発現も Day25 に比べ Day43 で上昇することから、神経発生が本培養系でも正常に進行することが確認された。以上の結果から、ミクログリアと神経発生を評価できる脳スフェロイド系を確立することができた。

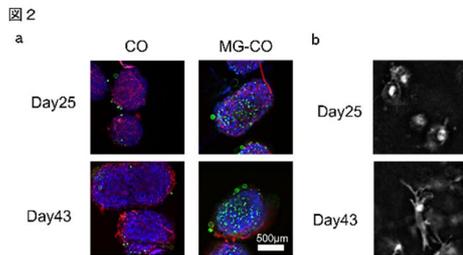


図 2. (a) Day25, 43 のミクログリア-脳スフェロイドの免疫染色。緑 : IBA1、赤 : TUJ1、青 : 細胞核、CO : 通常の脳スフェロイド、MG-CO : ミクログリア-脳スフェロイド (b) MG-CO の IBA1 染色の拡大像。

(2) グルココルチコイド曝露モデルの解析

ミクログリア-脳スフェロイドに対し、合成グルココルチコイドである Dexamethason (DEX) の曝露を行い、ミクログリアと神経分化に与える影響を評価した。グルココルチコイドの受容体である *GR* の発現量を定量 PCR で解析したところ、通常の脳スフェロイドに比べ、ミクログリア-脳スフェロイドでの高発現が認められた。また、DEX 投与によるグルココルチコイド応答遺伝子 *FKBP5* の発現上昇が通常の脳スフェロイドに比べ、ミクログリア-脳スフェロイドでより顕著に上昇することを見出した。さらに DEX 投与の 3 日後と 21 日後にそれぞれ IBA1 (ミクログリア) と TUJ1 (神経細胞) の免疫染色を行い、その数と形態を解析した。DEX 投与 3 日時点では、ミクログリア数や神経細胞に顕著な差は見られなかったのに対し、DEX 投与 21 日後ではミクログリア数の減少と TUJ1 染色性の低下が認められた。興味深いことに、ミクログリアの数や形態に差が見られなかった 3 日時点において、ミクログリア分泌因子の発現量を解析したところ、DEX 投与群で著減していることが分かった。以上の結果は、DEX 曝露が胎生期ミクログリアの分泌活性や生存に大きく影響することを示唆している。また、DEX 曝露により TUJ1 染色性が低下したことから、神経分化の抑制が示唆された。今後、ミクログリア由来分泌因子の減少が DEX による神経の分化障害に関与しているか調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Numakawa Tadahiro, Odaka Haruki	4. 巻 22
2. 論文標題 Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Pathophysiology of Alzheimer 's Disease: Beneficial Effects of Flavonoids for Neuroprotection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5719 ~ 5719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115719	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 Minoshima Fumi, Ozaki Haruka, Odaka Haruki, Tateno Hiroaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Integrated analysis of glycan and RNA in single cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102882 ~ 102882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102882	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 Umamoto Terumasa, Johansson Alban, Ahmad Shah Adil Ishtiyag, Hashimoto Michihiro, Kubota Sho, Kikuchi Kenta, Odaka Haruki, Era Takumi, Kurotaki Daisuke, Sashida Goro, Suda Toshio	4. 巻 41
2. 論文標題 ATP citrate lyase controls hematopoietic stem cell fate and supports bone marrow regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e109463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2021109463	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 Odaka Haruki, Ozaki Haruka, Tateno Hiroaki	4. 巻 3
2. 論文標題 scGR-seq: Integrated analysis of glycan and RNA in single cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101179 ~ 101179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101179	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 Odaka Haruki, Hiemori Keiko, Shimoda Asako, Akiyoshi Kazunari, Tateno Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 CD63-positive extracellular vesicles are potential diagnostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-022-02228-7	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 Odaka Haruki, Hiemori Keiko, Shimoda Asako, Akiyoshi Kazunari, Tateno Hiroaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Platelet derived extracellular vesicles are increased in sera of Alzheimer's disease patients, as revealed by Tim4 based assays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 741 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13068	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 Odaka Haruki, Numakawa Tadahiro, Soga Minami, Kido Jun, Matsumoto Shiro, Kajihara Ryutaro, Okumiya Toshika, Tani Naoki, Tanoue Yuki, Fukuda Takaichi, Furuya Hirokazu, Inoue Takafumi, Era Takumi	4. 巻 152
2. 論文標題 An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca2+ dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105279 ~ 105279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105279	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 Kajihara Ryutaro, Numakawa Tadahiro, Odaka Haruki, Yaginuma Yuji, Fusaki Noemi, Okumiya Toshika, Furuya Hirokazu, Inui Seiji, Era Takumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel Drug Candidates Improve Ganglioside Accumulation and Neural Dysfunction in GM1 Gangliosidosis Models with Autophagy Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 909 ~ 923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.03.012	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 -

1. 著者名 Kozo Matsushita, Tadahiro Numakawa, Haruki Odaka, Ryutaro Kajihara, Minami Soga, Shiro Ozasa, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mizuta, Takumi Era	4. 巻 414
2. 論文標題 Presynaptic Dysfunction in Neurons Derived from Tay-Sachs iPSCs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 128-140
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 -

1. 著者名 Odaka Haruki, Tateno Hiroaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Single Cell Glycan and RNA Sequencing (scGR seq)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Protocols	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) 10.1002/cpz1.777	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 Odaka Haruki	4. 巻 34
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR/Cas9 Screening Identifies KDM2B as a Modifier of Heparan Sulfate?Protein Interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E63 ~ E63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2203.6E	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 Numakawa Tadahiro, Odaka Haruki	4. 巻 23
2. 論文標題 The Role of Neurotrophin Signaling in Age-Related Cognitive Decline and Cognitive Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7726 ~ 7726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147726	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小高 陽樹
2. 発表標題 1 細胞糖鎖-RNA同時プロファイリング技術 (scGR-seq) の開発 (Simultaneous profiling of glycan and RNA in single cells)
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小高 陽樹
2. 発表標題 個々の細胞の糖鎖とRNAを同時解析する技術(scGR-seq)の開発
3. 学会等名 第40回 日本糖質学会年会（鹿児島）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小高 陽樹
2. 発表標題 ミクログリア含有ヒト大脳オルガノイドによる胎生期ストレスホルモン曝露モデルの解析
3. 学会等名 第 22 回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ミクログリア含有大脳オルガノイドの作製方法	発明者 小高 陽樹、館野 浩章	権利者 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2023-023418	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------