

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06202・19K21306

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞からの中脳オルガノイド作製手法の確立

研究課題名（英文）Induction of midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells

研究代表者

七浦 仁紀（NANAURA, HITOKI）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：00827909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト多能性幹細胞から、ヒト脳と類似した構造を持つ臓器様組織（脳オルガノイド）の樹立法が報告され、パーキンソン病を含めた中枢神経疾患の研究に有用と考えられている。本研究は、中脳を模した脳オルガノイドを短期間で作製することを目的とした。免疫染色や定量的PCRなどの手法により、ドパミン作動性神経細胞のマーカーの発現を確認し、中脳成分を含んだ脳オルガノイドの作製法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのヒト脳オルガノイド樹立プロトコルは、大脳皮質構造の再現を目的とするものが多く、中脳など脳幹部の構造を再現可能な手法は限られていた。本研究により、中脳を含めた脳幹部を模倣した脳オルガノイドを短期間で作製する手法を確立した。今後本手法は、パーキンソン病を含めた中枢神経疾患の病因解明や、治療薬剤のスクリーニングなどに有用なモデルとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Brain organoids derived from human pluripotent stem cells recapitulate the course of human brain development, and they seem to be useful for medical research on central nervous system disorders such as Parkinson disease. There are few reports of brain organoids mimicking the structure of midbrain. In this study, we aim to develop a new method to induce midbrain-like organoids.

Brain organoids were generated at one month, and immunohistochemistry and quantitative polymerase chain reaction confirmed the gene expression of dopaminergic neurons, such as tyrosin hydroxylase. RNA-seq analysis also revealed that the brain organoids contained cell populations like that of a human brainstem. Therefore, our brain organoids might be a useful model of the brainstem.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：脳オルガノイド 神経細胞 ドパミン 中脳 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病をはじめとする中枢神経疾患は、神経変性の機序に未解明な点が多く、病態解明および治療法開発が望まれている。しかし、ヒト生体の脳を用いて侵襲的な研究を行うことは倫理面から不可能であり、これまで分子メカニズムの詳細な検討が困難であった。近年、培養条件下でヒト多能性幹細胞から、ヒト脳と類似した構造を持つ臓器様組織(脳オルガノイド)の樹立が報告され、中枢神経疾患研究への有用性が期待されている。

これまでに報告されているヒト脳オルガノイド樹立プロトコルの多くは、主に大脳皮質の構造を再現することを目的としており、パーキンソン病においてドパミン作動性神経細胞が脱落する中脳黒質などの脳幹部構造を再現可能な手法は限られていた。Huck-Hui Ng らが中脳黒質様の細胞を含んだオルガノイドの誘導法を報告 [Cell Stem Cell 2016] しているが、この手法では数ヶ月という長期間の培養を要するため、基礎研究の進展や臨床への応用には大きな問題があった。

2. 研究の目的

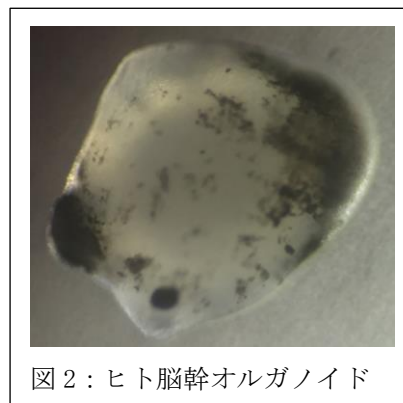
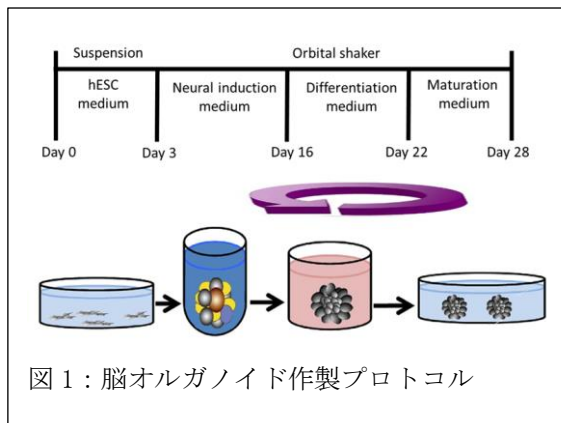
上記のような背景から、中枢神経疾患の病態メカニズム解明や再生医療に応用できるような、ドパミン作動性神経細胞を有するヒト中脳オルガノイドを短期間で作製する手法の確立を目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

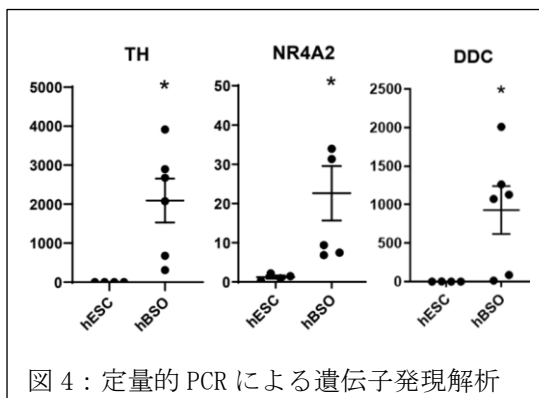
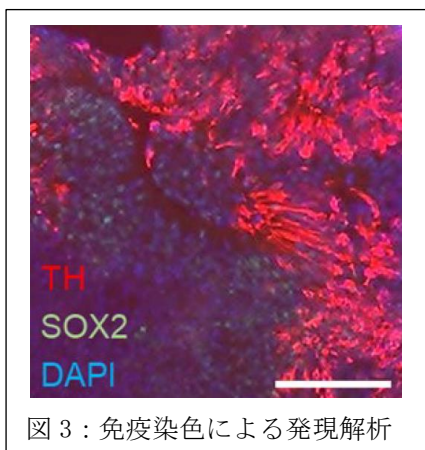
ヒト多能性幹細胞からヒト脳オルガノイドを分化誘導した後、定量的 PCR や免疫染色によるドパミン作動性神経細胞の発現解析、Fontana-Masson 染色による組織評価、電気生理学的解析、RNA シークエンス法による遺伝子発現解析などを行い、中脳成分を含んだ脳オルガノイド培養法の確立を試みる。

4. 研究成果

ヒト多能性幹細胞を、種々の growth factor を加えた Neural induction medium で分化誘導し、シェイカー上で1カ月間培養(図1)を行うことで、黒色細胞を含んだヒト脳オルガノイドを得た(図2)。



黒色細胞を含む脳オルガノイドについて、免疫組織学的評価を行い、中脳に存在するドパミン作動性神経細胞のマーカーである FOXA2 (Forkhead box protein A2) や、TH (tyrosin hydroxylase) などの発現を確認した(図3)。



また黒色細胞を含む脳オルガノイドについて、定量的 PCR による遺伝子発現解析を行い、ドパミン作動性神経細胞のマーカである TH(thyrosin hydroxylase) や NR4A2(Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2)、DDC(DOPA decarboxylase)などの発現を確認した(図4)。

脳オルガノイド内部の黒色素に関しては、hematoxylin-eosin 染色、Fontana-Masson 染色を行い、melanocyteであることを確認した(図5)。

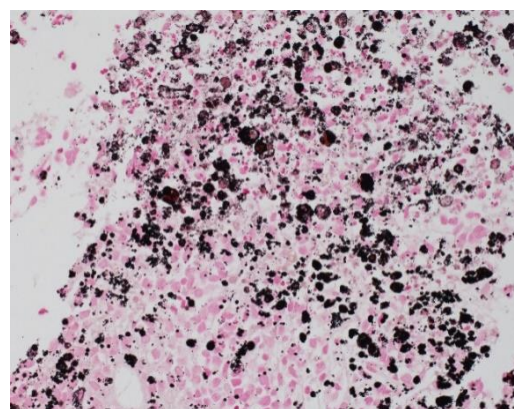


図5: Fontana-Masson 染色による評価

ホールセルパッチクランプ法を用いた解析では、脳オルガノイド内の神経細胞の電気生理学的活動が確認できた。RNA シークエンス法による解析では、ヒト胎児中脳に特徴的な LMX1B(LIM Homeobox Transcription Factor 1 Beta)の発現や、EN1(Engrailed Homeobox 1)の発現が確認できた。

また免疫組織学的評価にて、オルガノイド内部にコリン作動性神経細胞のマーカである ChAT(choline acetyltransferase)の発現を確認した(図6)。定量的 PCR でも同様に脳オルガノイドで ChAT の有意な遺伝子発現を確認した。またノルアドレナリン作動性神経のマーカである DBH(Dopamine β -hydroxylase)についても、免疫染色で脳オルガノイド内での発現を確認できた(図6)。これらの神経細胞は、延髄や橋といった脳幹に存在していることから、この脳オルガノイドは中脳だけでなく延髄や橋など脳幹の構成成分も含んでいると考えられた。

以上の解析結果から、中脳成分を含んだ脳オルガノイドを短期間で作製する手法が確立できた。これにより、既存の手法と比較して脳オルガノイド作製期間を大幅に短縮することができるようになり、基礎研究の進展や再生医療への応用といった領域に寄与することが期待される。

今後、中脳を含めた脳幹部を障害する中枢神経疾患の背景にある病態メカニズムの解析や、治療候補薬のスクリーニングといった目的で、本手法が有用となると考えられる。

本研究内容は、査読付きの国際学術誌(Frontiers in Neuroscience)に投稿し、受理された。(Brainstem organoids from human pluripotent stem cells)。

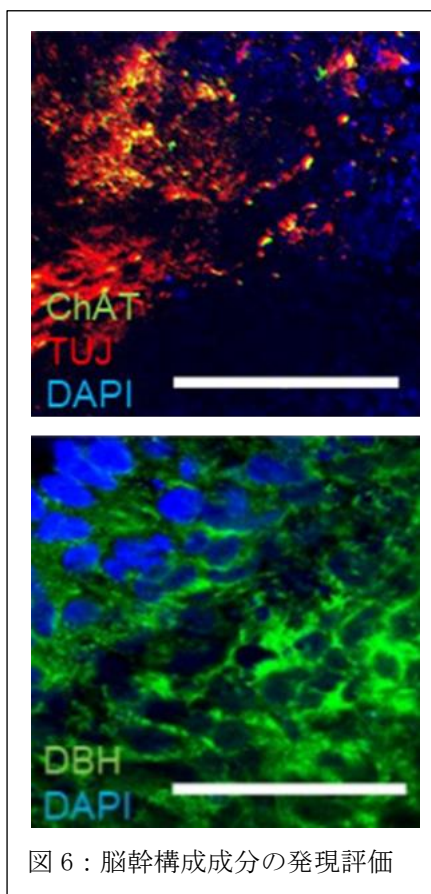


図6: 脳幹構成成分の発現評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Joachim Luginbuhl, Masaya Matsubayashi, Hitoki Nanaura et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Brainstem organoids from human pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	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） 10.3389/fnins.2020.00538	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 Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Aiba Y, Wiriyasermkul P, Kikuchi S, Nagata R, Matsubayashi M, Nagamori S, Shoji O, Ishimori K, Matsumura H, Sugie K, Saio T*, Yoshizawa T, Mori E	4. 巻 -
2. 論文標題 Toxic PR poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion target Kap 2 and dysregulate phase separation of low-complexity domains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/812099	査読の有無 無
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 Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Sahara Y, Nanaura H, Kikuchi S, Ashari A, Bui L, Kobashigawa S, Nakanishi M, Nagata R, Matsui TK, Kashino G, Hasegawa M, Takasawa S, Eriguchi M, Tsuruya K, Nagamori S, Sugie K, Nakagawa T, Takasato M, Umetani M, Mori E	4. 巻 -
2. 論文標題 Human URAT1/SLC22A12 gene promoter is regulated by 27-hydroxycholesterol through estrogen response elements.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/827709	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi K. Matsui, Nobuyuki Eura, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Yasuhiko Saitoh, Kazuma Sugie, Eiichiro Mori
2. 発表標題 Induction of electrophysiologically-active brain organoids showing human midbrain-specific structure
3. 学会等名 Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七浦仁紀、松井健、塩田智、江浦信之、森英一朗、杉江和馬
2. 発表標題 Rapid induction of midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells
3. 学会等名 第60回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井健、江浦信之、七浦仁紀、塩田智、森英一朗、杉江和馬
2. 発表標題 Human cerebral organoids recapitulate brain formation and genetic developmental disorders
3. 学会等名 第60回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019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
研究協力者	杉江 和馬 (SUGIE KAZUMA)		
研究協力者	松井 健 (MATSUI TAKESHI)		