

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22983

研究課題名（和文）複合オルガノイドによるヒト脳領域間ネットワークの形成

研究課題名（英文）Investigation of human brain function with organoid network

研究代表者

六車 恵子（MUGURUMA, Keiko）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞から3次元立体脳組織を自己組織的に分化誘導できるオルガノイド技術を基盤として、ヒト脳の領域間ネットワークを培養下で構築することに挑戦した。この再現系を、ヒト脳機能の理解・精神・神経疾患の病態解明のためのin vitroモデルとして展開することに成功した。世界的にも複数存在する既報のオルガノイド技術はいずれも組織構築の再現がヒト胎生期の20週齢前後に留まり、発生や機能解析を実施するには未だ十分ではない。既存技術の改良とともに、共培養系を駆使することによる機能解析技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞の分化誘導技術（オルガノイド技術）を革新して、ヒトの脳神経ネットワークを人工的に創り出し、構造と機能を計測して解析するまでの一連の技術開発は、人の脳に関する実証実験を行うための標準プラットフォームを構築することが可能になる。様々な分野の研究者が研究材料として解析できる環境が整い、分子・細胞・組織・器官の各レベルにおいて実験動物研究と同等の実証実験を自由に行うことができようになり、ヒト脳に関する科学的知見が加速度的に増大すると予想される。また、精神・神経疾患等の克服に関して重要な寄与をすることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：The project aims to develop standardized methods for analyzing the formation, degeneration and restoration of human brain tissues. Combining 3D brain organoid cultures of human pluripotent stem cells, 4D imaging and image analysis, we established efficient methods to faithfully recapitulate and to quantitatively analyze the ontogenetic formation of human brain tissues. We induced degeneration of the formed tissues to construct human neurological disease models. We performed experiments on the development of methods for (1) maturation of brain organoids, (2) network formation of brain organoids, and (3) method development of anatomical and functional evaluation of network formation.

研究分野：神経発生学、幹細胞生物学

キーワード：神経発生 神経ネットワーク オルガノイド iPS細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経科学の目標の1つは、ヒトの脳の発生・構造・機能を科学的に理解し、その知見を精神・神経疾患や神経損傷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、非侵襲法や剖検脳や株細胞を用いる手法に限られてきた。これに対し、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞の作製と、これら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の急速な発展は、技術的・倫理的に困難であったヒト脳に関する実証研究を、ミクロレベルからマクロレベル、発生期から発達期を経て成熟後に至る様々な時空間スケールで行うことを可能としつつある。これまで研究代表者は、脳オルガノイド技術の開発に従事し、小脳、大脳皮質を含む様々な領域の脳組織を構築する技術を開発した (Muguruma, *Keystone Symposia* 2018; Muguruma, *Cerebellum*, 2018; Eguchi et al., *BBRC*, 2018; Shiraishi et al., *Development*, 2017; Muguruma et al., *Cell Rep*, 2015; Muguruma et al., *Nat Neurosci*, 2010)。さらに、これらの技術を神経疾患由来 iPS 細胞に応用し、脊髄小脳変性症のヒト病態モデルの構築に成功した (Ishida et al., *Cell Rep*, 2017; Morino et al., *Mol Brain*, 2015)。オルガノイド技術はヒトの脳機能の解明、および、疾患の病態解析や創薬開発のための有用なツールになると期待されている。

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。国内外においてオルガノイド技術は盛んに開発・改良が進められてきているが、今のところ、研究代表者を含めてどの研究グループもオルガノイドをヒト胎生期の 12-20 週相当の組織以上に成熟させることには成功していない。また、個々のオルガノイド系で再現できるのは脳全体の組織ではなく、大脳や小脳といった限られた領域の組織である。「ミニブレイン」と呼ばれる脳全体を作製する手法が海外のグループから報告されているが、そこで形成される各々の領域は未熟で秩序だった組織構造を形成するには至らない。

このような状況において、時間的・空間的な限界を突破して、より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世界的に喫緊の課題である。一連の既存技術を改良して個々の成熟組織を作製し、これらを複合的に組み合わせれば、機能系を構成する神経回路ネットワークを形成できるのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト iPS 細胞から 3D 脳組織を自己組織的に分化誘導するオルガノイド技術を革新して、ヒト脳の領域間機能ネットワークを培養下で構築することに挑戦する。再現系をヒトの脳機能の理解、精神・神経疾患の病態解明に役立てる。研究代表者は、世界に先駆けて報告されたオルガノイド技術である SFEBq 法の開発に従事し、これをヒト iPS 細胞に適用することで様々な脳領域の組織の再現に成功してきた。しかし、現有の技術ではヒト胎生期 12-20 週齢までの再現に留まっており、脳の本質的特徴である、情報処理系としての脳領域間機能ネットワークの構築には成功していない。そこで本研究では、既存のオルガノイド技術の限界を突破して、時空間的に成熟した神経回路網を形成させるための方法を確立することを目指す。具体的には、神経細胞だけでなく非神経細胞も含む複雑系オルガノイドを作製することで妊娠後期以降への成熟を図るとともに、個別に作製した異なる脳領域の組織を共培養して複合オルガノイドを形成することで、脳領域間を結ぶ解剖学的・機能的神経ネットワークを形成させる。視覚系・運動系・大脳小脳連関係の3つの機能系を再現することを目的とする。

3. 研究の方法

研究項目として、(1) 複雑なオルガノイドによる脳組織の成熟化、(2) オルガノイドの共培養による脳領域間神経ネットワークの形成、(3) 解剖学的・機能的神経ネットワークの評価・解析の3つに分ける。

(1) 既存のオルガノイド作製技術は神経細胞の分化を主体とした SFEBq 法をベースとしており、非神経細胞の分化には不向きである。そこで、別途アストロサイト・オリゴデンドロサイト・ミクログリア・血管内皮細胞等を誘導し、これと SFEBq 法で得た神経細胞主体の凝集塊を混合して複雑系オルガノイドを形成し、より生体脳組織の細胞構成に近づけることで、より成熟した組織を構築する。

(2) 既存手法あるいは項目(1)の複雑系オルガノイド技術を用いて、個々の脳領域に相当する組織を個別に分化誘導した後、複数の組織を共培養し、複合型オルガノイドを構成する。視覚系(網膜 視床外側膝状体 大脳皮質視覚野)、運動系(大脳皮質運動野 脊髄 骨格筋)、大脳小脳関連ループ系の3つを目指す。

(3) 項目(2)の共培養系において神経ネットワークがどの程度形成されているのかについて評価・解析する。解剖学的な神経回路形成の評価には最新の各種イメージング技術を駆使する。細胞を蛍光色素あるいは蛍光遺伝子導入により標識しておき、蛍光顕微鏡により画像を取得する。また、細胞種特異的なプロモーターで特定の細胞種の標識、あるいは、ランダムな多色蛍光標識(Brainbow 等)で細胞を識別する。機能的ネットワークの解析には、カルシウム動態の光学計測を用いる。得られた解剖・機能データを解析しネットワーク形成の評価を行い、項目(1)(2)の研究にフィードバックする。

4. 研究成果

非神経細胞のアセンブルによる複雑系脳オルガノイドの形成は、SFEBq 法を基本とした既存技術により iPS 細胞から大脳または小脳オルガノイドを作製し、これにそれぞれ個別に誘導したアストロサイト、ミクログリア、神経堤由来細胞などをアセンブルする培養系の開発を進めた。大脳小脳関連ループとして大脳-小脳オルガノイド、視覚系として網膜-大脳オルガノイドの共培養系を作製し、領域間での神経軸索投射を確認した。中継核である視床の分化誘導法開発と、運動系の共培養系開発を進めた。運動系については、オルガノイドでの再現は未達であるが、マスター遺伝子導入による direct conversion 法で分化した骨格筋細胞と運動神経細胞との共培養を進め、ALS や脊髄小脳変性症特異的 iPS 細胞での表現型解析に応用可能であることを確認した。脳オルガノイドの機能解析のため、Ca センサータンパクをコードする jGCaMP7f を導入した iPS 細胞株を作製し、タイムラプス解析が可能であることを確認した。また、Brainbow を導入した iPS 細胞株の作製により、細胞個別の形態解析を可能とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3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 -

1. 著者名 Kamata Kazuma, Otsuka Yuki, Imamura Keiko, Oishi Akio, Kondo Takayuki, Suga Mika, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Sagara Yukako, Tsukita Kayko, Yasukawa Tsutomu, Usui Hideaki, Muguruma Keiko, Tsujikawa Akitaka, Inoue Haruhisa	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi004-A, derived from a patient with age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101787 ~ 101787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.101787	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 Kamata Kazuma, Otsuka Yuki, Imamura Keiko, Oishi Akio, Kondo Takayuki, Suga Mika, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Sagara Yukako, Tsukita Kayko, Yasukawa Tsutomu, Usui Hideaki, Muguruma Keiko, Tsujikawa Akitaka, Inoue Haruhisa	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi005-A, derived from a Best disease patient with BEST1 mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101782 ~ 101782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.101782	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 iPS細胞を用いた神経疾患研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 iPS細胞を用いた基礎研究
3. 学会等名 第50回日本臨床神経生理学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 六車恵子
2. 発表標題 多能性幹細胞の試験管内神経分化：あらたな可能性と今後の課題
3. 学会等名 日本薬学会 東海支部 特別講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 六車恵子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 372
3. 書名 決定版 オルガノイド実験スタンダード「II-7. 小脳オルガノイドの作製とプルキンエ細胞への誘導	

1. 著者名 Tamada A and Muguruma K	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 不明
3. 書名 Modeling of human cerebellar development and diseases with pluripotent stem cell-derived brain organoids. in 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------