

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21476

研究課題名(和文)脳ゲノム編集および幹細胞由来オルガノイド融合による霊長類精神疾患モデルの創出

研究課題名(英文)Development of psychiatric disorder models using marmoset embryonic stem cells

研究代表者

小坂田 文隆(Osakada, Fumitaka)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授

研究者番号：60455334

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)：近年のゲノム解析技術により、自閉スペクトラム症を初めとする神経発達障害の発症に関連する遺伝子変異や染色体異常が同定された。しかし、見出されたゲノム変異により生じる病態の解明には至っていない。そこで本研究では、神経発達障害の病態発症機序となる分子・神経回路異常を明らかにする目的で、霊長類のマーマセットを用いてin vitroの病態モデルを作製した。マーマセット胚性幹細胞(ES細胞)にノックインあるいはノックアウトしたES細胞株を樹立した。それらES細胞株から異なる脳領域のオルガノイドを誘導し、それらオルガノイドを融合し領野間相互作用を再構築し、構造及び機能を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マーマセットES細胞に関わる技術を独自に構築し、霊長類脳の解析をin vitroで実施できることを示した。中枢神経系治療薬の開発成功率を向上させるために、ヒトと齧歯類をつなぐモデルとして非ヒト霊長類を薬効評価に用いる流れがある。しかし、倫理的な理由から非ヒト霊長類の個体を用いた実験には制限がある。さらに、個体を用いた解析のみでは侵襲的な実験が難しいため、分子・細胞レベルでのメカニズム解析には限界がある。本研究で構築したマーマセット脳オルガノイドは、それらの問題点を克服することができると期待される。以上より本研究は、科学的意義に加えて、医学・薬学的意義も極めて高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent genome analyses have identified genetic mutations and chromosomal abnormalities associated with the development of neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorders. However, the pathophysiology caused by these genomic abnormalities has not been elucidated. In the present study, we created an in vitro pathological model using the primate marmosets to reveal the molecular and neural circuit mechanisms of neurodevelopmental disorder pathogenesis. We generated marmoset embryonic stem cell lines that were knocked-in or knocked-out of disease-causing genes or locus. We differentiated these ES cell lines toward organoids with different brain region characteristics, fused these organoids to reconstruct interregional interactions in vitro, and evaluated their structure and function.

研究分野：薬理学

キーワード：マーマセット 胚性幹細胞 オルガノイド アッセンブロイド 精神疾患 発達障害 ゲノム編集 イメージング

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。

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症を初めとする神経発達障害の発症において、遺伝的要因が強く影響することが疫学的に示されてきた。近年のゲノム解析技術により、精神障害の発症に関連する遺伝子変異や染色体異常が同定された。しかし、見出されたゲノム変異により生じる病態の解明には至っていない。今後、精神障害に対する治療法・診断法開発や創薬へと繋げるためには、分子病態および神経回路異常の解明が喫緊の課題である。また、病態の理解や治療法の開発のためには、よりヒトに近い脳機能や構造を有する霊長類を用いて、病態を模したモデルを作製し検証することが重要である。*in vitro* 病態モデルを作製することができれば、詳細な分子生物学的解析や生化学的解析や創薬スクリーニングに繋がると期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、神経発達障害の病態形成に繋がる分子・神経回路異常を霊長類にて明らかにするために、多能性幹細胞である胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて霊長類脳の構造と機能を *in vitro* で再構築し、*in vitro* 病態モデルを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

マーモセット ES 細胞は、マイトマイシン C で処置した線維芽細胞をフィーダーとして未分化維持を行った。未分化マーモセット ES 細胞からオルガノイドを誘導するために、ES 細胞を単一細胞に解離させ、非吸着性の 96 穴 V ボトムプレートに播種し、凝集体を形成させた。脳発生に必要な分化誘導因子として低分子化合物あるいは組み換えタンパク質を様々なタイミングで分化誘導培地に添加した。ゲノム標的配列に蛍光タンパク質や機能性タンパク質をノックインする、あるいは疾患関連遺伝子をノックアウトするために、ゲノム編集技術として CRISPR/Cas9 システムを用いた。オルガノイドの分化細胞特性を評価するために、転写因子などの分化マーカーの mRNA を qPCR により定量した。オルガノイドの組織構築を明らかにするために、オルガノイドを固定し、凍結切片を作製し、特異的な抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。オルガノイドの機能解析するために、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) あるいはレンチウイルスベクターを用いてカルシウム感受性緑色蛍光タンパク質である GCaMP を導入し、2 光子顕微鏡を用いて 920 nm にてライブイメージングを行った。

4. 研究成果

本研究では、まず異なる脳領域の神経細胞を得るために、マーモセット胚性幹細胞 (ES 細胞) から脳領域特異的なオルガノイドを誘導する分化条件を検討した。マーモセット ES 細胞から大脳皮質オルガノイドを誘導するために、ES 細胞から外胚葉への誘導するための浮遊培養条件を最適化した。マーモセット ES 細胞からオルガノイドを単一細胞に解離させ、非吸着性の 96 穴 V ボトムプレートに播種し、凝集体を形成させた。分化誘導に使用する細胞数、培地の種類、成分、発生に必要なシグナルの種類、それらの添加タイミングについて検討した。qPCR 解析により、神経分化の指標である Sox1 などの発現、さらには大脳皮質への分化誘導の指標である FoxG1, Pax6, β III-tubulin などの発現が認められた。さらに、オルガノイドの組織解析の結果、ロゼッタ構造の形成、層構造や極性構造の形成が認められた。

興奮性ニューロンは大脳皮質の背側にて産生されるが、抑制性ニューロンは medial ganglionic eminence (MGE) 領域にて産生され、tangential migration により大脳皮質へ移動することで、大脳皮質の神経回路に組み込まれることが神経発生学的な研究により明らかになっている。そこで、マーモセット ES 細胞から MGE 領域のオルガノイドの誘導を試みた。さらに、大脳皮質は視床と相互に投射を形成することで、感覚情報処理や知覚・認知などの機能を司る。そこで、マーモセット ES 細胞から視床オルガノイドの誘導も試みた。大脳皮質オルガノイドと同様に、マーモセット ES 細胞からオルガノイドを単一細胞に解離させ、非吸着性の 96 穴 V ボトムプレートに播種し、凝集体を形成させた。分化誘導に使用する細胞数、培地の種類、成分、発生に必要なシグナルの種類、それらの添加タイミングについて検討した。qPCR 解析および免疫染色解析を通じて、MGE オルガノイドおよび視床オルガノイドの誘導条件を最適化した。

次いで、マーモセットゲノムの特定の遺伝子座に外来遺伝子をノックインする、あるいは標的遺伝子をノックアウトするために、マーモセット ES 細胞に CRISPR/Cas9 システムを適用した。マーモセットゲノム上の AAVS1 領域と呼ばれる遺伝子座に、蛍光タンパク質である EYFP と mCherry をそれぞれノックインした ES 細胞株を樹立するために、それぞれのドナーベクターを作製し、AAVS1 領域に特異的な gRNA を設計した。マーモセット ES 細胞にトランスフェクションした後に、複数クローンを取得した。各クローンのゲノムを抽出し、genotyping により選別し、樹立したノックイン ES 細胞株の未分化能および分化能を検証することで、ノックインした

マーモセット ES 細胞株を樹立した。病態モデルを作製するために、同様に CRISPR-Cas9 システムを用いて、疾患関連遺伝子に変異を導入したマーモセット ES 細胞株を樹立した。

誘導されたマーモセット神経細胞の機能を明らかにするために、まずは分散培養あるいはオルガノイド培養に適したイメージングチャンバーを構築した。オルガノイドから分散培養したニューロン、さらにはオルガノイドから 2 光子顕微鏡で GCaMP を用いたカルシウムライブイメージングを行い、神経活動を観察した。Matlab を用いた独自の解析アルゴリズムを構築し、神経活動の解析を行った。次いで、脳の領域間相互作用を *in vitro* で再構成するために、マーモセット ES 細胞から異なる脳領域のオルガノイドを誘導し、それらを融合させた。形成させた融合オルガノイドは上記の qPCR や免疫染色、イメージングなどにより構造および機能を詳細に評価した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ye K, Takemoto Y, Ito A, Onda M, Morimoto N, Mandai M, Takahashi M, Kato R, Osakada F	4. 巻 10
2. 論文標題 Reproducible production and image-based quality evaluation of retinal pigment epithelium sheets from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 14387-14401
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 Okigawa S, Yamaguchi M, Ito KN, Takeuchi RF, Morimoto N, Osakada F	4. 巻 529
2. 論文標題 Cell type- and layer-specific convergence in core and shell neurons of the dorsal lateral geniculate nucleus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Comp Neurol	6. 最初と最後の頁 2099-2124
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 Onda M, Takeuchi RF, Isobe K, Suzuki T, Masaki Y, Morimoto N, Osakada F	4. 巻 -
2. 論文標題 Temporally multiplexed dual-plane imaging of neural activity with four-dimensional precision	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Res	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） なし	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 Ito A, Ye K, Onda M, Morimoto N, Osakada F	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficient and robust induction of retinal pigment epithelium cells by tankyrase inhibition regardless of the differentiation propensity of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	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） なし	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 Masaki Yuji, Yamaguchi Masahiro, Takeuchi Ryosuke F., Osakada Fumitaka	4. 巻 178
2. 論文標題 Monosynaptic rabies virus tracing from projection-targeted single neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 20 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.01.007	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 Ito Kei N., Isobe Keisuke, Osakada Fumitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Fast z-focus controlling and multiplexing strategies for multiplane two-photon imaging of neural dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	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) 10.1016/j.neures.2022.03.007	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 山口真広, 小坂田文隆	4. 巻 なし
2. 論文標題 G欠損狂犬病ウイルスベクター	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学別冊 決定版 ウイルスベクターによる遺伝子導入実験ガイド	6. 最初と最後の頁 57-72
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 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 Masahiro Yamaguchi, Moe Iwata, Riki Kamaguchi, Fumitaka Osakada	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation and Application of Engineered Rabies Viral Vectors for Neural Circuit Research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NeuroMethods	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) なし	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本 菜央、恩田 将成、石田 彩乃、竹内 遼介、磯部 圭佑、上川内 あづさ、小坂田文隆
2. 発表標題 セロトニン作動性ニューロンがショウジョウバエ聴覚応答の行動時間を調節する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小坂田文隆
2. 発表標題 神経回路の構造と機能を明らかにするウイルス遺伝子工学とイメージング技術
3. 学会等名 視覚科学フォーラム2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田萌，入江崇，川端涼子，鈴木俊章，森本菜央，坂口剛正，中西真人，小坂田文隆
2. 発表標題 神経回路の相互作用解析を可能にする新規ウイルスベクターの開発
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小坂田文隆
2. 発表標題 神経回路を標識する狂犬病ウイルスベクターの開発とその応用
3. 学会等名 東京大学医学部機能生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖川沙由美、小坂田文隆
2. 発表標題 Multimodal integration in the core region of the dorsal lateral geniculate nucleus revealed by the monosynaptic rabies virus tracing
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小坂田文隆
2. 発表標題 感覚運動誤差の脳内表現
3. 学会等名 若手新分野創成ワークショップ「脳を知り、疾患を理解する」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小坂田文隆
2. 発表標題 視覚-運動連関を担う神経回路メカニズム
3. 学会等名 第30回神経行動薬理学若手研究者の集い(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺知輝、原大樹、森本菜央、小坂田文隆
2. 発表標題 Generation of Cortical Organoids with Axial Polarity from Marmoset Embryonic Stem Cells
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村優利、森本菜央、小坂田文隆
2. 発表標題 Toward the generation of thalamic organoids from human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 釜口 力, 大月 祥子, 山口 真広, 田村 朋則, 森本 菜央, 浜地 格, 小坂田文隆
2. 発表標題 非遺伝子改変動物における細胞種特異的なウイルス感染法の開発
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2021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

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