

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20501

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来中脳皮質経路の構築と作動原理の理解

研究課題名（英文）Construction of an iPSC cell-derived mesocortical circuit in vitro

研究代表者

周 小余 (Chow, Siu Yu)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：90966590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、iPS細胞由来の中脳オルガノイドと大脳オルガノイドをマイクロ流体デバイス内で連結し、中脳皮質回路モデル組織を構築した。オルガノイドからの軸索はチャンネル内で伸び、2つのオルガノイドを接続する軸索束を形成する。分化は免疫染色によって確認した。マルチ電極アレイ（MEA）を使用して、大脳および中脳オルガノイドの活動を比較したところ、スパイクの数が同程度であるにもかかわらず、バーストの頻度などが異なるパターンを示すことが観察された。接続すると、オルガノイド間の活動の伝播し、機能的な接続が確立された。興味深いことに、活動主に大脳オルガノイドから中脳オルガノイドに伝わるということがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中脳皮質回路は報酬学習や統合失調症などの疾患において重要である。試験管内で中脳皮質回路の開発により、試験管内で中脳皮質回路の構造、細胞、機能の分析を実施し、報酬学習に重要なネットワーク接続の根底にある生物学を理解することができる。患者由来の iPS 細胞を使用して、この回路を疾患モデルとして使用し、統合失調症などの疾患が中脳皮質回路にどのように影響するかを明らかにし、将来の医薬品の開発に役立てることもできる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method to construct a model of the mesocortical circuit in vitro by culturing iPSC-derived cerebral and midbrain organoids inside a custom-made microdevice. Differentiated cerebral and midbrain organoids were placed into two chambers of the device. Axons grow and extend into a channel, eventually forming a bundle connecting the two organoids. Successful differentiation of the organoids was confirmed with immunostaining. Using multi-electrode arrays (MEAs), we recorded and compared the activity of the cerebral and midbrain organoids and observed that although the two organoids have a comparable number of spikes, they exhibit different activity patterns. Upon connection, we observed the propagation of activity from one organoid to another, indicating that a functional connection has been established in our circuit. Interestingly, we further found that the propagating activity was mostly initiated by cerebral organoids and received by midbrain organoids.

研究分野：神経科学、組織工学

キーワード：Organoid Neuron Dopamine Midbrain Schizophrenia Cerebral Reward learning

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトは、主に「動機づけ」を基盤として学習する。動機づけとは、ある行動や刺激によって「報酬」を受け取ることが関連付けされている状態であり、報酬につながる行動を促し(強化し)たり最適化したりするように学習が行われる。この複雑な報酬学習のプロセスは、神経伝達物質であるドーパミンとそれに関連する神経回路に依存している。特に、中脳皮質経路(mesocortical pathway)と中脳辺縁経路(mesolimbic pathway)は、報酬学習と動機づけに関わる2大ドーパミン経路である。両経路は中脳の腹側被蓋野(VTA)から生じ、それぞれ大脳の前脳前皮質(PFC)と線条体の側坐核(NAcc)へとつながっている。この2つの経路はさまざまな精神疾患において異なる役割を果たすため、異なる制御機構や機能を有していると考えられる。統合失調症では、中脳皮質経路が陰性症状、中脳辺縁経路が陽性症状に主に関与すると考えられている。また、コカインなどの薬物依存は、特に中脳皮質経路が影響を受けると考えられている。したがって、中脳皮質経路の作動原理を理解することは、脳の機能を理解する上で欠かせない。しかし、これらの神経回路は生体内では他の部位とも複雑に絡まりあっており、どのように形成され、報酬学習、動機づけ、意思決定などにおいてどのように機能するかを理解することが難しい。本研究では、中脳皮質回路の発達と機能を調査するために、*in vitro*で中脳皮質回路のモデルを構築することを提案する。

### 2. 研究の目的

本研究では、大脳オルガノイドと中脳オルガノイドを、中脳皮質経路の長距離投射を模倣した軸索束を介して連結した。これにより、神経細胞がオルガノイド内で局所的な回路を形成し、軸索束を介して他方のオルガノイドに伝達するというユニークなプラットフォームが提供される。*in vitro*の中皮質回路は、その機能性(神経活動)に基づいて特徴づけられ、構造的・生化学的解析とともに、報酬学習に重要なネットワーク接続を理解する。最後に、この回路を疾患モデルに応用することで、疾患が中脳皮質回路にどのような影響を及ぼすかについての知見を得るとともに、将来的には新たな治療法開発のためのモデルとして役立てる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中皮質回路の生成

中脳皮質回路を作製する際、最初に*iPS*(induced Pluripotent Stem)細胞をそれぞれの分化因子で誘導することにより、大脳と中脳のオルガノイドにそれぞれ分化させる。オルガノイドは、軸索の成長する方向を空間的に制御するマイクロ流体デバイスにプレーティングされる。時間の経過とともに、2つの異なる脳オルガノイドをつなぐ強固な軸索束が形成され、*in vitro*の中皮質回路(中脳-大脳コネクトイド)が構築される。

#### (2) 中脳皮質回路の評価

免疫染色やトランスクリプトミクスなどの構造的・生化学的解析に基づいて、*in vitro*の中皮質回路を評価する。これにより報酬学習において重要な、ネットワーク接続の基礎メカニズムを理解する。

#### (3) 中脳皮質回路の機能性

作製された回路の機能性を理解し、長距離投射を模倣した結合の重要性を明らかにするために、二次元神経細胞、単一オルガノイド、そして中脳-大脳コネクトイドと比較したい。具体的にはそれぞれの神経回路を多電極アレイ(MEA)にプレーティングし、電氣的測定を行う。中脳オルガノイドと大脳オルガノイドの接続に伴う電気活動パターンの変化を解析し、当研究室が以前に確立した皮質-皮質接続と私たちの中皮質接続を比較する。

#### (4) 中脳皮質回路の疾患モデル

疾患モデルの構築では、統合失調症患者由来の*iPS*細胞を用いて中脳-大脳コネクトイドを作製し、神経活動とドーパミン放出を測定する。この回路とコントロール*iPS*細胞で生成した回路を先述した様々な方法で比較を行う。

### 4. 研究成果

中脳皮質回路生成の最初のステップは、*iPS*細胞から大脳および中脳オルガノイドを分化させることである。大脳オルガノイドを誘導する分化因子のほか、*FGF8*、*SAG*、*CHIR99021*を加えることで中脳オルガノイドへの分化誘導に成功した(図1A)。

86日目に免疫染色を行ったところ、中脳オルガノイドは中脳ドーパミン前駆細胞マーカー*FOXA2*とドーパミンニューロンマーカー*TH*を発現しているが、大脳オルガノイドにはこれらのマーカーが発現していないことを確認した。また中脳オルガノイドでは大脳マーカー*FOXG1*が発現していなかった(図1B)。次に、オルガノイド内の死細胞を除去するため、分化したオルガノイドを100日齢前後で切断した。その後、オルガノイドをオービタルシェーカーで10日

間培養し、より小さなオルガノイドに再形成させた。これにより、マイクロデバイス内でのプレATINGが容易になり、軸索束の形成と電気生理学的測定での電極への接着が改善された。

軸索束形成を導くため、細長いチャンネルの両側にチャンバーを持つPDMS マイクロデバイスを設計・作成した。切断され、再形成された大脳オルガノイドと中脳オルガノイドをチャンネルに入れ、時間の経過とともに、各オルガノイドの軸索はチャンネル内に伸長した。その後2-3週間かけて2つのオルガノイドをつなぐ軸索束が徐々に形成され、中脳皮質回路が形成される(図1C)。コネクティドはプレATING後8週間以上(オルガノイド180日齢以上)培養させられ、成熟させることができた。

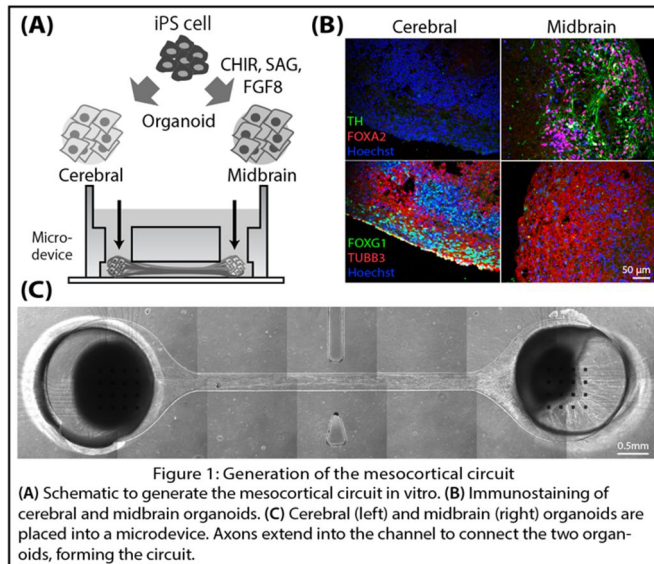


Figure 1: Generation of the mesocortical circuit (A) Schematic to generate the mesocortical circuit in vitro. (B) Immunostaining of cerebral and midbrain organoids. (C) Cerebral (left) and midbrain (right) organoids are placed into a microdevice. Axons extend into the channel to connect the two organoids, forming the circuit.

オルガノイドは多電極アレイ (MEA) プレートの上に培養されているため、オルガノイドの活動を経時的に測定・観察することができた。単一オルガノイドでは、大脳オルガノイドと中脳オルガノイドで同様のスパイク頻度が観察された(図2AおよびB)。興味深いことに、中脳オルガノイドは大脳オルガノイドに比べて、激しいバースト活動(LFPの振幅で定義)を示さないことがわかった。大脳オルガノイドと中脳オルガノイドを接続させることで、2つのオルガノイドの活動が同期していることが観察され、機能的接続が確立されていることが示された。この活動はほとんどが大脳オルガノイドによって開始され、中脳オルガノイドによって受信されることがわかった(図2C)。また、大脳オルガノイドに刺激を与えると、刺激されたオルガノイドが反応し、大脳オルガノイドから中脳オルガノイドへと活動が伝播する様子が観察された。

また、現在では3つの統合失調症患者由来iPS細胞株から大脳および中脳オルガノイドを分化させているところである。今後では、トランスクリプトーム解析、生化学的解析、形態学的解析、機能的解析を行い、コントロール細胞由来の回路と比較する予定である。

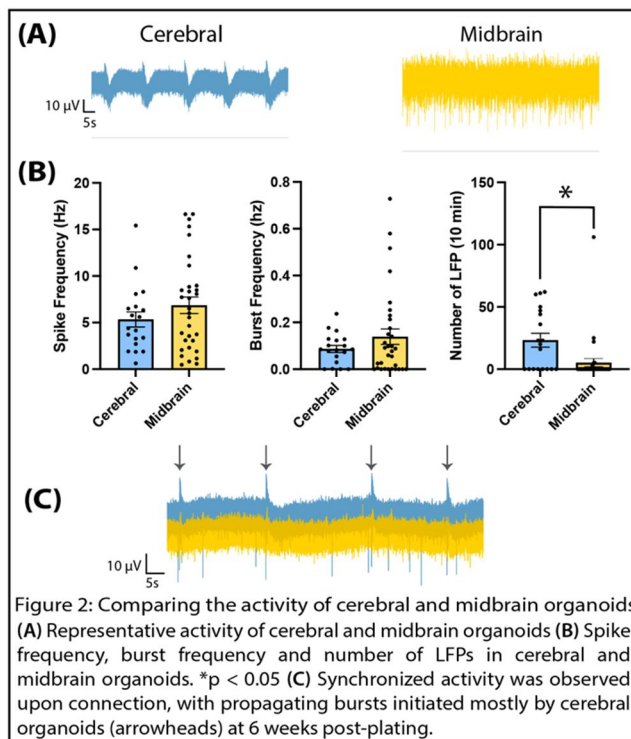


Figure 2: Comparing the activity of cerebral and midbrain organoids (A) Representative activity of cerebral and midbrain organoids (B) Spike frequency, burst frequency and number of LFPs in cerebral and midbrain organoids. \*p < 0.05 (C) Synchronized activity was observed upon connection, with propagating bursts initiated mostly by cerebral organoids (arrowheads) at 6 weeks post-plating.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chow, S.Y.A., Hu, H., Osaki, T., Levi, T., Ikeuchi, Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Advances in construction and modeling of functional neural circuits in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2529, 2544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-022-03682-1	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 該当する

1. 著者名 Chow, S.Y.A., Nakayama, K., Osaki, T., Sugiyama, M., Yamada, M., Takeuchi, H., Ikeuchi, Y.	4. 巻 40-12
2. 論文標題 Human sensory neurons modulate melanocytes through secretion of RGMB	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	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.celrep.2022.111366	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chow, S.Y.A., Nakayama, K., Osaki, T., Sugiyama, M., Yamada, M., Takeuchi, H., Ikeuchi, Y
2. 発表標題 Human sensory neurons secrete RGMB to regulate pigmentation pathway of melanocytes
3. 学会等名 45TH Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Okinawa, Japan
4. 発表年 2022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
---------	---------