ウェブサイト公開用

（様式 10）
（海外特別研究員事業）
令和　2年　6月　10日

# 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長　殿

採用年度　2019
受付番号　60684
氏　　名　坂口秀哉

（氏名は必ず自署すること）

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：　サンディエゴ　（国名：米国　）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
ヒト多能性幹細胞由来海馬オルガノイドを用いた精神疾患モデルの創出

3. 派遣期間：令和　2年　2月　29日　～　令和　2年　5月　7日

4. 受入機関名及び部局名
Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics LOG-G

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意　**書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）
（注）「6.研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

今回、次の職場への就職が予定より早く進んだため、海外特別研究員としての期間は 69 日間ととても短いものになった上、該当期間の研究の遂行に関しては、3 月 12 日より新型コロナウイルス感染症対策のため所属研究室が在宅勤務の形態に移行し、3 月 20 日よりカリフォルニア州全土がロックダウンの状態となり、終了日でもその状況は継続中であったため実験が十分できる環境ではなかった。この世界中でも新型コロナウイルス感染症による死者数が群を抜いて多いアメリカにおける大変特殊な事情により、海外特別研究員の期間中の実地での研究の進捗はほぼ無いのであるが、2019 年 2 月 19 日より日本学術振興会特別研究員 PD の立場で同研究室に長期渡航をしており、研究内容は継続する性質のもののため、その間に発表となった国内所属先での研究室の大脳オルガノイドを用いた神経機能評価に関する研究業績と、その後の渡航先で遂行した論文投稿の内容などについて、成果として述べる。

## 神経機能評価に関する研究結果

### 1) ヒト ES/iPS 細胞からの大脳皮質組織の自己組織化的な 3 次元分化誘導

まず、マウスおよびヒトの多能性幹細胞から中枢神経系を 3 次元で効率よく誘導する方法として知られる無血清立体浮遊培養法（SFEBq 法）を用いて、発生学的な大脳の分化を *in vitro* で再現するところから研究を始めた。ヒト ES 細胞を用いて無血清立体浮遊培養法を行い、TGFβ 阻害剤による神経組織誘導と、Wnt シグナル阻害剤による組織の前方化によって大脳マーカーを発現する 3 次元神経組織を分化誘導した（図 1 A）。この条件で誘導された組織には、終脳（最終的に大脳になる部分を含む）のマーカーである FOXG1 が上皮全体に発現しており（図 1 B）、培養 37 日目に $PAX6^+/SOX2^+$ の大脳皮質に存在する前駆細胞の神経上皮が見られ、その外側には胎生期の脳と同様に $TBR1^+$ や $CTIP2^+$ の大脳皮質神経細胞を認めた（図 1 C-D）。同様の結果はヒト iPS 細胞を用いても再現でき、ヒト多能性幹細胞の凝集塊から複雑な大脳組織が自己組織化的に誘導されることが示された。

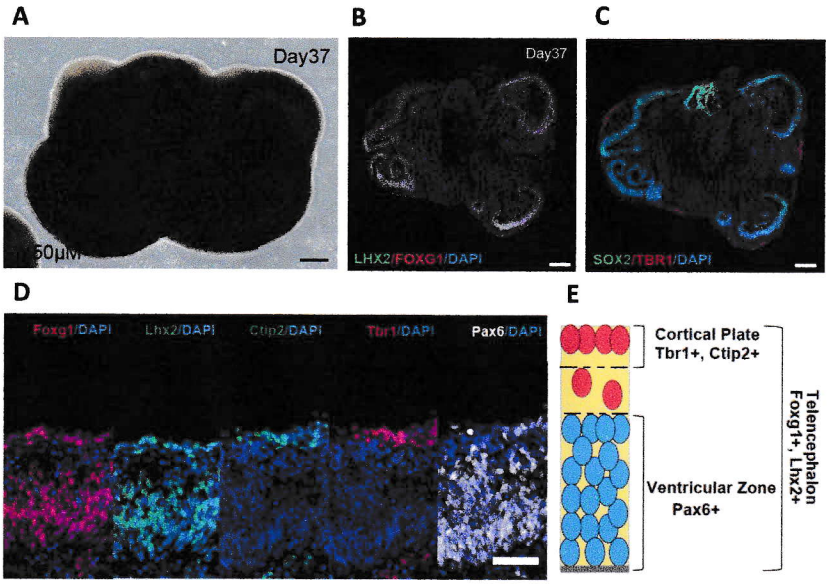


図 1：培養 37 日目の 3 次元大脳組織
A：位相差顕微鏡像。B-D：免疫染色像。E：D の模式図。スケールバー：A-C＝200 μm、D＝50 μm。

2) ヒト iPS/ES 細胞から自己組織化的に分化誘導した大脳皮質組織の長期培養、3 次元イメージング、およびカルシウムイメージングによる機能評価

誘導した神経組織をさらに長期培養すると 100 日以上の培養が可能で(図 2 A-B)、培養時期に応じて厚みを増しており発生過程を模倣できることも確認できた。さらに、組織の透明化と 3 次元イメージングを行い、投射性神経細胞マーカーの一つである CTIP2⁺の細胞が神経前駆細胞マーカーPAX6⁺の球状の上皮構造を取り巻くように位置する 3 次元構造の可視化に成功した(図 2 C-D)。

次に、この 3 次元大脳組織の神経活動について評価した。2 光子顕微鏡を用いて組織表面から 100 μm ほど深部における細胞内カルシウム動態の評価を行ったところ、培養 76 日、90 日、104 日のいずれのサンプルにおいても神経細胞における散発的なカルシウム発火を認めた(図 2 E)。ただし、神経機能評価における成熟の一つの指標となる同期発火は少数の細胞では認めたが、ネットワークとしての広い同期発火を認めることはなかった。

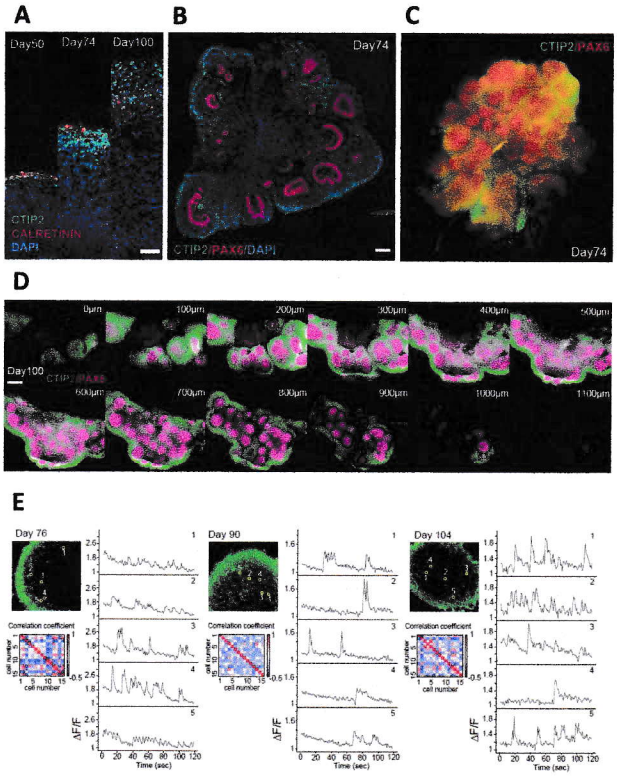


図 2：長期培養した大脳オルガノイドの 3 次元画像およびカルシウムイメージングによる機能評価
A：培養 50/74/100 日における免疫染色像の比較。B：免疫染色像。C, D：透明化大脳皮質組織の免疫染色像と 3 次元スライス画像。E：カルシウムイメージングによる神経機能評価。緑色で示されるのがカルシウム指示薬を取り込んだ神経細胞。右側のグラフは 1～5 のそれぞれの細胞での発火を表示したもの。左下のグラフは、15 個の細胞における同時発火の程度を示したもの。同期した組み合わせを赤く、そうではないものを青く表示している。スケールバー：A＝50 μm、B, D＝200 μm。

3)大脳オルガノイドの分散培養による機能的神経ネットワークの創出

機能的な神経ネットワークの構築のために、研究グループは次に大脳オルガノイドの分散培養を行った。まず培養 70-100 日の大脳オルガノイドを分散培養したところネットワークの形成が確認できた(図 3 A)。ここで形成されたネットワーク構造は培養期間が長くなるに応じてより長く、より太いファイバーを形成した(図 3 B)。免疫染色によって、細胞凝集塊を形成するのはおもにグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞で、GABA 作動性の抑制性ニューロンがその周辺に存在していることがわかった(図 3 C-D)。また、細胞凝集塊の細胞は CTIP2 や SATB2 を発現することから大脳の投射性神経細胞であることが示唆された(図 3 E)。

次に、この神経ネットワークの機能を確認するために、カルシウム指示薬を用いてネットワークにおける細胞内カルシウム動態を評価した。分散 2 週目までは神経活動は散発的で、主に非同期性の発火からなる神経活動を認めた(図 3 F)。興味深いことに、培養 4 週目に評価すると同期性の神経活動が非同期性の活動と共に認められた(図 3 G、赤丸)。これは時間依存性の神経活動の成熟を示唆する結果だった。この結果から、ヒト神経活動の評価基盤として、より包括的な評価ができないかを模索した。新しい評価方法を構築した今回の論文では、1820 細胞分の細胞内カルシウム動態を数値化し、細胞の分布、活動細胞と非活動細胞の可視化、発火パターンのラスタープロッティング、発火パターンのクラスタリングなどを示した(図 3 H)。この方法によって、ヒト神経細胞からなるネットワークとしての神経活動を既存の方法では評価が難しかった包括的評価として測定することが可能となった。 さらに薬剤添加によってこれらの神経活動が変化することも明らかにした。

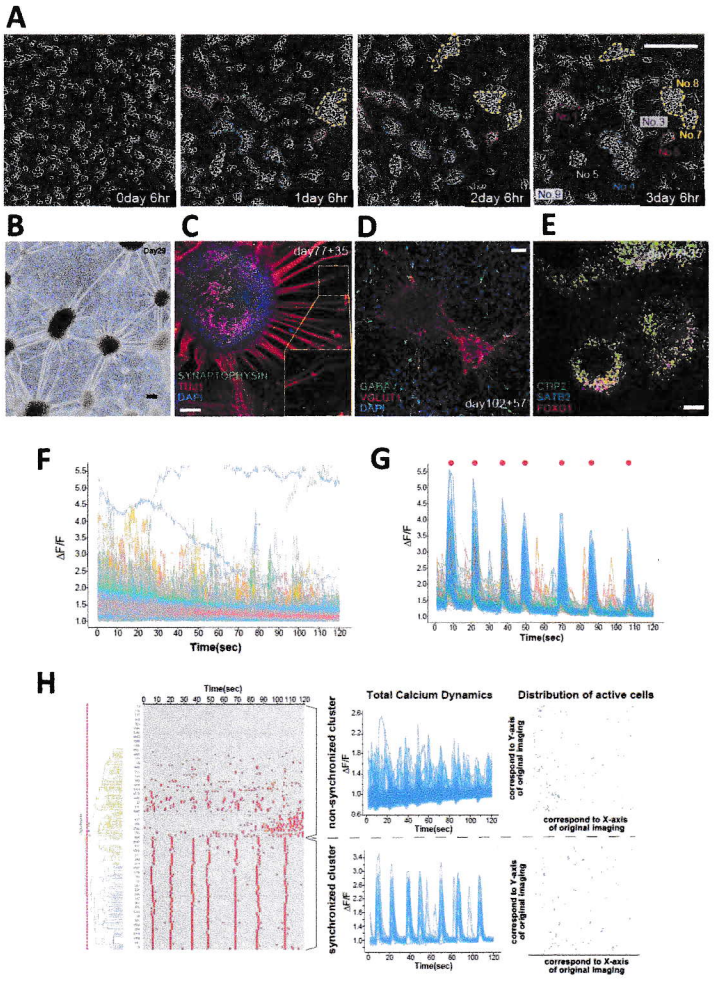


図 3：大脳オルガノイドの分散培養による機能的神経ネットワークの創出
A：分散培養初期の位相差顕微鏡による時系列画像。B：分散後 29 日の位相差顕微鏡画像。C-E：分散後の神経ネットワークにおける免疫染色画像。F,G： 分散後 2 週(F)と 4 週(G)におけるカルシウムイメージング。H：得られたカルシウムイメージングの結果の解析例。スケールバー：A-B＝200μm、C,E＝100μm 、D＝50μm。

**大脳オルガノイドのマウスへの移植に関する研究結果**

並行して、大脳オルガノイドのマウス脳への移植実験も進めていた。
ここでは、神経前駆細胞が deep-layer neuron を産生している時期（day42）と、upper-layer neuron を産生している時期（day70）の大脳オルガノイドを、それぞれマウス大脳皮質に移植し、生着、生着後に含まれる細胞、軸索投射を比較した。
day42 では生着率や投射軸索数は day70 より多かったものの、移植片の腫瘍化を示唆する overgrowth が見られ、正常脳を圧迫するような所見を認めた。一方で day70 の移植片では overgrowth は認めない代わりに、軸索投射数は day42 より少なかった。生着率や軸索投射数を

day42 と同等にするために、移植前 7 日目に脳内に lesion を作り、その後 day70 の大脳オルガノイドを移植すると、生着率や軸索投射も day42 と同等のレベルまで改善した。これを以て、安全にかつ効率的に大脳オルガノイドを生体の脳内に移植する方法が確立できたと考えられた。
本成果については現在論文投稿リバイス中である。

**一連の研究の意義と今後の展望**

今回自分が主導した研究では、ヒト多能性幹細胞から 3 次元大脳組織：大脳オルガノイドの分化誘導と 3 次元イメージング、その分散培養によって得られた同期発火を含む神経ネットワーク活動とその特性評価、および複雑な神経活動に対する新規評価基盤、および大脳オルガノイドのマウス脳への移植技術について確立した。誘導した大脳組織は発生学的な背景を反映したマーカー発現や構造を有しており、ヒト大脳皮質の発生過程を模倣していると考えられ、その応用例としての分散培養を通した神経ネットワーク構築は、将来的にヒト大脳を対象とした疾患へのアプローチをより容易にする可能性を持っていると考えられる。また、大脳オルガノイドの移植は、失われた脳機能の移植による再生医療への展開に貢献できる可能性を持つと考えられる。

**成果の発表・関係学会への参加状況**

海外特別研究員の期間中は新型コロナウイルス感染症対策のため、ほぼ全てのセミナー・学会は中止となったため、発表の機会は持っていない。ただ、神経機能評価の業績に関しては 2019 年の国際幹細胞学会で発表済みである。