

研究タイトル

成熟型ヒト脳オルガノイドによる革新的脳梗塞モデルの確立

所属：島根大学医学研究科 神経・筋肉生理学

助成対象者：松井 健

概要

超高齢化時代を迎えた日本では多くの脳梗塞患者が発生しており、根治的治療法の開発が急務となっている。これまでマウスモデルを用いた脳梗塞研究が数多く行われてきたが、齧歯類とヒトの脳の様々な違いが大きな障壁となっていた。そこで本研究では、オルガノイド技術を駆使し、脳梗塞研究の基盤となる世界初のヒト脳梗塞モデルの確立を試みた。

そして、ヒト多能性幹細胞由来の脳オルガノイドをマウス臓器に移植することで、ヒト大脳皮質に類似した神経構造と血管内皮細胞および脳内免疫細胞をもつ成熟型ヒト脳オルガノイドの誘導に成功した。今後、本モデルをさらに改良することで、脳梗塞研究への貢献が期待される。

abstract

The annual number of ischemic brain strokes remains quite high in Japan, reflecting rapid aging. Thus, we are required to immediately develop radical treatment. So far, the research on cerebral infarction has heavily relied on disease modeling with rodents. However, the interspecies differences between primates and rodents have posed a significant barrier. To solve this problem, we have tried to develop human-based modeling system to analyze cerebral infarction, using human brain organoids. We transplanted human pluripotent stem cell-derived brain organoids into mice, and successfully established human mature brain organoids, harboring not only human cerebral cortex-like neuronal structure, but also vascular endothelial cells and

brain-resident immune cells. With further improvement, this modeling system will contribute to the development of definitive care for stroke patients.

研究内容

<目的>

高齢化が進む日本では、毎年多くの脳梗塞患者が発生している。神経細胞には分裂能がないことから、脳梗塞によって失われた神経組織の自然治癒は期待できない。現在の治療は虚血による神経細胞死の拡大阻止に留まっており、その効果も限定的である。そのため、多くの脳梗塞患者が麻痺や認知機能低下など生涯にわたる後遺症に苦しんでおり、本疾患に対する抜本的治療法の確立は極めて重要な課題である。

現在、脳梗塞の新規治療法として、失われた脳組織の再構築によって神経機能の回復を促す再生医療が期待を集めている。神経機能の回復を実現するためには、生体ヒト脳内に存在するわずかな神経幹細胞の増殖や神経細胞への分化を促進して、損傷した神経ネットワークの再構築をはかることが有効と考えられる。脳梗塞に対する再生治療を確立するためには、ヒト脳内における神経幹細胞の増殖・分化などを制御する分子メカニズムを詳細に理解する必要があるが、倫理面での制約により、ヒト脳サンプルを大規模に確保して研究に用いることは非常に困難である。齧歯類などのモデル動物を用いて脳梗塞の病態を再現する実験系も開発されているが、ヒトと齧歯類の脳ではサイズ、構造、再生能力とも大きく異なり、脳を構成する細胞のタイプにも差異があるため、モデル動物を用いた研究にも限界がある。

一方、培養下でヒト脳の構造を再現した脳オルガノイドが相次いで樹立されている(1, 2)。発生初期のヒト脳では、神経幹細胞の周囲に分化した神経細胞が並ぶ神経管が見られるが、ヒト脳オルガノイドでもこの立体構造が再現されている。ヒト脳オルガノイドを用いて、入手困難であるヒト脳サンプルを代替することが可能となれば、ヒト脳の再生を目的とした研究に大きな貢献が期待できる。しかし、現在の手法で得られるヒト脳オルガノイドは生体脳の重要な構成要素である栄養血管を欠いているため、血流途絶によって生じる脳梗塞の病態を再現することは不可能である。また、これらの脳オルガノイドは、栄養血管の欠如により培養の長期化とともに細胞死を伴って成長が止まり、オルガノイド内の神経細胞も活動電位を示さない未成熟なものが大半を占める。さらに、これまでの脳オルガノイドには、脳梗塞の過程において重要な機能を有すると考えられる免疫細胞(ミクログリア)

が含まれていないなど、改善すべき点が数多く存在する。我々は、これらの課題を克服するために、栄養血管およびミクログリアを有する成熟型ヒト脳オルガノイドの作成を試みた。

<研究の方法>

-ミクログリア含有ヒト脳オルガノイドの樹立-

中枢神経系の免疫細胞であるミクログリアは、脳梗塞が生じた際には細胞死や炎症反応の制御など種々の重要な免疫機能を担い、脳梗塞患者の機能予後、生命予後にも大きな影響を及ぼすものと考えられている。そこで、我々はまずミクログリアを有するヒト脳オルガノイドの樹立に取り組んだ。初めに、ヒト iPS 細胞からヒト脳オルガノイドとヒトミクログリアを別個に分化誘導し、この両者を混合することによって、ミクログリアを有するヒト脳オルガノイドの誘導を試みた。同時に、ヒト iPS 細胞からミクログリア含有ヒト脳オルガノイドを一度に分化誘導する培養系の検討をおこなった。また、既存のヒト脳オルガノイド培養系を改良するため、オルガノイド培養液を高速で攪拌するデバイスを導入し、各種成長因子を添加して条件検討を行った。種々の条件下で得られたオルガノイドの内部に存在する細胞種を評価するため、免疫染色によって神経幹細胞（SOX2 を発現）、神経細胞（ β III-TUBULIN を発現）、アストロサイト（S100 β を発現）、ミクログリア（IBA-1 を発現）の同定を行った。このほか、タンパク質質量分析を用いて、オルガノイド内部に存在するタンパク質の発現プロファイルを網羅的に解析した。

-ミクログリア含有ヒト脳オルガノイドの血管化-

ミクログリア含有ヒト脳オルガノイドの樹立に成功した後、上記のオルガノイドを免疫不全マウス（NOD-Scid マウス）の多血臓器である肝臓、腎臓、脾臓に移植し、オルガノイドの血管化を試みた。そして移植から 1-2 ヶ月後にオルガノイドを移植した臓器を摘出し、オルガノイドの生着、および血管化の状況を免疫染色によって評価した。生着の評価にはヒト細胞のマーカーである HNA (Human Nuclear Antigen)、血管化の評価には血管内皮細胞のマーカーである PECAM-1 を用いた。このほかに移植されたオルガノイドのサイズ、ヒト脳オルガノイドや発生期ヒト脳に特徴的な神経管構造の評価も行った。さらに、より効率の良いオルガノイド血管化を実現するため、脳、皮下、腹腔内にも上記のミクログリア含有ヒト脳オルガノイドを移植し、同様の手法でその生着および血管化を評価した。

<成果および考察>

-ミクログリア含有ヒト脳オルガノイドの樹立-

我々が樹立したオルガノイドの内部には、神経幹細胞の周囲に分化した神経細胞が並ぶ神経管類似構造 (Fig. 1A-C)が確認できたほか、S100 β 陽性のアストロサイト(Fig. 1D)やIBA-1陽性のミクログリア様細胞(Fig. 1E)が多数含まれており、これらのオルガノイドがミクログリア含有ヒト脳オルガノイドであることが確認できた。さらに、タンパク質質量分析の結果、上記のミクログリア含有ヒト脳オルガノイド内部には神経幹細胞に発現するSOX2、神経細胞に発現するMAP2や β III-TUBULIN、DCX、抑制性神経細胞に特徴的なSOMATOSTATINなどのタンパク質が発現していることが明らかとなった。

しかし、生体内におけるミクログリアは脳実質内に比較的均一に分布しているにもかかわらず、我々が樹立したオルガノイドの内部に存在するミクログリア様細胞は、オルガノイド内部で不均一な分布を示し、多くがオルガノイド深部に密集していた (Fig. 1E)。

オルガノイド深部で酸素供給および栄養供給量が減少することが先行研究でも指摘されていることから (1, 2)、ヒト脳オルガノイド内におけるミクログリア様細胞の分化には、成長因子だけでなく酸素濃度やpH、培養液を攪拌する際に生じる剪断力などの要素が大きく関与しているものと考えられる。

-ミクログリア含有ヒト脳オルガノイドの血管化-

我々は、ミクログリア含有ヒト脳オルガノイドを移植された免疫不全マウスの各臓器を移植から1-2ヶ月後に摘出し、免疫染色によって生着および血管化の評価を試みた。その結果、肝臓、脾臓、腎臓においてヒト細胞マーカーHNAを発現する細胞が観察され、オルガノイドの生着が確認できた (Fig. 2A, C, E)。脾臓ではマウス血管内皮細胞およびヒト血管内皮細胞が移植オルガノイド内に存在していることが明らかになった (Fig. 2C, D)。また、腎臓においても移植されたオルガノイドの内部にマウス血管が進入していることを示唆する染色像が得られた (Fig. 2E, F)。

しかし、どの移植部位においても移植片のサイズが縮小し、ヒト脳オルガノイドの特徴である神経管類似構造が失われる傾向が顕著であった。また、肝臓に移植されたオルガノイドの内部には肝臓に存在する自然免疫細胞であるKupper細胞の集積が認められ、免疫拒絶反応が起きている可能性が示唆された (Fig. 2A, B)。

上記の結果から、オルガノイドの生着および血管化効率を改善するためには、移植実験に用いるマウスを NOD-Scid マウスよりも重度の免疫不全を呈する NOG マウスや NSG マウスに変更する、移植の際にオルガノイド周囲を血管進入の促進効果を有する VEGF(Vascular endothelial cell growth factor)でコートする、などの改良が有効と考えられる。これらの手段によってオルガノイド生着効率が改善し、十分な血管化が確認できれば、その後はオルガノイドに至る血流を遮断して、脳梗塞の病態再現実験に進むことが可能となる。

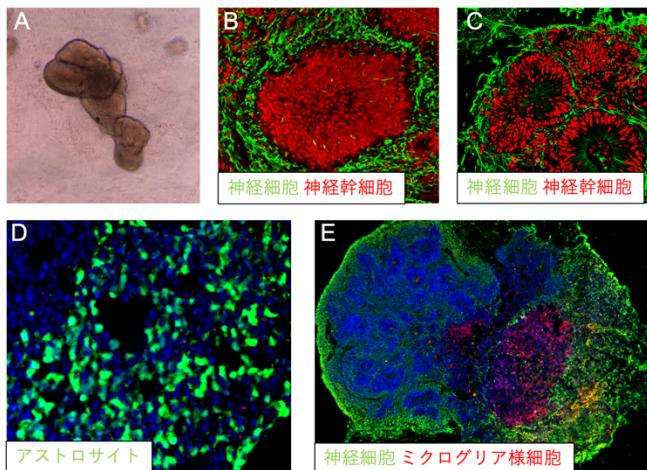


Fig. 1 ミクログリア含有ヒト脳オルガノイド
 (A) 外観
 (B) 神経細胞(β III-TUBULIN), 神経幹細胞(SOX2)
 (C) 神経細胞(β III-TUBULIN), 神経幹細胞(PAX6)
 (D) アストロサイト(S100 β)
 (E) 神経細胞(β III-TUBULIN), ミクログリア様細胞(IBA1)

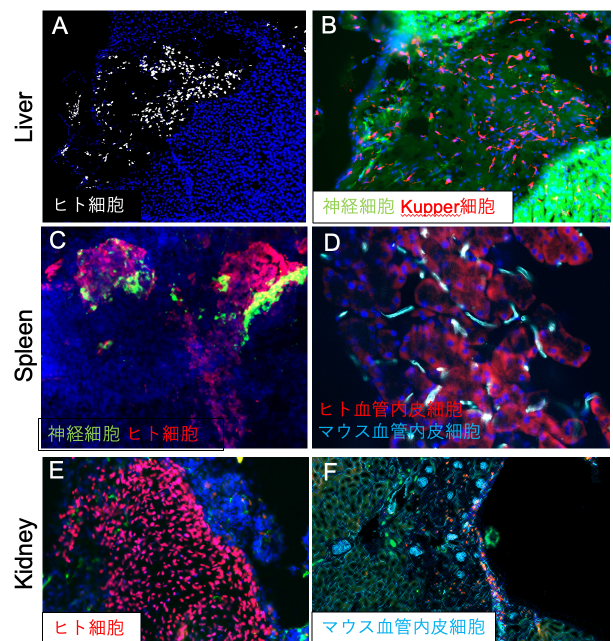


Fig. 2 各臓器に移植されたミクログリア含有ヒト脳オルガノイド
 (A) ヒト細胞(HNA)
 (B) 神経細胞(β III-TUBULIN), Kupper 細胞(Iba1)
 (C) 神経細胞(β III-TUBULIN), ヒト細胞(HNA)
 (D) ヒト血管内皮細胞(PECAM-1)、マウス血管内皮細胞(Pecam-1)
 (E) ヒト細胞(HNA)
 (F) マウス血管内皮細胞(Pecam-1)

引用文献

- (1) Lancaster MA, et al. Nature. 2013. PMID: 23995685
- (2) Qian X, et al. Cell Stem Cell. 2020. PMID: 32142682

本助成に関わる成果物

[論文発表]

Matsui TK, et al. Stem Cells. 2021. PMID: 33754425

[口頭発表]

Current and expected approaches to model blood brain barrier by human brain organoids, Takeshi K. Matsui, 3rd

Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research, 2021/3/26

[ポスター発表]

[その他]