

## iPS 細胞由来大脳皮質オルガノイドシートを用いた皮質再生法の開発

大阪大学医学系研究科 脳神経外科学

寺田 栄作

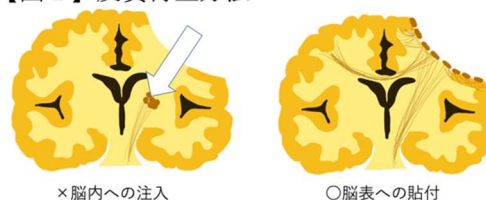
### 1. 諸言

ヒトの脳は損傷を一度受けると損傷した部位は回復することがほぼない臓器である。現在の医療、特に脳卒中領域においては脳損傷をいかに抑えるかということに重点が置かれている。血管内治療の進歩により急性虚血性脳卒中を救済できることは増えたが、完成した脳梗塞や脳出血などで損傷した場合には、リハビリテーションを行う程度しか治療方法がない状態である。そのため、脳の再生方法の開発が望まれている。

2013年に Lancaster らによって開発された<sup>1)</sup>ヒト多能性幹細胞を利用して3次元的に培養した大脳オルガノイド (human cerebral organoid) はホスト (ラット) からの血管新生を誘導することや、生着が良いこと<sup>2)</sup>、錐体路に沿って axon を伸長すること<sup>3)</sup>などの利点があり、損傷脳の再生において脚光を浴びている。申請者らは大脳皮質を再生するにあたり、錐体路などの皮質下投射

(subcortical projection) のみならず皮質間同士の機能的投射 (cortical projection) も回復させることが重要であり、損傷脳表に対して連続性を保った morphological な大脳皮質を再生させることが最善の策だと考えている (図1)。

【図1】皮質再生方法



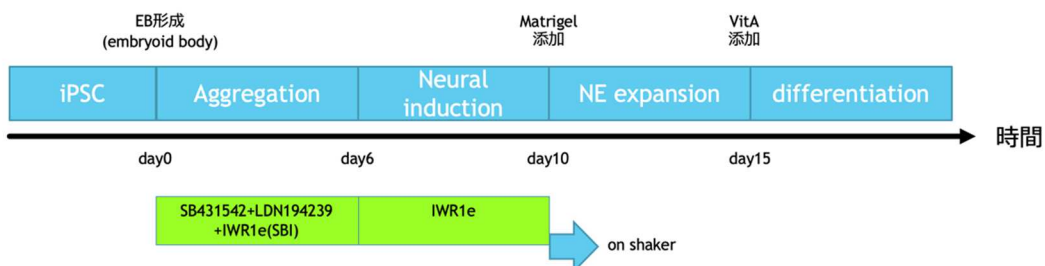
オルガノイドは中心部が低栄養や低酸素に晒されることにより壊死するため、4 mm 大までしか成長せず、形状も球体となる。また、成長に合わせてスライスして培養することによりオルガノイドを大型化させた報告はある<sup>4)</sup>ものの、大脳オルガノイド自体は柔らかく把持が困難であり、移植という観点からは問題があると考えられる。そのため、上記のような大脳皮質の再生を行うためにはシート化が必要であると考えた。シート化できれば形状として平らになるため栄養や酸素の拡散に有利であり、把持も可能になるというメリットがあると考えられるためである。

### 2. 方法

iPS 細胞 (201B7 株) を利用して大脳オルガノイドへの誘導は当研究室において既に確

立済みである。(図 2)

【図2】オルガノイド作成方法



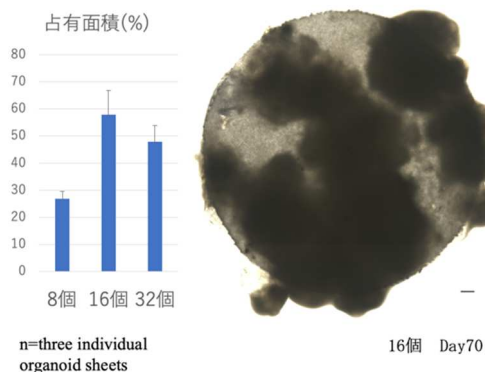
シート化するにあたり、足場 (scaffold) が必要となるため各種足場の選定が必要となる。足場の候補としてはバイクリルメッシュ (メッシュ状のポリ乳酸・グリコール酸共重合体 [poly-lactic-co-glycolic acid : PLGA]) や Cellbed (高純度シリカ三次元培養担体)、研究用幹細胞抽出培養シート (ORTHOReBIRTH 製) などで実験を行うこととした。一般的に行われている方法としては iPS 細胞から胚葉体を経て大脳皮質オルガノイドを形成するが、どの段階で足場に撒くか、培養条件として静置するのか、震盪培養を行うかなども検討した。各条件で培養したシートに関しての検討項目として遺伝子発現や免疫染色を行い、最もオルガノイドとして質の良いものの培養条件を探ることとした。

また、最終的には作成したオルガノイドシートをラットの大脳皮質除去モデルに移植して生着の確認や機能回復の評価などを行う方針とした。

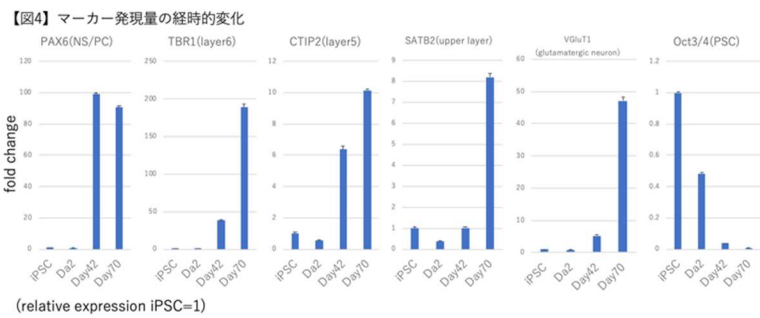
### 3.結果

まずはシート化の工程開発から開始した。各種シートに①iPS 細胞を直接 scaffold 上に撒いてそこで誘導をかける方法、②胚葉体形成直後 (day 2) に scaffold 上に撒く方法、③マトリゲル封入直前に細胞を解離して scaffold に撒く方法の 3 パターンを試した。①の方法では細胞凝集にばらつきが強く誘導が安定しないことが、③の方法では scaffold への接着が悪いことがわかった。また、②の方法であれば接着・誘導が安定することが判明した。続いてどの scaffold が最も良いか同時培養を行って判定した。結果としては細胞の生着性と形状の安定性が最も高かったのは Cellbed であった。さらに Cellbed に播種する細胞の最適密度の検討も行った。実際には day 2 の胚葉体を何個撒くのが最もシートの占有率を上げるかを検討し、16 個の胚葉体を撒く方法に決定した (図 3)。

【図 3】最適密度の検討



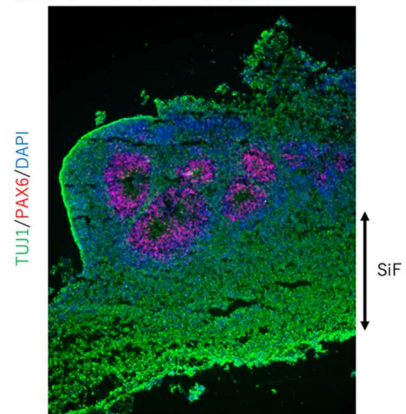
続いて、シートの質の評価を行なった。オルガノイドシート全体のmRNAを採取し Real time PCR を行い、経時的な変化の確認を行なった(図4)。神経幹/前駆細胞のマーカである PAX6



は十分に上がっており、また皮質のマーカにおいても第6層(TBR1)、第5層(CTIP2)、upper layer (SATB2) が経時的に増加していることが確認できた。また、興奮性ニューロンマーカーも上昇しており、逆に多能性幹細胞マーカーの OCT3/4 は低下していたため、時系列的に神経の成熟ならびに未分化性の低下の確認もできた。

さらに免疫組織化学染色での形態学的な評価も行なった。オルガノイドシート全体として神経へと分化していることが確認できた(図5)。また、Cellbed内には TUJ1 陽性の神経細胞が充満していることがわかった。PAX6 陽性の神経上皮様構造は Cellbed 内には存在せず、オルガノイドから産生された神経細胞がシート内に遊走していることが示唆された。

【図5】 オルガノイドシートの免疫染色



#### 4.考察

PLGA マイクロフィラメントを scaffold として用いて大脳オルガノイドを大型化させた論文の報告はある<sup>5)</sup>が、それ以降 scaffold を利用しての大脳オルガノイド作成方法の目立った報告はない。更なる免疫染色での詳細な検討が必要ではあるものの、本研究で Cellbed を用いることにより大脳オルガノイドをシート状に形成することには成功したと考えられる。また、Cellbed 内に神経細胞が充満していることに関しては、どのような神経細胞がシート内に存在しているのかを評価する必要があると考えられる。

今後はこの作成したシートが移植に適したものであるかどうかの評価も必要と考えられる。大脳オルガノイドの移植に関しては既に論文が散見されており脳梗塞モデル<sup>6)</sup>や外傷モデル<sup>7)</sup>においてある一定の機能回復効果はあると考えられる。移植に関してはシクロスポリンで免疫抑制をおこなったラットの脳皮質除去モデルを作成して移植の準備を進めている状態であり、追加でのシートの免疫染色での評価と並行して移植実験も行っており、移植後の機能評価も含めて進行していく予定である。

## 5.結語

高純度シリカ三次元培養担体を用いて大脳オルガノイドをシート状に形成することには成功したと考えられる。今後更なる免疫組織化学的な検討並びに移植での生着や機能回復評価などを行っていく必要があると考えられる。

## 6.文献

- 1) Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* [Internet]. 2013;501(7467):373–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12517>
- 2) Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2018 May 6;36(5):432–41. Available from: <http://www.nature.com/reprints/index.html>.
- 3) Kitahara T, Sakaguchi H, Morizane A, Kikuchi T, Miyamoto S, Takahashi J. Axonal Extensions along Corticospinal Tracts from Transplanted Human Cerebral Organoids. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2020;15(2):467–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.016>
- 4) Qian X, Su Y, Adam CD, Deutschmann AU, Pather SR, Goldberg EM, et al. Sliced Human Cortical Organoids for Modeling Distinct Cortical Layer Formation. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2020 May;26(5):766–781.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590920300552>
- 5) Lancaster MA, Corsini NS, Wolfinger S, Gustafson EH, Phillips AW, Burkard TR, et al. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nature Biotechnology*. 2017. p. 659–66.
- 6) Wang SN, Wang Z, Xu TY, Cheng MH, Li WL, Miao CY. Cerebral Organoids Repair Ischemic Stroke Brain Injury. *Transl Stroke Res*. 2019;
- 7) Wang Z, Wang S, Xu T, Hong C, Cheng M, Zhu P, et al. Cerebral organoids transplantation improves neurological motor function in rat brain injury. *CNS Neurosci Ther*. 2020;(December 2019):1–16.

## 7.成果発表

成果の発表は現在のところ無し。