

産経新聞社賞

ヒト神経活動の包括的評価技術

～大脳オルガノイドを用いたヒト神経活動へのアプローチ～

¹ 京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 高橋淳研究室

² Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics

³ 横河電機株式会社 金沢事業所 計測事業部 ライフサイエンスセンター

⁴ 株式会社パーキンエルマージャパン 東京営業所

坂口 秀哉^{1,2} 松原 孝宜^{3,4} 大石 尚孝⁴

1. 緒 言

大脳は、運動の指令、痛みや熱などの体性感覚、視覚・聴覚などの感覚の受容などに関わる情報処理に加え、意識や記憶などの高次脳機能を含む様々な神経機能の中樞を担う。その神経機能は、複数の細胞からなるネットワークの活動からなり、人間の思考や行動などの活動を生み出す基盤となる。この神経活動に障害が起これば、重大な神経精神疾患が起こればと知られているものの、実際にヒトの神経活動を細胞レベルで評価することはいまだに困難とされる。

ヒトの神経活動は、実験で使用可能な動物モデルにおける神経活動とは比較が難しく、精神疾患の動物モデルを抗精神薬評価に用いることには限界があり、十分に活動が評価できるヒト神経ネットワークの創出はヒトの神経活動を評価する基盤となるため、精神疾患をターゲットとした創薬研究のために必須である。

近年、ヒト多能性幹細胞からの神経組織への分化誘導研究が発展し、3次元で生体と同じような構造を保持した多能性幹細胞由来の神経組織の分化誘導が可能となってきた(文献1-2)。2013年以降、このような組織は神経オルガノイドという名称で認知されるようになり(文献3)、ジカウイルス感染症のモデリングなど(文献4-7)、今後、神経オルガノイド技術の発展は、ヒト細胞由来の大脳組織を提供できるという強みをもとに、神経領域研究における様々なブレイクスルーを起こすことが期待されている(文献8)。

本論文では、大脳オルガノイドを用いた神経組織分散培養法によって機能的な神経ネットワークを創出し、その神経活動について取得したすべての細胞の神経活動を包括的に計測し、多面的な評価方法を確立する技術について述べる(文献9)。本技術によって、これまでアプローチが困難であった機能的なヒト神経ネットワークに詳細に迫ることが可能となり、将来的な神経精神疾患のモデリングや治療薬開発などに大きく貢献することが期待される。

2. 研究開発の背景

筆頭申請者の坂口が大学院生として所属した理化学研究所の故笹井芳樹博士の研究室では、無血清凝集浮遊培養法(Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation(SFEBq 法))という方法で様々な神経領域を分化誘導する研究を行ってきた(文献1-2,10)。この方法は、体のすべての細胞に分化できる能力を持つ多能性幹細胞を酵素により個々の細胞に分散し、そこから数千個からなる細胞凝集塊を形成させることで発生初期において人体の元となる内部細胞塊のような組織を作り、次にその組織塊を作りたい神経組織の分化に適した培養液に浮遊させて培養することで、生体と同じような3次元の構造を有する神経組織を分化誘導するというもので、神経オルガノイド研究の先駆けとして現在認知されている(図1)。

無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq法) の概要

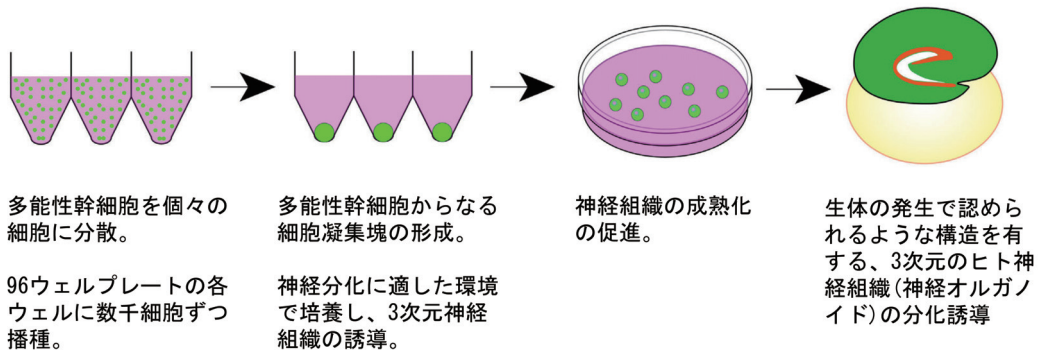


図1：無血清凝集浮遊培養法の基本コンセプト

神経オルガノイド研究には大きな課題がいくつか残されており、その一つは神経活動評価の困難である。

これには以下の3つの問題点が背景にある。

1. ヒト神経ネットワークへのアプローチの困難
2. 十分な神経活動を保持しつつ個々の細胞レベルで評価することの困難
3. 神経活動の評価において恣意性の排除ができないこと

これらの問題点がクリアされない限り、神経機能異常を主な病態とする精神疾患のモデル作成は、オルガノイド研究においても困難と考えられてきた。そこで我々は、これらの問題点を解決するにあたって、アプローチが容易なヒト神経ネットワークを創出することから研究を始めた。

3. 機能的なヒト細胞由来神経ネットワークの創出

①連続上皮構造を有した大脳オルガノイドの効率的分化誘導

笹井芳樹研究室は、ヒト多能性幹細胞から3次元神経組織の分化誘導研究として、2013年に培養90日を超えるヒト胚性幹細胞(英: embryonic stem cell (ES細胞))由来の大脳組織の長期培養と、それに伴う大脳発生過程の再現について報告している(Kadoshima et al. 2013)。この方法をもとに、分散後のヒト多能性幹細胞における細胞死を防ぐ効果をもつ ROCK inhibitor の初期濃度を検討したところ、以前の方法で採用していた濃度(培養0-6日目まで20 μ Mで添加)より濃い濃度で添加(培養0-3日目まで50 μ Mで添加)することで、より硬く凝集した細胞凝集塊の形成が確認できた(図2)。

大脳皮質分化誘導のプロトコール

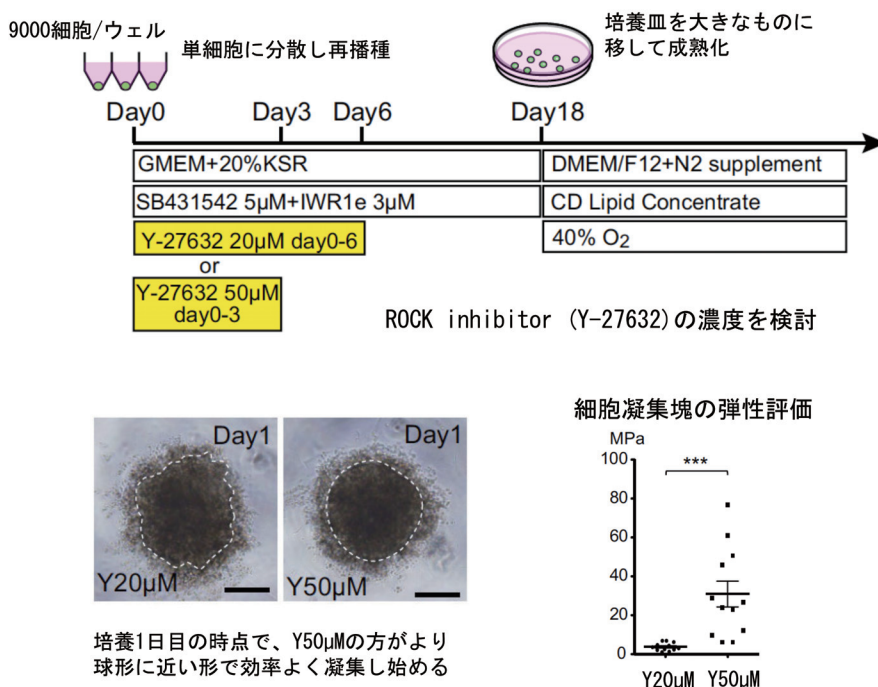


図2：大脳オルガノイドの分化誘導

(上段) 大脳オルガノイドの分化誘導プロトコール。(下段左) 培養1日目での細胞凝集塊の例。ROCK 阻害剤が高濃度の条件 (Y50μM) の方が球形の凝集塊を形成する。(下段右) 原子間力顕微鏡を用いた培養1日目における細胞凝集塊の弾性評価。(スケールバー：200μm)

また、高濃度の条件で誘導した細胞凝集塊からは、より効率的に連続性を有した上皮構造をもつ大脳オルガノイドが分化誘導された(図3 A-B)。得られた組織においては、生体の大脳で見られるのと同様に、終脳マーカーである FOXG1 と背側終脳マーカーである LHX2 が上皮全体に発現しており、誘導された神経上皮構造が大脳皮質組織であることが示された。その上皮に PAX6 陽性の脳皮質に存在する前駆細胞の神経上皮構造が見られ、その上皮構造の外側には皮質板深層に存在する TBR1 陽性や CTIP2 陽性の神経細胞からなる層構造を認めた(図3 C-D)。同様の結果はヒト人工多能性幹細胞(英: induced pluripotent stem cell (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脳組織が自己組織化的に誘導されることが示された。

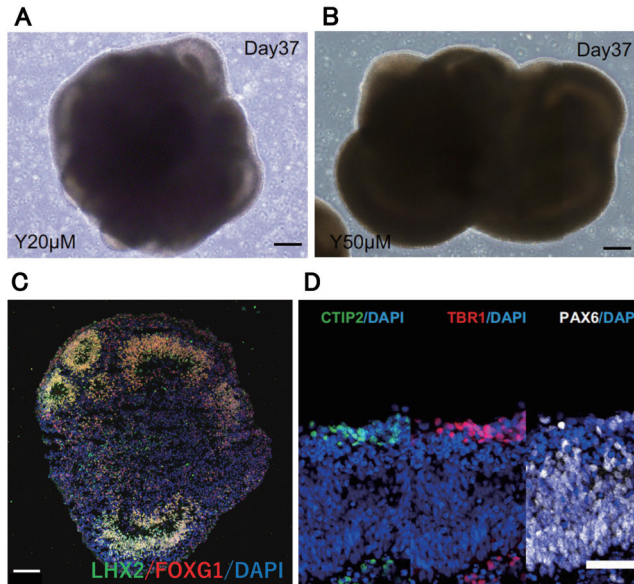


図3：分化誘導した培養30日台での大脳オルガノイド

(A) Y20 μ M と (B) Y50 μ M の大脳オルガノイドの位相差顕微鏡画像。Y50 μ M の条件で上皮構造はより連続性を有する。(C) 大脳オルガノイドにおける FOXG1/LHX2 の染色像と、(D) CTIP2/TBR1/PAX6 の染色像。(スケールバー：200 μ m (A-B), 100 μ m (C), 50 μ m (D))

誘導された上皮構造は発生過程を模倣しながら、培養100日前後まで層構造の厚みを増しながら、培養皿の上で維持可能であった(図4 A-D)。この分化誘導条件によって、既報より効率的に大脳皮質連続上皮を形成でき、本条件をもとに次のステップに進むことにした。

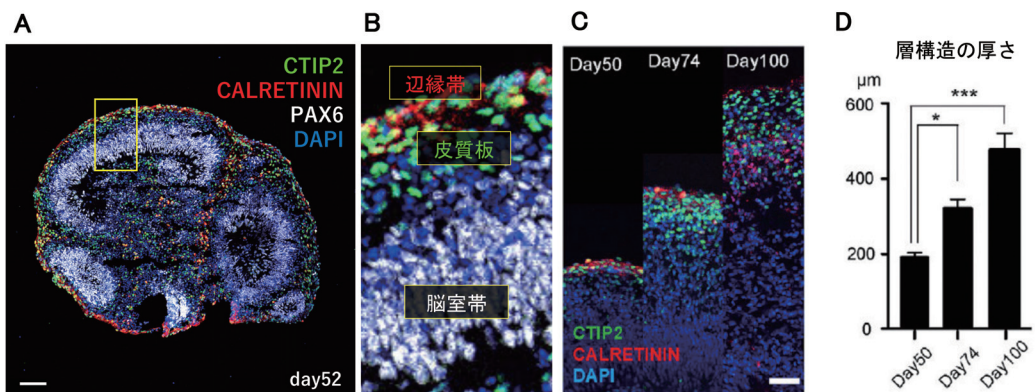


図4：大脳オルガノイドの長期培養

(A-B) 培養52日における大脳オルガノイドの免疫染色画像。CALRETININ 陽性の辺縁帯、CTIP2 陽性の皮質板、PAX6 陽性の脳室帯の各層構造が形成されている。(C-D) 培養50-100日における層構造の厚さの検討。(スケールバー：100 μ m (A), 50 μ m (C))

②機能的な大脳オルガノイド由来神経ネットワークの創出

次に、アプローチの容易な機能的な大脳神経ネットワークの構築にむけて大脳オルガノイドの分散培養による2次元の神経ネットワーク構築を試みた。

培養70-100日の大脳オルガノイドを単細胞に分散し、それを別の培養容器に再播種したところ(図5 A)、分散後1日以降から少数の細胞からなる細胞凝集塊が形成され、各塊間にネットワークが形成されることが確認できた(図5 B)。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、分散後4週目にミリメートル単位の長さを持つ神経ファイバーによって複数の細胞凝集塊が結合される神経ネットワークの形成が達成された(図5 C)。

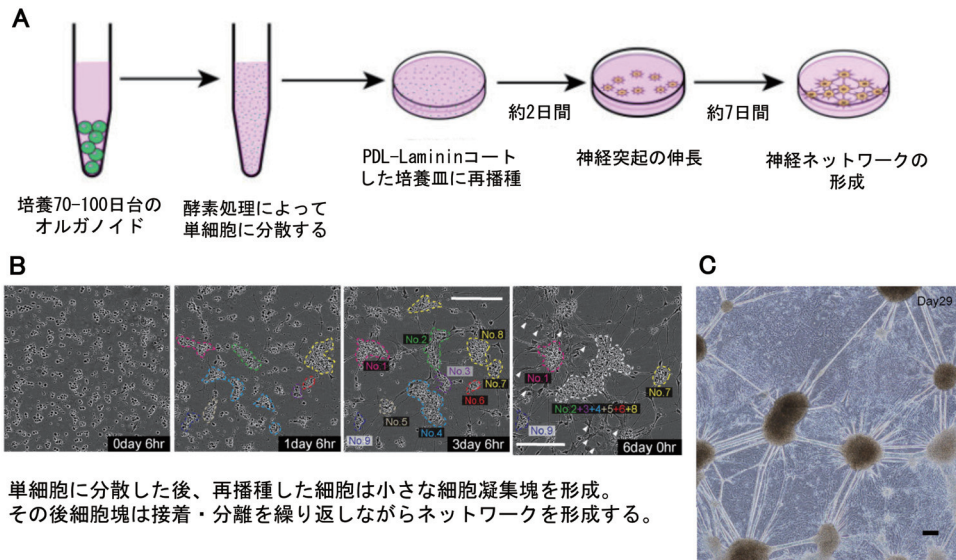


図5：大脳オルガノイドの分散培養による神経ネットワーク形成

(A)分散培養の概略。(B)分散後6日までのネットワーク形成過程。(C)分散後29日における位相差顕微鏡画像。(スケールバー：200μm(B-C))

免疫染色によって、これらの神経ネットワーク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、その周辺を取り巻く細胞はGABA作動性の抑制性ニューロンとアストロサイトからなることが確認できた(図6 A-B)。また、ネットワークの細胞はCTIP2やSATB2を発現していることから大脳の投射性神経細胞であり、かつCaMK2やSYNAPTOPHYSINの発現を認めることから成熟した神経機能を持つことが示唆された(図6 C-D)。

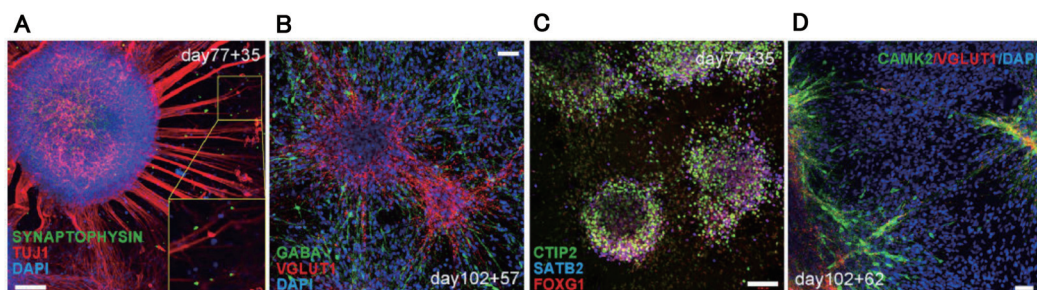


図6：大脳オルガノイド由来の神経ネットワーク

(A,C) 培養77日目の大脳オルガノイドを分散後35日経過したものの免疫染色。(B,D) 培養102日の大脳オルガノイドを分散後57日(B)と62日(D)経過したものの免疫染色。

(スケールバー：100 μ m(A,C), 50 μ m(B,D))

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イメージングで評価した(図7)。

分散2週目までにおいて神経活動は散発的で、主に非同期性の単独発火からなる神経活動を認めたが(図7 A)、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7 B)。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。以上の結果から、ヒト由来の機能的な神経ネットワークの創出が示された。

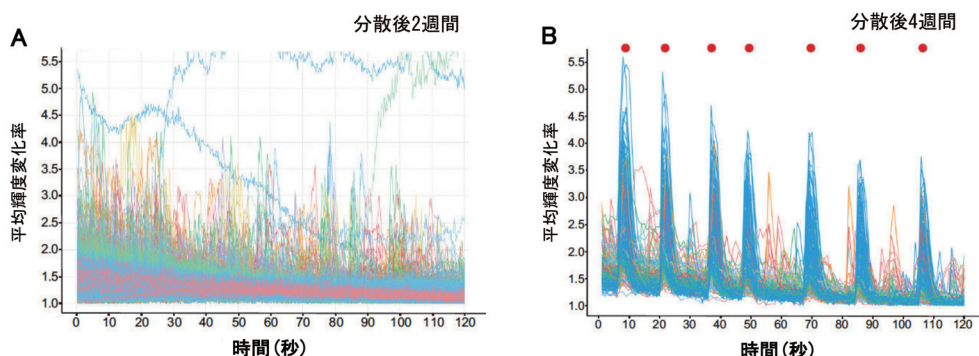


図7：大脳オルガノイド由来神経ネットワークにおけるカルシウムイメージング

(A)分散後2週間目でのカルシウムイメージング。(B)分散後4週間目でのカルシウムイメージング。赤丸で示すように、分散後4週目では複数の細胞が同期して発火することが確認できた。

4. 神経活動の包括的評価技術の確立

上記のステップによって先述の問題点1が解決された。そのため、次に問題点2の詳細な活動計測、および問題点3の包括的評価の困難の解決に挑戦することにした。ここでは、横河電機株式会社によるイメージサイトメーター CQ1と CellPathfinder の組み合わせによって取得画像・動画から網羅的にデータを抽出できるハイコンテンツアナリシスが可能であったことと、株式会社パーキンエルマージャパンによる TIBCO Spotfire のシステムが大規模

データの可視化に優れていたことから、これらの2つの会社による基盤技術を神経活動評価と組み合わせることで、複雑なヒト神経活動を詳細に評価できるシステムの構築を試みた(図8)。

ヒト神経活動の包括的評価技術の確立に向けたコンセプト

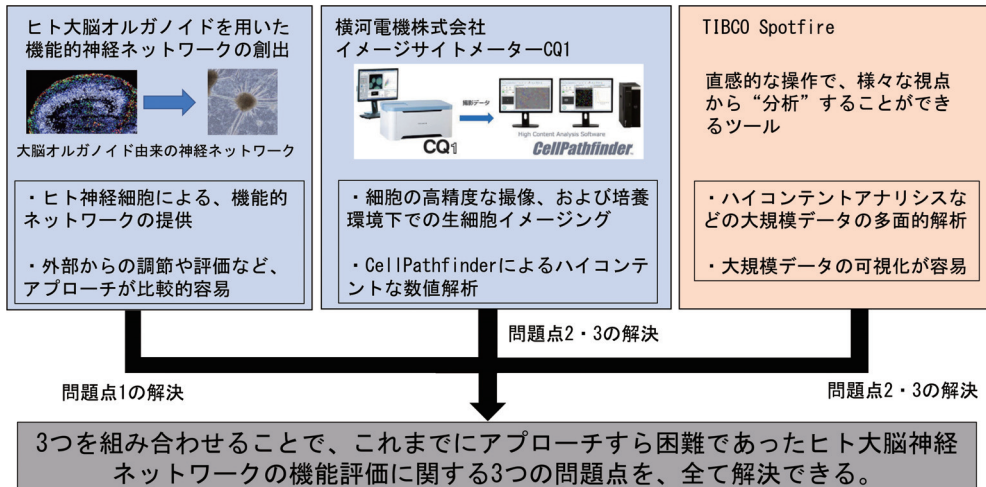


図8：ヒト神経活動の包括的評価技術の確立のコンセプト

まず、イメージサイトメーター CQ1を用いてカルシウムイメージングの動画を取得し、そこから画像解析に使う細胞の同定には CellPathfinder を用いて自動的に画像内のすべての細胞を個々に同定するよう解析条件を決定した(図9)。これによって、取得動画内のすべての細胞の活動を個々に計測し、数値化することが可能となった。

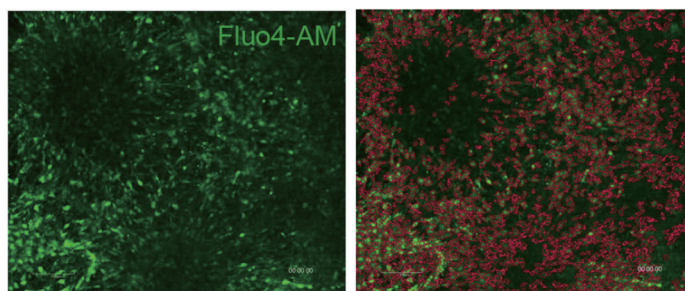


図9：カルシウムイメージングにおける全細胞の自動同定

(左) 図7Bにおける取得したイメージングの元画像。(右) 左画像における CellPathfinder を用いた自動での全細胞同定によって数千細胞の特定が容易に可能となる。

ここで、200msec～1sec 単位で数千細胞の活動を数分間取得した動画から得られた大規模なデータを可視化するため、パーキンエルマー社とのコラボレーションによって、Spotfire のソフトウェアを用いて新たな評価基盤を構築した(図10)。

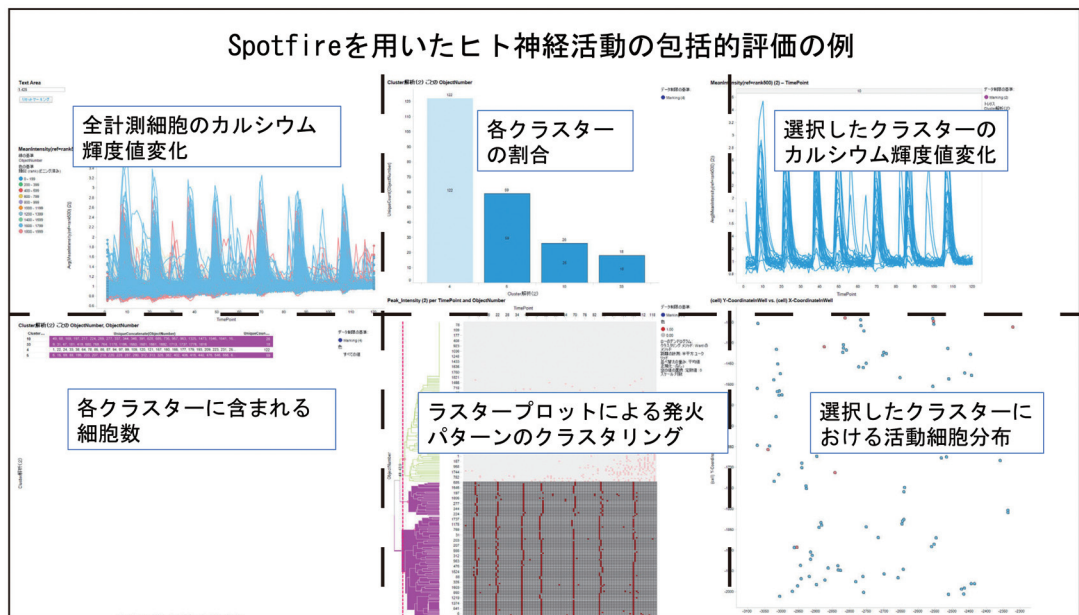


図10：Spotfire を用いたヒト神経活動の包括的評価をする際の代表的画像例

まず、Spotfire を用いることによって、数千細胞のデータにおいて、細胞の位置を示し、時系列での活動変化を示すことなどが可能となった。次に、神経活動評価として、ラスタープロットという活動した時点を点として表記し時系列での活動パターンを評価する方法を用い、このプロットパターンをクラスタリングによるパターン分類手法と組み合わせることによって、発火パターンをクラスタリングし、どのような発火をした細胞群がどこに位置していて、その発火パターンと類似した群や全く違った活動を示した細胞群との違いを示すことも可能となった(図10)。

ここで例として、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を示す(図11)。このように神経活動をこれまでになかったレベルで詳細に検討できる方法の確立によって、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。

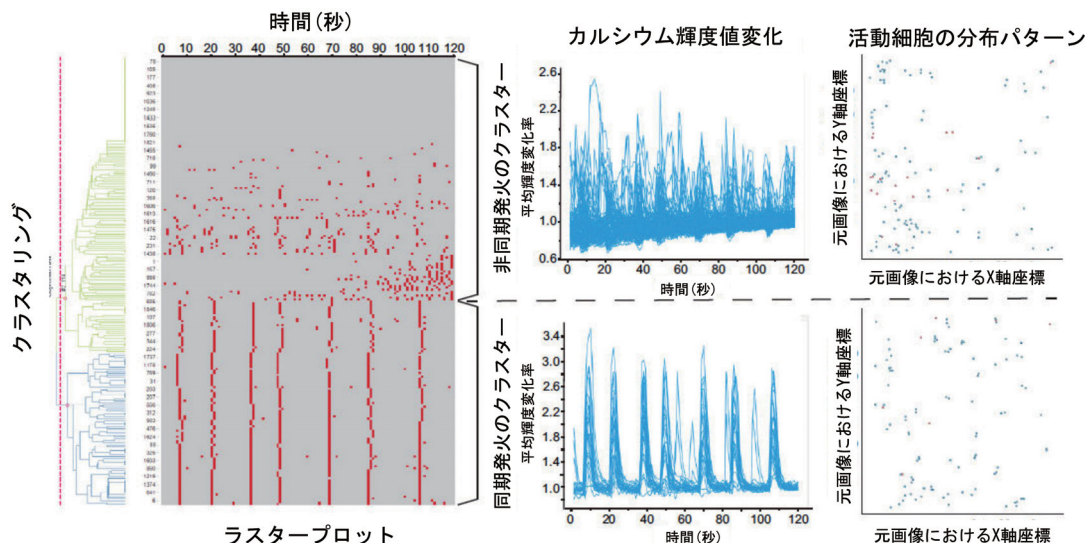


図11：Spotfireを用いた神経活動の包括的解析結果例

図7Bにおける同期発火パターンを含む複雑な神経活動をより詳細に解析。左に示されているのはラスタープロットによる発火パターンをクラスタリング解析したもので、同期・非同期発火パターンが綺麗に分けて表示されている。同期・非同期発火における発火パターンはカルシウム輝度値変化としてそれぞれ示され、またその活動細胞が画像のどこに位置しているかも同時に示すことができる。

神経活動はグルタミン酸の存在下で明らかとなり(図12 A)、GABAの添加によって著しく抑制され(図12 B)、GABA阻害剤の添加は神経活動の割合を高めたことから(図12 C)、この神経活動がグルタミン酸によって促進され、GABAによって抑制されることが示された。また、非NMDA受容体阻害剤であるCNQXによって、ごく微量で同期活動が抑制され、この神経同期活動が非NMDA受容体によって高感度に調整されていることが示唆された(図12 D)。

同期発火を認める部位では、GABA陽性細胞におけるvGlut1の数が有意に少ないことがわかった(図12 E)。この結果は、同期発火の創出には適切な興奮性と抑制性の細胞の割合が存在する可能性を示唆するものであった。

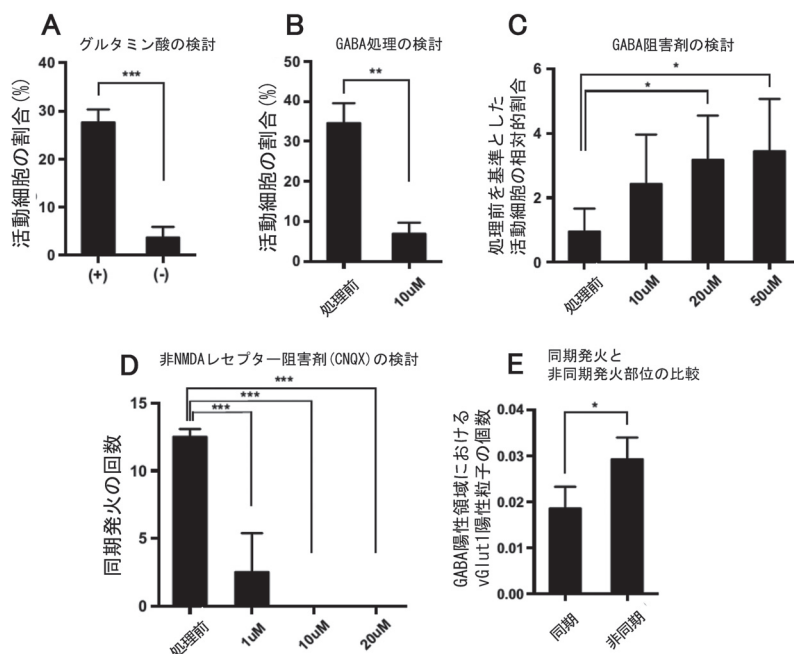


図12：大脳オルガノイド由来の神経ネットワークにおける神経活動の特性評価

(A)グルタミン酸の有無による活動細胞の割合。(B)GABA添加による活動細胞の割合の変化。(C)GABA阻害剤の添加による活動細胞の相対的割合変化。(D)非NMDAレセプター阻害剤(CNQX)添加による同期発火の回数変化(1分の計測)。(E)同期発火を呈する部位と非同期発火を呈する部位での、免疫染色によるGABA陽性領域におけるvGlut1陽性粒子の数の比較。

5. 神経活動の包括的評価技術の応用例

最後に、神経活動の包括的評価技術の応用例として、薬剤添加によるネットワークとしての神経活動の動的変化について評価した。まず、明らかに同期発火を認める部位でカルシウムイメージングを行い、次にCNQX添加によって神経活動を止め、その後薬剤を洗浄して5、10、20、30分後に同一視野でカルシウムイメージングを行なって、その神経活動の包括的評価を行った(図13)。

同期と非同期性の活動からなる神経活動がCNQXの添加によって一旦抑えられ、その活動が薬剤洗浄後に徐々に戻ってくる過程が可視化でき、神経活動の割合は薬剤洗浄後20分-30分で薬剤添加前のレベルまで戻ることが確認できたが、薬剤添加前に見られた同期発火の出現は認められなかった。また、活動神経細胞の分布についても、薬剤添加前と変わっていることがわかった。この実験系において、世界で初めて、同期発火を伴う神経活動の停止とそこからの活動再開の過程における、複雑な神経活動の動的変化を可視化・定量評価できることが可能となった。

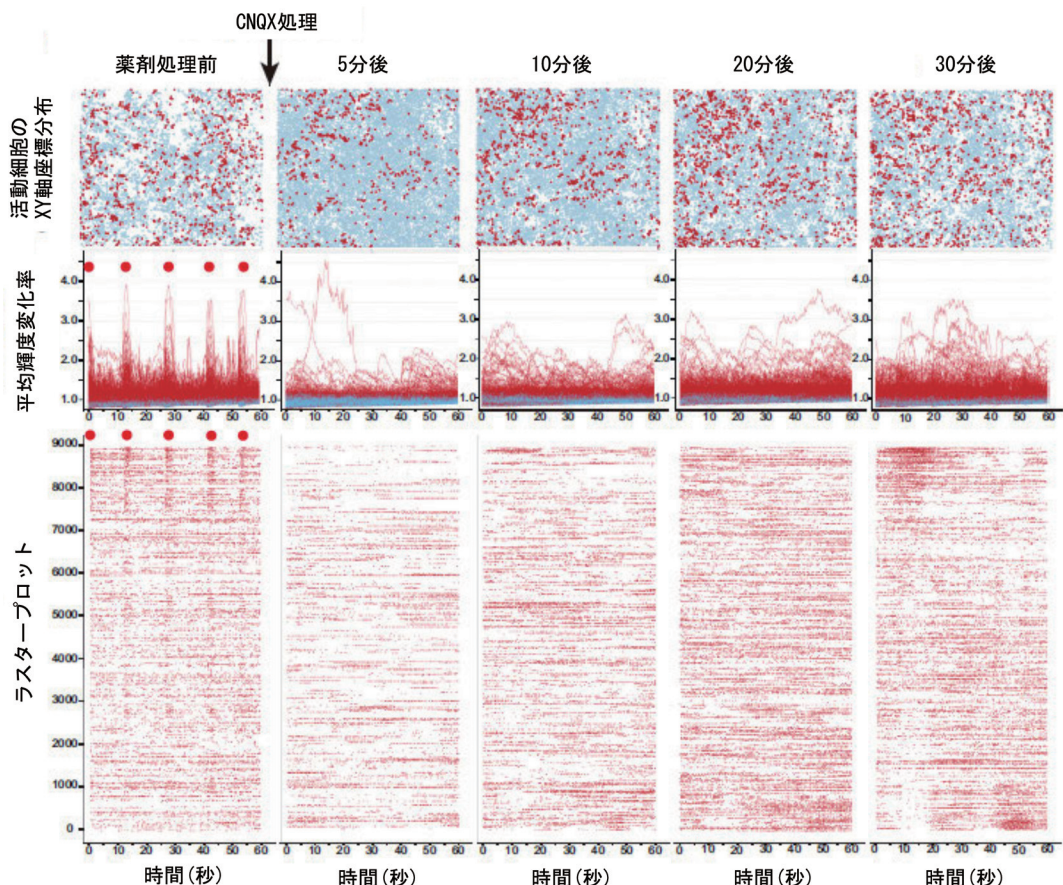


図13：CNQX添加による同期発火停止したのち、神経活動が再開する過程での同一視野での活動パターンの評価

6. 今後の展望

本研究で示した、ヒト大脳皮質の発生過程を模倣する大脳オルガノイドの分散培養を通じた神経ネットワーク構築は、これまでにアプローチの難しかったヒト大脳組織の機能評価を身近なものにする潜在性を有している。そのため、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おり、例えば想定可能な応用例として、**神経機能の異常を病態の本質とする精神疾患の疾患モデル創出や抗精神薬などの創薬スクリーニング、開発薬の毒性評価**などへの応用発展が期待できよう。実際に本評価法はヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム・神経チームにおいて、薬剤スクリーニングにおける神経細胞への安全性・毒性評価方法の一つとして採用されており、複数の製薬会社において、神経機能評価法の一つとして導入された。今後適切な病態モデルと組み合わせることで、本研究における包括的な神経機能評価が、将来的な抗精神疾患薬の開発に寄与できればと思う。

7. 結 言

ヒトの脳における神経機能異常を本質とする神経精神疾患分野では、未だに原因が明らかになっていない部分が多く、疾患モデル作成やヒトの脳機能へのアプローチも困難なため、将来的な治療の開拓のためにはツールが不足している分野といえる。にもかかわらず、変化の多い現代社会において、大うつ病性障害といった気分障害やパニック障害などの不安障害は、多くの人にとって身近な疾患になってきており、物質面だけでなく精神面でも豊かな社会の構築のためには、神経精神疾患の治療法開拓は社会的にも益々需要の高い分野となってきたと言える。本論文で報告した**大脳オルガノイド由来の神経ネットワークにおける包括的神経機能評価は、ヒト由来の神経活動を個々の細胞レベルで詳細に評価することを可能とすることで、これまで困難であった神経精神疾患の本体である神経活動異常の本質に迫ることを可能とするツールの一つとなることが期待される。**本研究が、次世代における精神面でも豊かな社会構築の実現に貢献できることを願っている。

謝 辞

筆頭申請者の坂口は、ヒト多能性幹細胞から3次元神経組織を分化誘導する先駆的研究への道に誘っていただいた理化学研究所 CDB の故笹井芳樹博士に感謝いたします。また、自身の研究を継続する機会を与えていただいた、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の永樂元次教授と、京都大学 iPS 細胞研究所の高橋淳教授に厚く御礼を申し上げ、感謝の意を表します。

参考文献

- (1) Eiraku M, et al, Cell Stem Cell, 3: 519-532, 2008
- (2) Kadoshima T, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110: 20284-20289, 2013
- (3) Lancaster MA, et al. Nature, 501: 373-379, 2013
- (4) Qian X, et al. Cell, 165: 1238-1254, 2016
- (5) Garcez PP, et al. Science, 352: 816-818, 2016
- (6) Dang J, et al. Cell Stem Cell, 19: 258-265, 2016
- (7) Watanabe M, et al. Cell Reports, 21: 517-532, 2017
- (8) Sasai Y. Cell Stem Cell, 12: 520-530, 2013
- (9) Sakaguchi H, et al. Stem Cell Reports, 13: 458-473, 2019
- (10) Sakaguchi H, et al. Nature Communications, 6: 8896, 2015