

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲 第 号
------	--------

氏 名

小寺 知輝

論 文 題 目

非ヒト霊長類 ES 細胞由来オルガノイド複合体を用いた  
脳モデルの構築

論 文 審 査 担 当 者

主 査	名古屋大学准教授	小坂田 文隆
委 員	名古屋大学教授	饗場 浩文
委 員	名古屋大学教授	人見 清隆
委 員	名古屋大学准教授	加藤 竜司

## 論文審査の結果の要旨

精神疾患領域における新規治療薬開発の成功率は他領域と比較して低い。その要因は、非臨床試験で主に使用される齧歯類では正しく薬効を評価できないことにあると指摘されている。それを打開するために、精神疾患研究の新たな非ヒト霊長類モデル動物としてコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) が注目されている。マーモセットはヒトと似た脳構造を有し、音声を用いたコミュニケーションを行うなど高い社会性を示すため、精神疾患研究の優れたモデル動物である。しかし、倫理的観点から侵襲的な実験は限定されるため、マーモセットの *in vitro* 評価系が必要とされている。そこで著者は、マーモセットを用いた脳研究を階層横断的に促進させるため、遺伝子レベルから神経回路レベルまで解析可能なマーモセット *in vitro* 脳モデルを構築することを目指した。

マーモセット脳の *in vitro* モデルを作製するために、オルガノイドに着目した。オルガノイドは多能性幹細胞から作製される3次元の細胞凝集塊を指し、様々な臓器の構造や機能を一部再現できる。しかし、現在の技術では生体において離れた異なる領域をオルガノイド内部に同時に誘導することができないという課題がある。生体脳の神経回路は主に興奮性神経細胞と抑制性神経細胞から構成され、これらの細胞種は大脳皮質と基底核原基という異なる領域から発生するため、単一領域のオルガノイドでは生体脳の神経回路形成を再現することができない。そこで、著者はこれら2種の細胞種を産生する領域を別々に誘導し、融合させることで神経回路形成を再現可能なオルガノイド複合体（アセンブロイド）を作製する手法を用い、マーモセットの神経回路形成過程ならびに神経機能を *in vitro* で再構成することを目指した。

これまでにマーモセット多能性幹細胞から脳オルガノイドの誘導は報告されていないため、本研究ではまずマーモセット胚性幹細胞（ES細胞）から大脳皮質オルガノイド、基底核原基オルガノイドへの分化誘導法を検討した。検討した誘導法をもとに作製した各オルガノイドが目的領域へと分化したことを評価するため遺伝子発現および組織構造を検証した。大脳皮質オルガノイド条件では背側終脳マーカーである *EMX2* および *LHX2* の発現と生体脳の層構造と類似した極性構造が認められ、基底核原基オルガノイド条件では腹側終脳マーカーである *NKX2.1* および *LHX6* の発現と抑制性神経前駆細胞、抑制性神経細胞マーカー発現細胞が観察された。以上より、マーモセット ES細胞から大脳皮質オルガノイドおよび基底核原基オルガノイドへの分化誘導法を確立した。

次に、本研究で作製したオルガノイド内部の神経細胞が活動を行う機能的なものであるかを評価するために、組織の深部まで観察可能な2光子顕微鏡とカルシウムセンサーである *jGCaMP8m* を組み合わせた  $Ca^{2+}$  イメージングを行った。アデノ随伴ウイルスベクターを用いて *jGCaMP8m* をオルガノイドに発現させた。培養50日台のオルガ

ノイドの  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、オルガノイド内部の神経細胞は同期的な活動パターンを示した。この神経活動パターンがオルガノイドの成熟に伴い変化するかを検証するため、培養 70 日台のオルガノイドを用いて同様の実験を行ったところ、同期的な活動は消失し、非同期的な活動パターンを示した。さらに、神経細胞の時間あたりの活動量を定量したところ、オルガノイドの成熟に伴い活動量は増加した。以上の結果より、オルガノイド内部の神経細胞は自発的な活動を示し、その活動パターンはオルガノイドの成熟に伴い非同期的に変化していくことが分かった。

次いで、これら 2 種のオルガノイドを融合し、生体脳の神経回路を模倣する大脳アセンブロイドの作製を行った。まず、蛍光タンパク質を恒常発現するレポーター ES 細胞株を樹立し、大脳皮質オルガノイドと基底核原基オルガノイドをそれぞれ異なる色の蛍光タンパク質で標識した。大脳アセンブロイドを作製したところ、基底核原基オルガノイドから大脳皮質オルガノイドへの細胞の移動が観察された。生体の脳において、基底核原基から大脳皮質への細胞移動には LHX6 の発現が関与することが報告されており、皮質-基底核アセンブロイドにおいても基底核オルガノイド側から移動した細胞は LHX6 を発現していた。さらに、このアセンブロイド内の細胞移動は基底核から皮質へと一方向に生じていた。以上の結果より、マーマセット ES 細胞由来オルガノイドから作製した大脳アセンブロイドは、生体脳と同様のメカニズムで抑制性神経細胞が大脳皮質領域へ遊走することが明らかになった。

最後に、大脳アセンブロイド内で生じる抑制性神経細胞の移動が大脳皮質の神経活動に影響を与えるか検証するために、大脳アセンブロイドにおける大脳皮質オルガノイド側の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った。大脳アセンブロイド内部の皮質オルガノイドは皮質オルガノイド単独の場合と比較して、有意に神経細胞の活動頻度が減少した。以上の結果から、大脳アセンブロイド内部において移動した抑制性神経細胞は、大脳皮質オルガノイドの神経活動に影響を与えることが示唆された。

以上、著者は、マーマセット ES 細胞由来オルガノイドから大脳アセンブロイドを作製し、生体脳の神経回路形成を模倣した *in vitro* 脳モデルの構築に成功した。マーマセット ES 細胞由来大脳アセンブロイドは、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の相互作用、大脳皮質の神経活動動態、さらにはそれらの異常を分子・細胞・回路レベルで検証できる有用なモデルとなると期待される。本研究成果は、マーマセットを用いた階層横断的な神経科学研究や系統学的な進化研究、オルガノイドや分化細胞の同種移植による再生医療研究、薬物スクリーニングなどの創薬研究に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（創薬科学）の論文として価値あるものと認める。