

# 主論文の要約

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

名古屋大学 大学院創薬科学研究科 細胞薬効解析学分野

博士後期課程 3 年 小寺 知輝

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おらず、ヒトへの外挿性が低いことにあると指摘されている。そこで、精神疾患研究の新たな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、精神疾患研究のため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、*in vivo* の代替となるようなマーモセット脳の *in vitro* 評価系が必要とされている。そこで本研究では、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、本研究では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分化誘導して作製される 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。しかしながら、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問題がある。生体脳の神経回路は大きく分けて興奮性神経細胞と抑制性神経細胞から構成される。大脳皮質のこれらの細胞種は発生中に大脳皮質脳室帯と基底核原基という異なる領域から産生されるため、単一オルガノイドでは大脳皮質の神経回路形成を再現することができない。そこで、本研究ではこれら 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* で再構成し、以下の新知見を得た。

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。そこで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オルガノイドがそれぞれ目的の大脳皮質と基底核原基へ分化したかを評価するため qPCR を行った。その結果、大脳皮質誘導条件では背側終脳マーカーである *Emx2* の発現が、基底核原基誘導条件では腹側終脳マーカーである *Nkx2.1* や *Lhx6* の発現が認められた。また、オルガノイド内部の組織構造を免疫染色により検討したところ、大脳皮質オルガノイド内には生体脳の層構造と類似した極性構造を有していた。一方、

基底核原基オルガノイドは、抑制性神経前駆細胞、抑制性神経細胞マーカーを発現しており、それぞれのオルガノイドが生体脳の対応した領域と類似した特性を有することを示唆するものであった。以上の結果より、マーマセット 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確立した。

次に、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞との神経回路を模倣するために、これら 2 種のオルガノイドを融合し、皮質-基底核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。皮質-基底核原基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。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。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。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皮質-基底核アセンブロイドは、生体脳と同様のメカニズムで基底核原基オルガノイド由来の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、本研究で作製したオルガノイドの神経細胞が脳活動に相当する機能を有す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  $\text{Ca}^{2+}$  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、非同期的な自発活動を示した。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。

また、単一遺伝子変異が神経回路へと影響を及ぼすような疾患を *in vitro* で解析することを可能にするため、精神疾患関連遺伝子を欠損させた ES 細胞株を樹立し、病態モデルの確立にも取り組んでいる。

以上、本研究ではマーマセット ES 細胞由来オルガノイドから皮質-基底核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。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の研究、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ことが期待される。