

マイクロ流体デバイスを用いて大脳オルガノイド^{*1}の血管新生因子を特定 ～血管床を活用した Microphysiological systems (MPS)～

概要

京都大学大学院工学研究科横川隆司教授、Stanislav L. Karsten 特定准教授らの研究グループは、関西医科大学医学部 iPS・幹細胞応用医学講座六車恵子教授らと共同で、血管床を有する生体模倣システム（Microphysiological systems (MPS)）にヒト iPS 細胞^{*2}由来の大脳オルガノイドを導入し、その血管化に必要な因子を特定する技術を開発しました。

幹細胞由来の大脳オルガノイドは、脳の発生過程の理解や疾患モデルへの活用が期待されているものの、機能的な血管系を持たないため長期培養が可能な試験管内モデルが実現できていません。これまでに、オルガノイドを血管化する試みは報告されているものの、機能的な血管網の発達につながる完全な血管化は、マウスへの移植によってしか達成されていません。従って、ヒト脳の発達を模倣できるオルガノイド技術を確立するためには、神経-血管相互作用の理解に基づく血管化メカニズムを理解することが不可欠です。本研究では、マイクロ流体デバイス、オルガノイド、トランスクリプトミクスを組み合わせた学際的アプローチにより、ヒト iPS 細胞由来の大脳オルガノイドに対し血管新生を促進する因子を同定しました（図 1）。さらに、これらの因子により MPS 内の血管床からオルガノイドへの血管新生が促進されることを実証しました。

生体内で起こる血管化を MPS で再現することにより、大脳オルガノイドの発生とその血管化を実時間で観察しながら長期培養することができるため、動物実験の低減に貢献します。今後は、同様のアプローチによる血管化を様々なオルガノイドに適用することで、ヒト臓器の発生を理解する基礎研究や薬剤のスクリーニングツールとして活用し、社会に貢献していくことが期待されます。

本研究成果は 2024 年 1 月 29 日に国際学術誌「*Lab on a Chip*」のオンライン版に掲載されました。

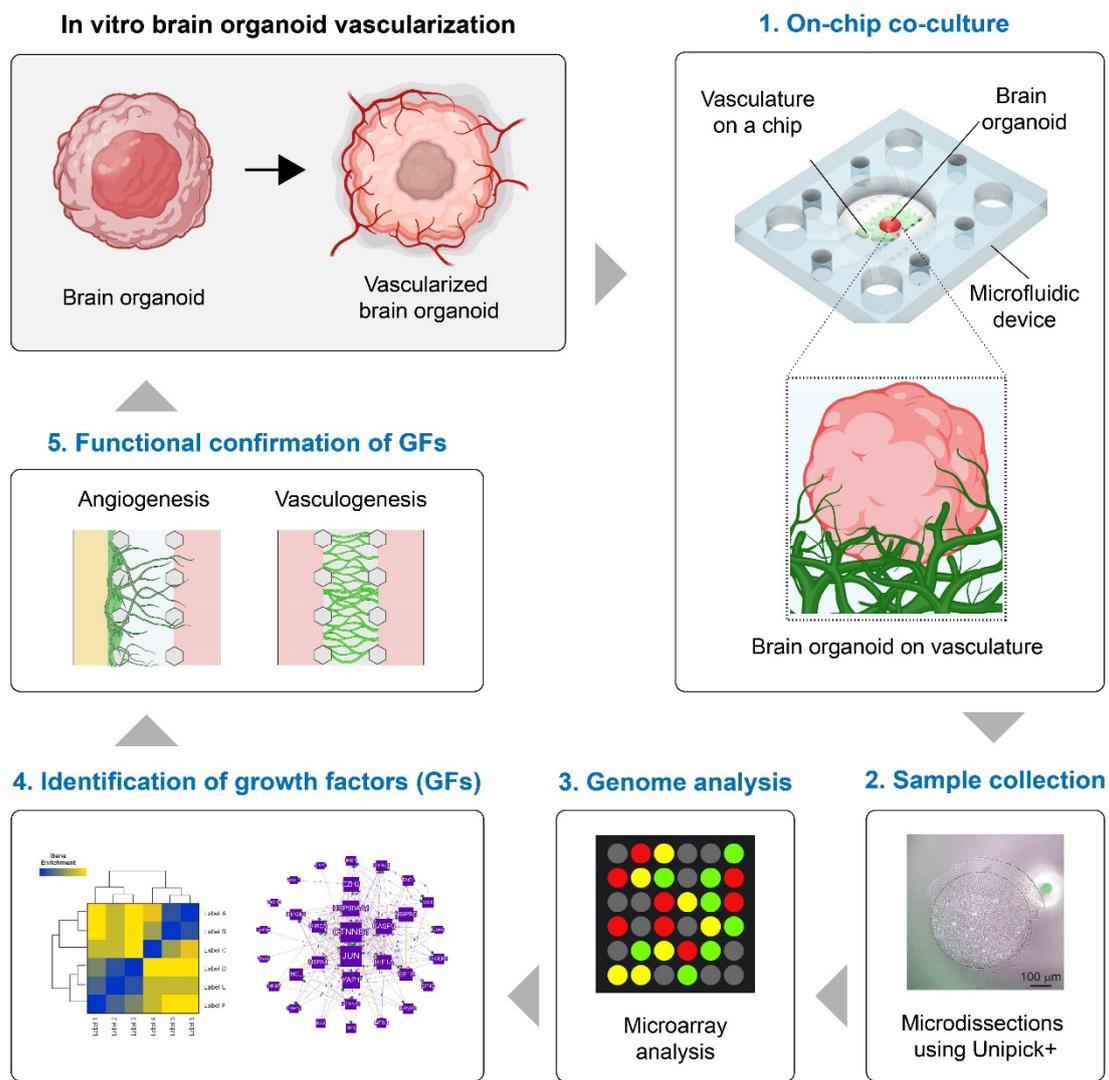


図 1：本研究の概要。

【本研究のポイント】

- ◆ 生体模倣システム（Microphysiological systems (MPS)）内に作製した血管床とヒト iPS 細胞由来の脳オルガノイドを共培養する技術を開発した。
- ◆ 脳オルガノイドに対して一時的に血管新生が促進されるものの、共培養 10 日目には形成された血管網が退縮してしまうことがわかった。
- ◆ トランスクリプトーム解析により共培養時に発現低下する血管新生因子として CYR61 と HDGF を特定し、これらを追加することで脳オルガノイドへの血管新生が促進されることがわかった。

1. 背景

各種幹細胞から作成されるオルガノイドは、ヒト臓器の発達やさまざまな病気のメカニズムを解明するための新たな強力なツールとして期待されています。しかし、現在のオルガノイド技術では、高コストな分化誘導、組織特異的な形態形成の難しさ、分化誘導時のばらつき、長期培養の難しさなどが課題です。これらの問題を解決するためのひとつとして、オルガノイドの血管化があげられます。血管は酸素や

栄養素の供給、また老廃物の排出において非常に重要です。特に脳では発生初期から血管網が構築されておりその正常な発達には不可欠です。これまでに、脳オルガノイドのマウスへの移植や、血管内皮細胞の誘導などが報告されていますが、脳オルガノイドを生体外で血管化する方法はまだ報告されていません。

一方、MPS とオルガノイド技術を融合することで、オルガノイドの分化誘導を促進したり、よりヒト臓器に近い機能を再現することが可能になってきました。我々は、ヒト iPS 細胞から作製したオルガノイドを用いて腎近位尿管上皮組織における再吸収を模倣したり、灌流可能な血管網と腫瘍スフェロイドを共培養したりする技術を報告してきました。

そこで、本研究では MPS 内にあらかじめ血管床を作製しておくことで、生体の血管網に相当する環境を準備しました。別途作製した大脳オルガノイドを血管床と共培養することで胎生期の脳環境を生体外で模倣し、オルガノイドの分化誘導、マイクロダイセクションとトランスクリプトーム解析を通して、ヒト大脳発生初期の血管新生に関与する因子を特定することに挑戦しました。

2. 研究手法・成果

まず、血管床を作製する流路とオルガノイドを培養する流路が直接接するように、ポリジメチルシロキサン (PDMS) からなる 3 層の MPS を設計しました (図 2a)。この MPS 内に血管成長因子を導入してヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 7 日間培養することで、血管床を作製しました。大脳オルガノイドはこれまでに開発済みの SFEBq 法(無血清凝集浮遊培養法)※3を用いて、健常ヒト iPS 細胞から作製し 25 日目まで分化誘導を進めたところで MPS に導入し、血管床との共培養を開始しました。

共培養開始後、3、6、10 日目つまりオルガノイドの培養日数では 28、31、35 日目において、オルガノイドへの血管化を評価しました (図 2b)。その結果、共培養 10 日目(オルガノイド培養 35 日目)においても血管床の構造や灌流能は維持されており、オルガノイドにおける神経前駆細胞の誘導も正常に進んでいることがわかりました (図 2c)。一方、血管網の形成については、共培養 6 日目まではオルガノイドを取り巻く血管網が増え内部の血管化

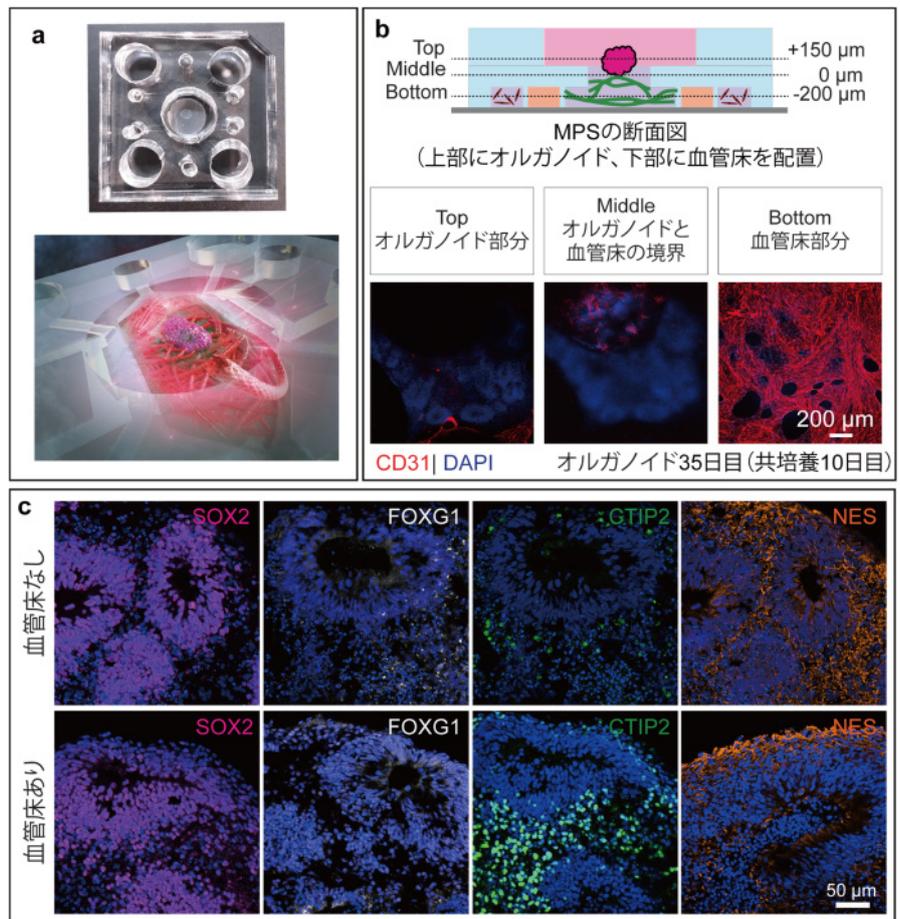


図2:a) 生体模倣システム (Microphysiological systems (MPS)) の概要とイメージ図。b) オルガノイドと血管床の配置。c) 血管床の有無にかかわらず、オルガノイドの分化誘導が進み、神経前駆細胞マーカーSOX2、FOXG1、神経分化マーカーCTIP2、神経幹細胞マーカーNESTINが発現していることがわかる。

も進むものの、共培養 10 日目には退縮することが明らかになりました。

そこで、オルガノイドを MPS から取り出してマイクロアレイ解析を実施しました。特に血管化の初期段階に関わると考えられるオルガノイド外周部の細胞のみをマイクロダイセクションにより回収し、共培養 3、6、10 日目の遺伝子発現変化を評価しました。その結果、複数の血管新生促進因子とその下流標的因子が協調的に制御されていることが明らかになりました。特に、VEGF-HIF1A-ACT ネットワークが脳オルガノイドの血管新生に関与する中心的な経路として同定されました。血管新生に関連する 324 の制御遺伝子のうち、6 つの転写産物が共培養中の血管新生に影響を与えており、これらの因子の血管新生能力を評価しました。その結果、

CYR61 と HDGF が特に高い血管新生能力を示したため、これらを用いて脳オルガノイドの血管新生を促進することを試みたところ、血管網の面積と分岐数が増加しました (図 3a)。さらに、いずれの因子も共培養 10 日目には、オルガノイド内部の血管化を有意に促進することを実証できました (図 3b)。

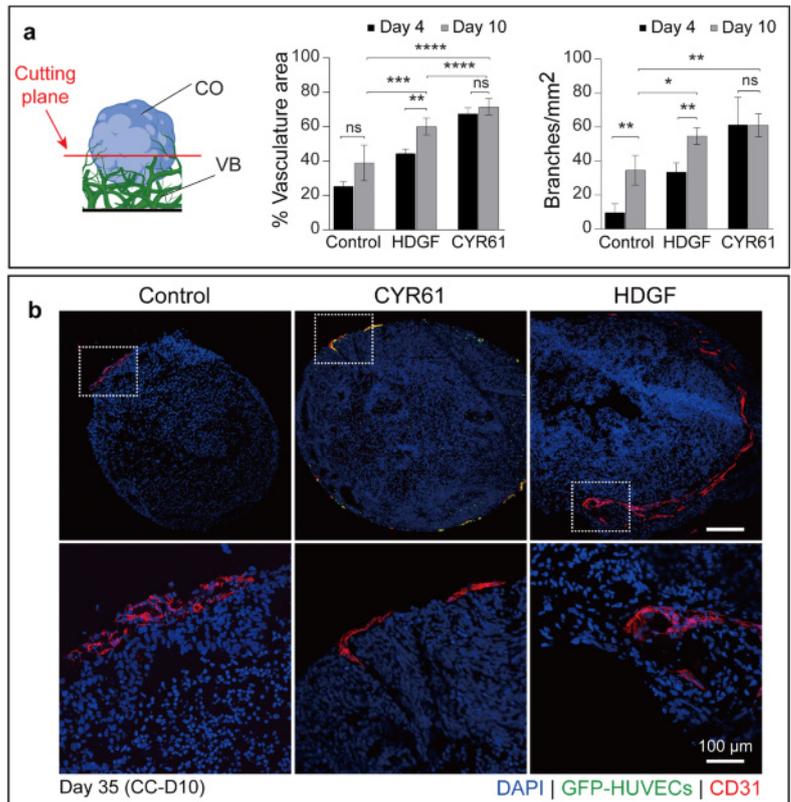


図3:a) オルガノイドの断面における血管網の面積と血管の分岐数。血管新生因子HDGF、CYR61により増加した。b) オルガノイド内部への血管侵入の様子。HDGF、CYR61により内部まで侵入していることがわかる。

3. 波及効果、今後の予定

従来的大脑オルガノイド分化誘導技術においては、効率的な血管化技術がないため長期培養による成熟化を実現することができませんでした。本研究では、新たな MPS 開発により脳オルガノイドと血管床の共培養を可能にし、さらにマイクロアレイ解析により初期の血管新生を促進する因子を特定しました。このようなアプローチは、脳オルガノイドに限らず様々なオルガノイドの血管化を促進するための基盤技術となります。今後は、オルガノイドの更なる長期培養を通じた成熟化が可能になり、ヒト臓器の発生の理解につながると共に疾患モデルを用いた薬剤開発などを通して社会に貢献していくことが期待されます。

4. 資料提供

本研究成果に関連する画像や動画資料は下記 URL よりご利用いただけます。報道で使用される場合、提供元は「横川隆司 京都大学工学研究科教授」と明記するようお願いいたします。

<https://doi.org/10.1039/D3LC00930K>

5. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) MPS プロジェクト (JP22be1004204, JP17be0304205)、

文部科学省「ナノテクノロジープラットフォーム」事業（JPMXP09F19KT0107）、JSPS 科研費（JP 22K18319）、公益財団法人ノバルティス科学振興財団、JICA FRIENDSHIP Program（No. D1956066）の支援を受けました。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Deciphering potential vascularization factors of on-chip co-cultured hiPSC-derived cerebral organoids

著者：Maneesha Shaji, 玉田篤史, 藤本和也, 六車恵子*, Stanislav L. Karsten*, 横川隆司*

掲載誌：Lab on a Chip DOI：10.1039/D3LC00930K

* 責任著者

<用語解説>

1. オルガノイド (organoid)

「臓器 (organ)」 「~のようなもの (-oid)」 からなる造語であり、in vitro（試験管内）で多細胞集団が自己組織的に形成する機能的構造体を指す。1990年代初頭にカイクメンをバラバラの細胞にしても再集合できることが明らかになったことから、幹細胞が自己組織化能を持つことが知られるようになった。2008年に理化学研究所でES細胞（胚性幹細胞）から大脳皮質の作成に成功した（Eiraku et al., Cell Stem Cell, 3, 519, 2008, DOI: 10.1016/j.stem.2008.09.002）のをきっかけに、脳をはじめとしたミニ臓器としてのオルガノイド研究が世界的に盛んになっている。オルガノイドは胚発生 の 解 明 や 創 薬 や 病 態 解 明 な どの医学的用途、進化の解明など様々な応用が期待されている。

2. iPS細胞

身体を構成するすべての種類の細胞に分化する能力（多能性）をもち、未分化なまま培養して無限に増やすことができる細胞。再生医療の材料として期待されている。胚性幹細胞（ES細胞）が発生の初期段階である胚盤胞から作られるのに対し、iPS細胞は体細胞（血液や皮膚などの細胞）に遺伝子を導入して作製される。患者さんの体細胞から作製されたiPS細胞は「疾患特異的iPS細胞」とよばれ、その病態を再現することが可能と考えられている。

3. SFEBq法（無血清凝集浮遊培養法）

SFEBqはSerum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregate with quick reaggregationの略。iPS細胞やES細胞などを酵素により単一細胞へとバラバラに分散し、これを数千個程度の細胞の塊に再凝集させたものを分化培養の材料に用いる。この細胞凝集塊を細胞非接着性加工が施された培養容器の中で、血清など神経分化阻害効果のある成分を一切含まない特殊な培養液を用いて浮遊培養するとオルガノイドとよばれる多細胞組織体を作ることができる。