

# 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

所属機関名 京都大学大学院 工学研究科

職名・氏名 博士課程1年 荻原 龍馬

## 1. 研究テーマ

代謝制御に基づく大脳オルガノイドの超長期培養法の開発

## 2. 研究背景・目的

ヒト大脳は、他の動物には見られない特有の神経細胞サブタイプや複雑な構造を持ち、これが高度な認知機能や社会性を支えている。また、脳疾患においても、ヒト特有の病態や進行様式が存在する。そのためヒト大脳の発生や機能を正確に再現するモデルを構築することは、神経科学や疾患研究における重要な課題である。こうした課題に対する革新的な手法として、ヒト多能性幹細胞 (hPSC) から誘導される三次元 *in vitro* モデルである大脳オルガノイドが開発されてきた。大脳オルガノイドは、ヒト固有の遺伝的背景を保持し、発生過程を再現することで、ヒト特有の神経細胞サブタイプの発生や脳の初期形態形成を模倣する画期的な技術である。これにより、モデル生物では捉えきれないヒト特有のメカニズムの解明が進んでいる。

大脳オルガノイドのさらなる発展は、疾患モデル構築、機能的な神経ネットワークの解析、創薬研究への応用など、広範な可能性を秘めている。しかし、こうした応用を実現するためには、長期的な生存性と成熟度の向上が不可欠である。現行の大脳オルガノイド培養は 100 日を超えると細胞死が顕著となり、発生後期の複雑な構造や機能の再現が難しい。特に、神経ネットワークの高度な発達やシナプス結合の維持が不完全であり、生体の脳組織と比べて機能的成熟度が大きく劣るという問題がある。そのため、大脳オルガノイドの長期間の培養において細胞死が起こる原因を解明し、解決する新たな培養戦略の確立が求められている。

そこで本研究の目的は、ヒト大脳の発生や機能をより正確に再現可能な大脳オルガノイド培養系の高度化に向けて、長期培養に伴って生じる細胞死や成熟不全の要因を明らかにし、超長期培養を可能にする培養戦略の基盤を得ることである。大脳オルガノイドは、ヒト特有の神経細胞サブタイプの出現や初期発生過程を再現する有用なモデルである一方、培養の長期化に伴って細胞死が増加し、後期発生様式や高次機能に関わる構造・性質の再現が困難になるという課題を抱えている。そこで本研究では、こうした制約の背景にある代謝状態の変化に着目し、とくに培養初期の酸素環境が細胞生存性および代謝関連遺伝子発現に与える影響を明らかにするとともに、周囲間葉の存在がオルガノイドの代謝状態に及ぼす影響を検討することで、長期生存性の向上につながる基礎的知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、大脳オルガノイドの長期培養における生存性低下の背景にある要因として、培養初期の酸素環境および周囲環境が代謝状態に与える影響に着目した。特に、初期低酸素条件が細胞生存性および代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響、ならびに周囲間葉の存在がオルガノイドの代謝状態に与える影響を検討した。

#### ① 培養初期の酸素環境が代謝状態に与える影響の解析

大脳オルガノイドを含む三次元 *in vitro* 培養系では、組織内部への酸素供給が不十分となりやすく、これが細胞死の一因と考えられている。一方で、生体の発生初期においては、血管網が十分に発達する以前の組織は相対的に低酸素環境に置かれていると考えられる。また、神経系細胞の生存や成熟には、単に酸素濃度の高低のみならず、酸素利用を伴う代謝経路の適切な制御が重要である。そこで、培養初期における酸素条件を変化させた培養系を設定し、初期低酸素条件がオルガノイド内の細胞死および代謝関連遺伝子発現に与える影響を解析した。細胞死については組織学的評価を行い、代謝状態については qPCR により TCA 回路関連遺伝子の発現変化を調べた。

#### ② 周囲環境の違いが代謝状態に与える影響の解析

脳は発生過程において単独で形成されるのではなく、周囲の間葉系細胞などと相互作用しながら発生が進行することが知られている。とくに周囲間葉は神経発生に大きな影響を与えることが示されている一方で、こうした周囲環境が脳組織の代謝状態やその変化にどのような影響を及ぼすかについては十分に明らかではない。そこで本研究では、周囲間葉を伴う条件と伴わない条件を比較し、代謝状態に関わる遺伝子群の発現変化を qPCR により解析した。これにより、周囲環境の再構成が大脳オルガノイドの代謝状態に及ぼす影響を探索した。

### 4. 研究の成果

本研究では、大脳オルガノイドの長期生存性に関わる代謝制御機構の理解に向けて、培養初期の酸素環境および周囲間葉の存在が代謝状態に及ぼす影響を検討した。

まず、培養初期の酸素環境の影響について検討した。予備的検討として、LDHA 阻害により解糖系依存の代謝状態から TCA 回路への移行を促進したところ、死細胞の減少が認められた。この結果は、神経細胞の生存において TCA 回路への移行が重要である可能性を示唆する。一方で、発生初期には解糖系優位であると考えられる代謝状態が、どのような機構で TCA 回路優位へと移行するのかは明らかでない。生体内では発生初期に比較的低酸素な環境が存在し、その後の酸素環境の変化に伴って代謝状態が変化している可能性があるのに対し、*in vitro* 培養系では初期から相対的に酸素が豊富であることから、この違いが代謝切り替えに影響している可能性を考えた。

この仮説に基づき、生体胎児脳と比較した際にオルガノイドで発現低下がみられた遺伝子 A に着目し、培養初期の酸素条件による発現変化を検討した。具体的には、培養初期を 5% O<sub>2</sub> で維持し、その後 20% O<sub>2</sub> へ移行させる条件を設定した。また、比較のため、解析時点まで低酸素状態を維持する条件についても予備的に評価した。その結果、低酸素状態を継続した条件では神経新生が抑制され、SOX2 陽性のラジアルグリア細胞が主体となった一方で、少なくともラジアルグリア集団において顕著な細胞死は認められなかった。さらに、通常酸素条件と低酸素条件における遺伝子 A の発現量を qPCR で比較したが、明確な差は検出されなかった。このことから、初期低酸素環境のみでは遺伝子 A の発現変化を十分に誘導できない可能性、あるいは培養系において時系列的に付加しているタンパク質や低分子化合物との相互作用の中で、酸素条件の効果が単独では顕在化しにくい可能性が示唆された。

一方で、別条件において、初期低酸素環境を経た後に TCA 回路への移行を促進した場合には、死細胞の減少と神経細胞数の増加が認められた。したがって、初期低酸素環境は単独で明確な遺伝子 A の発現変化を示さなかったものの、その後の代謝状態や神経系細胞の生存・分化能に影響を与える可能性が残されており、初期環境が後続の代謝制御に与える影響について、さらに検討する必要があると考えられた。

次に、周囲環境の違いが代謝状態に与える影響について検討した。周囲間葉を伴わない脳オルガノイドについては公開データを用い、周囲間葉を伴う脳オルガノイドについては申請者が取得した scRNA-seq データを用いた。また、比較対象として同一終齢相当の生体胎児脳の公開データを用いた。これらのデータにおいて遺伝子 A の発現を比較したところ、周囲間葉を伴わない脳オルガノイドでは、生体胎児脳と比較して遺伝子 A の発現がほとんど認められなかった。一方、周囲間葉を伴う脳オルガノイドでは、神経細胞クラスターにおいて遺伝子 A を発現する細胞が認められた。

さらに、KEGGに基づく TCA 回路関連遺伝子群からモジュールスコアを算出し、各条件で比較した。その結果、生体胎児脳では神経上皮段階から神経新生の進行に伴って、神経幹細胞および神経細胞の双方で TCA 回路モジュールスコアが上昇した。一方、周囲間葉を伴わないオルガノイドでは同スコアは全体に低い傾向を示したのに対し、周囲間葉を伴うオルガノイドでは神経幹細胞において高値を示し、神経細胞においても比較的高い値が認められた。これらの結果は、周囲間葉との相互作用が、大脳オルガノイドにおける代謝状態、とくに TCA 回路関連プログラムの活性化に寄与している可能性を示唆する。

## 5. 今後の展望

本研究により、培養初期の酸素環境および周囲間葉の存在が、大脳オルガノイドの細胞生存性と代謝関連遺伝子発現に影響する可能性が示された。一方で、現時点では死細胞の変化と一部の代謝関連遺伝子発現の変動を捉えた段階にとどまっております。どの代謝経路がどの領域で変化しているのか、また何がその変化を規定しているのかは十分に明らかではない。代謝制御による長期生存法の開発に向けては、代謝状態の記述にとどまらず、その上流因子を明らかにし、制御可能な培養条件へと接続することが必要である。

今後は、まず初期酸素条件と周囲間葉の有無を組み合わせた複数条件・複数時点で比較解析を行い、初期応答とその後の変化を区別しながら、代謝変化と細胞生存性との対応関係を整理する。その上で、オルガノイド外層と内部の違いに着目した空間解析を導入し、空間プロテオーム解析や領域分離後の分子解析により、代謝関連分子の局在差を評価する。さらに、<sup>13</sup>C 標識基質を用いたトレーサー解析により、解糖系および TCA 回路への炭素流入を評価し、遺伝子発現変化と実際の代謝フラックスとの対応を検証する。

加えて、周囲間葉の効果については、周囲環境の異なる条件や分泌因子依存性の検討を通じて、代謝状態に影響を与える上流因子の絞り込みを進める。さらに、三次元組織に内在する酸素勾配そのものが代謝状態を規定している可能性を踏まえ、将来的には組織内酸素環境をより精密に制御できる培養系へと発展させることで、代謝状態を意図的に制御し、大脳オルガノイドの長期生存性向上につなげたい。

## 6. 研究成果の発信方法

本研究助成によって得られた研究成果は、第 48 回日本分子生物学会においてポスター発表を行った。今後も国内外での学会発表、論文発表などを行なっていく予

定である。

\*特許申請計画中および論文投稿準備中であるため、具体的な遺伝子名や分子名、その他データ等については掲載を控えさせていただきます。