The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Silicate Microfiber Scaffolds Support the Formation and Expansion of the Cortical Neuronal Layer of Cerebral Organoids With a Sheet-Like Configuration
Author(s)	寺田, 栄作
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95958
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	寺田 栄作
論文題名 Title	Silicate Microfiber Scaffolds Support the Formation and Expansion of the Cortical Neuronal Layer of Cerebral Organoids With a Sheet-Like Configuration（シリカマイクロファイバー培養担体は大脳オルガノイドの皮質神経細胞層のシート状の形成と拡大をサポートする）

論文内容の要旨

［目的（purpose）］

大脳オルガノイドは、多能性幹細胞から自己組織化というプロセスを経て分化誘導される、三次元的組織構造である。大脳オルガノイドは胎児期の大脳皮質に類似する特性を有することが明らかとなり、疾患モデリングや進化生物学、創薬スクリーニング、再生医療の研究において不可欠なツールとなっている。しかしながら大脳オルガノイドは、複数が不均一に融合した形状で、大脳皮質神経細胞層は菲薄で十分成長していないなど、ヒト胎児大脳との相違点も多く、これがさらなる大脳オルガノイドの応用への障壁となっている。特に、試験管内での培養系には血管系が存在しないことから、大脳オルガノイドは成長とともに細胞塊内部への酸素の拡散が制限されることで幹細胞の生存や分化に影響が生じ、神経細胞の分化や成長が制限されていると考えられている。そこで我々はこれらの問題を解決することを目的に、シート状の三次元培養担体を用いた大脳オルガノイド法を開発した。

［方法/成績（Method/Result）］

ヒトiPS細胞を凝集させ形成した細胞塊を三次元培養担体上に配置し、SMAD阻害剤とWNT阻害剤を用いて、前脳領域に選択的に神経分化誘導を行った後、マトリゲルに包埋し、振盪培養をすることにより、培養担体上で大脳オルガノイドを成長させた。複数の培養担体を検討したところ、繊維の太さが1μmの不織布状のシリカマイクロファイバーからなる三次元培養担体を用いると大脳皮質神経細胞層が内部に形成されていくことが明らかとなった。さらにその神経細胞層は培養担体内部にシート状に広がり、培養担体の厚さに依存して拡大した。その厚さは培養担体を用いない大脳オルガノイド（従来法）の最大9.43±0.78倍となった。さらに、cleaved caspase 3陽性細胞を定量すると、従来法に比べて大きく減少していた。培養担体内は細胞密度が75.6±2.2%と従来法に比べて緩和されており、適度な細胞間隙の存在が組織内への栄養・酸素供給を改善したものと考えられた。定量的PCR法による各種マーカーの定量では、多能性幹細胞のマーカーであるOCT4の発現レベルは分化誘導後に速やかに大きく減少し、前脳領域のマーカーであるFOXG1や大脳皮質神経細胞のマーカーであるTBR1、CTIP2、SATB2、グルタミン酸作動性神経細胞のマーカーであるVGLUT1の発現レベルは経時的に上昇することが確認された。各種マーカーの発現を免疫組織化学法で定量・比較すると、培養担体内の細胞構成は従来法と同等であることが示され、培養担体は大脳皮質神経細胞の分化効率に影響を与えないことが明らかとなった。組織構築を評価すると、神経幹・前駆細胞のマーカーであるPAX6陽性細胞が形成する神経管を模倣した神経ロゼットは培養担体内部には形成されず、表面に形成することが確認され、NESTIN陽性の線維は培養担体内に広く伸展していた。胎児脳における大脳皮質の組織極性や、それを生み出す放射状グリア構造に類似していると考えられた。またPAX6陽性細胞は散在性に培養担体内にも見られ、その一部はHOPX陽性であり、外側脳室下帯放射状グリアと呼ばれるヒトの大脳皮質進化に重要な役割を持つと考えられる細胞も存在することが明らかとなった。さらに培養担体内での大脳皮質神経細胞マーカーの局在を検討するとTBR1, CTIP2（下層のマーカー）陽性細胞は、SATB2（上層のマーカー）陽性細胞よりも近位側に位置する傾向があることが明らかとなり、胎児脳に見られる原始的な層構造を有することが明らかとなった。多光子顕微鏡を用いて三次元構成するとシート内の神経突起は水平方向に伸びていた。定量的PCR法ではシナプスマーカーの経時的な上昇を認めており、免疫組織化学法ではシナプス小胞が少ないながらも存在しており、未熟なシナプスが形成されていることが示唆された。また、多光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより、個々の神経細胞は自発的に発火していることが観察され、これらが機能的に成熟したグルタミン酸作動性ニューロンに分化していることが示唆された。

［総括（Conclusion）］

本研究ではシリカマイクロファイバーからなる三次元培養担体を用いることで、大脳オルガノイドの大脳皮質神経細胞層を従来法に比較して飛躍的に成長させるとともに、その形状をシート状にすることに成功した。今後、ヒト大脳皮質形成障害症の疾患モデル開発・病態解明をはじめとした基礎研究や、生体工学・再生医療への応用などが期待されると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　寺田 栄作

		（職）	氏　　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	貫島 晴彦	印
	副　査	大阪大学教授	宮川 一繁	印
	副　査	大阪大学教授	西田 幸二	印

論文審査の結果の要旨

大脳オルガノイドは多能性幹細胞から自己組織化というプロセスを経て分化誘導される三次元的組織構造であり、胎児期の大脳皮質に類似する特性を有することが明らかとなっている。しかし、大脳オルガノイドは不均一に融合した形状や皮質層が菲薄であることなど、ヒト胎児大脳との相違点も多く応用への障壁となっている。本論文において、大脳オルガノイドをシリカマイクロファイバー上で誘導することで、大脳オルガノイドの皮質神経細胞層の成長を促進する新しい方法を開発した。シリカファイバー内部には従来の大脳オルガノイドよりも厚い皮質神経細胞層が形成され、胎児大脳皮質に類似した層構造が認められた。また、シート内部の神経細胞は神経突起伸長能と電気的活動を示したが、シナプス形成は未熟であった。本方法を利用することで今後、大脳皮質の発達や滑脳症、皮質異形成、胎児脳への薬剤作用などの研究に役立つと考えられ、この研究成果は学位の授与に値するものと認める。