

2022年9月9日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

# 次世代型認知症モデル脳オルガノイドの作製に成功 - 認知症患者の病理をミニチュア脳内で再現ー

脳オルガノイドは、構造・機能的に生体組織に近いことから疾患モデルへの応用が期待されています。慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之教授、嶋田弘子特任講師らのグループは、iPS細胞から脳オルガノイドの作製方法を改良し、アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD、注1)患者由来iPS細胞から作製した脳オルガノイド(注2)において、ADの主要な病理の一つであるアミロイドプラーク様の構造を再現することができました。また、アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus; AAV、注3)を用いて変異型タウタンパク質(注4)を脳オルガノイドに強制発現させることで、タウ線維形成を模倣した次世代型タウオパチー(注5)モデル脳オルガノイドを作製することに成功しました。これらの認知症モデル脳オルガノイドは、病理の一部を再現しているミニチュア脳と考えられ、認知症の病態メカニズムの解明、創薬スクリーニングや創薬候補の検証に応用できる有用な基盤技術となることが期待されます。

本研究成果は、2022 年 9 月 8 日(米国東部時間 EST)、学術科学雑誌 *Cell Reports Methods* オンライン版に掲載されました。

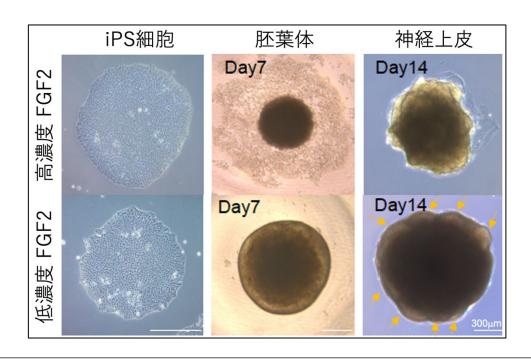
#### 1. 研究の背景と概要

これまでに、認知症モデルマウスから多くの知見が得られているものの、疾患モデルマウスが必ずしもヒトの病態を反映しているわけではないという問題点があります。一方で、病理解剖による剖検脳組織は貴重な検体であるものの、神経変性が起こった後の状態を示しており、さらには患者様の脳組織へのアクセスは限られていることが認知症研究の課題になっています。これらに対しiPS 細胞から作られる脳オルガノイドは、ヒト脳を模倣した3次元の構造体であり、神経変性が進行している状態を再現できる可能性があるため、認知症研究を進めるための有望なアプローチです。脳オルガノイドは、複数の細胞種から成り神経細胞の成熟度が高いことなどから、将来、動物モデルに代わる疾患モデルとしての応用が期待されています。そこで、家族性 AD 患者由来iPS 細胞から脳オルガノイドの作製を試みました。

#### 2. 研究の成果と意義

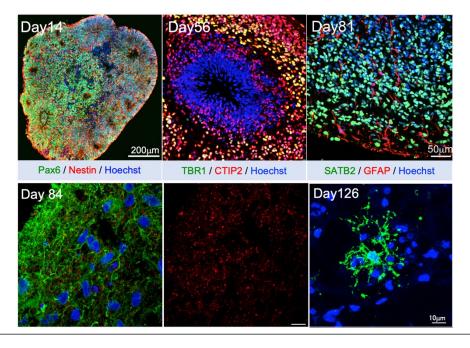
iPS 細胞の維持には、フィーダー細胞との共培養が必須とされてきました。ところが近年、フィーダー細胞を用いない、維持操作が簡略化されたフィーダーフリー(Feeder free; ff) iPS 細胞(注 6) が主流になってきました。ff-iPS 細胞を用いると、脳オルガノイドへの分化誘導

を開始する際に、フィーダー細胞が持ち込まれないという利点があります。しかし、ff-iPS 細胞からの脳オルガノイドの作製は効率が低く、また、培養バッチ間における作製効率の差が大きいことが問題となっていました。そこで本研究グループは、ff-iPS 細胞から脳オルガノイドを効率よく作製するために、iPS 細胞の維持に必須な因子である FGF2 (注 7) の濃度に着目しました。培養液中の FGF2 の濃度を、通常の 1/10 程度の濃度に下げて脳オルガノイドへの分化誘導を開始したところ、脳オルガノイドの前段階にあたる胚葉体の形成効率が安定し、多くの神経上皮構造ができるようになりました(図 1)。このようにして作製した神経上皮構造から神経細胞、アストロサイト、さらにオリゴデンドロサイトといった生体脳を構成する種々の細胞を含む脳オルガノイドを作製することができました(図 2)。



【図1】ff-iPS細胞からの胚葉体、神経上皮形成

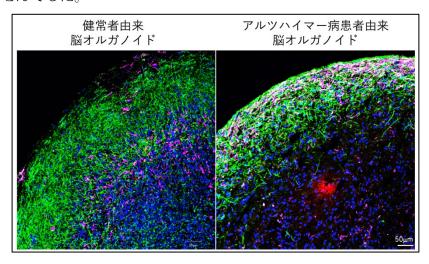
ff-iPS 細胞の培養液中の FGF2 の濃度が低濃度の場合には、高濃度の場合に比べて、 安定して胚葉体を形成することができ、多くの神経上皮様構造(下段右、黄色い矢印で示す)が観察された。



【図2】脳オルガノイドの免疫染色像

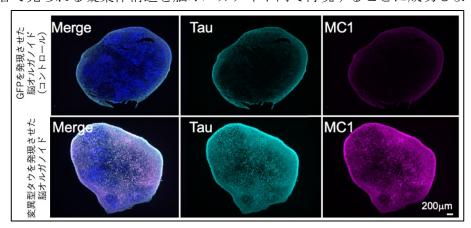
培養 14 日目では、神経幹細胞(緑、赤)が観察され(上段左)、その後、培養 56 日目には深層神経細胞(緑、赤)(上段中央)、培養 81 日目には浅層神経細胞(緑)に加えてアストロサイト(赤)も生み出された(上段右)。培養 84 日目には、神経細胞に発現して神経伝達に関与するシナプトフィジン(下段左、中央の赤いドット、緑はタウタンパク質、)が多数観察され、培養 126 日目には、オリゴデンドロサト(緑)の存在を確認することができた(下段右)。

この方法を用いて、AD 患者由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作製したところ、培養 120 日目の AD 患者由来脳オルガノイドにおいて、 $\beta$  アミロイド(注 8) からなるアミロイド プラーク様の構造が観察されました(図 3)。しかしながら、タウの凝集までは観察することができませんでした。



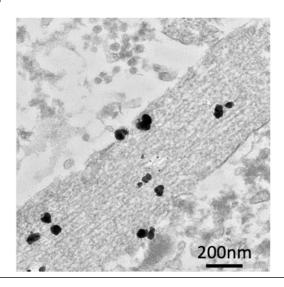
【図3】AD 患者由来脳オルガノイドにおけるアミロイドプラーク様構造 培養120日目のAD 患者由来脳オルガノイドでは、アミロイドプラーク様構造(赤) が観察された。緑はタウタンパク質、ピンクはアストロサイトを示す。

そこで、脳オルガノイドに AAV をガラス針で注入して、タウオパチー患者で見られる変異 (P301L) を持つタウタンパク質を過剰発現させました。その結果、免疫染色によりタウ凝集体の存在が示され(図 4)、それらが界面活性剤に対して不溶性を獲得していることから、タウオパチー患者脳でのタウ凝集体と同様の生化学的性質を持つことが示されました。さらに、この凝集体の免疫電子顕微鏡観察により、タウ線維構造の形成が認められ(図 5)、タウオパチー患者で見られる凝集体構造を脳オルガノイド内で再現することに成功しました。



【図4】タウオパチーモデル脳オルガノイドの免疫染色像 脳オルガノイドに AAV を用いて変異型タウを過剰発現させたところ(下段)、MC1 抗体陽性の凝集したタウ(ピンク)が、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させたコントロール(上段)と比べて顕著に観察された。

今回本研究グループは、脳オルガノイドの作製方法を改良し、脳オルガノイドへの AAV 注入方法を確立して、従来のタウオパチーモデル細胞よりも、タウオパチー患者で見られる タウ凝集に更に迫る、タウオパチーモデル脳オルガノイドを作製することができました。本 研究グループが作製した認知症モデル脳オルガノイドは、認知症病態メカニズムの解明や、 創薬スクリーニングや創薬候補の検証に応用できるヒト細胞モデルとして、有用な基盤技術 になるものと期待されます。



【図 5】 タウオパチーモデル脳オルガノイドの電子顕微鏡による解析 タウオパチーモデル脳オルガノイドでは、免疫電子顕微鏡解析により、MC1 抗体で 標識される(黒いドットで示す)タウ線維構造が観察された。

#### 3. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 医療研究開発革新基盤創成事業 (CiCLE) 「産医連携拠点による新たな認知症の創薬標的創出」、エーザイ株式会社からの 共同研究費の支援を受けて行われました。

# 4. 論文

英文タイトル: A next-generation iPSC-derived forebrain organoid model of tauopathy with tau fibrils by AAV-mediated gene transfer

タイトル和訳: AAVを介した遺伝子導入による、タウ線維形成を模倣した次世代型タウオパ チーモデル脳オルガノイド

著者名:嶋田弘子、佐藤裕太、佐々木貴史、下沢明希、今泉研人、信藤知子、宮尾幸代、 喜山公輔、近藤崇弘、芝田晋介、石井聖二、黒光淳郎、青柳浩史、伊東大介、 岡野栄之

掲載誌: Cell Reports Methods

DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100289

### 【用語解説】

- (注 1) アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD): 認知症の一種で、8 アミロイドというペプチドの細胞外での蓄積と、タウというタンパク質の細胞内での蓄積に伴って神経細胞死が引き起こされて脳が萎縮すると考えられている。
- (注 2) 脳オルガノイド: iPS 細胞などの多能性幹細胞から、神経発生を模倣して三次元培養により作られる、脳に似た立体的な構造体。神経幹細胞、神経細胞、アストロサイトなどの、生体脳を構成する複数の細胞種を含む。
- (注3) アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) ベクター: 細胞に感染して 目的の遺伝子を導入することができるウイルスベクター。安全性が高く、動物への 遺伝子導入に適している。
- (注 4) タウ:微小管に結合して微小管を安定化するタンパク質。神経細胞に豊富に存在する。タウの凝集、蓄積が認知症発症に関係すると考えられている。
- (注 5) タウオパチー: タウタンパク質が細胞内に異常に蓄積することにより発症する神経変性疾患の総称。アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺などが含まれる。
- (注 6) フィーダーフリー (Feeder free; ff) iPS 細胞: iPS 細胞はこれまでフィーダー細胞と呼ばれる細胞上で維持されてきたが、現在は、フィーダー細胞を用いないフィーダーフリーiPS 細胞が主流になっている。フィーダーフリーiPS 細胞の培養液中には、高濃度の FGF2 が添加されている。
- (注7) FGF2: 塩基性線維芽細胞増殖因子。生体内で多くの組織に発現している成長因子

であり、FGF2 に特異的な受容体タンパク質に結合してシグナルを伝達する。ヒト iPS 細胞を含むヒト多能性幹細胞の培養液に含まれる重要な因子である。

(注 8)  $\beta$  (ベータ) アミロイド: アミロイド $\beta$  前駆体タンパク質から切り出される約 40 アミノ酸残基から成るペプチド。アルツハイマー病患者の脳では、 $\beta$  アミロイドが 過剰に蓄積してアミロイド斑(老人斑)と呼ばれる凝集体が沈着することが知られている。

ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

# 【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 生理学教室

教授 岡野栄之(おかのひでゆき)

TEL: 03-5363-3747 FAX: 03-3357-5445 E-mail: hidokano@keio.jp

http://www.okano-lab.com

## 【本リリースの発信元】

慶應義塾大学

信濃町キャンパス総務課:山崎・飯塚・奈良

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL: 03-5363-3611 FAX: 03-5363-3612 E-mail: med-koho@adst.keio.ac.jp

https://www.med.keio.ac.jp/