

京都大学	博士（工学）	氏名	Maneesha Shaji
論文題目	Establishing Cerebral Organoid on a Chip Model for In Vitro Vascularization and Disease Modeling (血管化および疾患モデリングのためのオンチップ脳オルガノイドの確立)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、機能的な血管系を有する脳オルガノイドを培養するためのマイクロ流体デバイス、脳オルガノイドの血管形成に関わる因子の同定、および提案したデバイスの神経疾患モデルへの実用性を実験により検証したものであり、6章から構成されている。</p> <p>第1章は序論であり、本論文の背景、目的、提案する研究方法、論文全体の構成について述べている。まず、ヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）由来の脳オルガノイドは、ヒト脳の発生や疾患発症をモデル化するための強力なツールであることが述べられている。しかし、現在の脳オルガノイドには、機能的な血管系がないことが欠点であることを指摘している。生体における脳の血管形成は、ヒト発生の機序にしたがって高度に組織化されており、複数の制御因子の入力が必要であるため、従来の細胞培養法ではこれを模倣することが困難である。このような複雑な血管形成プロセスを <i>in vitro</i> で再現するためのマイクロ流体技術の利点とその有用性について、詳細を説明している。また、これまでに脳オルガノイドを血管化するための様々な生化学的手法が報告されているものの、完全な血管化を可能にするモデルは存在しないことを述べ、脳オルガノイドの血管形成を促進するためのマイクロ流体デバイスの利用を提案している。さらに、本論文の第2章から第5章において報告された研究結果の概要を述べ、本論文の全体的な構成について説明することで締めくくられている。</p> <p>第2章では、hiPSC 由来の脳オルガノイドを予め形成された3次元血管床の上で共培養するためのマイクロ流体デバイスの開発と、それによるオンチップ脳オルガノイドモデルの確立について述べている。5本のチャンネルから構成されるデバイス内には、フィブリンゲルがマイクロピラー間の表面張力により各チャンネルに維持されることを利用して細胞をパターンニングした。血管新生因子を産生するヒト肺繊維芽細胞（hLF）培養チャンネル、培地導入チャンネル、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）が自己組織化により血管床を作製するチャンネルからなる。hLFとHUVECの7日間の共培養により血管床を作製した後、無血清凝集浮遊培養法を用いて作製した脳オルガノイドを10日間共培養した。デバイス内では、神経分化培地と血管内皮細胞増殖培地を混合した培地を利用し、脳オルガノイドの神経系分化と血管床の成長の両方に必要な栄養素を同時に供給した。その結果、この環境における脳オルガノイドの神経細胞系は維持されること、あらかじめ形成された血管床は長期培養中も灌流可能であることが示された。また、10日間培養した脳オルガノイドの表面には、血管床から内皮細胞が伸展してくる様子が観察された。しかし、オルガノイド内部への血管の浸潤は観察されなかった。従って、共培養システムを最適化し、より効率的に行うことが重要であることを述べている。</p> <p>第3章では、第2章で確立したマイクロ流体デバイス上で共培養した脳オルガノイドの初期血管形成に関与する分子メカニズムを理解するためのスクリーニング方法について述べている。ここでは、オルガノイド周辺部の細胞が産生する血管新生因子が、血管床からの血管新生を誘起するという作業仮説を立てた。血管新生が始まる際に関与する血管新生因子の制御ネットワークを特定するために、マイクロアレイを用いて脳オルガノイドの全トランスクリプトーム解析を実施した。この際、オルガノイドの最外層の細胞のみを選択的に取得し、中心部の低酸素条件で培養された細胞を除外することにより、血管内皮細胞と接触している細胞のみにおけるトランスクリプトーム</p>			

の変化を検出することを可能にした。細胞のサンプリングは、初期の血管新生反応が起こる共培養 3 日目、血管伸展が起こる共培養 6 日目、血管新生が阻害される共培養 10 日目とした。マイクロアレイ解析の結果、共培養 6 日目までに血管新生が活性化され、最外層の細胞と内皮細胞の相互作用により血管新生が生じる可能性が示唆された。しかし、血管新生因子は共培養 10 日目には顕著に低下した。この解析により、VEGF-HIF1A-AKT ネットワークにおける複数の血管新生因子とその下流標的の協調的な制御が明らかになった。さらに、この解析を通して、血管新生を促進する 6 つの成長因子 CYR61、HDGF、HDGFRP3、MANF、sFRP1 および FGF13 を抽出することができたため、これらを含む培地を用いることで脳オルガノイドの血管化を検討した。それぞれの成長因子の血管新生および脈管形成に対する活性をマイクロ流体デバイスにより評価したところ、CYR61 と HDGF が灌流可能な血管網を形成することが明らかになった。この結果に基づき、CYR61 と HDGF の存在下で脳オルガノイドを血管床と共培養したところ、オルガノイドへの血管伸展および貫入が見られ、血管形成が改善されることが明らかになった。

第 4 章では、オルガノイド用の培地に含まれる亜セレン酸ナトリウムが、オンチップ血管床の形態と機能に与える影響について報告している。亜セレン酸ナトリウムは、無血清培地に含まれる抗酸化物質で、抗血管新生作用がある。第 2 章および第 3 章の結果から、脳オルガノイドが内部まで血管化しなかったことは、混合培地の使用が一因であると考え、亜セレン酸ナトリウムが血管形成に及ぼす影響を評価した。hLF を用いて形成した HUVEC の血管床に対して、異なる濃度の亜セレン酸ナトリウムを曝露することで、オルガノイドの有無に関係なく亜セレン酸ナトリウム特異的な血管系への影響を評価した。高濃度 (3.0 μM) の亜セレン酸ナトリウムに曝露すると、最初の数日間で血管構造が失われ灌流できなくなり、血管壁の透過性が低下した。低濃度 (3.0 nM) では、長期間の培養が可能であり形態に顕著な変化は生じなかったが、血管壁透過性が上昇した。生体模倣システムでは、血管内皮細胞が組織内に機能的で灌流可能な血管様ネットワークを構築し、血管網を介した組織の成熟と有害物質の除去を促進することが必須であるため、亜セレン酸ナトリウムによる血管壁透過性の上昇は組織の機能障害や細胞死につながる恐れがある。さらに、血管新生因子や細胞接着因子の遺伝子発現を評価することにより、VEGF 発現の上昇や細胞間結合の破壊、あるいはその両方により血管壁透過性が上昇した可能性が示唆された。

第 5 章では、第 2 章で確立したオンチップ脳オルガノイドモデルを神経疾患のモデル化に応用することを提案している。血管化が不完全な脳オルガノイドでは、その内部において低酸素状態が発生しやすく、細胞の成熟化が阻害されたり細胞ストレスが増加したりする可能性がある。血管床との共培養後 3 日目、6 日目、10 日目のオルガノイドについて、中心部の低酸素領域の細胞のみを取得してマイクロアレイ解析を実施し、その後 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて遺伝子発現を比較解析した。オルガノイドの血管化が進む共培養 6 日目には、認知学習、生物の成長、脳の発達に関連する遺伝子が活性化され、神経発達症や神経変性疾患に関連する遺伝子が不活性化されていた。一方、血管化が阻害される共培養 10 日目には、認知学習、生物の成長、脳の発達に関連する遺伝子も不活性化し、神経発達症や神経変性疾患に関連する遺伝子は活性化していた。この結果は、オルガノイドにおける血管新生の重要性を示すとともに、オンチップ脳オルガノイドモデルが初期疾患のバイオマーカーを研究する基盤技術になることを示したと述べている。

第 6 章は本論文の結論であり、本論文における研究の結果とその意義について論じるとともに、今後に向けた展望について述べている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、脳オルガノイドを 3 次元血管系と共培養することにより血管化オルガノイドを作製するマイクロ流体デバイスモデルを報告し、神経変性疾患研究への応用により本モデルの有効性を実証したものである。得られた主な結果は以下の通りである。

1. 脳オルガノイドを血管床と共培養するためのマイクロ流体デバイスを設計・製作した。血管床とオルガノイドを共培養することで、神経細胞系は維持されること、あらかじめ形成された血管床は 10 日間の共培養中も灌流可能であることが示された。

2. オルガノイドの周辺部に血管内皮細胞が観察されたが、内部への血管浸潤は観察されなかった。そこで、オルガノイド最外層の細胞をマイクロアレイで解析した結果、共培養 6 日目には血管新生が活性化されたが、共培養 10 日後には抑制されることが明らかになった。また、オルガノイドと血管内皮細胞の間には VEGF-HIF1A-AKT 経路を介した相互作用があり、これがオルガノイドの血管新生を誘起する主要な経路であることが示された。

3. トランスクリプトーム解析により、血管床と 10 日間共培養したオルガノイドにおいて血管新生因子の発現が著しく抑制されていることを明らかにした。マイクロ流体デバイスを用いて、これらの因子に対する血管新生能および脈管形成能を評価することで、血管形成を最も惹起する成長因子として CYR61 および HDGF を見出した。

4. オルガノイド培地の必須成分である亜セレン酸ナトリウムを長期間添加した場合、血管の形態は変化しないものの、低濃度でも血管壁透過性が増加することを明らかにした。これは、VEGF の調節異常と細胞間結合の破壊に起因するものであり、共培養の微小環境制御に重要な知見である。

5. 脳オルガノイドの血管化が不十分な部位についてトランスクリプトーム解析を実施することにより、脳オルガノイドと血管網の共培養系が神経疾患のモデリングに有用であることを示した。血管新生が抑制されると、脳奇形や運動障害に関連する疾患マーカーが上昇することがわかり、この共培養システムが疾患解析ツールとして有用であることを示した。

本論文では、脳オルガノイドと血管網の共培養系を実現するモデル構築について述べ、脳発生と神経疾患研究に向けた系統的方法論を確立した。本論文の脳オルガノイドモデルは、定量的な実験結果によって十分に確立されており、これらの革新的な知見は、脳神経-血管相互作用やそれによる脳発生の理解に有用であると認められる。さらに、神経疾患のモデルとして活用すれば、創薬研究における初期疾患バイオマーカーの同定に利用できることを示しており、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、2023 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問をおこなって、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規定第 14 条 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。