

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム事業
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト体内時計全身制御の解明と新規眠剤創薬のための時計中枢オルガノイドの研究
開発

(英語) Development of Central Clock Organoids for elucidation of the mechanism of
systemic regulation of human circadian clock and drug discovery of hypnotics

研究開発実施期間: 令和3年6月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 田宮 寛之
(英語) Hiroyuki TAMIYA

研究開発代表者 所属機関・部署

(日本語) 京都府公立大学法人 京都府立医科大学 大学院医学研究科・統合生理学

(英語) Department of Physiology and Systems Bioscience, Kyoto Prefectural University of Medicine,

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

代表者は、ES 細胞から機能的 SCN を高効率で誘導し、成熟させることに成功した。誘導された SCN 組織 (SCN オルガノイド) の免疫染色では AVP, VIP などの強発現密集領域が観察され、Core/ Shell の構造もある程度再現されていた。シングルセル RNA Seq (scRNA Seq) では、S, R, R, L, N, V, R, S, G などの SCN 特異的遺伝子群の発現が高く、視床下部 scRNA Seq の既報 (Romanov Nature 2020) と重ね合わせると、成体視床下部のわずかに 0.7% に過ぎない SCN が 20% 以上誘導されており、非常に高効率な実験系であることが示された。この高い誘導効率を活用し、時系列 8 点での scRNA Seq により SCN の分化系譜を明らかにすることができた。また、時計遺伝子の発光イメージングでは、神経活動依存的な 2 週間以上減衰しないロバストな振動が観察され、SCN にしか存在しない細胞時計の同期機構が証明された。さらに SCN 破壊マウスへの移植では、SCN 破壊で消失したピリオドグラムでの行動リズムピークが回復した。総じて視交叉上核オルガノイドの製造方法・機能的視交叉上核を高効率に誘導する技術の開発に成功した。また、SCN オルガノイド技術はヒト iPS 細胞へも応用可能なことを確認でき、概日リズム障害治療薬のスクリーニングにも有望と考えられた。現在は、われわれが開発に成功した SCN レポーター iPS 細胞を使用し、発生学的な知見を用いることで更なる効率の向上に努めている。また、SCN オルガノイド・PVN スライス共培養系の構築に成功し、現在解析を進めている。さらに、朝型・夜型各々の被検者各 2 名の活動量計・質問票のデータを取得し、各被検者が極端な朝型・夜型の表現型を持っていることを確認した。現在これらの被検者の血球細胞からテイラーメイド創薬を目指したクロノタイプ別 SCN オルガノイド作製に向けて iPS 細胞の樹立を進めている。

The circadian clock exists in nearly all cells throughout the body, but in mammals, the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus functions as the central clock, conveying time information to the entire body. Despite dramatic advances in brain organoid technology over the past 15 years, there have been no reports of induced SCN. Using our experience in modeling circadian rhythm disorders with embryonic stem (ES) cells (Tamiya Sci Rep 2016), we report the successful high-efficiency induction and maturation of functional SCN from mouse ES cells. Immunostaining of the induced SCN organoid showed dense expression areas of AVP and VIP, and the Core/Shell structure was also partially recapitulated. Single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq) showed high expression of SCN-specific genes such as S, R, R, L, N, V, R, S, G, etc. Comparison with previously reported hypothalamic scRNA-Seq data (Romanov Nature 2020) revealed that the SCN, which constitutes only 0.7% of the adult hypothalamus, was induced at a rate of over 20%, indicating an exceptionally high-efficiency system. This high induction rate allowed us to elucidate the differentiation lineage of SCN at eight time points using scRNA-Seq. Furthermore, bioluminescence imaging of clock genes showed robust oscillations that did not decay for over two weeks, dependent on neural activity, proving a synchronization mechanism unique to SCN cells. Additionally, transplantation into SCN-ablated mice seemed to restore the behavioral rhythm peaks in the periodogram that were lost due to SCN destruction. Since SCN organoid technology is also applicable to human iPS cells, it is considered promising for screening therapeutic drugs for circadian rhythm disorders. (Tamiya (corresponding author), et al, in preparation; JP2023-087986)