

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15753

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝オルガノイドによるヒト胎児肝造血の再現

研究課題名(英文) Composing the human fetal liver niche for HSC using human iPSC-liver organoids.

研究代表者

角出 啓輔 (Sumide, Keisuke)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：20826458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの血液細胞を産生する造血幹細胞は、胎児の肝臓内で最も活発に増殖すると報告されているが、そのメカニズムは解明されていない。一方、胎児肝組織を多数回収し研究利用することは困難である。そこで、本研究では、ヒトiPS細胞から誘導した胎児肝を構成する3種の細胞を3次的に組合せたiPS肝オルガノイドを作製し、ヒト臍帯血造血幹細胞を移植することで、擬似的に胎児肝造血環境を模倣することを着想した。本研究で、ヒトiPS細胞から誘導した肝芽細胞及びiPS肝オルガノイド中では、胎児造血様の活発な赤血球分化が認められた。一方で、HSCの増殖は認められず、まだ要素が足りないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト造血幹細胞(HSC)特性を維持したまま体外で維持培養または増殖培養できれば、難病に対する遺伝子治療や献血に頼らない輸血用製剤の開発等、待望される数々の技術を実現化する。現在、数種報告のあるHSC増幅技術は、その機序に不明点が多く、HSCが活発に増幅する胎児肝環境における細胞同士の関係性を理解する必要があった。本研究では、ヒトiPS細胞由来肝芽が胎児造血に特徴的な赤血球分化の促進を認めたものの、現時点ではHSC自身の増殖は認められなかった。一方で、ヒトHSCは肝細胞の成熟に寄与する示唆を得た。本研究成果は、HSC増殖を支持する、より高度なヒト肝オルガノイド構築法界へ津への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to almost blood cells. HSCs have been reported to proliferate most actively in the fetal liver. However, the mechanism of that has not been elucidated. On the other hand, it is difficult to collect a large amount of fetal liver tissue for research use because of the ethical reasons. In this study, to mimic the environment of the human fetal liver HSC niche, I tried to make-up the fetal-liver-like organoids composed by human iPSC-derived hepatoblasts, stellate cell-like cells and sinusoidal endothelium-like cells. Then, human cord blood HSCs were included or transplanted into the organoids. As the results, fetal hematopoietic-like active erythroid differentiation was observed in HSC coculture system with hepatoblasts and the organoid. On the other hand, less proliferation of HSC was observed. These data suggest that the elements of fetal liver environments are still lacking in the organoids.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒト造血幹細胞 肝オルガノイド 胎児造血

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞(HSC)は、全ての血液細胞の起源である。この HSC は HSC 自身を産生する能力を持ち、生涯に亘って血液細胞を供給する。ヒト HSC は移植医療が普及しているほか、先天性血液疾患に対する HSC の遺伝子治療や安定かつ大量の輸血製剤の開発等の革新的医療への応用が期待されている。しかし、HSC 特性に関する知見の多くはマウス研究に由来し、体外で急速に活性を失う性質のためにヒト HSC の特性解明は難しく、体外的ヒト HSC 活性維持法確立が渴望されてきた。申請者は、胎児肝臓環境で活発に増殖する HSC の特性に着目し、胎児肝臓がヒト HSC 増幅を支えるメカニズム解明を目標とした。しかし、倫理的に胎児肝臓そのものを研究対象とするのは難しい。そこで、ヒト胎児肝組織を代替する技術の確立が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、胎児肝臓がヒト HSC 増幅を支えるメカニズム解明を目標とし、人見らが開発したヒト iPS 細胞から胎児型肝細胞への分化技術とヒト臍帯血（胎児由来）HSC の超高度純化技術を用いて、ヒト胎児肝造血環境の再現を目指す。

3. 研究の方法

1. ヒト iPS 細胞由来胎児肝構成細胞の分化誘導とヒト臍帯血 HSC との共培養

ヒト iPSC より肝芽細胞(iHep)、星細胞様細胞(iSC)、類洞内皮様細胞(iSEC)を誘導し、各種細胞とヒト臍帯血 HSC を 10 日間共培養した後、HSC 分画細胞の増殖を検討した。

2. *In vitro* における、ヒト iPS 細胞由来胎児肝様 LB の作製

上記 iHep、iSC、iSEC を誘導し、アルギン酸培養キットやマトリゲル等キット並びに回転浮遊培養法を用いて混合し、3D スフェロイド培養を実施した。スフェロイドを 14 日間培養した後、構成細胞の生存及び細胞活性を測定した。

3. *In vivo* における、ヒト iPS 細胞由来胎児肝様 LB の作製

上記 iHep、iSC、iSEC を誘導し、マトリゲル中にて混合し、NSG マウス腎被膜下に埋設した。移植後 2-4 週後に移植片を摘出し、生存細胞・移植片の重量・構成比率を検討した。

4. 研究成果

本研究では、コロナウイルス流行による研究活動の障害並びに研究代表者の異動による研究体制の再構築等によって研究計画は大幅に遅れている。現在は、これまでに得られた知見をもとに研究計画を遂行している。これまでに、本研究において以下の知見を得た。

1. ヒト iPS 細胞由来胎児肝構成細胞の分化誘導とヒト臍帯血 HSC との共培養を実施した。

- A. iHep とヒト臍帯血 HSC とを共培養した結果、HSC をヒト成人骨髄由来間質細胞(MSC)と共培養した場合と同等に HSC 分画(Lineage⁻CD34^{hi}CD133^{hi})の割合を維持した。しかし、細胞の増殖率は MSC との共培養時に比べて 32% (±26%, n=12) 低い結果となり、iHep 単独と HSC との共培養系では、HSC の増幅は認められなかった。一方、iHep-HSC 共培養の結果、MSC との共培養では認められない、高い赤芽球系細胞の出現を検出した。

- B. ヒト iPS 細胞より iSC を誘導したところ、マーカー分子 ALCAM, PDGFR β 及び CD271 を細胞表面に高発現し、中皮細胞マーカー podoplanin 及び mesothelin を発現しない間質細胞を誘導した。これらの一部はレチノール蓄積を認めた。また、iSEC は、リンパ管マーカー Flt-4 及び特異的マーカー LYVE1 を細胞表面に発現し、adrenomedullin 存在下にてヒアルロン酸及びヒトアルブミンを取込み、顆粒状に蓄積する性質を認めた。これら iSC または iSEC とヒト臍帯血 HSC とを共培養した結果、いずれも、HSC-MSC 共培養系と同等の細胞増殖率並びに HSC 分画の維持を認めた。一方、HSC の分化特性に対する影響は殆ど認められなかった。
2. まず、iHep(2~5x10⁶ 細胞)・iSC・iSEC をそれぞれ 5:1:4 の割合でマトリゲル培地中に播種すると、不正球形な各種細胞混合スフェロイドが形成された。ここに 2,000 個のヒト臍帯血 HSC を同時播種したものの、HSC は肝スフェロイドに収納されることはなく漏出した。次に、一旦複数の 100 μ m 前後のスフェロイドを上記の割合で形成し、マトリゲル封入を試みたところ、一旦スフェロイドになった細胞塊が自己組織化を示すことはなかった。そこで、100~200 個の上記マイクロスフェロイドを回転浮遊培養系に適用した。その結果、直径 15mm 前後の 2 つのスフェロイドが形成されたが、14 日間培養段階で構成細胞を測定したところ、スフェロイド中の iSC 及び iSEC は殆ど消失し、iHep のみ生存していた。このことから、長期間培地に晒されたマトリゲルは、37°C 環境でも基質が漏出していくことが示唆された。そこで、今度は、温度・水分量による変化の少ないアルギン酸ビーズを試みた。上記細胞を、それぞれ 2-4mm 長のアルギン酸ビーズに封入した。ここに、ヒト臍帯血 HSC を 2,000 個/ビーズで同時封入したところ、HSC 非存在下に比べて、培養 10 日目におけるヒトアルブミン及びヒト α -fetoprotein の分泌量が増大した。また、胎児造血に特徴的な活発な赤芽球分化を観察した。しかし、封入された HSC の増殖は他の方法よりも障害された他、それぞれ iHep, iSC 及び iSEC と接触することはなく、HSC 分画自体も大きく増殖することはなかった。
3. iHep(0.1~30x10⁶ 細胞)・iSC・iSEC をそれぞれ 5:1:4 の割合でマトリゲルに封入し、スフェロイドを形成させ、NSG マウスに移植した。しかし、十分な数の HSC を移植するに足る十分な大きさの移植片が形成されなかった。移植片を回収したところ、マトリゲル中における実質の細胞数自体は input よりも減少している他、血管構造の形成も認められなかった。また、腎被膜下では HSC 移植が難しいことから、皮下への肝スフェロイド移植を実施したが、これも同様の結果であった。

以上より、これまでに、胎児肝造血環境を十分に模倣可能な肝オルガノイドを形成することは出来ていないが、形成した肝オルガノイドは *in vitro* にて胎児肝に特徴的な赤血球系造血を認めた。これらのことから、iHep, iSC, iSEC を混合するだけでは胎児肝環境を模倣するには未だ十分ではないことが示唆された。そこで、現在、ヒト成人骨髄由来間質細胞及び HUVEC 細胞を同時に封入する方法を検証している。一方、*in vitro* において、ヒト HSC の存在によって肝実質細胞 (iHep) の特性が強化させる現象を観察したことから、現在では、ヒト HSC の存在が iPSC-hepatoblast に対して与える影響の評価についても計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuoka Yoshikazu, Sumide Keisuke, Sonoda Yoshiaki	4. 巻 15
2. 論文標題 One-Year Observation of the SCID-Repopulating Cell Activities of Human Cord Blood-Derived CD34-Positive and -Negative Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 459 ~ 461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12015-019-09884-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumide Keisuke, Matsuoka Yoshikazu, Sonoda Yoshiaki	4. 巻 70
2. 論文標題 A novel model of human hematopoietic stem cell (HSC) hierarchy in cord blood with CD34-negative (CD34-) HSC at the apex, revealed from single-cell-based analyses of human HSC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Kansai Medical University	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5361/jkmu.70.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------