

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21597

研究課題名(和文)スフェロイド・デザインによる原腸由来臓器作成技術の開発

研究課題名(英文)Development of primitive-gut-derived organ bioengineering methods based on spheroid designing.

研究代表者

岡本 隆一 (Okamoto, Ryuichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50451935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞由来原腸スフェロイドの高効率作成法の開発及び融合・分化能の解析を通じ、スフェロイド作成法の最適化を行い、一定のサイズ制御を行いながら均一かつ大量のスフェロイドの作成及び分化誘導が可能となった。また同スフェロイドについて、超免疫不全マウスへの生体移植により一定期間で生着し、サイズの増大や原腸由来臓器特異的機能の獲得が促進されることが確認された。以上の結果より、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉(Definitive Endoderm)を経て原腸由来の複臓器への分化誘導を行うために生体内外の環境を利用する手法が各々確立し、その基盤となる知見・手法の最適化が進展した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い効率で任意のサイズを有する原腸スフェロイドを作成可能であるばかりでなく、同法で作成したスフェロイドが極めて高い融合指向性と体外環境における原腸由来臓器への分化能を兼ね備えていることを利用し、任意の形状・サイズを有する原腸由来前駆体から原腸由来組織を分化誘導する「スフェロイド・デザイン」を可能とするための基盤となる知見が確立された。

研究成果の概要(英文)：Through our development of a highly efficient iPS cell-derived primitive-gut spheroid production and the analysis of their fusion/differentiation potential, we have optimized the spheroid-forming method. Also, we have succeeded in developing a method to produce a highly uniform and abundant number of primitive-gut spheroids under the control of their final size and regulate the differentiation of those spheroids. In addition, we have confirmed that those or spheroids can engraft within a certain period after transplantation to severely immunodeficient mice, and also acquire tissue-specific functions and increase their tissue size in vivo. From these results, we have succeeded in developing methods and essential knowledge to induce differentiation from human iPS cells to primitive-gut-derived tissue via the definitive endoderm with the help of both in vitro and in vivo experimental environments.

研究分野：消化器内科学

キーワード：iPS細胞 原腸由来臓器 スフェロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは広汎な腸管機能欠損に対し、移植治療に利用可能な腸組織を体外で構築するため、iPS細胞を用いた臓器作成・分化誘導法の開発に取り組んできた。この過程で、中・後腸由来組織の基となる細胞で構成されるスフェロイドを均一・大量に作成する技術の開発に成功した。また同技術で作成したスフェロイドは高い融合指向性と有し、かつ腸管組織への高い分化能を兼ね備えていることから、任意のサイズ・形状を有する中・後腸由来臓器が体外で作成する“スフェロイド・デザイン”が可能と考え研究開発を実施している。同技術を応用・展開することにより、より幅広い原腸由来臓器をデザインし体外で構築・作成する技術が開発可能となると考え、本研究を着想している。幅広い原腸由来臓器にも展開することで、さまざまな臓器の体外作成技術が開発可能となるだけでなく、複数臓器機能を兼ね備えた臓器を作成する技術へと発展されることも期待される。

2. 研究の目的

消化管を含む原腸由来臓器は消化・吸収・代謝を司るだけでなく、多彩なホルモン分泌機能等を介して全身機能の調節・制御を司る極めて重要な役割を果たしている。このため、これら臓器の機能的廃絶・破綻を来した病態である短腸症候群・肝硬変・糖尿病等の疾患や先天的な原腸由来臓器機能欠損を来す諸疾患においては、必要な原腸由来臓器を体外で製造・構築し、欠失した機能を代替・補完することが可能となる治療技術の開発が切望されている。iPS細胞等の多能性幹細胞から原腸由来組織をミニ臓器「オルガノイド」として培養する技術は、本邦の研究者らが先導し研究開発が推進されてきた(Takebeら, Science, 2019)。これら研究を通じ、一定サイズのオルガノイドとして腸・肝臓・膵臓・胆管等の原腸由来臓器をiPS細胞よりin vitroで分化誘導し、機能的に再構築することが可能となっている。しかしながら現在のオルガノイド技術ではサイズ・形状の制御が困難であり、このため患者に応じて必要なサイズ・形状をデザインし、特異的機能を兼ね備えたオーダーメイド臓器をiPS細胞から作成・提供することは未だ極めて困難である。研究代表者らは広範な消化管機能廃絶を来すクローン病等の難病に対する新規治療に関する研究の中で、移植治療に用いることが可能なヒトiPS細胞由来腸組織の体外構築・製造法の開発に取り組んできた。その過程で、大型臓器作成における技術的な障害となっていた原腸スフェロイドを均一・大量に作成する新手法の開発に成功している。同法を用いることにより、高い効率で任意のサイズを有する原腸スフェロイドを作成可能であるばかりでなく、同法で作成したスフェロイドが極めて高い融合指向性と体外環境における原腸由来臓器への分化能を兼ね備えていることを利用し、任意の形状・サイズを有する原腸由来前駆体から原腸由来組織を分化誘導する「スフェロイド・デザイン」が可能であることを実証済みである。本研究では従ってこれら新技术・知見をより幅広い原腸由来臓器にも展開し、任意のサイズ・形状を有する全ヒト原腸由来臓器を体外で作成可能な技術の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトiPS細胞より任意デザインの原腸由来臓器を作成するための基盤技術を確立するため、以下3つの課題を計画期間2年で実施した。1) iPS細胞由来原腸スフェロイドの高効率作成法の開発: 複数のiPS細胞株を用い、中・後腸スフェロイドと同様に任意サイズの原腸スフェロイドを均一・大量に作成するための培養条件ならびに誘導技術の最適化を試みる。スフェロイド作成に用いるプレートの形状・表面加工等に加え、播種時の細胞密度や培地構成等についても詳細に条件検討を実施する。2) iPS細胞由来原腸スフェロイドの融合・分化能の解析: 作成した原腸スフェロイドが適切な融合指向性を有するか、低接着プレート上での融合試験を実施する。また原腸由来臓器への分化能を有するか、細胞株毎の指向性も考慮し検討を加え、臓器毎の分化誘導法について最適化を図る。3) 生体内移植による原腸スフェロイド由来臓器の特異的機能獲得の検証: 作成した原腸スフェロイドを任意のサイズ・形状に融合することにより原腸由来臓器の前駆体を作成し、さらに2)にて最適化した手法により分化誘導を行った後、超免疫不全マウスへの皮下移植を行い生体内における成熟能の検証等を行う。

4. 研究成果

1) iPS細胞由来原腸スフェロイドの高効率作成法の開発

ヒトiPS細胞由来の胚体内胚葉(Definitive Endoderm)への分化誘導について条件検討を行った。この結果、ActivinA等の分化誘導因子を一定期間用いることにより、複数のiPS細胞株に於いて内胚葉特異的遺伝子の発現上昇が確認可能な条件が確認された。これに基づき、以後の分化誘導については同検証において設定した条件を用いて初期分化誘導を行う方針とした。同法に依りiPS細胞からヒト内胚葉への分化方向づけを行った以降、Wnt等の複数の細胞内シグナル系を賦活・阻害する条件の差異に依存し、特に原腸における前後方向の運命決定に明確な差異が

生じ、前後方向の部位特異的な遺伝子発現を誘導可能であることが確認された。これら結果から、原腸由来臓器を誘導する際に基盤となる適切な原腸スフェロイドの作成・調製方法の基盤が確立した。

2) iPS 細胞由来原腸スフェロイドの融合・分化能の解析

1)において最適化したスフェロイド作成条件の下で分化誘導を進め、古典的な手法で3次元スフェロイド化をすることが可能であったが、形成されるスフェロイドのサイズは不均一かつサイズの制御が極めて困難であった。しかしながら研究代表者らが開発した手法を基に新たに開発した手法を用いることにより均一かつ一定のサイズ制御を行いながら大量のスフェロイドが作成可能であった。また同スフェロイドの分化誘導を継続することにより、一定の腸上皮形質等の原腸由来臓器に特異的な機能や遺伝子発現を誘導可能であることを複数のiPS細胞系統を用いて確認した。以上の結果より、ヒトiPS細胞より、胚体内胚葉 (Definitive Endoderm) を経て原腸由来の複数臓器への分化誘導を行うための基盤となる知見が得られた。

3) 生体内移植による原腸スフェロイド由来臓器の特異的機能獲得の検証

1)及び2)において最適化したスフェロイド作成及び分化誘導条件の下で均一な3次元化を行い、分化の方向づけを行ったスフェロイドについては、培養添加因子の最適化により生体外環境下におけるサイズの増大や原腸由来臓器特異的機能の獲得が誘導できることが確認された。また同スフェロイドについて、超免疫不全マウスへの生体移植により一定期間で生着し、サイズの増大や原腸由来臓器特異的機能の獲得が促進されることが確認された。以上の結果より、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉 (Definitive Endoderm) を経て原腸由来の複数臓器への分化誘導を行うために生体内外の環境を利用する手法が各々確立し、その基盤となる知見・手法の最適化が進展した。

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 Tsuchiya Mao, Ito Go, Hama Minami, Nagata Sayaka, Kawamoto Ami, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kuno Reiko, Takeoka Sayaka, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Mizutani Tomohiro, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 542
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40～47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.021	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 Kuno Reiko, Ito Go, Kawamoto Ami, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Takeoka Sayaka, Nagata Sayaka, Takahashi Junichi, Tsuchiya Mao, Anzai Sho, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Notch and TNF- signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100906～100906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100906	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水谷知裕、岡本隆一、渡辺 守
2. 発表標題 炎症性腸疾患に対する上皮再生医療
3. 学会等名 第48回 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本隆一
2. 発表標題 東京医科歯科大学における内視鏡を用いた基礎研究の取り組み
3. 学会等名 第101回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okamoto R
2. 発表標題 Organoid-based regenerative and precision medicine for IBD
3. 学会等名 KDDW2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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