

平成30年9月3日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05677

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来臓器原基移植操作技術の最適化

研究課題名(英文) Optimization of human iPS cell derived liver bud transplantation

研究代表者

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)

横浜市立大学・先端医科学研究センター・教授

研究者番号：20612625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代表者が開発した複合組織誘導技術の医療応用を目指すための第一歩として大量かつ均質な小型の肝臓原基をiPS細胞から作製するための基盤的細胞操作技術を開発した。さらに、さまざまな移植部位を比較することにより、機能発現に最適な移植床を選定した。大量製造したAll-iPSC肝臓原基をマウス肝不全モデルの腎被膜に移植すると、このマウスの生存率が有意に改善されることを示した(Cell Reports, 2017; Cell Reports, 2018)。また膵島を用いた劇症糖尿病を対象とした応用可能性についても示唆を得た。臓器移植の代替治療の実現に向けて、重要な基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Organoid technology provides a revolutionary paradigm towards therapy, yet to be applied in humans mainly because of the reproducibility and scalability challenges. Here, we overcome these limitations by evolving scalable organ bud production platform entirely from human iPSC. First, we identified effective progenitor populations for generating liver buds in a highly reproducible manner: hepatic endoderm, endothelium and septum mesenchyme. Furthermore, we achieved human scalability by developing an omni-well-array culture platform for mass-producing homogenous and miniaturized liver buds on a large scale (>10⁸-scale). Vascularized and functional liver tissues generated entirely from iPSC significantly improved subsequent hepatic functionalization, enabling functional rescue against acute liver failure via transplantation. Overall, our study provides a stringent manufacture platform for multi-cellular organoid supply, thus facilitating clinical and pharmaceutical applications.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 移植外科学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導研究において、従来の「細胞の分化誘導」という開発概念から脱却し、異なった細胞系譜の時空間的な相互作用を活用した、「臓器の再構成に基づく分化誘導」を実現化した革新的な三次元培養技術を新たに開発し、ヒト肝臓創出に向けた革新的技術を確立してきた (*Nature*, 499: 481-484, 2013)。すなわち、肝発生の初期プロセスに必須である前腸内胚葉細胞と未分化血管内皮細胞と間葉系幹細胞との細胞間相互作用に着目し、前腸からの肝臓原基 (肝臓原基) の出芽 (budding) という、肝発生において極めて重要なイベントを人為的に再現することのできる新たな三次元培養系により、世界で初めてヒト臓器の創出を可能とする基盤技術を確立している。本法では、異なる三系譜のヒト未分化細胞を特定条件下で培養を行うことにより、各細胞系列のダイナミックな空間的再配置が自律的に誘導され、ヒト iPS 細胞由来の肝臓原基を人為的に構築することが可能である。

本研究では、本技術の臨床応用の実現を目指し、生体内での肝機能発現を最大化する最適な移植手法を明らかにする。直径 150 μm 程度まで小型化したヒト iPS 由来肝臓原基を大量作製し、腸間膜上や腎被膜下や同所移植などを比較し、最適な移植手法を同定する。将来的に莫大な医療ニーズに応え、多くの患者を救済することの可能な革新的手法となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大きく次の2つである。

1. 大量かつ均質な小型の肝臓原基を作製するための基盤的細胞操作技術を開発する。2. 同所、および異所を含むさまざまな移植部位を比較する。以上を通じて、臓器不全症治療の実現を目指したヒト iPS 由来肝臓原基移植操作技術の最適化を試みる。

3. 研究の方法

まず、血管内からの投与が可能な小型肝臓原基の大量創出法を検討した。申請者は予備的知見を得つつある3次元培養プレートを活用することで、ヒト iPS 細胞から小型 (直径 150 μm 大) の均質な肝臓原基の創出が可能であることを検証した。具体的には、肝臓原基作製に必要な肝内胚葉細胞・血管内皮細胞・間葉系幹細胞の各種細胞材料の最適な混合比率の決定、肝臓原基の形成・維持・分化誘導に用いる培養液の最適化、培地交換の頻度などの各種培養操作条件の決定、移植後の機能成熟を最大化するために適した培養期間の決定などを行った。作製された組織の大きさに関しては、本教室にすでにセットアップ済みの超高速イメージングサイトメーター IN Cell Analyzer 2000 を用いることにより計測を行った。肝臓原基の成熟度に関しては、定量 RT-

PCR やマイクロアレイによる遺伝子発現解析に加え、アルブミンなどのタンパク質合成機能、アンモニア代謝機能の評価などを組み合わせて検証を行った。なお得られた小型肝臓原基は、次年度以降の研究項目において門脈内からの移植実験に利用し、in vivo での機能発現の情報と常に対比させながら培養技術の最適化を図った。

次に、GFP マウス・ラットより分離した胎児細胞を用いて肝臓原基化したものを移植することにより検証し、再現性の高い移植操作技術を確立した。レシピエントには、免疫不全動物 (NOD/SCID マウスおよび IL2Rg KO ラット: すでに導入済み) を用い、肝障害の存在・非存在下において門脈内投与に適正な肝臓原基のサイズと数の決定を試みた。まず、3次元組織の門脈内移植の実現可能性について、移植後のレシピエント動物の肝臓を経時的にサンプリングを行い、置換率を定量的に解析した。これにより宿主肝臓の置換率を最大化するために必要なパラメーターの初期検討 (移植細胞数、スフェロイドサイズと数、レシピエントの肝障害の有無と程度、移植日数) を行った。

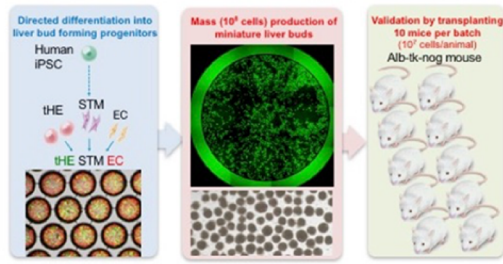
これらの解析結果をもとにヒト iPS 細胞由来肝臓原基を用いた検証を行った。先の方法により創出した既知のサイズと数のヒト iPS 細胞由来肝臓原基の門脈内投与を行い、移植後の機能発現を定量評価した。特に移植後早期の段階での生着効率と有害事象のリスク評価を同時に行った。さらに、移植した肝臓原基より分化した肝組織の分化成熟度に移植操作が及ぼす影響について、ヒト肝細胞特異的な機能マーカーを用いた組織解析に加え、血清中に分泌されたヒトアルブミンやインスリンの ELISA 法による定量解析を行い、組織構造と機能発現を詳細に検討した。本検証では、申請者がこれまでに進めてきた腸間膜上や脾臓内、腎被膜下などの異所性部位への移植実験を並行して進め、最適な移植部位を決定した。また、得られた組織は網羅的遺伝子発現解析を実施し、成体のヒト肝組織のアレイ情報との類似性を検討した。

さらに、ヒト iPS 細胞由来肝臓原基の大量移植による亜急性肝不全モデルに対する治療的効果を検討するために、ガンシクロビル応答性に肝細胞障害を誘発可能なトランスジェニックマウス (Albumin-Tk-NOG マウス) を用いて移植実験を実施した。本マウスをレシピエントとすることで、肝細胞特異的に任意のタイミングで強い障害を引き起こすことが可能となった。これまでで最適化したヒト iPS 由来微小肝臓原基を異所・同所へ移植し、治療効果を各種臓器障害マーカーや、体重・生存率等の変動を計測することにより評価した。

4. 研究成果

(1) 同所性移植を実現するヒト iPS 細胞由来微小肝臓原基大量作製法の構築
本検討に先んじて、まず iPS 細胞から肝臓内

図 1. 大量製造を行った肝臓原基の機能検証スキーム

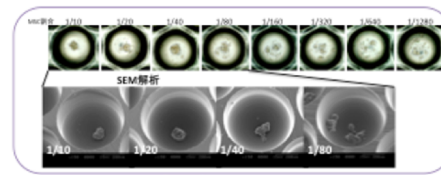


胚葉細胞・血管系細胞・間葉系細胞の分化誘導プロトコルを確立した。次に、ウェル内に多数のマイクロウェル（極小のくぼみ）を保有するプレートを用いることで、大量の A11-iPSC 肝臓原基の作製を行った（図 1）。

まず、各マイクロスポットに形成される 1 肝臓原基あたりの構成細胞数を 150-1200 細胞の条件で細胞播種を行い検討した結果、細胞数依存的に大きさが増大し（数 10~300 μ m 程度の範囲において）、肝臓原基の大きさは播種する細胞数依存的に調節可能であることが確認できた。さらに、15 日程度分化誘導を行った最終産物の機能解析を行ったところ、肝細胞分化マーカーである各種遺伝子発現量、および培養上清に分泌される ALB の比較の結果、1 組織あたり 600 細胞から作製した肝臓原基が最も高いことが判明した。また、血管・間質細胞の比率を検討した結果、これは肝臓原基内の低酸素状態や栄養源の枯渇などの影響により中心壊死を起こしていることが考えられ、実際、シングルセル次世代 RNA シーケンス解析の結果からもこれを示唆するデータを得ている（Nature, 2018）。

次に肝臓原基の構成細胞比率の最適化を行った。肝臓原基の構成細胞は、iPS 細胞由来ヒト肝内胚葉細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、間葉系幹細胞の三種である。高品質な肝臓原基作製においてさらなる品質の安定化を目指す上では、各種細胞の混合比率を最適化する必要がある。そこで、立体組織形成に重要な役割を担う間葉系幹細胞の混合比率の検討を行った。間葉系幹細胞の割合を 1/10-40 に調製し作製した肝臓原基は球状構造を形成したが、1/80 以下の細胞割合では、球状構造が形成されなかった。また、間葉系幹細胞の割合を減少させると共に形成効率も低下し、得られる肝臓原基の絶対数が減少した。肝臓特異的遺伝子 ALB の発現解析では、しっかりと球状構造を有している 1/10-40 の肝臓原基では発現が高く、球状構造を構築しなかった 1/80-1280 では発現が低いことが明らかとなった（図 2）。これらの結果は、肝臓原基内において生じる細胞間相互作用の減少や、細胞密度が低下したことがその後の分化誘導に大きな影響を及ぼしたと考えられ、三次元培養の重要性を示唆するデータであった。

図 2. 肝臓原基作製法の至適化



以上の検証より決定した条件に基づき、蛍光タンパク質を発現する iPS 細胞より誘導した各細胞種を用いて肝臓原基を形成した結果、マイクロウェル内でも 3 種の細胞が均一に混ざり合った凝集塊が形成された。またマイクロウェルプレートより形成された A11-iPSC 肝臓原基の培養上清を回収し、アルブミン (ALB), C3a, FVIII, AAT, CFH などの成熟肝細胞が分泌する因子について ELISA 解析を行った。その結果、すべての構成細胞が iPS 細胞由来肝臓原基は、従来の作成手法に比べて、各因子の分泌量が有意に高いことが確認された。

本検証により、機能的な iPS 細胞由来肝臓原基を大量に製造可能であることが確認された。

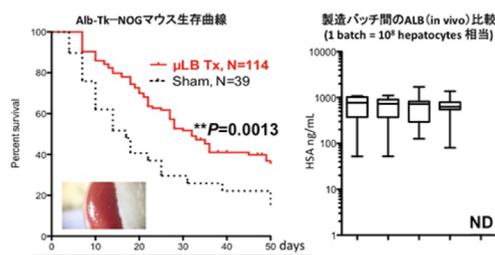
(2) ヒト iPS 細胞由来肝臓原基移植手法の最適化

得られた A11-iPSC 由来肝臓原基を頭蓋内に移植した。移植後の血管形成が誘導されるか否かを直接イメージングにより解析を実施した。その結果、移植後 20 日目における肉眼観察の結果、従来の臍帯細胞を用いた肝臓原基移植の結果と同様に、レシピエントからの血流灌流を受けていることが明らかとなった。また、移植を行ったマウスを麻酔下において、共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、移植後 28 日目の段階において、FITC-Dextran をマウスの尾静脈から投与し観察を行ったところ、肝臓原基内部に FITC の流入が確認されたことから、血液灌流が生じていることが判明した。以上より、iPS 細胞から作製した肝臓原基においても機能的な血管ネットワーク形成が生じることが明確に示された。

次に、腎被膜、同所、遠位腸間膜と近位腸間膜にヒト肝臓原基の移植が可能であるか検証した。同所については、門脈本幹より肝臓原基の門脈内投与法を実施した。3D 培養期間 48 時間、播種細胞数 4000 cells/spot、移植肝臓原基数 6000-12000 個を選択的に門脈内投与したところ、ヒト肝臓原基の組織学的生着が確認された。しかし小動物においては、門脈内投与可能な細胞の量に限界があることも一方で判明した。

一方、異所・同所を比較したヒトアルブミン分泌能試験については、腎被膜下への移植が最も効率的であることが示された。そこで、肝臓原基を大量に作製し、その後、免疫不全マウスの腎被膜下に 10 匹に分散して移植したところ、安定して機能発現を得ることができるとも確認された（図 3）。

図 3. 肝臓原基の in vivo 機能検証



また、組織染色および、免疫組織化学染色解析の結果から、移植後 20 日目程度の段階からアルブミン陽性領域が確認され、それ以降、移植後の経過に伴って、徐々にアルブミン陽性領域の範囲が拡大していくことが明らかとなった。組織解析により肝細胞領域が拡大していくことに伴って、アルブミン分泌も経時的に増加していく可能性が示唆されている。

以上の結果から、移植後肝障害非存在下においても、肝臓原基内部の肝内胚葉細胞は増殖と分化を通じて肝細胞へと成熟していくことが示唆された。

(3) 臓器障害モデルマウスを用いたヒト肝臓原基移植治療効果の検証

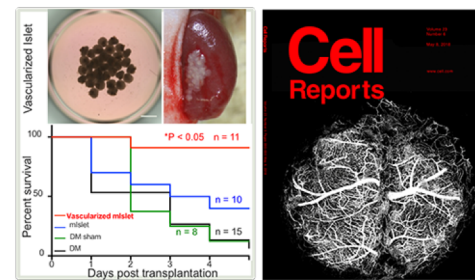
これまでの検討を踏まえ、3 種類の細胞を各々10 日間分化誘導し、これらの細胞より iPS 由来肝臓原基を創出した。具体的には 6well のマイクロウェルプレート 1well 当たりに、肝臓内胚葉細胞を 3×10^6 、血管内皮細胞を 2.1×10^6 、間葉系細胞を 3×10^5 個播種し、24 時間培養を行った後、創出されたヒト肝臓原基を移植に用いた。すなわち、1 匹当たり約 $3-6 \times 10^6$ hepatocytes 相当の肝臓原基を移植を実施した。

レシピエントとしては、Alb-Tk-NOG マウスの腹腔内に 50 mg/kg のガンシクロビル(GCV)を投与した亜急性肝障害モデルを選択し、腎被膜下移植による肝臓原基移植の効果を検討した。肝臓原基移植群 (N=114) と、非移植 (Sham) 群 (N=39) について、生存率の比較を行った。その結果、移植後 50 日までの期間において、肝臓原基移植群では有意に ($P=0.0013$) 生存率の改善が認められた (図 3)。

さらに、本手法の拡張性を評価するため、由来が異なる組織、すなわち、糖尿病等で機能障害をきたす膵島を対象とした実験も実施した。血管内皮細胞、間葉系細胞と培養した膵島をそれぞれ、劇症糖尿病モデルマウスに移植し、移植後の生存率を評価した。その結果、大幅な生存率の改善を認めることが明らかとなった (図 4)。また、生存個体では血清中の血糖値が大きく改善することも明確に示された。

以上のことから、安定的かつ大量にヒト iPS 細胞由来肝臓原基を製造可能であること、移

図 4. 膵島への応用可能性の検証



植手法の最適化を通じて亜急性肝不全モデルへの治療効果が発揮可能であること、ひいては、膵島を対象とした再生医療にも拡張化膿性があることなどを示すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Takebe T*, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Funayama S, Nakanishi N, Hisai T, Kobayashi T, Mori A, Ayano S, Ejiri Y, Amimoto N, Yamazaki Y, Ogawa S, Ishikawa M, Kiyota Y, Ueno Y, Taniguchi H: Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, 21(10):2661-2670, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.005. 査読有. (*Corresponding author)
2. Camp JG, Sekine K, Gerber T, Loeffler-Wirth H, Binder H, Gac M, Kanton S, Kageyama J, Damm G, Seehofer D, Belicova L, Bickle M, Barsacchi R, Okuda R, Yoshizawa E, Kimura M, Ayabe H, Taniguchi H, Takebe T*, Treutlein B*: Multilineage communication regulates human liver bud self-organization from pluripotency. *Nature*, 546, 533-534, 2017. doi: 10.1038/nature22796. 査読有. (*Joint corresponding authors)
3. Koike H, Zhang R-R, Sekine K, Ueno Y, Zheng Y-W, Takebe T*, Taniguchi H*: Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-amino acid metabolism. *Development*, 15;144(6):1018-102, 2017. doi: 10.1242/dev.143032. 査読有. (*Joint corresponding authors)
4. Sekine K, Takebe T, Taniguchi H: Liver Regeneration Using Cultured Liver

- Bud. *Methods Mol Biol.* 1597:207-216, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-6949-4_15. 査読有.
5. Asai A, Aihara E, Mizuochi T, Phelan K, Mayhew C, Shivakumar P, **Takebe T**, Wells J, Bezerra J: Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells. *Development*, 15;144(6):1056-1064, 2017. doi: 10.1242/dev.142794. 査読有.
 6. Ito K, Sakuma S, Kimura M, **Takebe T**, Kaneko M, Arai F. Temporal Transition of Mechanical Characteristics of HUVEC/MS Spheroids Using a Microfluidic Chip with Force Sensor Probes. *Micromachines*, 7(12), 221, 2016. doi: 10.3390/mi7120221. 査読有.
 7. Kagimoto S, **Takebe T***, Kobayashi S, Yabuki Y, Hori A, Hiroto K, Mikami T, Uemura T, Maegawa J, Taniguchi H: Autotransplantation of monkey ear perichondrium-derived progenitor cells for cartilage reconstruction. *Cell transplantation*. (*Joint corresponding authors), 2016;25(5):951-62. doi: 10.3727/096368916X690917. 査読有.
 8. **Takebe T***, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa H-Y, Taniguchi H: Vascularized And Complex Organ Buds From Diverse Tissues Via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell*, (*Corresponding author, Best of Cell Stem Cell), 16(5): 556-565, 2015. doi: 10.1016/j.stem.2015.03.004. 査読有.
 9. K Ito, S Sakuma, M Kimura, **T Takebe**, M Kaneko, F Arai: Stiffness-index map based on single cell-spheroid analysis using robot integrated microfluidic chip. *IEEE* 29th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 157-160, 2015. doi: 10.1109/MEMSYS.2016.7421582. 査読有.
 10. Asai A, Aihara E, Mizuochi T, Phelan K, Mayhew C, Shivakumar P, **Takebe T**, Wells J, Bezerra J: Hepatic maturation of induced Pluripotent Stem Cells is regulated by paracrine signals from endothelial and mesenchymal stem cells in culture and during organoid formation. *Hepatology*, 62, 544A-544A, 2015. doi: 10.1242/dev.142794. 査読有.
 11. Lee S, Takahashi Y, Lee KM, Mizuno M,

Nemono JG, **Takebe T**, Lee JI: Viability and functional assessment of murine pancreatic islets after transportation between Korea and Japan. *Transplant Proc.* 2015 Apr; 47(3):738-41. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.12.031. 査読有.

[学会発表] (計 108 件) 省略

[図書] (計 6 件)

1. 武部貴則 他、日本経済新聞出版社、『挑む！化学を拓く 28 人』再生医療研究のホープ i P S 細胞から臓器を作る、2017、247
2. 武部貴則、羊土社、オルガノイド 4.0 時代 次世代のオルガノイド研究のデザイン、2017、139
3. 武部貴則、東京医学社、小児内科 Vol.49、2017、100
4. Shinozawa T, Yoshikawa H-Y, Takebe T, *Developmental Biology*、Reverse Engineering Organ Buds through Self-Driven Condensation and Organization.、2017、8
5. 松崎賢寿 吉川洋史 谷口英樹 武部貴則、日本バイオマテリアル学会、Rational design of mechanical environment for self-organizing organ bud、2017、3
6. 松崎賢寿 吉川洋史 谷口英樹 武部貴則、化学とマイクロ・ナノシステム研究会、Impact of mechanical environment on cell adhesion regulating biological process、2017、5

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: digitalized human organoids and methods of using same.

発明者: Takebe T, Kimura M

権利者: 同上

種類: 特許

番号:

出願年月日: 2017

国内外の別: 国外

名称: 細胞選別法

発明者: 松崎賢寿 谷口英樹 武部貴則

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-43744 号

出願年月日: 2017 年 03 月 08 日

国内外の別: 国内

名称: 細胞培養システム

発明者: 谷口英樹 武部貴則 江尻洋子

権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類：特許
番号：PCT/JP2015/002738
出願年月日：2015年09月18日
国内外の別：国外

名称：培養方法及び細胞塊
発明者：谷口英樹 武部貴則 関根圭輔 砂山裕
信 西村哲也 中尾敦
権利者：公立大学法人横浜市立大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/076615
出願年月日：2015年05月29日
国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)
横浜市立大学・先端医科学研究センター・教授
研究者番号：20612625

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし