

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15597

研究課題名(和文)血管内皮、間葉系細胞のシングルセルヘテロジェネイティ解析

研究課題名(英文)Single cell heterogeneity analysis of endothelial and mesenchymal cells

研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：臍帯由来血管内皮細胞および間葉系細胞のシングルセルレベルでの網羅的遺伝子発現情報を取得すると共に、iPS細胞由来肝芽内の血管内皮細胞、間葉系細胞についての解析を実施した。取得した発現情報からそれぞれの細胞集団において発現する遺伝子を抽出した。さらに、iPSC肝芽において細胞間相互作用による細胞分化に関与するを明らかにした。また、それぞれの細胞集団におけるヘテロジェネイティを解析した。これらの知見は、ヒトiPS肝芽の製造過程での品質評価において有用な情報となるなど、今後のiPSC肝芽の品質および安全性向上に向け有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive gene expression analysis was performed on human umbilical cord-derived vascular endothelial cells and human bone marrow mesenchymal cells at the single cell level. Gene expression data on vascular endothelial cells and mesenchymal cells in the iPSC-liver bud was also obtained. Genes expressed in each cell population were analyzed. Furthermore, it was revealed that genes involved in cell-cell interaction in iPSC liver bud. We also analyzed heterogeneity in each cell population. These findings are useful information for quality evaluation in the process of manufacturing human iPSC-liver bud, and for future improvement of iPSC-liver bud quality and safety.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 再生医療 シングルセルゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

再生医療応用への期待から iPS 細胞から機能的な細胞へ分化誘導するための研究は世界的に競争が激化している。しかしながら多くの研究はある特定の 1 種類の機能細胞を分化誘導する研究である。我々は、世界で初めて、ヒト iPS 細胞から肝臓の基となる 3 次元組織(肝芽)を in vitro 培養条件下で創出することに成功した(Nature 2013, Nat Protoc. 2014)。本技術はヒト iPS 細胞を用いてヒトの立体臓器を in vitro において人為的に構成することを可能にするという、これまでに成しえていなかったヒューマンバイオロジーを解析するための糸口となる基盤技術である。一方、細胞加工製品をもちいた医療である再生医療、特に iPS 細胞を用いた再生医療においては化合物医薬品とは異なり、決して均一ではなく、常に変わらざる状態にある細胞をいかに一定の品質を保って製造し、品質を逸脱した細胞をいかに検出するかということが、極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

本技術を用いた再生医療応用へむけ大きな課題となるのが、iPS 細胞由来肝細胞と共培養する血管内皮細胞及び間葉系細胞のヘテロジェネイティである。すなわち、再生医療応用へ向けた必須の解決課題は移植細胞の品質と安全性であり、品質評価法および安全性の評価法の確立が極めて重要である。品質評価・安全性評価を実施する上で、評価指標の確立および評価手法そのものとしても、遺伝子発現情報は極めて重要である。但し、これまでの細胞集団全体を対象とした“バルク”の解析ではヘテロな細胞集団の遺伝子発現を正確に把握することは不可能であった。そこで、本研究では立体臓器創出技術による再生医療応用へ向けた必須の基盤情報を取得するという目的に加え、ヒトの立体臓器におけるヘテロジェネイティや細胞間相互作用の解明を目的とした。

3. 研究の方法

正常ヒト血管内皮細胞(HUVEC: PromoCell 社)およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC: PromoCell 社)をそれぞれ、EGM(EGM BulletKitt, Lonza 社)、MSCGM(MSCGM BulletKit, Lonza 社)を用いて培養した。iPS

細胞は mTeSR1(STEMCELL Technologies 社)あるいは StemFit AK02N(味の素社)を用いて Matrigel(Corning 社)あるいは iMatrix-511(ニッピ社)上で培養した。肝細胞への分化誘導は ActivinA、Wnt3A 存在下で 6 日間分化誘導し胚体内胚葉(DE)とし、更に DMSO、2-mercaptoethanol 存在下で肝内胚葉細胞(HE)を得た。iPSC 肝芽は iPSC-HE と HUVEC および MSC を共培養することにより作製した。また、iPS 細胞より血管内皮細胞(iPSC-EC)および間葉系細胞(iPSC-MC)を分化誘導することですべての細胞材料を iPSC より分化誘導した A11-iPSC 肝芽も作製した。培養した細胞あるいは肝芽を酵素処理により、シングルセルレベルにバラバラにし、マイクロフルイディックス(C1, Fluidigm 社)を用いて、シングルセルを取得、逆転写、増幅を行い次世代シーケンサー(HiSeq2500, Illumina 社)によりシーケンズデータを取得した。データ解析は主に R を用いた。

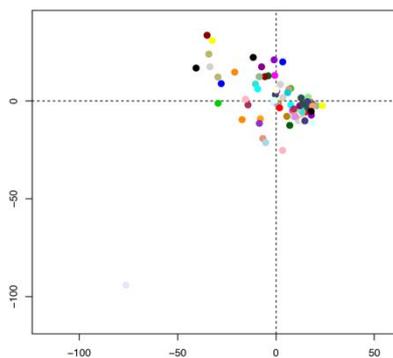
4. 研究成果

臍帯由来血管内皮細胞および間葉系細胞を平面培養し、シングルセルレベルでの網羅的遺伝子発現情報を取得すると共に、iPS 細胞由来肝芽内の血管内皮細胞、間葉系細胞についてシングルセルレベルでの網羅的遺伝子発現解析を実施した。取得した発現情報からそれぞれの細胞集団において発現する遺伝子を抽出した。さらに、iPSC 肝芽における細胞間相互作用によって発現が変動する遺伝子を抽出すると共に、リガンド-受容体関係にある遺伝子の発現の組み合わせを解析することにより、細胞間相互作用に関わると考えられる遺伝子の抽出を実施した。抽出した細胞間相互作用に関わると考えられる候補遺伝子については阻害剤および siRNA によるノックダウンにより実際に iPSC 肝芽において細胞間相互作用による細胞分化に関与するを明らかにした(Nature 2017; Cell Reports 2017)。

また、それぞれの細胞集団におけるヘテロジェネイティを解析したところその程度は様々であり(図1および図2)、ほぼ全ての細胞で発現が見られる遺伝子がある一方で、ある遺伝子では発現が高い細胞から低い細胞まで存在するなど一口にヘテロジェネイティといっても単純に複数の細胞集団があるというよりもそれぞれの細胞のバラツキも存在することが明

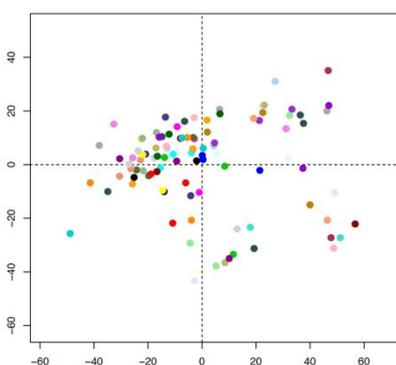
らかとなった。これらの知見は、ヒト iPSC 肝芽の製造過程での品質評価において有用な情報となるばかりでなく、分化細胞に存在する未分化 iPSC のマーカー抽出など、今後の iPSC 肝芽の品質および安全性向上に向け有用な知見となると期待される。

図1. 血管内皮細胞の解析



1つのドットが1つの細胞を表す

図2. 間葉系細胞の解析



1つのドットが1つの細胞を表す

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 6件)

- Zhang RR, Koido M, Tadokoro T, Ouchi R, Matsuno T, Ueno Y, Sekine K, Takebe T, Taniguchi H.

Human iPSC-Derived Posterior Gut Progenitors Are Expandable and Capable of Forming Gut and Liver Organoids. 査読有

Stem Cell Reports. 10: 780-793. (2018) doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.006. Epub 2018 Feb 8.

- *Sekine K, †Camp JG, 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 † equal contribution., * corresponding author.

Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency 査読有

Nature. 546:533-538. (2017)

doi: 10.1038/nature22796. Epub 2017 Jun 14.

- Takahashi Y, Sekine K, Kin T, Takebe T, Taniguchi H

Self-Condensation Culture Enables Vascularization Of Tissue Fragments For Efficient Therapeutic Transplantation 査読有

Cell Reports. 23:1620-1629. (2018)

doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.123.

- Takebe T, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M, Funayama S, Nakanishi N, Hisai T, Kobayashi T, Kasai T, Kitada R, Mori A, Ayabe H, Ejiri Y, Amimoto N, Yamazaki Y, Ogawa S, Ishikawa M, Kiyota Y, Sato Y, Nozawa K, Okamoto S, Ueno Y, Taniguchi H

Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells 査読有

Cell Reports 21: 2661-2670. (2017)

doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.005.

- Sekine K, Takebe T, Taniguchi H.

Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud 査読無

Methods Mol Biol. 1597: 207-216. (2017) doi: 10.1007/978-1-4939-6949-4_15. PMID: 28361320

- Chang PH, Sekine K, Chao HM, Hsu S, Chern E

Chitosan promotes cancer progression and stem cell properties through Wnt signaling in colon and hepatocellular carcinoma cells 査読有

Scientific Reports 8, Article number: 45751 (2017)

doi: 10.1038/srep45751.

- Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Taniguchi H

Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-amino acid metabolism. 査読有

Development. 144: 1018-1024. (2017) doi: 10.1242/dev.143032.

[学会発表](計 13件)

- 濱田 侑希, 関根 圭輔, 都築 周作, 小林 達也, 安居 良太, 上野 康晴, 武部 貴則, 池田 一貴, 谷口 英樹: ヒト iPSC 肝芽の臨床応用に向けた安全性評価手法の確立 第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月 22 日

- 関根圭輔, 奥田諒, 井上達也, 金子千夏, 碓井彩華, 上野康晴, 谷口英樹: 腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドは薬剤耐

性を示す。

第 76 回日本癌学会学術総会 口頭
Sep.28-30(29),2017 横浜

- 3 奥田諒、**関根圭輔**、上野康晴、佐藤準也、高橋正希、井上達也、金子千夏、碓井彩華、谷口英樹：腫瘍微小環境を模倣した患者由来ヒト膵がんオルガノイドの創出。

第 76 回日本癌学会学術総会 口頭
Sep.28-30(29),2017 横浜

- 4 碓井彩華、奥田諒、**関根圭輔**、上野康晴、佐藤準也、高橋正希、井上達也、金子千夏、谷口英樹：腫瘍微小環境を伴う膵癌オルガノイドは薬剤耐性を示す。

第 76 回日本癌学会学術総会 ポスター
Sep.28-30(29),2017 横浜

- 5 上野康晴、奥田諒、金子千夏、碓井彩華、**関根圭輔**、谷口英樹：微小環境を伴うヒト膵癌オルガノイドの再構築に基づく新規膵癌薬剤評価系の構築。

第 76 回日本癌学会学術総会 ポスター
Sep.28-30(29),2017 横浜

- 6 金子千夏、奥田諒、**関根圭輔**、上野康晴、佐藤準也、高橋正希、井上達也、碓井彩華、谷口英樹：腫瘍微小環境を伴う膵癌オルガノイドは in vitro で治療抵抗性を示す。

第 76 回日本癌学会学術総会 ポスター
Sep.28-30(29),2017 横浜

- 7 Taniguchi H, **Sekine K**, Okuda R, Ueno Y: Development of a human pancreatic cancer organoid recapitulating the tumor microenvironment. The 41st Naito Conference, Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance Invited Speaker Jul.5-8, 2016 Hokkaido, Japan

- 8 佐藤準也、奥田諒、濱中香織、高橋正希、**関根圭輔**、上野康晴、谷口英樹：膵癌組織中の微小環境を有する膵癌オルガノイドを用いた新規薬剤評価系の構築

第 15 回日本再生医療学会(大阪)、口頭発表

- 9 高橋禎暢、武部貴則、小池直人、**関根圭輔**、谷口英樹：血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立。

第 16 回日本再生医療学会総会 ポスター
Mar. 7- 9, 2017 国内

- 10 高橋禎暢、武部貴則、小池直人、**関根圭輔**、谷口英樹：血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立。第 44 回日本膵・膵島移植研究会 口頭 Mar. 10-11, 2017 国内

- 11 奥田諒、**関根圭輔**、上野康晴、佐藤準也、高

橋正希、祖父江瑤子、井上直、濱中香織、谷口英樹：腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドの創出。

第 39 回分子生物学会、Nov.30-Dec.2,2016 国内

- 12 **関根 圭輔**, J. Gray Camp, Barbara Treutlein, 武部 貴則、谷口 英樹：シングルセルレベルでの iPSC 肝芽構成細胞のポピュレーションヘテロジェネイティ解析

第 39 回分子生物学会、Nov.30-Dec.2,2016 国内

- 13 奥田諒、高橋正希、佐藤準也、**関根圭輔**、上野康晴、谷口英樹：腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドの創出

第 75 回日本癌学会総会、2016.10.6-10.8,パシフィコ横浜 国内

〔図書〕(計 1 件)

Organ Regeneration Based on Developmental Biology

Springer book; Editors: Tsuji, Takashi (Ed.)

ISBN: 978-981-10-3766-5 (Print)

978-981-10-3768-9 (Online)

DOI10.1007/978-981-10-3768-9

Number of Pages XIII, 257

Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud

Pages 223-235

Keisuke Sekine, Takanori Takebe, Hideki Taniguchi

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし