

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0073

研究課題名(和文) 器官形成を誘導する分子・細胞・力学要素の時空間構造の解明

研究課題名(英文) Investigation of spatiotemporal regulation of molecular, cellular, and mechanical basis for organogenesis

研究代表者

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：20612625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は多細胞システムにおける相互作用を最大化するための精度アップポイントを抽出・再設計し、試験管内において高品質な臓器原基(臓器のたね)を誘導するための人為的構成技術の確立することである。研究成果としては、(1)未分化細胞に特徴的な膜流動性に着目した新規細胞選別法の開発を通して、細胞原料を均質化する基盤技術の確立を達成した。さらに(2)複雑な構造を有する肝臓原基の誘導を目指して、不均一マトリクス環境をモデル化した新規の培養基板開発に成功した。以上によって細胞原料側だけでなく培養基板の最適化を達成し、本研究課題を大幅に進展させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、細胞の物理特性と外部環境の精密な設計・制御が多細胞行動と機能の制御とともに、構成的細胞操作技術確立のための基礎として極めて重要な知見となる点である。本研究によって支持体の硬さ条件などの細胞外部環境を踏まえた多細胞系の自律的組織化機構に一步迫ることができたことは、世界に先駆けて構成的生物学的な観点からその意義を明快に示すことにつながった。さらに、本研究によって最適化された臓器原基の創出原理をより質の高い再生医療の実現、創薬研究への応用につながることから、大きな社会的意義の期待される成果であった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to extract physical parameter for maximizing interaction in multicellular systems and construct optimized methodology to derive highly organized organ bud in vitro. In this project, we established cell purification methodology in large quantities focusing on membrane physical fingerprints of pluripotent stem cells. Furthermore, we newly developed substrate mimicking heterogeneous mechanical environment in vivo for the derivation of liver bud with complex structures. Collectively, the optimization of both cell source and culture substrate greatly facilitate future efforts to develop self-organizing systems in vitro.

研究分野：再生医学

キーワード：臓器原基 人為的構成 多細胞システム ヒトiPS細胞 膜物性指紋 細胞選別法 原基培養基盤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内における細胞の形態・運動性・分化機能は、その細胞の属する組織を構成するさまざまな細胞・組織間の相互作用、および周辺から感受する種々の外的環境により厳密に調節されている。このような細胞内部・外部最適環境の設計は、細胞の行動・機能の制御を通じた複合組織誘導技術の礎として、次々世代型の再生医療実現に大きく貢献する重要課題の一つである。しかし、多くの先行研究では、単一種の細胞を平面培養モデル下で解析しているにすぎず、世界的にみても多細胞システムの時・空間挙動を解析する例は皆無であった。

一方で研究代表者は、従来の「単一細胞の分化誘導」という開発概念から脱却し、多細胞間の時・空間的な相互作用を人為的に模倣して「臓器原基の人為的構成」を実現する独創的な幹細胞培養系を確立している。具体的には、臓器原基(肝芽)の誘導に関わる肝内胚葉、間葉系細胞、血管細胞の3種類の細胞を混ぜ合わせることで、iPS細胞から立体的なヒト肝臓原基を創り出す基盤技術(Organ Bud Generation法)の確立に成功した。このような複合組織構成技術は国際的にも類を見ず、その極めて高い独自性が広く評価されてきている(Nature 2013. ベルツ賞, 2014)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、多細胞システムにおける相互作用を最大化するための各種精度アップポイントを抽出し、再設計を試みる。これにより、試験管内において高品質な臓器原基(臓器のたね)を誘導するための構成的細胞操作技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究の礎となるのは我々が確立したヒト iPS 細胞からの立体的なヒト肝臓原基の創出技術(Nature 2013 及び Cell Stem Cell 2015)である。本研究では、より高品質な器官原基を誘導する内部環境因子(細胞の質・種類・比率など)及び外部環境因子(培養基材の力学的・生化学的特性など)の最適化を図った。

まず内部環境の中でも、臓器原基の細胞材料の品質に着目した。細胞原料中に含まれる非標的細胞(未分化細胞など)の混入を克服するため、我々は表面マーカーに頼らない、細胞膜の流動性に着目するという全く新しい視点のアプローチを進めた。

膜流動性は細胞膜中のタンパク質集積に大きな影響を与え、細胞接着などの細胞機能を制御していることが示唆されてきた重要な物理特性の一つである。そこで、膜物性の定量評価を目的として、膜流動性に応じてその蛍光波長を赤から青まで変化する環境感受性色素である Laurdan を用いて、赤・青の蛍光強度比から相対値である GP 値 (Generalized polarization) として算出した。

さらに我々は内部環境だけでなく、外部環境が肝臓原基の誘導へ与える影響について評価を行った。すなわち、生体内のような不均一な硬さ環境が細胞集合現象におよぼす影響の検証を実施した。これまで我々は均一な硬さを有する培養基板を用いて、効率的に肝臓原基の効率的な誘導に成功している(Cell Stem Cell 2015)。そこで本研究では本基板をベースに改良を進め、生体内の不均一環境をモデル化した新規の培養基板を用いて、複雑な組織構築が可能であるかを検証した。以下にこれらの主要な成果の概要について述べる。

4. 研究成果

(1) 分化と細胞膜流動性の関係

未分化細胞から内胚葉誘導で得た前期分化細胞(Definitive endoderm, DE)および後期分化細胞(Hepatic endoderm, HE)のGPカラー図を取得した所、それらの差はほぼ観察されなかった(図1A左)。ここで(1)脂質分子の配向性と(2)コレステロール量の2つの重要なパラメーターが細胞膜物性を制御している。そこでMβCD(methyl beta-cyclodextrin)を添加して

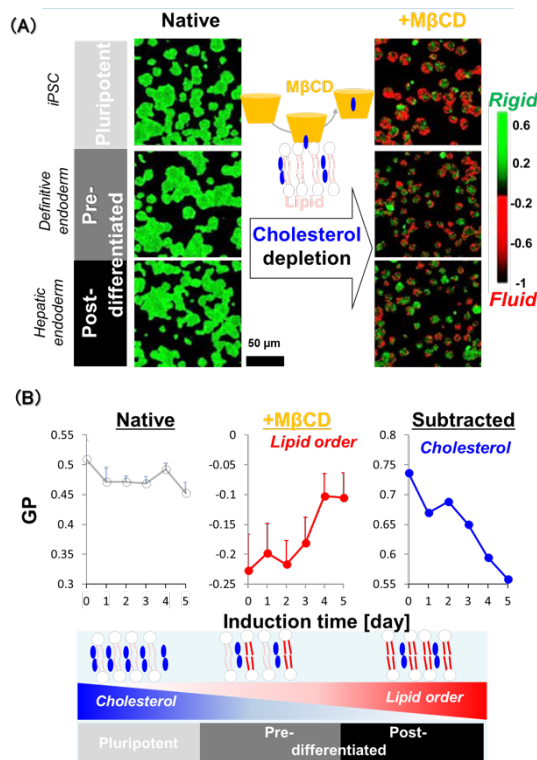


図 1: 未分化細胞に特有な膜物性指紋の発見。(A) 分化と膜物性の経時変化とその (B) 定量解析結果。MβCD が脂質膜からのコレステロール除去剤として機能する。コレステロール量の推定には反応前後の GP 値の差分から定量。Stem Cell Reports から許可を得て転載。

生体内の不均一環境をモデル化した新規の培養基板を用いて、複雑な組織構築が可能であるかを検証した。以下にこれらの主要な成果の概要について述べる。

コレステロールを除去し、脂質分子からの増強シグナルを観察した。すると分化が進むに連れて、緑色で低流動的な細胞膜へと変化することが明らかとなった(図1A右)。さらに定量的なデータを得るために、1日置きに細胞を浮遊状態で平均 GP の経時変化を測定した(図1B上)。先述した傾向と一致するデータが得られた。つまり、未処理の膜では内胚葉誘導が進んでもほぼ GP 値は変化しないのに対して、コレステロールが脱離された状態では GP 値が2倍増大して高配向な脂質分子が増大していることが推測される。ここで未処理群(赤)からMβCD処理群(赤)のデータを差し引くことで、細胞膜中のコレステロール量を推定できる。すると分化誘導日数とともに総量が減少していくことを確認できた。以上のデータから推測される脂質膜の組成のモデル図を示す(図1B下)。未分化細胞膜は分化細胞膜に比べてコレステロールが多く、低配向性の脂質分子から構成されることが明らかになった。よって未分化細胞の膜には特有の物性が存在することを初めて報告した。

(2) 分子生物学的アプローチを用いた膜流動性の変化のメカニズム

興味深いことに高配向の脂質分子が増大することが引き金となって、未分化状態からの離脱が促進されていく。なぜこうした脂質分子の配向性の変化が分化には必要なのだろうか？我々が着目したのは内胚葉誘導に必須のActivin経路である(図2A)。Activinはレセプターに結合すると、Smad2/3がリン酸化される。ここに低配向性の脂肪酸(オレイン酸)を添加して強制的な流動化を促すと、Activinに応答しない不活化集団が10-20%程度現れた(図2A左)。ここでレセプターはActRII/IIBとALK4の複合体で形成される。高配向性の脂質分子に支えられる本レセプターが、強制的な流動化によって脱乖離し、Activinに応答なくなったものと考えられる。以上のように脂質膜の配向性が高くなることは、分化誘導因子の結合レセプターの構造を安定化に大きく寄与していることがわかり、さらにその後の分化誘導を増強するのに優位に働いているものと考えられる。

どのような分子生物学的な指標(タンパク質)が未分化膜の物性を構成しているのだろうか？網羅的な遺伝子発現解析から、未分化細胞は低配向性の脂肪酸合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素(Stearoyl-CoA desaturase-1, SCD1)及びコレステロール合成に関わる酵素(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR)を高く発現していることを見出している。そこでこのような酵素の阻害剤を添加した際に、細胞の未分化性が変化するかどうかを評価すれば、本タンパク質が膜の組成を優位に制御していることが推察できる。そこでまずはSCD1の直接阻害剤(CAY10566)の未分化細胞のマーカー(Tra2-49/6E)の発現強度に対する影響をフローサイトメーターにより評価した(図2B)。すると阻害剤の濃度が上昇するに伴い未分化マーカーが減少し、細胞は未分化状態からすばやく離脱することを見出した。同様にしてHMGCRの直接阻害剤(Lovastatin)を添加しても、未分化マーカーの低減が確認できた。以上によって未分化細胞膜においてSCD1とHMGCRが恒常的に高く発現することで、低配向性の脂肪酸と豊富なコレステロールを有する特徴(以降、膜指紋と呼ぶ)を支えることを初めて見出した(図2B右)。

(3) 未分化細胞膜の物性指紋に着目した新規細胞選別法の開発

上述した未分化細胞と分化細胞との膜流動性の個性差は、流動性制御剤(独自ライブラリーから特定:ポリフェノール)が大きくかつ迅速に拡大することを見出している。脂質膜の流動性が変化する事は膜タンパク質の集積の変化を介して細胞接着に寄与することが推測できる。よって30分以内の短時間で完了する細胞接着をアウトプットにすれば、臨床応用に向けた大量選別を高速かつ低毒性(ポリフェノールは副作用は小さい)での実施可能性が期待される。本コンセプトの実証に向けて、蛍光ラベルされた未分化細胞と無標識の分化細胞を混ぜ合わせ、接着選別から未分化細胞の除去率を定量評価した。この時の接着条件は、

- 生化学的条件(基質の種類と濃度)
- 物理学的条件(溶質の種類と濃度)
- 時間条件(培養時間, 30分以内)

で構築した1150条件の接着条件アレイであり、分化細胞としては内・中・外胚葉細胞の超網羅的な条件である。興味深いことに内・外胚葉は上澄みに濃縮され除去率の最大値も基質条

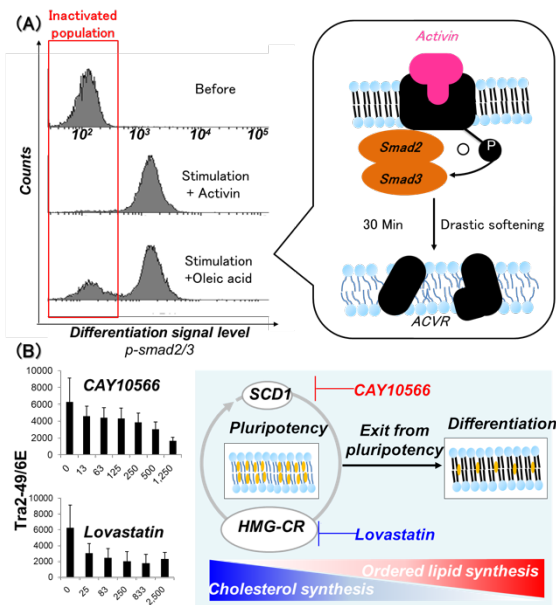


図2: 膜流動性の物理・生物学的な制御による未分化状態への影響。(A) 流動的な脂質分子の添加によるアクチビンシグナルへの影響。(B) 脂肪酸・コレステロール合成経路の阻害に伴う未分化状態の変化。Stem Cell Reports から許可を得て転載。

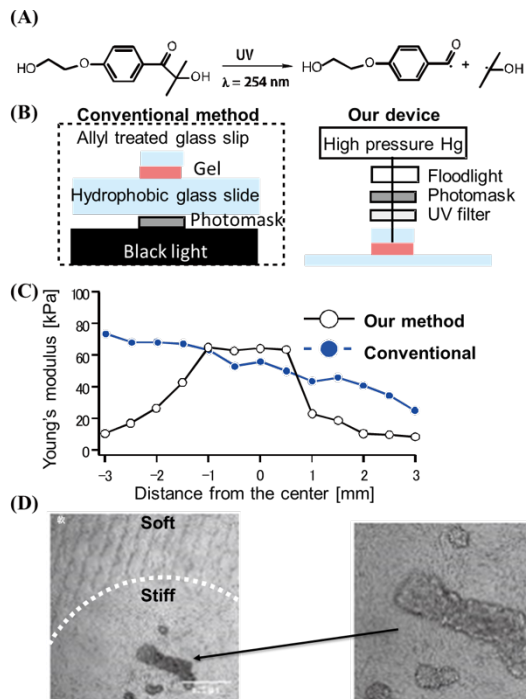


図3：光パターン照射による不均一硬さを有した新規培養基板の開発。(A) Irgacure2959 のラジカル生成機構 (B) 既存と新規照射装置の比較と (C) 実際に得られた培養基板の原子間力顕微鏡による硬さ測定。(D) 細胞を均一に播種して1日後の細胞集合体の明視野像。バイオマテリアル誌より許可を得て転載。

形成に対して周囲の硬さの“不均一”環境が如何に影響を与えているかといった情報は未知である。そこで我々が開発してきた均一基板をさらなる改良として (*Cell Stem Cell* 2015) 光応答性ラジカル重合剤 (Irgacure2959) を導入することで光照射による硬さパターンを有した新規培養基板の構築に成功した (図3A)。既存法はブラックライトを光源に用いていたが (図3B)、非集光のためにブラックライト管の位置に応じて硬さパターンに偏りが生じる (図3C青)。一方、本研究で開発した独自の照射装置は高圧水銀光源から投光管を介して平行光にしているために、均一に光照射が可能となる。反応溶液に励起光を照射する際にはフォトマスクを介することで励起光の強照射/弱照射 (硬い/柔らかい) 領域のパターンを施した。なおこの時に得られる硬さの空間パターンは (I) フォトマスクの黒色パターン (II) 反応溶液中の架橋剤濃度 (III) UV 照射時間の 3 つのパラメーターで自在に制御可能である。そのため今回の硬さパターン以外にも自在な硬さ空間パターンを基板に施すことが可能であり、本ゲルの拡張性・汎用性は非常に大きい。実際に研究提案者が開発した中心が硬く周囲が柔らかい硬さパターンゲルに対して細胞を均一に播種した (図3D)。すると均一細胞を播種したにもかかわらず、中心の硬い領域には長さ $500 \mu\text{m}$ 程度の長方形の集合体が形成され、組織集合を場の硬さパターンで制御することに成功した (論文投稿中, 2019)。

以上の細胞原料側の均質化、さらに器官原基を誘導する培養場の最適化を含む成果によって本研究課題を大幅に進展させることができたと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Matsuzaki T, Matsumoto S, Kasai T, Yoshizawa E, Okamoto S, Yoshikawa H-Y, Taniguchi H and **Takebe T**. Defining lineage-specific membrane fluidity signatures that regulate adhesion kinetics. *Stem Cell Reports*, 11 (4), 852-860, 2018. (*Corresponding author & Lead contact) PMID: 30197117 査読有.
2. Nie YZ, Zheng YW, Miyakawa K, Murata S, Zhang RR, Sekine K, Ueno Y, **Takebe T**, Wakita T, Ryo A, Taniguchi H. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine*. pii: S2352-3964(18)30300-1, 2018. PMID: 30120080 査読有.
3. Ayabe H, Anada T, Kaomoya T, Sato T, Kimura M, Yoshizawa E, Kikuchi S, Ueno Y, Sekine K, Camp J-G, Treutlein T, Ferguson A, Suzuki O, **Takebe T*** and Taniguchi. Oxygen-Dependent Intercellular TGF β Signaling Regulates Human iPSC-Derived

件で多く見られた。これは未分化細胞に比べて内・外胚葉細胞の接着強度が弱いため、未分化細胞が好む基質条件 (Laminin や Matrigel) で、上澄みに分化細胞が濃縮されたためである。一方で中胚葉細胞においては基板側に迅速に濃縮されていることがわかった。これは未分化細胞に比べて中胚葉細胞の接着強度が強いことと、未分化細胞の接着強度を流動性制御剤 (ポリフェノール) が弱めるために、除去率の最大値がポリフェノール条件側で多く見られたものと考えられる。

本システムは質量分析法などでは得られない生きた細胞膜の物理特性を取得できる重要な技術である。また、発生だけでなくがんなどの様々な生命現象のメカニズムを物理的・生化学的なアプローチの両面からの解明に大きく寄与することが期待される。一方で本手法の選別法としての応用性は、未分化細胞と分化細胞との流動性の個性差を利用することで、8分で最大94%の細胞選別が達成できる。本手法は何度も繰り返すことができるので、例えば1%の未分化細胞の混入の場合、2回繰り返すことで $(6/100)^3 = 0.004\%$ と高純度になることが期待される。よって本研究システムが基礎的な研究だけでなく、実際の臨床応用に用いる細胞原料の選別法として広く利用されていくことを期待される。

(4) 生体内の不均一環境をモデル化した新規培養基板の開発

古くから胚発生 (原腸陥入や眼杯形成) において硬さの時空間分布の重要性が提言されている。しかしながら、我々が着目している肝臓原基の

- Liver Bud Differentiation. *Stem Cell Reports*, 11(2), 306-316, 2018. (*Corresponding author & Lead contact) 査読有.
4. Takebe T, James M-W, Michael H, Zorn A: Organoid center strategies for accelerating clinical translation. *Cell Stem Cell*, 22, 6, 806-809, 2018. 査読有.
 5. Lewis K, Takebe T*: Tumoroid a la carte: path to personalization. *Hepatology*, 2018. doi: 10.1002/hep.29846. (*Corresponding author) 査読有.
 6. Kimura M, Azuma M, Zhang R-R, Thompson W, Mayhew C, Takebe T: Digitalized human organoid for wireless phenotyping. *iScience*, 4, 294-301, 2018. 査読有.
 7. Takahashi Y, Sekine K, Kin T, Takebe T*, Taniguch H: Self-Condensation Culture Enables Vascularization of Tissue Fragments for Efficient Therapeutic Transplantation. *Cell Reports*, 23(6):1620-1629, 2018. Selected for Cover (*Corresponding author & Lead contact). 査読有.
 8. Zhang R-R, Koido M, Tadokoro T, Ouchi R, Matsuno T, Ueno Y, Sekine K, Takebe T*, Taniguch H: Human iPSC-Derived Posterior Gut Progenitors Are Expandable and Capable of Forming Gut and Liver Organoids. *Stem Cell Reports* (10), 3, 780-793, 13 2018. (*Joint corresponding authors) 査読有.
 9. 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. (*Corresponding author) 査読有.
 10. 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. (*Joint corresponding authors) 査読有.
 11. Koike H, Zhang R-R, Sekine K, Ueno Y, Zheng Y-W, Takebe T*, Taniguch H*: Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-amino acid metabolism. *Development*, 15;144(6):1018-102, 2017. (*Joint corresponding authors) 査読有.
 12. Sekine K, Takebe T, Taniguch H: Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud. *Methods Mol Biol.* 1597:207-216, 2017. 査読有.
 13. 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 査読有.

〔学会発表〕 (計 22 件)

1. 武部貴則, 肝臓の再生医療の現状と展望, 日本再生医療学会シンポジウム, 2019
2. Takebe T., The Era of Organoid Medicine, 日本再生医療学会 International Symposium e, 2019
3. Takebe T., Next-Gen Organoids from Pluripotency, Keystone Symposia, 2018
4. 武部貴則, Translational Embryology Towards Therapy -from human liver organoid experience, 分子生物学会, 2018
5. Takebe T., The Era of Organoid Medicine-from screen to therapeutics, Korean organoid symposium, 2018
6. Takebe T., William F Balistreri Lecture - Promise of future health impact of liver organoids, NASPGHAN(North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition), 2018
7. Takebe T. Modeling Early Hepatogenesis Using Human iPSC Towards Organoid Medicine, Cincinnati CuSTOM industrial Symposium 2018
8. 武部貴則, 臓器再生から創生へーオルガノイド移植の展望, 第 17 回組織移植学会総会・学術集会, 2018
9. 武部貴則, 再生医学の新潮流～創薬から移植まで, 受療者医療保険学術連合会 総会シンポジウム, 2018
10. Takebe T., Modelling Steatosis and Fibrosis in Human Vascularized Organoids, Gordon Research Conference, 2018
11. Takebe T., The Era of Organoid Medicine, Korea Organoid Symposium, Seoul, 2018
12. 武部貴則, 次世代オルガノイド医療の展望, 日本小児科学会学術集会 基調講演, 2018
13. 武部貴則, 「多色細胞系譜解析とオミクスデータの統合による幹細胞・がん研究の新展開」 横浜, ヒト肝炎オルガノイドを用いたホロミクス研究 再生医療学会シンポジウム, 2018
14. 武部貴則, オルガノイド技術を用いたヒト肝臓発生の理解と制御, 第 40 回日本分子生物学会総会, 2017
15. 武部貴則, iPS 細胞由来ミニ肝臓を用いた再生医療, 第 38 回日本炎症・再生医学会シンポ

ジウム,2017

16. 武部貴則, iPS 細胞由来ミニ肝臓と血漿蛋白産生, 第 65 回日本輸血・細胞治療学会講演, 2017
17. Takebe T., Human Liver Bud Transplantation Towards Therapy, Innovation showcase sponsored by Healios, ISSCR 2017 ANNUAL MEETING, Boston, 2017
18. 武部貴則, ヒト器官原基法に基づく移植医療応用への試み, 第 19 回外科分子細胞治療研究会 横浜, 2017
19. 武部貴則, 臓器形成におけるヘテロジェネイティの理解と制御, 日本分子生物学会総会 パシフィコ横浜, 2016
20. Takebe T., Engineering Liver Via iPSC, 2016 Basic Research Workshop American Association for Study of Liver Disease Annual meeting, Boston, 2016
21. Takebe T., De novo generation of diverse organ buds towards therapy, International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, San Francisco, 2016
22. Takebe T., Generation of Diverse Organ Buds from Human iPSCs, French Society for Cell and Gene Therapy, , Marseille, France, 2016

〔図書〕(計 4 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 編著、「実験医学」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 他、日本バイオマテリアル学会誌、Rational design of mechanical environment for self-organizing organ bud, 2017, 58-61
4. 武部貴則 他、化学とマイクロ・ナノシステム学会誌、Impact of mechanical environment on cell adhesion regulating biological process, 2017, 21-26

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：細胞選別法

発明者：武部貴則、松崎賢寿、谷口英樹

権利者：公立大学法人 横浜市立大学

種類：特許

番号：特願 2017-43744 号

出願年：2017

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://takebelab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉川洋史

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, Hiroshi

所属研究機関名：埼玉大学大学院

部局名：理工学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50551173

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小池博之

ローマ字氏名：KOIKE, Hiroyuki

※科費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。