

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09299

研究課題名(和文) 胚葉間の相互作用を意識した、ヒトiPS細胞由来の肺類器官(肺様体)培養法の開発

研究課題名(英文) Lung Organoid culture method concerning meso-endodermal interaction

研究代表者

舟橋 淳一 (Jun-ichi, FUNAHASHI)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：00270827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでのiPS細胞から様々な臓器を作り出そうという研究には、臓器構築には内胚葉由来の上皮細胞だけでなく、中胚葉由来の組織も必要であるという観点が欠落していた。そこでまず、iPS細胞から中胚葉へと分化誘導した細胞(間充織前駆細胞)を得た。これとは別に同じiPS細胞から内胚葉を誘導し、さらに未熟な段階のorganoidまで分化させた。続いて、間充織前駆細胞をMatrigel中に分散させ、内胚葉由来のorganoidをその中に包埋することで共培養を行った結果、内胚葉由来organoidを単独でMatrigelに包埋した場合と比較して、肺organoidの形態形成が促進されるという結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで多能性幹細胞を二つの異なる胚葉に分化させ、それらを組み合わせて培養する研究はほとんど行われておらず、この手法の有用性が明らかとなったことには学術的意義がある。また、自己あるいは組織抗原の一致するiPS細胞から人工的に臓器を作成することが可能になれば、臓器移植の代替手段の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Making organs from human pluripotent stem cells (iPSC) is a challenging approach for developmental biology, cell biology and regenerative medicine.

There are several reports that describe induction of organoid such as gastric, intestinal, pancreatic, liver bud and recently lung. In most of the cases, they first tried to induce endoderm, then further differentiation of endoderm and mesenchyme which supports endoderm. However, in normal development, most of the mesenchyme which works for maintenance of differentiated endoderm is derived from mesoderm. We thought that this discrepancy introduces limitation for further differentiation. Based on this idea, we developed step-wise protocol to make highly organized lung form iPSC. As a first step, we attempted to re-produce the lung organoid that was reported before. In the second step, we induced lung mesenchyme from mesoderm which is derived from iPSC. In the last step, these tissues were combined to produce mature lung.

研究分野：発生生物学

キーワード：オルガノイド 肺の再生 間葉系前駆細胞 共培養

## 1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞（ES細胞）やiPS細胞を分化させて様々な組織を作り出す試みは、ES細胞が樹立されるとほぼ同時に始まり連綿と続いている。しかし、マーカー遺伝子の発現で見ると限りは特定の組織の細胞の性質を獲得している様に見えても、残念ながら培養下で「臓器」と呼べるまで組織構築を進めることに成功した例はない。その原因を考察して、それらの研究には「胚葉」の概念が抜け落ちていることに気づいた。発生生物学の発展により、発生を制御する様々な拡散性の因子が明らかになってきたため、適切なタイミングで正しい量の因子を加えさえすれば、全てを制御できるような錯覚に我々は陥っている危惧がある。

そもそも正常な肺の発生過程では、内皮細胞層と間充織が相互作用することで、分化と形態形成を進めている。ところが、これまでの研究では、まず多能性幹細胞を一つの胚葉（肺の場合で言えば内胚葉）に分化させ、組織を構成する全ての細胞種をそこから生み出そうとしていた。いっぽう正常発生の過程では、内胚葉由来の組織から間充織が生み出されることは、心臓の弁や中隔形成時以外には発生後期ではほとんどみられない。正常発生では、肺の間充織は臓側中胚葉に由来する。

そこで、iPS細胞から中胚葉へと分化誘導した細胞集団を、内胚葉へと分化誘導した細胞集団と共培養すれば、より高度に組織化された肺様体を生み出せるのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

iPS細胞から中胚葉へと分化誘導した細胞集団を、内胚葉へと分化誘導した細胞集団と共培養して、より高度に組織化され且つ新生児肺に近い組織を作り出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

**内胚葉から細気管支や肺胞内皮細胞への誘導** 研究開始時点で、すでに米国のグループからの細気管支や肺胞内皮からなる肺様体の作製法の報告《Dye, B.R. et al. eLife 4, e05098 (2015)》の再現性は確認できていた。いっぽう2017年に別のグループからも、やや異なる方法による、より効率の良い肺様体の作製法の報告があったので《Chen, Y.-W. et al. Nature Cell Biology 19, 542-549 (2017)》、この方法に基づき肺様体の作製を行った。

またこれらの報告では米国で樹立されたiPS細胞を使っているが、ここではアジア人由来の細胞を使っても再現できるか否かを確認するため、理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けた日本人体細胞由来 iPS 細胞を用いた。

**中胚葉から前腸の間充織への誘導** 高濃度 (30 ng/ml) の BMP と低濃度 (10 ng/ml) の Activin-A を培地に加えることで、iPS 細胞を側板中胚葉へと分化誘導できると言われている。つづいて、正常発生では側板中胚葉は壁側中胚葉と臓側中胚葉へと分化するが、臓側中胚葉への分化は Shh により誘導されるという報告があるので、いくつかの濃度で Shh を培地中に加え、分化して来た細胞が発現するマーカー遺伝子を調べることで、臓側中胚葉への分化を確認する。

臓側中胚葉は胸部では主に心臓の中胚葉と前腸の中胚葉を形成する。心臓の中胚葉への分化には BMP シグナルの関与が示唆されている。逆に BMP シグナルを阻害する Noggin

や Chordin は心臓の中胚葉への分化を抑制するので、これらの濃度を調節して培地に加えることで前腸の中胚葉を誘導できる可能性があるため、このを検証を行う。

**内皮細胞と間充織細胞の共培養** どの発生段階で両者を組み合わせるのが最も有効かを、検討した。まずは前腸の発生段階にある内胚葉と、間葉系前駆細胞との組み合わせを試みた。その結果をみながら、より若い発生段階の間葉系前駆細胞との組み合わせも行なった。

#### 4. 研究成果

**内胚葉から気管支や肺胞内皮細胞への誘導** 《Chen, Y.-W. et al. Nature Cell Biology 19, 542-549 (2017)》の方法に基づき、日本人の体細胞由来のiPS細胞からの肺様体の作製に成功した。さらに安定的かつ実験者の手技の習熟度にできる限り依存せずにするため、市販の分化誘導培地 (3dGRO Human Lung Organoid Culture System, Sigma-Aldrich) を用いて、肺様体の作製を試み成功した。いずれの方法においても、今回用いたiPS細胞では、胚体内胚葉への見かけ上の誘導効率が非常に低かった。これは、胚体内胚葉へ分化できなかつたiPS細胞が培地に浮遊せずに、分化した胚体内胚葉の上に強固に接着してしまうために、選択的な排除が起きなかつたことに起因する。これが日本人あるいはアジア人由来のiPS細胞の特性なのか、あるいは今回用いたiPS細胞の個性なのかは、今後の検証が必要と思われる。

**中胚葉から前腸の間充織への誘導** 当初の計画から変更し、市販の中胚葉から間葉系前駆細胞への誘導培地 (STEMdiff Mesenchymal Progenitor kit, Veritas) を用いて、初期間葉系前駆細胞と間葉系前駆細胞を得ることができた。これを肺様体との共培養に用いた。

**内皮細胞（肺様体）と間葉系前駆細胞との共培養** 間葉系前駆細胞をマトリゲル（細胞外マトリックス構成分子の混合物）中に分散させ、この中に肺様体を埋め込んで共培養を行った。この結果、肺様体の形態形成が促進されただけでなく、間葉系前駆細胞との間に、興味深い相互作用が観察された。具体的には、肺様体の近傍に形成された間葉系前駆細胞のコロニーから、索状の構造物が伸び、肺様体と結合していた。この構造物は顕微鏡下では管状に見え、毛細血管である可能性がある。現在ではまだ培養を継続中で今後の検証が必要であるが、仮に血管であれば、これまでの肺様体形成の問題点を解決する重要な第一歩となり得る。これまで肺に限らず様々な臓器のオルガノイドがiPS細胞から作られてきたが、それらを十分な大きさまで成長させるために必要な血管網の作出は困難であった。間葉系前駆細胞と共培養することで血管網が誘導できるのであれば、この問題を一気に解決できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舟橋淳一、岡田克典
2. 発表標題 iPS細胞から肺を作る；内胚葉と中胚葉の共培養
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
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
---------	---------