

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18034

研究課題名（和文）発生期肝臓の血管構築過程の三次元解析

研究課題名（英文）3D analysis of vascular formation during liver development

研究代表者

久世 祥己（Kuse, Yoshiki）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：70837806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：臓器形成期における立体的な血管形成過程について十分な解析がない。本研究では、マウス胎児肝臓内の血管構築過程を明らかにするため、ホールマウント染色、組織透明化技術、3次元画像解析等を用いた検討を実施した。マウス発生初期における大血管と肝臓内血管の連結過程を明らかにした。また、単離した胎児大血管と肝臓の共培養系において大血管から肝臓への血管新生が認められた。そのため、臓器形成期における血管形成過程の一端を明らかにし、それを再現する培養系の基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管構築過程の立体的な解析手法を確立し、胎児肝臓の血管形成に重要な大血管の特定に至った。今後、その大血管の血管内皮細胞等に近似した細胞をiPS細胞から誘導しヒトiPSC肝臓オルガノイド内への混入により組織構造化や機能向上等が認められれば、疾患モデルの確立などに有益となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Vascular formation in organs is accompanied by three-dimensional angiogenesis. Analysis of the angiogenesis process is insufficient during early organogenesis. In this study, we used fetal mouse whole-mount staining, tissue clearing techniques and three-dimensional imaging analysis to clarify the vascular formation between the macrovessels and the liver. In a co-culture system of isolated fetal blood vessels and liver, angiogenesis from the blood vessels toward the liver was observed. Therefore, we clarified a part of the process of angiogenesis during organogenesis and established the basic culture system to recapitulate this process.

研究分野：発生学

キーワード：肝臓発生 3次元画像解析 組織透明化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臓器に近い組織を生体外で創出することにより、ドナー臓器の代替や疾患モデルの確立など様々な応用が期待できると考えられる。近年では発生学に基づく各種臓器のオルガノイド (臓器様構造体) の培養技術が急速に進展している。そのため、発生学の理解を進めることにより、今後のオルガノイド等の培養技術のさらなる発展が期待される。

当研究室では発生初期の肝臓形成プロセスを模倣することにより、ヒト iPS 細胞から立体的なヒト iPSC 肝臓オルガノイドの創出に成功している (Takebe T et al., Nature, 2013, Cell reports, 2017)。生体に近い血管系をヒト iPSC 肝臓オルガノイド内部に形成させるためには、in vivo 血管構築プロセスの模倣が必須である。しかしながら、発生期肝臓での血管構築過程について十分な解析が進んでおらず情報が少ないのが現状である。

### 2. 研究の目的

マウス発生期肝臓内の血管構築過程を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス胎児肝臓の血管構築過程の解析

マウス胎児 (胎齢 9.5, 10.5 日) を対象として、肝臓周囲の血管構築過程の観察、解析を行った。胎齢 9.5 日のマウス胎児については数時間毎の経時変化を観察するため、体節数によりステージを判定した (Theiler Stage Definition を参照)。肝前駆細胞マーカーである HNF4 と血管マーカーである Endomucin



図1 マウス胎児の染色・透明化

抗体を用いて胎児ホールマウント染色を行い、染色後に benzyl alcohol/benzyl benzoate (BABB) を用いて透明化を行った。透明化後、共焦点顕微鏡による撮影を行い、画像解析ソフト Imaris (Bitplane) により任意領域を視覚化した。

#### (2) 培養系における大血管と胎児肝臓の血管形成評価

In vivo における胎児肝臓の血管構築過程を模倣するため、肝臓と大血管をゲル包埋下で共培養し、血管新生評価を行った。肝臓に連結する大血管等や肝臓を単離後、ゲルに包埋し VEGF 添加培地で培養を実施した。培養後のサンプルを免疫染色し共焦点顕微鏡による観察を行い 3 次元血管新生評価を行った。

#### (3) マウス胎児大血管の RNA シークエンスによる遺伝子発現解析

単離したマウス胎児大血管の RNA シークエンスデータに基づく遺伝子発現解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス胎児肝臓の血管構築過程の解析

E9.5 以降の肝臓の体積増加を確認し、肝芽細胞と血管の経時的な増殖を確認した。E9.5 の途中段階より肝芽細胞の増殖が生じ始めることを明らかにした。続いて、肝臓と周囲大血管の立体的な位置関係について調べた。特に肝臓内への血液流入・流出路血管である臍帯静脈・静脈洞と肝臓内血管の構築過程について調べたところ、E9.0 以降、肝臓内血管は静脈洞と連結していること、E10.5 の時期に臍帯静脈と血管吻合が一部始まることを明らかにした。また、肝臓サイズは E10.5 以降に大きく増加することが明らかになった。別の手法を用いた解析により、肝臓内への血流開始が E10.5 付近において起きることを明らかにしているため、肝臓内血管と大血管との吻合および大血管から肝臓内への血流開始によって肝臓サイズは増加すると考えられる。

#### (2) 培養系における大血管と胎児肝臓の血管形成評価

In vivo における発生期肝臓周囲の血管構築過程の解析結果をもとに、肝臓周囲に存在する各大血管 (静脈洞、臍帯静脈) の血管新生能について評価した。各大血管をゲル中において培養した結果、いずれの大血管も血管新生を示すことを明らかにした。培養後の大血管についてホールマウント染色を行い 3 次元画像解析を実施したところ、立体的な分枝血管形成など、各大血管について特徴的な血管新生が認められた。また、in vivo において胎児肝臓と連結している静脈洞を単離し、胎児肝臓と共培養を行った。胎児肝臓の単体培養と比較して、胎児肝臓周囲への血管形成、肝芽内部の肝前駆細胞増殖が促進した。

#### (3) 肝臓周囲大血管の特性解析

各大血管の遺伝子発現解析を行い、それぞれ異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした。各大血管に特異的な因子 (発現値 2 倍以上) は約数千個認められ、その中でも肝臓の初期発生時期に特異的な因子は数百個まで絞り込むことができた。また、単離した大血管の遺伝子発現解析から抽出した上位の発現変動遺伝子について免疫染色を行い、胎児切片上で各大

血管における特異的タンパクの発現が確認できた。

以上の結果から、胎児期における臓器形成期の立体的な血管形成過程を明らかにし培養系においても一部 *in vivo* に近い現象を確認できたことから、胎児肝臓の血管形成に特定の大血管の重要性を示した。今後、ヒト iPS 細胞からその大血管の血管内皮細胞等に近似した細胞の分化誘導系の開発を進め、ヒト iPSC 肝臓オルガノイド内に混入しオルガノイドの機能向上等について検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuse Yoshiki, Taniguchi Hideki	4. 巻 28
2. 論文標題 Present and Future Perspectives of Using Human-Induced Pluripotent Stem Cells and Organoid Against Liver Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 160S ~ 165S
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689719888459	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久世 祥己, 田所 友美, 鈴木 優衣, 松野 達也, 山里 輔, 谷口 英樹
2. 発表標題 新規オルガノイド創出に向けた胎児性血管の有用性
3. 学会等名 第19回再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久世 祥己, Carolina Erica, 松本 真弥, 田所 友美, 上野 康晴, 谷口 英樹
2. 発表標題 血流開始後の臓器肥大メカニズム解析に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------