

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22666

研究課題名（和文）in vitro血管発生再現法を用いた肺組織再構成

研究課題名（英文）Human iPSC-derived lung generation using in vitro vasculogenesis

研究代表者

田所 友美（TADOKORO, Tomomi）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20507644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、ヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）から肺の細胞を作製し、その細胞を元に3次元的な臓器の構造を模倣した肺オルガノイドの作製を行った。将来の移植医療に応用するためにはオルガノイド移植後の早期の血管化が重要であると考え、肺オルガノイドへ血管組織を付与する技術の開発とその移植方法について開発を進めた。その結果、再生医療に応用可能なヒト肺組織創出の基盤技術を確立することができた。将来的に呼吸器疾患を対象とした創薬開発や再生医療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じ、ヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）から3次元的な組織構造を模倣した肺オルガノイドを作製した。さらに、再生医療への応用を見据えた肺オルガノイドへの血管付与技術と肺への同所性移植法の開発を行った。肺へのオルガノイド同所性移植法に関しては、他の臓器と比較すると開発の遅れている部分であり、学術的にも価値のある研究開発である。また、肺オルガノイドへの血管付与は、移植効率の向上に加え、肺の主な働きである血中への酸素取り込みの向上も期待できる。本技術は、呼吸器疾患を対象とした創薬開発や再生医療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, lung progenitors were differentiated from human induced pluripotent stem cells (hiPSC), and then lung organoids, which can recapitulate three-dimensional tissue structure, were generated from hiPSC-derived lung progenitors. To apply these organoids to regenerative medicine, it is important to get early access to blood supply. Therefore, we developed the vascularized lung organoids and the method for orthotopic transplantation of lung organoids. We could establish the technology for human lung tissue generation from hiPSCs, which is applicable to regenerative medicine. This technology is expected to apply to drug discovery and regenerative medicine for respiratory disorders in the future.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：肺オルガノイド 血管 移植

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

三次元臓器創出研究は、1998年のヒトES細胞の発見からEmbryoid bodyを介した分化誘導などを用いて行われており、眼胞オルガノイドなどが作製されてきた[Eiraku *et al.*, *Nature*, 2011]。一方、2009年のSatoらによる組織幹細胞を用いた腸上皮オルガノイドを皮切りに、様々な組織の三次元上皮オルガノイド培養技術が発達してきていた。さらに、Yamanakaらによる2007年のヒトiPS細胞の発明が加わり、ヒト組織の三次元上皮オルガノイド培養技術が世界中で開発されている。ヒトiPS細胞の発明によりヒト組織材料が豊富に手に入るようになり、自家細胞が作製可能なことから再生医療への応用へ向けた機運が高まり、2014年にTakahashiらによる滲出型加齢黄斑変性症を対象とした人類初の自家iPS細胞由来網膜色素上皮シート移植が実施された。その後、本邦においてiPS細胞を用いた再生医療が次々と実用化している。

そして近年では、上皮細胞に加えてより複雑な組織構造、例えばin vivoにおける血管構造や神経などの付与技術が開発されつつある[Takebe *et al.*, 2017; Workman *et al.*, 2018]。研究代表者が所属する研究室では、移植先でホスト血管と吻合し機能的なヒト血管構造を再構成可能な肝オルガノイドを開発していた[Takebe *et al.*, 2013; Takebe *et al.*, 2017]。研究代表者はこの技術を発展させ、in vitroにおいて血管構造を含む肝組織を再構成可能な「in vitro 血管発生再現法」を開発した。

### 2. 研究の目的

本研究は、肝オルガノイドからの組織再構成を可能にする「in vitro 血管発生再現法」をヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)由来肺オルガノイドに応用し、ヒト肺組織を再構成することを目的としている。

### 3. 研究の方法

細胞株、動物などの入手法

ヒトiPS細胞1231A3株(HPS0381)はRIKEN Cell Bankより購入した。GFP発現マウスC57BL/6-Tg(CAG-EGFP)は日本SLCより、NOD/Scidマウスは三協ラボよりそれぞれ購入した。

ヒトiPS細胞維持培養

ヒトiPS細胞1231A3株は、StemFit AK02培地(AJINOMOTO)中、フィーダーフリー培養により未分化細胞の拡大培養を行った。

肺胞オルガノイド作製

肺胞オルガノイドの分化誘導はYamamotoらの方法を改変し行った[Yamamoto *et al.*, *Nat Methods*, 2017]。未分化維持培養したヒトiPS細胞1231A3株を酵素分散後、ラミニンコートした培養皿に播種し、アクチビンAとWntシグナル活性化因子CHIR99021の添加により胚体内胚葉(DE)へと分化誘導し、NogginとSB431542の添加によりBmpシグナルとTGF-betaシグナルを抑制することで前腸内胚葉(AFE)へと分化誘導した。その後、Bmpシグナル、レチノイン酸シグナル、Wntシグナルを活性化させることで前方前腸内胚葉(VAFE)へと分化誘導を進めた。その後、マトリゲル中に包埋し、最大2週間まで3次元培養を行った。通常、肺胞オルガノイドの作製には間葉系の細胞が必要とされているが、本研究においては胚体内胚葉への分化誘導期間を調整することにより内胚葉細胞と間葉系細胞の双方を含むよう改変している。

GFP発現マウス由来の肺胞オルガノイドは、E13マウス肺を酵素分散した後、マイクロパターンプレートに播種することにより作製した。

血管化肺胞オルガノイド作製

血管化肺胞オルガノイドは、上記の前方前腸内胚葉を作製後、ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞、間葉系細胞と共にマイクロパターンウェル上で混合培養することにより形成した。その後、「in vitro 血管発生再現法」によりこれら小型のオルガノイドを融合している。

肺胞オルガノイド移植

NOD/Scidマウスはメドトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの三種混合薬による麻酔下、肺胞オルガノイドの注入移植を実施した。肺への移植の際は人工呼吸器へ接続を行った。Bleomycinによる肺傷害モデルは、麻酔後、気道を介して1.25 mg/kgを投与することで作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) 肺胞オルガノイドの分化誘導法

ヒトiPSC細胞からの各分化誘導ステージにおけるマーカー遺伝子発現をqRT-PCR解析した

(図1)。その結果、未分化マーカーである Oct-4 の発現は iPS 細胞でも高く、DE、AFE、VAFE と分化が進むにつれて低下した。DE マーカーである FoxA2 の発現は DE で最も高く、AFE、VAFE と徐々に発現が低下した。未分化マーカーと AFE マーカーとしても知られている Sox2 は、ヒト iPS 細胞と AFE で高い発現を示した。肺前駆細胞マーカーである Sox9 は AFE、VAFE と分化が進むにつれて発現量が上昇していた。肺前駆細胞マーカーの Nkx2-1 は、VAFE で初めて発現が認められた。

免疫蛍光染色により、肺前駆細胞マーカー Nkx2-1 の発現と間葉系細胞マーカー Vimentin の発現が認められた。さらに、Flowcytometry 解析によって、上皮細胞マーカー EpCAM 発現細胞が約 90%、間葉系細胞マーカー CD140b 発現細胞が約 7% 存在することも明らかとなった (図2)。

三次元培養後の肺臓器オルガノイド構成細胞について免疫蛍光染色法により解析を行ったところ、肺前駆体マーカーである Sox9 と Sox2 が共発現していた。また、I 型肺臓器上皮細胞マーカー AQP5 の発現と II 型肺臓器上皮細胞マーカー LPCAT1 と SFTPC の発現も認められ、分化能を有する肺臓器オルガノイドの作製法が確立できた (図2)。

### (2) 血管化肺臓器オルガノイドの作製

ヒト iPS 細胞由来肺前駆細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞の3種類の細胞を 10:2:2 の割合で混合し、マイクロパターンプレートに播種してオルガノイドを形成した。血管内皮細胞は蛍光標識を行っている。その後、それらのオルガノイドを融合し、in vitro における血管形成の観察を7日間行った (図3)。その結果、in vitro における血管形成が認められたが、肝臓オルガノイドと比較すると細く血管密度も低かった。今後は培地条件を至適化することで in vitro 血管形成を促進することができると考えられる。

### (3) 肺臓器オルガノイド同所性移植系の確立

肺臓器オルガノイドの移植に関しては、オルガノイドとして移植するのではなくシングルセルとして移植している報告が多い[Mou *et al.*, Cell Stem Cell, 2012; Miller *et al.*, Stem Cell Rep, 2018]。また、移植のしやすさから同所性でなく皮下や腎被膜に移植されることも多い[Mou *et al.*, Cell Stem Cell, 2012; Chen *et al.*, Nat Cell Biol, 2017; Dye *et al.*, eLife, 2017]。肺への同所性移植をしているのは、Miller らによる iPS 細胞由来肺前駆体オルガノイドを酵素処理で分散させた細胞の気道への注入移植である。前処理が Naphtalene による気道傷害モデルであったため、気道への生着と気道上皮細胞への分化に関しては評価されているが、肺への生着は不明である[Miller *et al.*, Stem Cell Rep, 2018]。従って、肺臓器オルガノイド同所性移植系の確立は非常に挑戦的な開発であることは間違いないが、将来的にオルガノイドによる肺の再生医療に発展させるためには避けて通れない技術開発であると言える。

図1. ヒトiPS細胞から肺臓器上皮細胞への分化誘導法

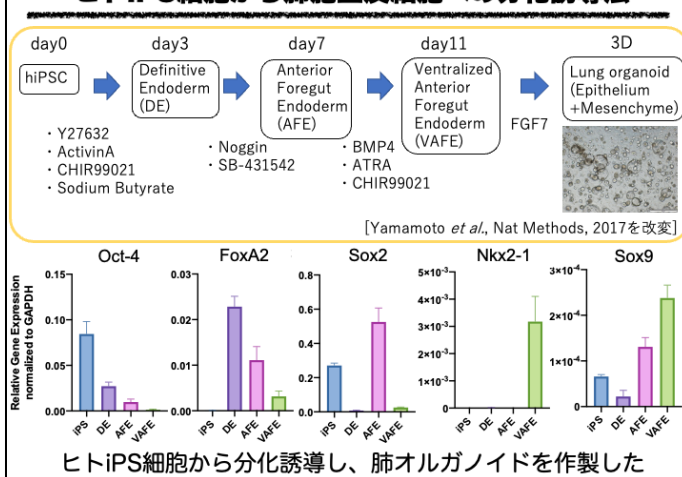


図2. 肺臓器オルガノイド構成細胞の解析

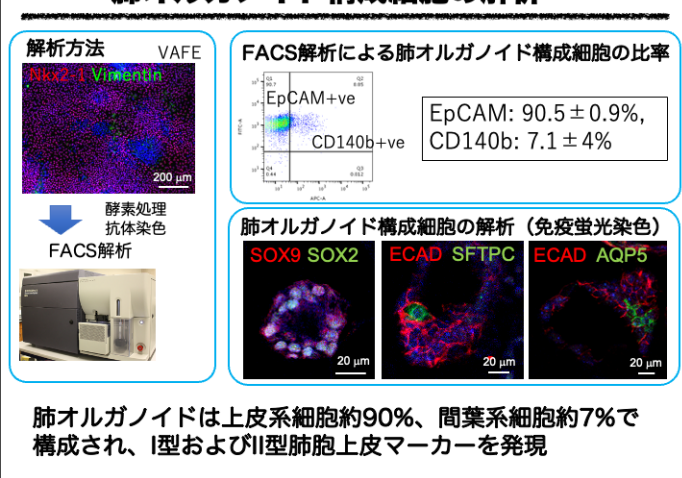
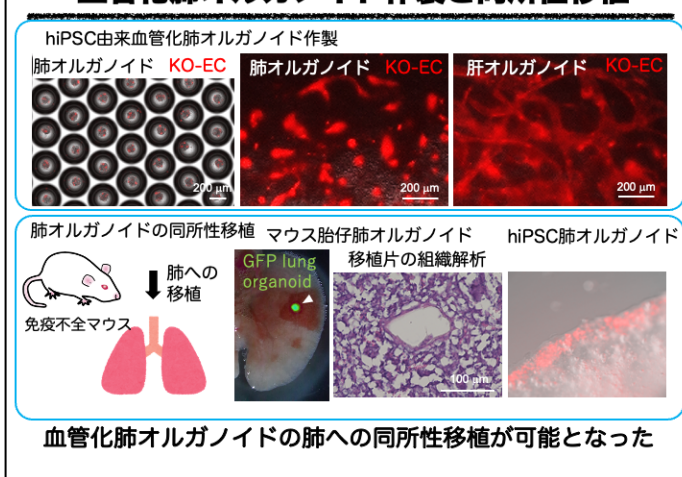


図3. 血管化肺臓器オルガノイド作製と同所性移植



In vitro 血管化オルガノイドを肺表面に貼付する移植する方法については、肺が大きく伸縮するという動きにより移植そのものが非常に困難であった。そこで、肺の肋骨の間を切開し、GFP マウス胎仔肺由来オルガノイドの肺への注入移植を試みた。その結果、移植3週間後においてGFP 発現領域が確認された(図3)。組織解析を行うと、移植片中には気道様構造と未熟な肺胞様構造の形成が認められた。また、移植片内部における血球や毛細血管の存在が認められた。以上より、オルガノイド移植による肺組織再構成が確認された。

肺注入移植においては注入部位でのみ組織再構成が生じるため、移植片の位置制御が可能となるのが利点であるが、肺全体における組織再構成の実現は困難であると推定された。そこで、我々はさらにクサビラオレンジ発現ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞を含む血管化ヒト iPS 肺オルガノイドの免疫不全マウス NOD/Scid への気道注入移植を試みた。その結果、特に肺傷害モデルにおいて特に肺辺縁部にクサビラオレンジ陽性細胞の生着が認められたが、明確な血管化については認められなかった。

以上の結果より、肺へのオルガノイド移植に成功し、同所性における肺組織再構成が可能であることが示された。今後は細胞の状態や移植方法の最適化を行うことで、血管化を含む肺組織再構成法を再生医療への応用に向けて進展させることが必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mori A., Murata S., Tashiro N., Tadokoro T., Okamoto S., Otsuka R., Wada H., Murata T., Takahashi T., Seino K., Taniguchi H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Establishment of Human Leukocyte Antigen-Mismatched Immune Responses after Transplantation of Human Liver Bud in Humanized Mouse Models.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10020476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida T., Murata S., Matsuki K., Mori A., Matsuo M., Mikami S., Okamoto S., Ueno Y., Tadokoro T., Zheng Y.W., Taniguchi H.	4. 巻 21
2. 論文標題 The Regenerative Effect of Portal Vein Injection of Liver Organoids by Retrorsine/Partial Hepatectomy in Rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 1件）

1. 発表者名 Tomomi Tadokoro, Keisuke Tanaka, Brigid L.M. Hogan, Hisato Kobayashi, Hideki Taniguchi.
2. 発表標題 DORSOVENTRAL DIFFERENCE IN TRACHEAL BASAL STEM CELLS
3. 学会等名 ISSCR 2019 meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田所 友美、加藤 幹茂子、小林 達哉、武部 貴則、谷口 英樹
2. 発表標題 ヒトiPSCを用いた肺繊維化オルガノイドモデルの創出
3. 学会等名 第126回日本解剖学会第98回日本生理学会大会合同会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tomomi Tadokoro and Hideki Taniguchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 16
3. 書名 Advances in Medicine and Biology.	

〔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
研究協力者	村田 聡一郎  (Murata Soichiro)		

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
---------	---------