

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22920

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来自己組織化腸管スフェロイドによるグラフト製造および移植法の開発

研究課題名(英文) Development of intestinal graft production and transplantation method using human iPS cell-derived self-organization intestinal organoids.

研究代表者

水谷 知裕 (Mizutani, Tomohiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80632588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から誘導された自己組織化腸管スフェロイドを特殊な溝状のプレート上で、管状のスフェロイドへと自律融合させることに成功した。また、バイオリアクターによる回転浮遊培養を導入することで、効率的な培養条件を見出した。樹立した腸管スフェロイドを、免疫不全マウスに移植し、in vivoでさらなる組織成熟を図った。腸間膜部への安定した移植法を確立することができた。腸管スフェロイドは移植後により増大、成熟することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞由来の「自己組織化腸管スフェロイド」を用い、実際の移植治療に応用可能な腸管グラフトへと成熟させる技術の開発を目指す本研究は、世界で初めての管腔構造を有する腸管グラフトを作出し、免疫不全マウス実験系を用いたグラフト成熟技術の確立により、体外で作出した腸管グラフトを移植することで腸機能を回復させるという新規治療のPOC (Proof Of Concept) 取得を目指したものである。本研究の成果を発展させることで、広範な腸機能の消失を伴う短腸症候群に対する根本的治療の基盤技術開発のみならず、腸上皮幹細胞による体外での自律的な3次元臓器形成、機能獲得に関する重要な知見の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Self-organization intestinal spheroids derived from human iPS cells were successfully auto-fused into intestine-like tubular spheroids on a special low-attachment micro groove plate. Efficient culture conditions to maintain a large structure of tubular intestinal spheroids were also found by introducing rotational suspension culture using a bioreactor. The established intestinal spheroids were transplanted into immunodeficient mice for further tissue maturation in vivo. We were able to establish a stable transplantation method of intestinal tubular spheroids to the mesenteric region. The intestinal spheroids grew and matured into intestinal graft tissue after transplantation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸管スフェロイド iPS細胞 腸管グラフト 自己組織化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞研究、再生医療の発展に伴い、免疫拒絶反応を回避し得る自家腸管組織移植への期待は高まっているが、未だ全層性の管腔構造として腸管機能を有する「iPS 細胞由来の腸管グラフト」を作出する技術は達成されてない。本研究では、iPS 細胞由来の「自己組織化腸管スフェロイド」を用い、実際の移植治療に応用可能な腸管グラフトへと成熟させる技術の開発、および臨床応用への検証としてマウスを用いた移植、二次的な成熟腸管グラフト吻合技術の開発を目指す。本研究の遂行により臨床応用可能な技術開発の基盤のみならず、腸上皮幹細胞による体外での自律的な3次元臓器形成、機能獲得に関する重要な知見の創出を期待する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者らが独自に進めてきたヒト iPS 細胞由来の「自己組織化腸管スフェロイド」を用いて、1) 世界で初めての管腔構造を有する腸管グラフトを作出し、2) 免疫不全マウス実験系を用いたグラフト吻合移植技術の確立による POC (Proof Of Concept) 取得を目指すものである。近年、体性幹細胞あるいは多能性幹細胞由来の培養細胞、人工腸管など移植技術の開発が多く報告されているが、iPS 細胞由来の管腔構造を有する腸管スフェロイドを使用し、移植による腸管グラフトを作出する試みは研究代表者らの独自のものである。加えて、自律的に管腔構造をとる腸管スフェロイドを使用することで、既存研究とは別次元の完成度を有するグラフト移植技術の確立を目指す本研究は、患者由来腸管グラフト移植治療という新規臨床治療法の基盤研究として、POC 確立に大きな寄与を期待できると考える。

3. 研究の方法

1) ヒト iPS 細胞由来自己組織化腸管スフェロイドの成熟最適条件の検討：

ヒト iPS 細胞から特殊な低接着プレート上で、自律的に融合を促すプレート法により誘導された自己組織化腸管スフェロイドを用いて、*in vitro* における腸管グラフトとしての成熟、伸展条件の検討を行なう。網羅的な培養成長因子および発生生物学の見地から胎生期の腸管成熟および伸展に重要なシグナル因子に候補を絞った培養条件を検討する。各条件におけるスフェロイドは遺伝子発現解析・組織学的評価・機能試験を行い、腸管特異的機能の安定獲得が可能な誘導条件を決定する。これら管腔状スフェロイドから、免疫不全マウスに移植可能な直径 3000 μ m、長さ 10mm 程度の腸管グラフトへと成熟し得る培養条件を最適化する。

2) ヒト iPS 細胞由来自己組織化腸管スフェロイドのマウス移植の開発：

樹立した管腔状スフェロイド由来の腸管グラフトを、NSG 超免疫不全マウスに移植し、*in vivo* でさらなる組織成熟を図る。生体内における後腸スフェロイドの成熟には腎被膜下や腸間膜部への移植の報告があるが、二次的なグラフト吻合技術の開発を視野に入れた腸間膜部への腸管スフェロイドの移植を中心に移植部位、期間、吻合術のタイミングの検討を行う。移植法が確立した後は、体内での腸管グラフトの生着、成熟を評価する。体外で作出された腸管グラフトが実際の生体内でいかに腸管して機能するか、腸管上皮の吸収機能や分泌機能の評価、および腸管

内容物によるグラフト上皮の成熟を中心に解析する。

4. 研究成果

1) ヒト iPS 細胞から特殊な低接着プレート上で、自律的に融合を促すプレート法により誘導された自己組織化腸スフェロイドを安定的に作出することを確立した。その後、腸管形状への誘導のための特殊な溝状のプレート内で、スフェロイドを管状スフェロイドへと自律融合させることに成功した。AGC 社と共同で設計した、より溝形状の大きなプレートを用いることで、融合時点より更に大きな直径の腸管スフェロイドを作出することに成功した。In vitro における腸管グラフトとしての成熟、伸展条件の検討を行ない、網羅的な培養成長因子および発生生物学の見地から胎生期の腸管成熟および伸展に重要なシグナル因子に候補を絞った培養条件を検討することで、Wnt シグナルを中心とした培養因子の最適濃度を見出した。

また、バイオリアクターによる回転浮遊培養を導入することで、融合により大型化した腸管スフェロイドに効率的なガス交換、培地供給が可能であることを見出した。

各条件におけるスフェロイドは遺伝子発現解析・組織学的評価を行い、腸管特異的分化細胞の存在や、分化に応じた遺伝子発現を確認することができた。また、In situ hybridization により、腸上皮幹細胞マーカーである Lgr5 の発現も確認することができた。

2) 樹立した管腔状スフェロイド由来の腸管グラフトを、NSG 超免疫不全マウスに移植し、in vivo でさらなる組織成熟を図った。培養条件、培養環境、培養期間が異なる腸管スフェロイドを移植することで、生体内での臓器構築、成熟を評価した。その結果、一定期間の体外培養により in vitro で成熟させた腸管スフェロイドがより安定的に生着、成長することが確認された。生体内における後腸スフェロイドの成熟には腎被膜下や腸間膜部への移植の報告があるが、今回は、腸間膜部への腸管スフェロイドの移植を中心に移植部位、期間のタイミングの検討を行なった。安定した移植法を確立することができたが、体内での腸管グラフトの成熟において、腸管スフェロイドの管腔が多房化することを認めため、二期的な吻合術を行うことはできなかった。今後、多房化する条件を検証し、移植後も腸管スフェロイドが単腔のグラフトとして機能しうる手法の開発を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuno Reiko, Ito Go, Kawamoto Ami, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Takeoka Sayaka, Nagata Sayaka, Takahashi Junichi, Tsuchiya Mao, Anzai Sho, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Notch and TNF- signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100906 ~ 100906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100906	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 Tsuchiya Mao, Ito Go, Hama Minami, Nagata Sayaka, Kawamoto Ami, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kuno Reiko, Takeoka Sayaka, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Mizutani Tomohiro, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 542
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.021	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 -

1. 著者名 Morikawa Ryo, Nemoto Yasuhiro, Yonemoto Yuki, Tanaka Shohei, Takei Yuria, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Nozaki Kengo, Mizutani Tomohiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Intraepithelial Lymphocytes Suppress Intestinal Tumor Growth by Cell-to-Cell Contact via CD103/E-Cadherin Signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.01.014	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0件

〔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
---------	---------