

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689052

研究課題名(和文) ヒト iPS 細胞を用いた革新的三次元肝・膵組織創出法の開発

研究課題名(英文) Generation of vascularized and functional tissues from human iPS cell

## 研究代表者

武部 貴則 (TAKEBE, TAKANORI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20612625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導研究において、異なった細胞系譜の時空間的な相互作用を活用した、「臓器の再構成に基づく分化誘導」を実現化した革新的な三次元培養技術を新たに開発し、ヒト臓器創出を可能とする基盤技術を確立した。本法を用いて創出した肝臓原基や、膵島原基を免疫不全マウスに移植することにより、ヒト血管網を有した機能的な組織が構築されることが判明した (Takebe, et al. Nature, Cell Stem Cell)。本法を基盤技術として、様々なヒト臓器再構成系を開発していくことにより、多くの患者を救済する革新的な再生医療を実現化できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Critical shortage of donor organs for treating end-stage organ failure highlights the urgent need for generating organs from induced pluripotent stem cells (iPSCs). Despite many reports describing functional cell differentiation, no studies have succeeded in generating a three-dimensional vascularised organ such as liver. In this program, we showed the generation of vascularised and functional human liver from iPSCs by transplantation of liver buds created in vitro (iPSC-LBs). Mesenteric transplantation of iPSC-LBs rescued the drug-induced lethal liver failure model. Furthermore, similar principle was extended to generate vascularized pancreatic islet towards therapy. Although efforts must ensue to translate these techniques to patients, our proof-of-concept, i.e. organ bud transplantation, provides a promising new approach towards regenerative medicine.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

従来の固形臓器を対象とした再生医療研究の多くは、iPS 細胞等の幹細胞へ様々な分化因子を導入することにより機能細胞誘導を試みるものが主であった。しかし、仮に成体レベルの機能細胞を得られたとしても、一般に細胞移植療法の治療効果は限定的であり、臓器移植に代わる再生医療実現化のためには、“細胞”ではなく、“臓器”構成系の開発が急務であった。

### 2. 研究の目的

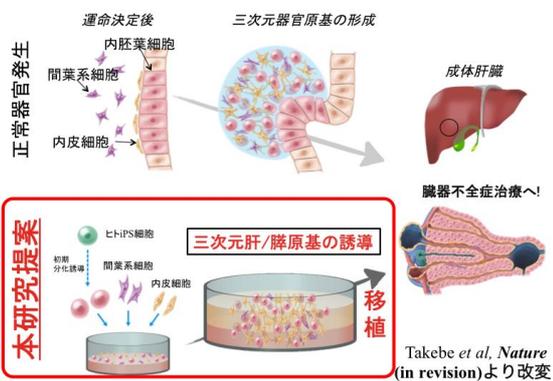
肝臓や膵臓の器官形成過程は、運命決定を終えた細胞集団(以下、肝/膵前駆細胞)と内皮細胞、間葉系細胞との相互作用により原基の形成が始まる(右図)。代表者は、これら発生初期過程の再現化により三次元ヒト肝/膵原基の誘導に成功した。誘導された原基は、移植により血管構造を有するヒト肝/膵組織へと成熟することを示している(次項図; Takebe, T et al. *Transplant Proc*; 組織及び臓器の作製方法. 特願 2011-210157)。本研究ではヒト iPS 細胞より誘導した肝/膵前駆細胞から臓器の原型となるヒト肝/膵原基の創出を行う。さらに、その移植操作技術を検討することにより機能的なヒト肝/膵組織を再構成し、医療応用するための基盤技術を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

各組織(皮膚・血液・肝細胞)から樹立したヒト iPS 細胞株の肝細胞系への分化誘導効率の比較検討し、高分化能ヒト iPS 細胞株を選別した。選別したヒト iPS 細胞株 TkDA3-4 を用いてヒト iPS 細胞から肝細胞系列への分化誘導法を開発した。その際、アミノ酸代謝酵素(TAT, TD02)、糖代謝酵素(G6Pase, PEPC)、アンモニア代謝酵素(CPS1)の発現上昇を評価した。次に成熟肝細胞に特徴的なトランスポーターによる取り込み能および排出能を indocyanine green (ICG)を用い検証した。次には、選別したクローンを用いて、器官発生で生じる複数の異なった未分化細胞による細胞間相互作用の再現化というアプローチにより、3 次元的なヒト組織・臓器再構築技術の開発を実施した。

生体内における肝発生過程においては、運命決定を終えた肝臓内胚葉細胞に対し、未分化血管内皮細胞および間葉系細胞との相互作用が立体的な肝芽形成に必須である。そこで、これらの肝発生初期プロセスの再現化を目的として、ヒト iPS 細胞由来肝臓細胞に対しヒト臍帯静脈由来内皮細胞およびヒト間葉系幹細胞と共培養を実施した。すなわち、ヒト iPS 細胞から分化誘導したヒト肝臓細胞に対し、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)を加え特殊条件下で共培養を実施した。ダイナミックな細胞の空間的再配置による自律的な組織化のプロセスは顕微鏡により追跡を行った。各種細胞

### 発生初期プロセスの再現化に基づくヒト臓器構成系開発



Takebe et al. *Nature* (in revision)より改変

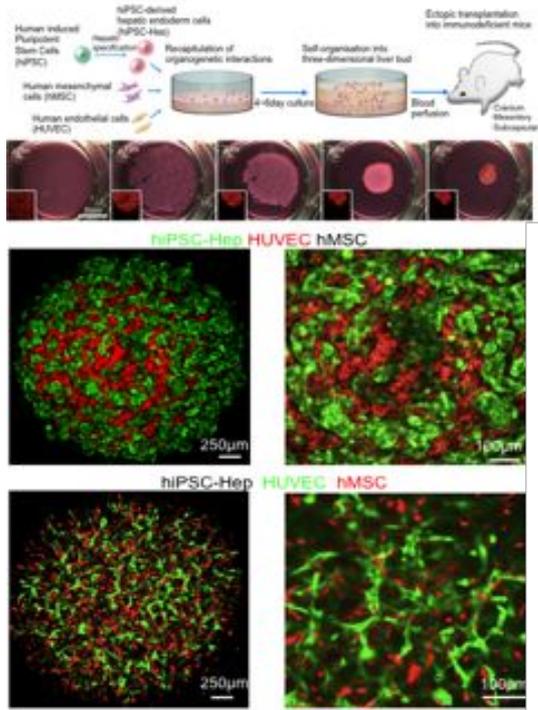
に異なる蛍光たんぱく質を導入することにより、超高速ライブイメージング 4D 共焦点顕微鏡による細胞の形態および局在解析を行った。構造体の分化段階を理解する目的で定量 PCR およびマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。さらに、免疫不全マウスへの移植実験を実施し、ヒト肝芽様構造体のさらなる分化を試みた。尚、移植片における細胞動態を生きたまま経時追跡するため、本研究室が独自に確立してきたクラニアルウインドウ法による移植モデルを用いた。クラニアルウインドウ法とは、免疫不全マウスの頭蓋骨を取り除いて作製した観察窓(クラニアルウインドウ)下、脳表面上へ移植する方法で、ホストマウスの血流を有する長期間安定した血管ネットワークの再構築が可能な技術である。本法と各種蛍光標識細胞細胞を組み合わせることで、超高速ライブ観察を実施した。また、再構成された血管構造がホスト血管から十分な血液供給を受けていることを示すために、ローダミンデキストランの尾静脈注射による血流の可視化を行った。移植二週目には、組織学的解析を実施した。移植 60 日目には、移植したマウス血清中にヒトアルブミンタンパク質や、ヒト型代謝を検出可能な薬物であるケトプロフェンの代謝試験を実施した。成熟化したヒト肝組織は、メタボローム解析により肝臓特異的な代謝物質を評価するとともに、電子顕微鏡による解析により特徴的な微細構造が形成されているか検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト iPS 細胞由来肝臓原基形成過程の in vitro ライブ観察

我々は任意の条件で未分化な三種類の細胞、即ち、iPS 由来肝内胚葉細胞と、血管内皮細胞、間葉系細胞を共培養することにより、三次元組織が自律的に形成されることを見いだした。驚くべきことに、本法においては平面環境で細胞培養を行うにも関わらず、細胞同士がダイナミックに遊走し、相互作用を持ちながら立体的な組織が形成されることが判明した(図 1)。形成された組織は、5mm 大の球状構造を取り、のちの移植操作等に耐えうる力学的に安定した構造体であった。さらに、蛍光標識細胞を用いた共焦点顕微鏡に

図1 ヒト iPS 細胞由来肝原基の創出



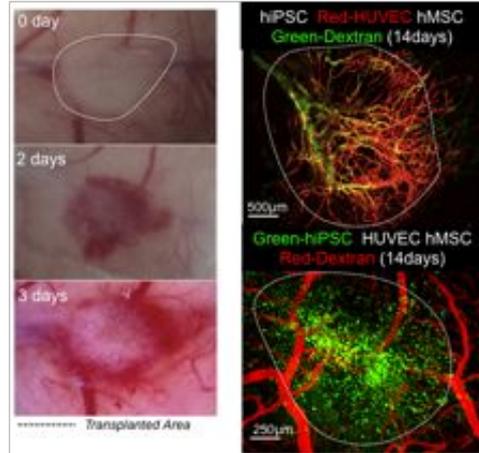
よる観察の結果、間葉系細胞に裏打ちされた血管内皮細胞がネットワーク構造を形成し、iPS 細胞由来肝芽細胞はそれらに沿って均一に配置されていた。三次元組織の特性解析を実施する目的で、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。肝臓発生の際、段階的に発現が上昇する 83 種の肝臓特異的遺伝子発現情報の比較から、三次元組織は生理的に形成される肝芽と同様のパターンを示すことが明らかとなった。以上より、器官発生の初期プロセスを人為的に再現するという独自の手法によって、複数の細胞系譜による相互作用を介した初期分化誘導を行うとともに、初期分化を遂げた内胚葉細胞の組織形成能力を誘導し、試験管内で組織・臓器の元となる肝芽 (Human iPS-cell-derived liver bud; hiPSC-LB) を人為的に作製することに成功したものと示唆された。

**(2) ヒト iPS 細胞由来肝臓原基移植による機能的な肝組織の創出**

さらに、形成されたヒト iPS 細胞由来肝臓原基 (hiPSC-LB) が終末分化組織を構成できるか否かを検討するために、免疫不全マウスの頭部観察窓内への移植実験を実施した。本法の利点は、観察窓内から移植組織を取り出す必要なく、*in vivo* において追尾定点観察することが可能な点である。

移植を行った hiPSC-LB は、早期 (48 時間) の段階で鮮紅色の血液灌流が移植片全域に行われることが肉眼的に観察された (図 2)。共焦点顕微鏡によるライブ観察の結果からも、再構成されたヒト血管内に血液が流入していることが確認された。移植片の辺縁部に

図2 ヒト iPS 細胞由来肝原基の *in vivo* ライブ観察

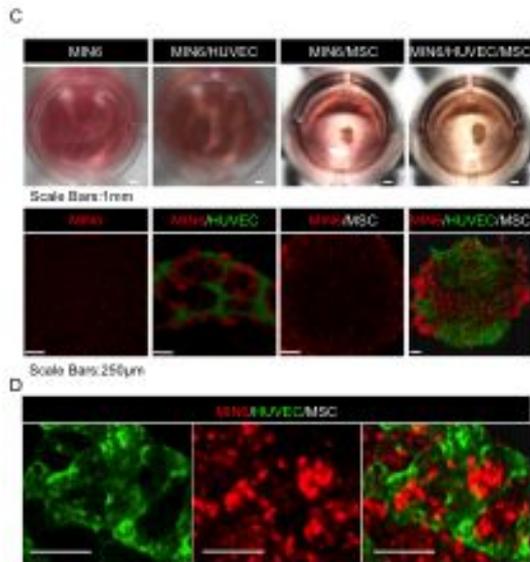


においては、マウス・ヒト血管が直接吻合し、内腔では血液が交通していることが示された。再構成された血管の内径は、10~200  $\mu\text{m}$  まで大小様々な階層性を有しており、120 日以上の長期間に渡り機能的な構造を保っていた。

このようなヒト血管網の早期再構成により、hiPSC-LB はヒト肝臓の機能を発揮可能であることが示唆されている。すなわち、移植を行ったマウスの血清よりヒト特異的なタンパク質が検出され、肝臓の重要な機能の一つである薬物代謝機能も発揮されることが明らかとなっている。以上より、従来の二次元培養系では達成困難であった、血管網を有する機能的なヒト肝臓の創出が可能であることが示唆された。

そこで、重篤な免疫不全状態で異種細胞や組織の生着・分化に優れる NOG マウスの特徴を活かし、肝細胞が選択的・特異的に破壊される Alb-Tk-NOG マウスを導入した。Alb-Tk-NOG マウスは、ガンシクロビル(GCV) 投与により肝障害を誘導する誘導発症型肝傷害マウスモデルである。本モデルを導入し、ヒト iPS 細胞由来肝臓原基移植による肝不全治療効果の検証を試みた。その結果、移植後 30 日目における生存率は非移植群 (N=10) において 30% 程度であったのに対し、ヒト iPS 細胞由来肝臓原基移植群 (N=17) においては、90% 以上のを保つことが示された。驚くべきことに、移植 30 日目におけるヒト iPS 細胞由来肝臓原基移植群 ( $1 \times 10^7$  cells) の生存率は、ヒト成体肝細胞を  $1 \times 10^7$  cells 移植を行った群よりも優れることが明らかとなった。以上より、ヒト iPS 細胞由来肝臓原基は移植により、肝臓の機能を総合的に発揮し、著名な治療効果を発揮可能であるものと示唆された。

**(3) 脾島誘導に向けたヒト血管網を有する三次元組織創出系の確立**

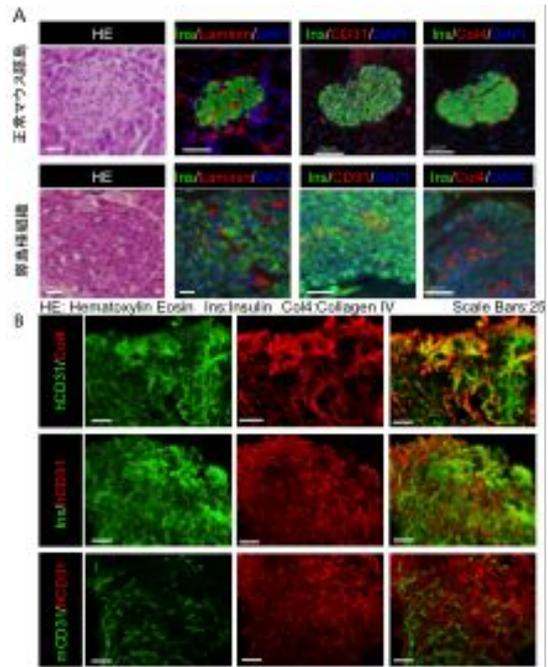


さらに、本法が他臓器へ応用可能かを検討するため、蛍光標識を行った膵細胞(MIN6)と、血管内皮細胞、間葉系細胞の共培養によりヒト血管構造を有した膵島様組織の創出を試みた。三系譜細胞の共培養により自律的に組織化が生じ、三次元構造体が誘導された(上図)。組織内部では、膵細胞株はスフェロイドを、血管内皮細胞はその周囲を覆うように管腔構造を形成した。また、比較として行ったMIN6単体培養や、MIN6、HUVECの共培養では、自律的な3次元組織創出は行われなかった。また、MIN6、MSCの共培養では、3次元組織創出は行えたが、血管網は構築されなかった。以上のことより3種類の細胞を共培養することで、従来必須と考えられてきた足場材料などを用いることなく、血管網を有する3次元組織の構築を細胞自律的に創出できることが示された。

#### (4) ヒト微小血管網を有する膵島組織への成熟

移植を行った血管網を有する3次元組織は、CWに移植後2日目で宿主からの血流を受け始めていた。また共焦点顕微鏡により、移植片内部で形成されたHUVECによる血管網の再構成が起きることを確認した。再構成されたヒト血管網は、宿主側血管と吻合を行い移植組織内部に血液が流入していることを確認した。MIN6、MSCのみの共培養により創出された3次元組織の移植では、移植後4日の時点でも宿主からの血流は入らず血管の再構成も生じなかった。従って、HUVECを含む血管網を再構成することが、移植後早期に血液を流入させるために必須であるものと判明した。

創出された膵島様組織を免疫組織学的に解析した。移植1ヶ月後に回収し凍結切片を作製した。膵島組織の特徴として、インスリンを分泌する細胞が島状構造をとっており、豊富な血管網が存在している。血管内皮細胞マーカーであるCD31、Col4、Lamininの免疫染色により膵島様組織は正常膵島組織



と同様に血管網を有することを示した。また、Whole mount法を用いた免疫染色により膵島様組織内部を染色した。hCD31の染色によりMIN6の集団内部にはHUVEC由来のヒト血管網が存在し、血管内皮細胞の分泌する細胞外基質であるCol4を分泌する基底膜に裏打ちされた血管網であることが示された。また、mCD31の染色により示される宿主血管がHUVEC由来の血管網が宿主血管と吻合していることを示した(上図)。

共焦点顕微鏡を用いた追尾定点観察により、移植組織の経時変化を追跡した。HUVEC由来血管網の再構成と同時にスフェロイド状のMIN6が凝集し、増殖を行い球状の膵島様組織を構築した。またMIN6の増殖により周囲に存在するHUVEC由来の血管網が内部に取り込まれ、血管網を有する膵島様組織へと成熟することが明らかとなった。

#### (5) 3次元組織移植による糖尿病治療効果

共培養により創出された血管網を有する3次元組織を劇症1型糖尿病モデルマウスに移植を行い、糖尿病治療の検討を行った。3次元組織を移植後15日目に正常血糖まで血糖値が低下し、移植による糖尿病治療効果が現れていることを確認した(次項図)。

臓器移植に代わる治療法の開発は、多くの患者救済のために必須であるばかりか、その待機治療に莫大なコストを要するために医療経済学的観点からもその開発ニーズは非常に高まっているといえる。本研究における成果を基盤として、将来的にヒト組織・臓器の人為的創出が可能となれば、それらを利用した創薬産業に革新的な創薬スクリーニング技術をもたらすことが期待されるだけでなく、(細胞移植ではなく)臓器移植の代替治療として、多くの患者を救済できる極めて重要な再生医療のための革新的技術となることが期待される。

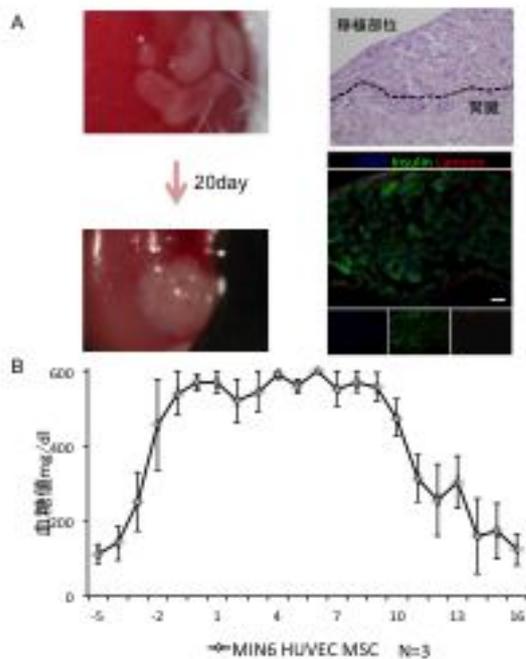


Fig7. 血管網を有する3次元組織移植による糖尿病治療  
 A) 3次元組織移植による糖尿病治療プロトコル。  
 B) 3次元組織移植による糖尿病の治療効果。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 21 件)

1. Takebe T\*, Kobayashi S, Suzuki H, Mizuno M, Chang YM, Yoshizawa E, Kimura M, Hori A, Asano J, Maegawa J, Taniguchi H: Transient vascularization of transplanted human adult-derived progenitors promotes self-organizing cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 査読有 2014 Oct 1;124(10):4325-34. doi: 10.1172/JCI176443. Epub 2014 Sep 9. (\*: Correspondence)
2. Takebe T\*, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Sekine K, Taniguchi H\*: Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols* 査読有 9, 396-409 (2014). (\*: Correspondence)
3. Nam BM, Kim BY, Jo YH, Lee S, Nemeno JG, Yang W, Lee KM, Kim H, Jang IJ, Takebe T, Lee JI : Effect of cryopreservation and cell passage number on cell preparations destined for autologous chondrocyte transplantation. *Transplant Proc.* 査読有 2014.46(4):1145-9
4. Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Polycomb Group Protein Ezh2 Regulates Hepatic Progenitor Cell Proliferation and Differentiation in Murine Embryonic Liver. *PLoS one* 査読有 9 (8), e104776, 2014
5. Jo YH, Jang IJ, Nemeno JG, Lee S, Kim BY, Nam BM, Yang W, Lee KM, Kim H, Takebe T, Kim YS, Lee JI: Artificial Islets From Hybrid Spheroids of Three Pancreatic Cell Lines. *Transplant Proc.* 査読有 46 (4), 1156-1160, 2014
6. Zheng YW, Nie YZ, Tsuchida T, Zhang, Aoki K, Sekine K, Ogawa M, Takebe T, Ueno Y, Sakakibara H, Hirahara F, Taniguchi H: Evidence of a Sophisticatedly Heterogeneous Population of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Transplant Proc.* 査読有 46 (4), 1251-1253, 2014
7. Sekine K, Takebe T, Taniguchi H: Fluorescent Labeling and Visualization of Human Induced Pluripotent Stem Cells With the Use of Transcription Activator-Like Effector Nucleases. *Transplant Proc.* 査読有 2014.46 (4), 1205-1207
8. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Ouchi R, Obana Y, Mori M, Sekine K, Takebe T, Zheng YW, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Ring1B Promotes Hepatic Stem/Progenitor Cell Expansion via Simultaneous Suppression of Cdkn1a and Cdkn2a. *Hepatology*, 査読有 2014. 60(1):323-333,
9. Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H: The development of humanized liver with Rag1 knockout rats. *Transplant Proc.* 査読有 2014 May; 46(4):1191-1193.
10. Zhang RR Takebe T\*, Sekine K, Koike H, Zheng YW Taniguchi H\*: Identification of Proliferating Human Hepatic Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Transplant Proc*, 査読有 46 (4), 1201-1204,2014. (\*: Correspondence)
11. Takebe T\*, Koike N\*, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW, Taniguchi H\*: Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks. *Organogenesis*, 査読有 2014.10 (2), 0-1. (\*: Correspondence)
12. Takahashi Y, Takebe T\*, Enomura M, Koike N, Lee S, Nemeno JG, Sekine K, Lee JI, Taniguchi H\*: High-resolution intravital imaging for monitoring the transplanted islet in mice. *Transplant Proc*, 査読有 46 (4),

- 1166-1168, 2014. (\*: Correspondence)
13. Enomoto Y, Enomura M, **Takebe T\***, Mitsuhashi Y, Kimura M, Yoshizawa E, Taniguchi H\*: Self-Formation of Vascularized Hepatic Tissue from Human Adult Hepatocyte. *Transplant Proc*, 査読有 46(4): 1243-1246, 2014 (\*: Correspondence)
  14. **Takebe T\***, Sekine K, Enomura M, Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H\*: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 査読有 499, 481-484, 2013. (\*: Correspondence)
  15. Zhang RR<sup>1\*</sup>, **Takebe T<sup>1\*</sup>**, Miyazaki L, Takayama M, Koike H, Kimura M, Enomura M, Zheng YW, Sekine K, Taniguchi H: Efficient Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells In A Three-Dimensional Microscale Culture. *Stem Cells and Tissue Repair*, 査読有 2014;1210:131-41. (1: Equal contribution, \*: Correspondence)
  16. Tanaka H\*, Tanaka S\*, Sekine K\*, Kita S, Okamura A, **Takebe T**, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J, Taniguchi H(\*; Equal contribution): Efficient generation of pancreatic  $\alpha$ -cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials*, 査読有 2013, S0142-9612.
  17. **Takebe T**, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc*, 査読有 44 (4), 1018-1020, 2012.
  18. **Takebe T**, Koike N, Sekine K, Enomura M, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Generation of human vascular network in vitro. *Transplant Proc*, 査読有 44 (4), 1130-1133, 2012 .
  19. Sekine K, **Takebe T**, Suzuki Y, Kamiya A, Nakauchi H, Taniguchi H: Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent stem cells. *Transplant Proc*, 査読有 44 (4), 1127-1129, 2012 .
  20. Sekine K, **Takebe T**, Enomura M, Matsui C, Tanaka H, Taniguchi H: Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation. *Transplant Proc*, 査読有 44 (4), 1104-1106, 2012.
  21. Koike H\*, Kubota K\*, Sekine K\*, **Takebe T**, Ouchi R, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H. (\*; Equal

contribution): Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells. *BMC biotechnology*, 査読有 12 (1), 81, 2012.

〔学会発表〕(計 57 件)省略

〔図書〕(計 3 件)

1. Zhang R-R, Koike H, **Takebe T**. "Chapter 17. The visualization of human organogenesis from stem cells by recapitulating multicellular interactions." *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems*, Springer, 2015
2. **武部貴則**、谷口英樹 “ヒト臓器の人為的構成に基づく肝細胞の分化誘導”，実験医学別冊『ES・iPS 細胞実験スタンダード』，2014年2月，羊土社
3. **武部貴則**、関根圭輔、谷口英樹 “ヒト臓器の人為的構成に基づく肝細胞の分化誘導 ES・iPS 細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識 ”，235-245, 2014年2月，羊土社

〔産業財産権〕

出願状況(計 9 件)

名称：組織及び臓器の作製方法

発明者：谷口英樹、**武部貴則**

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-536370, PCT/JP2012/074840、

日本特願 2013-536370、米国 14/347,482

出願年月日：2012.9.28

国内外の別：国内外

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

武部貴則 (TAKEBE, Takanori)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10612625

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：