

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25253079

研究課題名(和文) 移植医療に応用可能なiPS細胞を用いたヒト膵島作製技術の開発

研究課題名(英文) Generation of pancreatic islet-like tissue by using an innovative 3D-culture method.

研究代表者

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70292555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、器官発生の初期プロセスで生じる血管および間葉系細胞との相互作用の再現化により、立体的なヒト組織再構成法を開発している(Nature 499:481-484, 2013)。この革新的な三次元培養法を活用し、三次元的な膵島組織を人為的に構築するための細胞操作技術を開発することを試みた。マウスおよびヒト膵島を対象として、複数の膵島のクラスタリング技術および血管化促進技術の開発を行い、複数の膵島を凝集させ、その周囲に血管様構造を形成させることに成功した。作製した血管化膵島を劇症1型糖尿病モデルマウスに移植することにより、生存率の著しい向上が得られることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We are developing a scaffold-free 3D-human organ bud generation method from reproduction of interaction with endothelial and mesenchymal cells mimicking initial process of organogenesis (Nature 499:481-484, 2013). Adapting this 3D-culture system, we have tried to develop a cell manipulation technique to artificially build a 3D pancreatic islet tissue using pancreas cells. We have succeeded in condensation of multiple pancreatic islet and forming vascular-like structures around it by developing multiple clustering technology and promotion technology of vascularization targeting mice and human pancreatic islet. By transplanting this vascularized islet to immune-deficient mice, the same level of vasculature as pancreatic islet in vivo is maintained inside the vascularized pancreatic islet. The vascularized islets was transplanted into fulminant type 1 diabetes mellitus modeled mice resulted in significant improvement of survival rate of these mice.

研究分野：移植外科学

キーワード：膵臓 膵島移植 三次元培養 血管

1. 研究開始当初の背景

「臓器置換」という治療概念に基づく移植医療が確立されつつあるが、ドナー臓器の供給には明らかな限界が存在している。21世紀の移植外科学のひとつの方向性として、幹細胞システムの制御に基づく、「置換臓器の人為的な再構成」という新しい実用化技術の開発に大きな期待が集まっている。従来、再生医学においては胚性幹 (ES) 細胞に対する期待が先行していた。ところが、初期胚を破壊することにより樹立される ES 細胞の医療応用については、生命倫理的な観点から大きな議論がわき起こっており、「脳死」同様、社会的コンセンサスの形成に至るまでに相応の時間が必要であると考えられた。そのため、生命倫理問題を回避して体性細胞から樹立することが可能な iPS 細胞を対象とした再生医学に、臨床応用という観点から極めて大きな世界的な期待が寄せられている。ところが、従来の ES/iPS 細胞を対象とした分化誘導研究は、例えばヒト iPS 細胞から膵β細胞を創出するといった「細胞を創り出す」ための研究であり、分化誘導により得られる細胞の成熟分化機能・分化誘導効率・移植後の治療効果の発現等において大きな問題を抱えているのが現状であった。

このような状況の中、研究代表者らは世界に先駆けて iPS 細胞からヒト器官原基を作製するための革新的な三次元培養法 (Organ Bud Generation 法)を開発した (*Nature* 499:481-484,2013、特願 2011-210157; PCT/JP2012/74840)。本法を用いて iPS 細胞からヒト肝芽 (肝臓原基) を作製し、免疫不全マウスへ移植することにより、ヒト特異的な蛋白質分泌能・薬物代謝能・肝不全モデルに対する治療効果を有した機能的なヒト肝臓を作製することに成功している。本法の意義は、iPS 細胞の分化誘導に関する開発概念を、「細胞を創り出す」ことから「組織・臓器を創り出す」ことへと大きく変貌させたことにある。

研究代表者らが肝臓を対象として有効性を示しつつある独創的な Organ Bud Generation 法について、膵臓などの他臓器への適応拡大に大きな期待が寄せられており、移植医療に応用可能なヒト膵島の大量製造技術の開発に注目が集まっている状況にあった。

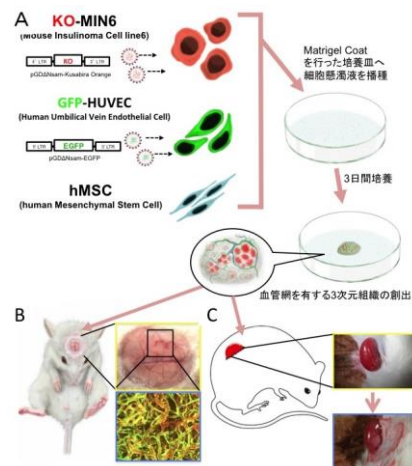
2. 研究の目的

研究代表者らが世界に先駆けて開発した革新的な三次元培養法を活用し、ヒト膵島 (ランゲルハンス氏島) 組織を人為的に構築するための革新的

な細胞操作技術を開発する。すなわち、膵細胞や膵島組織を対象として、ヒト間葉系幹細胞・ヒト血管内皮前駆細胞との三次元共培養による独自性の高いヒト器官原基作製法を用いることにより、血管ネットワーク構造を併せ持つ血管化された膵島組織の作製技術の開発を試みる。さらに、臨床応用が開始されたヒト膵島移植に応用することができる血管化されたヒト膵島移植のための基盤技術の開発を試みる。

3. 研究の方法

マウス膵β細胞株 (Mouse insulinoma cell line6: MIN6)、ヒト血管内皮前駆細胞 (HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞 (MSC) の3種類の細胞をマトリゲル上で共培養し、血管ネットワーク構造を有する3次元膵島様組織の人為的創出を試みた (下図)。また、共焦点顕微鏡により3次元膵島様組織の構築過程を観察した。さらに、創出された膵島様組織を8~9週齢の免疫不全マウス (NOD/SCID) に作製した頭部観察窓 (Cranial Window: CW) に移植し、膵島様組織への成熟過程を観察した。移植により成熟した膵島様組織を免疫組織学的手法により解析し、正常マウス膵島組織との比較を行った。また、糖尿病モデルマウスに3次元組織を移植し、血糖降下作用を検討した。また、膵β細胞株に加え、マウス膵島およびヒト膵島を用いて同様の検討を実施した。

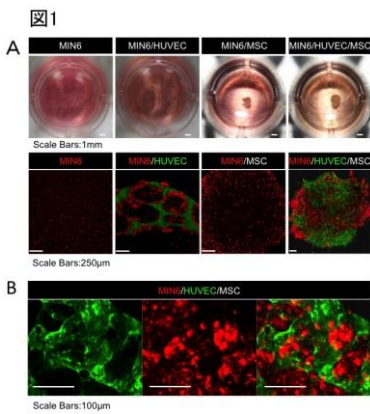


4. 研究成果

(1) 血管様構造を有する3次元膵島様組織の創出

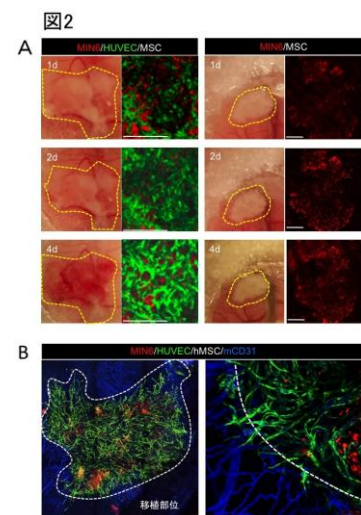
MIN6・HUVEC・MSCの共培養開始後10時間で各細胞が自律的に凝集し始め、20~24時間で培養皿中心部に3次元組織が構築され、内部ではHUVECによる血管様構造が構築された。また、MIN6単体培養や、MIN6とHUVECの共培養では、

自律的な 3 次元組織構築は行われなかった。また、MIN6 と MSC の共培養では、3 次元組織の構築は可能であったが、内部血管様構造は確認できなかった。以上より、血管様構造を有する 3 次元膵島様組織の構築が可能であることが明らかとなった (図 1)。



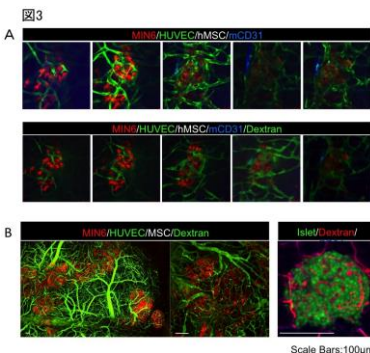
(2) 生体内における膵島様組織の再構築

創出された血管様構造を有する 3 次元膵島様組織を CW に移植したところ、移植後極めて早期 (2 日目) に宿主からの血液灌流が生じることが確認された (図 2)。また、共焦点顕微鏡観察により、HUVEC による血管ネットワーク様構造の構築が生じることを確認した。再構築された血管網は、宿主血管と吻合しており、移植した膵島様組織の内部への血流が確認された。MIN6 と MSC の共培養により創出された 3 次元組織の移植では、血管系の再構成が起こらず血液灌流も生じなかった。



(3) 再構築された 3 次元膵島様組織の解析

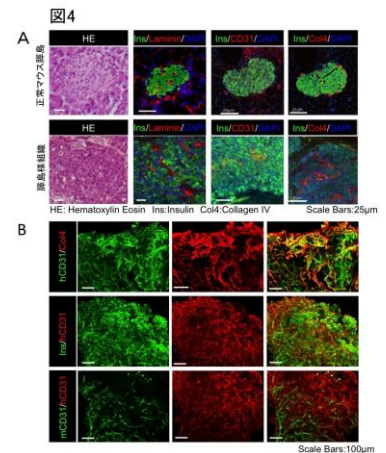
共焦点顕微鏡を用いた追尾定点観察により、移植組織の経時変化を観察したところ、膵島に類似した球状組織の構築が確認された。また、MIN6 の増殖により、周囲に存在する HUVEC 由来の血管系が移植組織の内部に侵入し、血管ネット



ワーク構造を有する膵島様組織へと変化することが確認された (図 3)

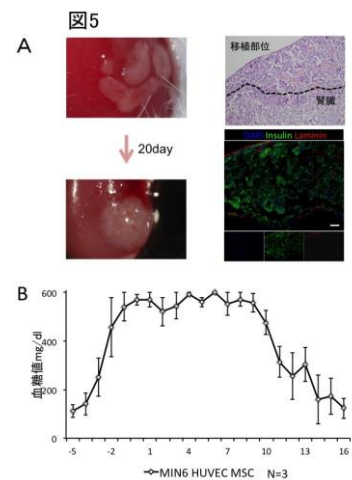
(4) 膵島様組織の免疫組織学的解析

生体内で構築された膵島様組織を移植 1 ヶ月後に回収し、免疫組織学的に解析した (図 4)。ヒト血管内皮細胞マーカーである hCD31、Col4、Laminin の免疫染色により、膵島様組織は正常の膵島組織に類似した血管網を有することが判明した。また、hCD31 の染色により、移植組織の内部には HUVEC 由来のヒト血管網が存在することが確認された。これらの血管網の周囲には、細胞外基質である Col4 沈着が確認された。mCD31 染色を併用することにより、マウス宿主の血管系と HUVEC 由来のヒト血管系が吻合していることが判明した。



(5) 次元膵島様組織移植による糖尿病の治療効果の検証

人為的に創出した 3 次元膵島様組織を糖尿病モデルマウスへ移植し、糖尿病に対する治療効果の検討を行った。糖尿病モデルマウスの血糖値は 3 次元組織を移植後 15 日目に正常となることが確認され、糖尿病に対する治療効果が示唆された (図 5)。



(6) 膵島を用いた血管化膵島組織の創出

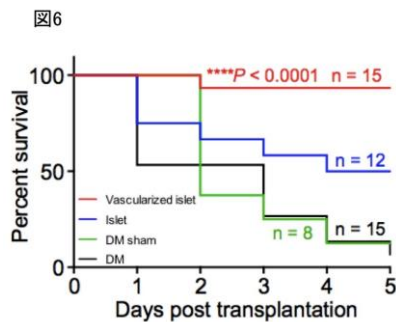
ヒト器官原基作製法を膵島移植に応用した。マウスまたはヒトから単離した膵島を HUVEC および MSC と共培養すると、培養ウェル内に散乱していた膵島が凝集し組織構造体を形成した。共培養 12 時間後には HUVEC による血管様構造が膵島周辺に形成された。以下、この構造を“血管化膵島”

(直径約 400 μ m) と呼ぶ。血管化膵島は複数の膵島からなり、ヒト血管内皮細胞は膵島内のマウス血管内皮細胞と密接な関わりを保ちながら膵島周辺に存在していた。ヒト膵島を用いた検討でも、同様の血管化膵島の創出に成功した。

(7) 血管化膵島移植の治療効果

血管化膵島移植による糖尿病治療効果を検証するため、ジフテリア毒素の投与により高血糖(300 mg/dl 以上)を誘発する

免疫不全劇症 1 型糖尿病モデルマウスを作製した。腎被膜下に膵島を移植し、生存率と体重を測定した。移植 5 日目には対照マウスのほとんどが死亡し、膵島単独移植群の生存率は 50%であった。一方、血管化膵島移植群の生存率は 90%であった。血管化膵島移植群のみ体重増加が観察され、高血糖誘発前体重まで回復することが確認された(図 6)。これらの結果から、血管化膵島移植は効率的な血管新生を促すことで糖尿病の治療効果を向上させることが示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Taniguchi H, Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-chain amino acid metabolism, *Development*, 査読有, 144(6), 1018-1024, 2017.
2. Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa HY, Taniguchi H, Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation, *Cell Stem Cell*, 査読有, 16(5), 556-65, 2015.
3. Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Nakata S, 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.
4. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S,

Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H, Ring1B promotes hepatic stem/progenitor cell expansion through simultaneous suppression of Cdkn1a and Cdkn2a in mice, *Hepatology*, 査読有, 60(1), 323-33, 2014.

5. Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Koike N, Sekine K, Taniguchi H, Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nat Protoc*, 査読有 9(2), 396-409, 2014.

[学会発表] (計 6 件)

1. Taniguchi H, Sekine K, Okuda R, Ueno Y, Development of a human pancreatic cancer organoid recapitulating the tumor microenvironment, The 41st Naito Conference, Jul 5-8, 2016, シヤトレーゼ札幌 (北海道)
2. Taniguchi H, Murata S, Yunzhong N, Miyakawa K, Ryo A, Generation of new cell culture system using human iPS cells for infection with hepatitis virus, June 10-12, 2016, 2016 Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference on Hepatitis C, Kaohsiung (Taiwan)
3. Taniguchi H, Takebe T, Generation of functional human organ from pluripotent stem cell, Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research, May 14-16, 2016, Taichung (Taiwan)
4. Taniguchi H, Generation of functional human organ from pluripotent stem cell, Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference, Apr 8-10, 2016, Busan (Korea)
5. Taniguchi H, Generation of functional human organ from pluripotent stem cell, The 11th Annual Meeting of KSSCR 2015, Aug.27-28, 2015, Seoul (Korea)
6. Takebe T, Taniguchi H, Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, 7th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC), April 12-14, 2014, Taichung (Taiwan)

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~saisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 70292555

(2) 研究分担者

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号： 20612625

(3) 研究分担者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号： 00323569

(4) 研究分担者

小池 直人 (KOIKE, Naoto)
横浜市立大学・大学院医学研究科・客員教授
研究者番号： 50301081