

研究報告書

「多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 12 月 - 平成 29 年 3 月

研究者: 武部 貴則

1. 研究のねらい

人工多能性幹細胞(iPS 細胞)等の幹細胞を用いた再生医療の実現を目指す上では、目的とする機能細胞のみならず、血管や血液、間質、神経などの支持細胞を含む立体的な複雑構造の時・空間変化を再現することが必要であるという仮説が有力になりつつある。これらを実現するために、多種多様な細胞間相互作用を多能性幹細胞に由来する器官創出系に応用する革新的な 3 次元(4次元)培養系が待望されていた。

近年、われわれは、試験管内においてヒト iPS 細胞から立体的な肝臓の原基(肝芽)の自律的な複合組織化(自己組織化)を誘導できることを示してきた。すなわち、前腸内胚葉からの出芽により形成される肝芽(Liver Bud)の誘導に必要な間葉系前駆細胞、血管内皮前駆細胞と肝内胚葉細胞との細胞間相互作用を模倣する培養系を確立してきた。本法により、特別な条件下で未分化な 3 種類の細胞(内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞)を共培養すると、培養 48 時間程度で細胞が集合し、数日の培養により立体的な肝芽が形成される。しかしながら、肝臓原基が自律的に形成されるメカニズムは全く未解明であった。

本研究では、まず iPS 細胞由来肝芽の自己組織化現象を細胞動態の数理解析および、分子細胞生物学的手法で解析することにより、肝臓原基形成のメカニズム解明を目指した。次に、肝臓原基を創出するために必須となるパラメータを検討し、細胞外部、および内部環境における条件の最適化を図った。さらに、肝臓以外のさまざまな臓器における器官原基(臓器の芽: Organ Bud)を人為的に創出するための培養法および移植操作技術の確立を行った。以上を通じて、多細胞系から複雑なヒト組織を構成するための基盤技術である器官原基法(Organ Bud Generation 法)という新規概念の有効性実証を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

近年われわれは、器官形成期に生じる細胞間相互作用を再現する特殊な培養により、ヒト iPS 細胞由来肝内胚葉細胞から巨大な肝臓原基が自律的に形成されることを発見した。本現象では、まず多数の細胞が巨大集合体を形成し(Self-condensation)、その後器官原基が自己組織化(Self-organization)する。本研究ではこのメカニズムを詳細に解析したところ、立体的な肝臓原基の作製には 1. 間葉系細胞を起点とした細胞集合体の力学的な収縮、および 2. 最適な物理因子を有する外部環境(硬さ環境など)の設計、が必要であることを明らかにした。さらに、このメカニズムを他器官原基の作製に応用した結果、肝臓のみならず、膵臓、腎臓、腸、肺、心臓、脳、がん細胞などを含む複数種類の細胞から 3 次元的な血管化された複合組織を創出することに成功した。創出された 3 次元器官原基は、移植後すみやかに血流を有する血管網を再構成するのみならず、機能的な組織を自律的に形成した。中でも、腎臓原

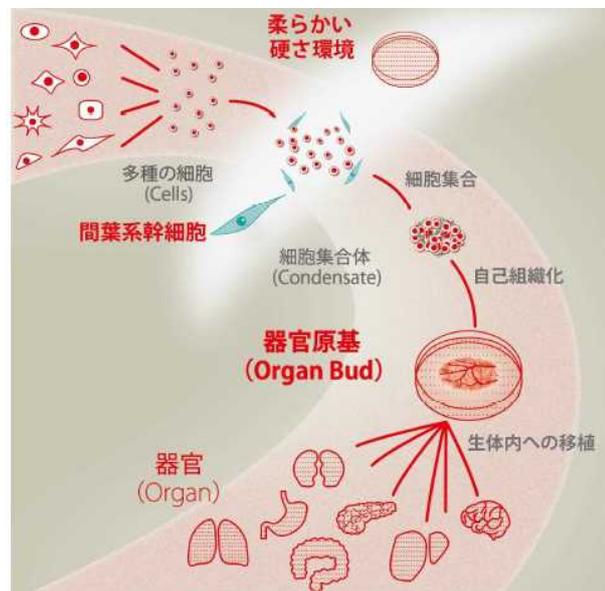
基や膀胱原基を移植した群においては、最終的に尿を産生する腎組織や、糖尿病治療効果を有する膵組織を生み出すことが示されている。本技術は、複雑構造を有した組織形成を実現する画期的な技術基盤であり、さまざまな器官の再生医療への応用のみならず、新たな医薬品開発のツールとしての応用が強く期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「器官原基形成メカニズムの解明」

器官原基形成が、迅速な集合反応 (Self-condensation) により細胞集合体が形成された後に、内皮細胞によるネットワーク形成といった自己組織化 (Self-organization) を通じた空間の再構成が生じ、器官原基 (Organ Bud) が形成されるという2段階の反応で説明できることを見出した。さらに興味深いことに、器官原基形成の第一ステップ (Self-condensation) では、その急激な細胞集合体収縮ダイナミクスは、化学分野で扱われる粘弾性体の収縮を記述するための数理モデルである Kelvin-Voigt model で良く近似できることがわかった。つまり、細胞集合体の形成と収縮現象が、個々の細胞の自律的遊走ではなく、多数の細胞系における力学的な収縮によるものであることを示唆する結果を得た。

このような異分野の考察からのアナロジーに基づき、薬理的阻害剤や、細胞種特異的ノックダウンなどの分子生物学的検討を加えたところ、間葉系細胞における細胞骨格系タンパク質の収縮力が、Self-condensation の駆動源であることが示された。

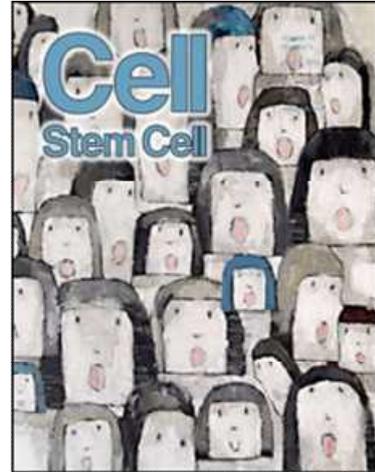


研究テーマ B「細胞外部環境の再設計に基づく器官原基形成の人為制御」

以上のような力学的な細胞集合体形成メカニズムを活用し、次にこれらを人為的に制御するための培養外部環境の再設計を図った。具体的には、細胞播種を行う培養基板上の「生化学的因子 (ラミニン、エンタクチン、フィブロネクチン等)」と、「物理的因子 (硬さ)」の双方を自在に制御可能なハイドロゲル基板を用いて、さまざまな培養条件の比較検証を実施した。その結果、基板の硬さ (ヤング率, E) が、細胞の接着力や収縮力など力学的相互作用に最も強く影響を与えることが強く示唆され、細胞集合体の形成は $E \sim 10$ kPa 程度の硬さ条件でのみ効率的に誘導されることがわかった。本結果は、ミリメートルに渡る大きなサイズスケールの場合、細胞—細胞間の収縮力・接着力と、細胞—外場間の接着力との間に力の競争が存在し、ゲル基板の硬さがその制御パラメータであることを示していると考えられた。上記の結果から、最適な力学条件を有するゲル基板の設計を行うことで、多細胞系から器官原基が形成される過程を制御する手法の確立に成功した。これらの技術は特許出願を行い、企業への技術導出を行った。

研究テーマ C「器官原基法を用いたさまざまな器官への応用」

至適な硬さ環境における間葉系細胞を起点とした収縮現象が、自律的な細胞集合現象 (Self-condensation) に重要であることが示されたため、本法は胚葉の由来に関係なく、他臓器の自己組織化培養に拡張することができるものと考えられた。そこで、さらなる汎用性を評価するために、胚や成体マウスの複数臓器から細胞を単離し、本法により共培養を行ったところ、細胞集合現象による複合組織形成は、肝臓のみならず、内胚葉性臓器の膵臓・腸・肺、中胚葉性臓器の心臓・腎臓・軟骨、外胚葉性臓器の脳、さらには癌を含むすべての細胞種でも保たれていた。再構成された膵臓原基は劇症1型糖尿病の疾患モデルマウスへの移植により、優れた治療有効性を示すことが明らかとなった。一方、作出した腎臓原基は移植により数日で血液を濾過する原尿生成機能を有した糸球体様組織を再構成することが明らかとなった。以上の結果は、Cell Stem Cell 誌に報告を行うことができた。本成果は同号の表紙を飾ったことに加えて、Cell Stem Cell 誌が年間を通じて最も優れた研究成果を紹介する Best of Cell Stem Cell に選出されるなど世界的にも大きな注目を集めた。



Cover workに選出

また、さががけ研究期間で当初計画想定していなかった進展として、血管や神経を欠く極めて単純な構造として知られている軟骨組織においても、血管系の一過的な再構成とその排除を伴うことが効率的な軟骨発生に重要であるという全く新たな原理を世界で初めて明らかとした。この知見に基づき、ヒト弾性軟骨を効率的に再構成するための技術を新たに確立し、J Clin Invest 誌に報告するとともに、特許出願・各国移行を行った。

以上から、当初計画で想定していた内容として、メカニズム解明からの横展開(多臓器への応用)を中心に、概ね達成することができた。また計画を超えて、軟骨組織の新たな発生原理を解明するなど予期せぬ知見も得ることが出来た。今後は、縦への展開(肝臓分野におけるさらなる発展技術開発)を中心に、複雑臓器の人為構成モデルの確立を目指す。

3. 今後の展開

今後は、本研究期間で達成することが出来た「多細胞システム」を発展させ、隣接多臓器間の相互作用を加味した複雑モデルである「多臓器システム」を人為構成するための研究を展開する。これにより、未踏課題であった隣接臓器間の連結部(例えば、肝・胆・膵組織)の人為創出に挑む。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

ヒト臓器原基を誘導するための多細胞培養システムを確立するとともに、そのメカニズムを解明した。メカニズム解明については、全く異なる分野である化学分野における理論からのアナロジーにより生物学的疑問を解くという、独創的な着眼を実証することができた。さらに、当

初想定していた肝臓のみならず、軟骨や、膵臓・腎臓・癌といったさまざまな臓器の人為的構成に有益な技術であることを発表し、中でも Cell Stem Cell 誌に報告した論文は年間論文の中でも最もインパクトが高い成果が紹介される Best of Cell Stem Cell に選出された。一方で、従来の培養では不完全な要素、例えば、肝臓・胆道・膵臓の連続性が欠損していることが明らかとなった。すなわち、臓器間の境界条件の適正発現が担保された臓器形成といった、より高度な生命現象の再構成に向けた技術課題があぶり出され、今後の研究開発の方向性の示唆を得ることが出来た。

また、本研究課題の成果創出に基づき、新たにシンシナティ小児病院での独立准教授として、日本にて武田薬品工業との共同プロジェクトである T-GiRA プログラムで PI として、新規の研究室を2つ立ち上げることができ、今後のさらなる発展に向けた研究推進体制が整った。

さきがけの研究成果は、複数のテレビ・新聞・ネットなどで取り上げられるなど注目を集め、一般の方々にとっても「器官原基」という概念の重要性が認知されるに至った。今後研究が進展することにより、ヒト iPS 細胞からさまざまな器官原基を自在に構成することができれば、それらを利用した創薬スクリーニングや、移植による再生医療の実現が期待され、莫大な患者救済につながる革新的技術となる可能性がある。今後も、臓器移植を待つ多くの患者さんを一日でも早く治療できるよう研究を推進する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

iPS細胞由来肝芽の自己組織化現象を肝臓原基形成のメカニズムの解明にとどまらず、肝臓以外のさまざまな臓器における器官原基を人為的に創出するための培養法および移植操作技術の確立に成功した功績は、すでに、国際的に高く評価されている。さらに、隣接臓器を含めた臓器系統(例えば、肝胆膵)を連続的に誘導するという新たな革新概念へ転換するための基盤技術開発に着手しており、その意欲的な展開は称賛に値する。再生医療分野の様々な研究者や臨床医と共同研究を行い、基礎研究と臨床研究の両輪で、着実に進めて頂きたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Takebe T***, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa H-Y, Taniguchi H: Vascularized And Complex Organ Buds From Diverse Tissues Via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell*, (*Corresponding author, Best of Cell Stem Cell),16(5): 556-565, 2015
2. **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*, 2014 Oct 1;124(10):4325-34. (*: Corresponding author)
3. **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* **9**, 396–409 (2014). (*: **Corresponding author**)

4. Kagimoto S, **Takebe T***, Kobayashi S, Yabuki Y, Hori A, Hiroto K, Mikami T, Uemura T, Maegawa J, Taniguchi H*: Autotransplantation of monkey ear perichondrium-derived progenitor cells for cartilage reconstruction. *Cell transplantation*. (***Joint corresponding authors**), 2016;25(5):951–62.

(2)特許出願

研究期間累積件数:5件

1.

発明者: 武部貴則、張冉冉、谷口英樹

発明の名称: 原始腸内胚葉細胞及びその作製方法

出願人: 横浜市立大学

出願日: 2014/12/9

特許番号: 特許第 5777127

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な招待講演

1. **Takebe T**: Generating diverse organ buds towards therapy. *CiRA / ISSCR 2016 International Symposia / Kyoto* 2016 22–24 Mar 2016, Japan.
2. **Takebe T** : Generation of Diverse Organ Buds from Human iPSCs. *French Society for Cell and Gene Therapy*, 14 March 2016, Marseille, France.
3. **Takebe T** : De Novo Generation of Diverse Organ Buds from Human iPSCs –Modeling human organogenesis– . *The Gladstone Institute of Cardiovascular Disease and the Cardiovascular Research Institute, Seminar*, 21 Sep 2015, San Francisco. **Invited Speaker**
4. **Takebe T** : De novo generation of liver buds from stem cells, *International Conference of Future Hepatology at Kaohsiung*, 25 Jul 2015, Kaohsiung Taiwan. **Invited Speaker**
5. **Takebe T** : Realization of human iPSC-derived liver bud transplantation therapy, *the Young Investigators' Stem Cell Symposium 2015*, 8 June 2015, Singapore. **Invited Speaker**
6. **Takebe T**: Realization of iPSC-organ bud transplantation therapy, Cambridge, Wellcome Trust–Medical Research Council, **Cambridge Stem Cell Institute**, Apr 2015, UK. **Invited Speaker**
7. **Takebe T**: Regenerative approaches through developmental biology *EASL, 50th the International Liver Congress*, 22–26 Apr 2015, Vienna Austria. **Invited Speaker**
8. **Takebe T**: Human iPSC-derived organ bud based approaches. *112th ITC(INTERNATIONAL TITISEE CONFERENCE*, 22 Oct 2015, Mainz Germany. **Invited Speaker**

受賞

- ・ベルツ賞(2014年)
- ・文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2016年)
- ・New-York Stem Cell Foundation(NYSCF)Robertson Investigator Award(2016年)
- ・WIRED Audi INNOVATION AWARD (2016年)
- ・発表論文が Best of Cell Stem Cell に選出(2016年)
- ・文部科学省科学技術・学術政策研究所 ナイスステップな研究者(2016年)

主なメディア掲載

1. 日経産業新聞 「肝臓育て移植の代替に」2016.2.4
2. テレビ東京 「クロスロード【武部貴則／再生医療研究者】」 2015.10.31
3. 日経産業新聞 「ヒトiPSから作製した肝芽を使った再生医療の開発について」 2015.10.19
4. 朝日新聞 「科学の扉」 2015.10.11
5. 読売新聞 「ヒト肝細胞を大量培養する装置の開発」 2015.8.13
6. HORIEMON.COM 「「ネアンデルタール人の臓器も再現可能」横浜市立大学准教授・武部貴則が語る「再生医療」と「広告医療」の最先端とは？」 2015.7.20
7. 産経新聞 「さまざまな種類の臓器を立体的に作製する汎用的手法を確立」 2015.5.4
8. NHK 「臓器の芽を作製する革新的な培養手法を確立」 2015.4.17
9. BSフジ 「プライムニュース番外編 SP～再生医療大国に挑むサムライたち」 2014.12.31
10. 日刊工業新聞 23面「拓く・研究人(52)横浜市立大学大学院医学系研究科准教授・武部貴則氏」
11. 日刊工業新聞 朝刊 17面「ヒト軟骨効率再生」 2014.9.11
12. 神奈川新聞 朝刊 19面「体外で軟骨作製新しい手法開発」 2014.9.11
13. 日経産業新聞 朝刊 10面「再生医療で立体臓器 横浜市大や東大作製」 2014.6.23
14. 日経新聞 朝刊 科学技術面「立体構造の腎臓マウスで作製」 2014.6.17
15. 日経新聞 朝刊 科学技術面「マウスで膵臓作製に成功 横浜市立大が基盤技術を開発」 2014.3.3
16. TBS テレビ「未来の起源:治らないその病気から救いたい」 2014.2.23 放送
17. 日経新聞 朝刊 科学技術面「臓器をつくる・上」 2014.1.28
18. 神奈川新聞 元旦特集紙面一面「夢抱く若き研究者」 2014.1.1