

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

特別講演

ヒューマン・オルガノイド研究の新展開

New development of human organoid research using iPS cell

谷口英樹\*<sup>1,2</sup>

Hideki TANIGUCHI

はじめに

従来の再生医療開発が目指していたのは、疾患治療に有益と思われる「細胞」を創り出すことであった。しかし肝疾患領域においては、ヒト肝細胞移植の臨床の有効性は現時点では不明確である。一方、臨床的に確立した治療法である肝移植においては、ドナー臓器の絶対的な不足が深刻な問題となっている。例えば、米国において1年間に新規発生する待機リスト登録者約17,000名のうち、実に約4,000名の患者が肝移植を待ちながら、ドナー肝臓が届くことなく死亡している。

最近われわれは、ヒトiPS細胞由来肝内胚葉細胞を材料として、血管内皮細胞と間葉系細胞との共培養による三次元的なヒト肝臓原基(肝芽: human iPS-derived liver bud: hiPSC-LB)の人為的創出法を開発した<sup>1)</sup>。そして、このようなオルガノイドの移植により生体内において機能的なヒト肝臓の創出が可能であり、この方法が肝疾患に対する有効な治療手法となることを明らかにしている。

われわれが取り組んでいるオルガノイドの人為的創出とその移植に基づく肝疾患治療法の開発は、ヒト肝芽という「臓器の芽(organ bud)」を創り出し、それを患者の身体の中で「臓器(organ)」に育てるという、従来の細胞移植に基づく再生医療とは全く異なる新たな治療コンセプト(proof of concept: POC)である。すなわち、細胞移植でもなく臓器移植でもない、オルガノイド移植(器官原基移植)という第三の新概念である。

オルガノイドを用いた新規治療法

従来、ヒトiPS細胞などの多能性幹細胞を肝細胞(hepatocyte)へ分化誘導するための方法は、他の機能細胞と同じように、培養ディッシュによる二次元培養系が用いられてきた。すなわち、肝臓の器官発生プロセスにおいて重要な役割を果たしている分化因子を段階的に作用させることにより、iPS細胞→内胚葉細胞(definitive endoderm)→肝内胚葉細胞(hepatic endoderm)→未熟肝細胞様細胞(imature hepatocyte-like cell)→肝細胞様細胞(hepatocyte-like cell)へと、順次、分化を誘導する方法である<sup>2)</sup>。

しかし、この方法では、肝内胚葉細胞以降の分化誘導効率が著しく低下すること、最終産物である肝細胞様細胞の機能が低いこと、肝細胞様細胞を肝障害モデル動物に移植しても生着しないこと、肝細胞様細胞の生体内での機能が確認できない、などの深刻な問題が存在した。すなわち、この方法で分化誘導できているのは肝細胞様細胞(hepatocyte-like cell)であって、肝細胞(hepatocyte)とはいえない状況であった。

われわれは、iPS細胞からヒト肝臓を創出することを目標として、まず最初に*in vitro*において器官発生過程で生じる細胞間相互作用を再現し、hiPSC-LBを創出することを試みた。そして、そのhiPSC-LBを移植し、*in vivo*において血液灌流を生じさせて成熟化を促し、機能的なヒト肝臓へと分化誘導することができるのではないかと考えた。

さまざまな条件を検討し、ヒトiPS細胞由来肝内胚葉細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト間葉系細胞を共培養することにより、直径数mm大のボール状の三次元的立体組織が自律的に形成されることを見出した<sup>1)</sup>。驚くべきことに、こ

\*1 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター・再生医学分野

\*2 横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学

のボール状組織の内部には、間葉系細胞により裏打ちされた血管内皮細胞による網目状の管状構造体がわずか数日以内に形成され、iPS 細胞由来肝内胚葉細胞がそれらに沿って配置されることが判明した。

この三次元構造体は、マイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析や組織学的解析により、肝臓発生の初期段階、すなわち hiPSC-LB であることが示唆された。また、フローサイトメトリーを用いた定量解析により、ヒト iPS 細胞由来細胞の約 70% が肝細胞系へ分化していることが明らかとなった。以上より、肝臓の器官形成に関連する複数の異種細胞間の相互作用を活用することにより、*in vitro* において立体的な hiPSC-LB の創出が人為的に可能であることを証明した<sup>1)</sup>。

この hiPSC-LB を機能的なヒト肝臓へ成熟化させることを目的として、免疫不全マウスへ移植することにより、生体内における血液灌流の誘導を試みた。その結果、驚くべきことに移植後のきわめて早い時期(48~72 時間以内)に、hiPSC-LB 全域に血液灌流が効率良く生じることが判明した。hiPSC-LB 内部に移植前から血管網が形成され始めているため、新生血管系と宿主血管系との吻合がきわめて効率良く生じるためと思われる。

移植後 60 日後の hiPSC-LB の組織学的解析では、ヒトアルブミン、CK8/18、ZO-1、ASGR1 などを発現するヒト iPS 細胞由来肝細胞が索状構造を形成していることが明らかとなった。さらに、hiPSC-LB を移植した免疫不全マウスの血清中にヒト型アルブミンや  $\alpha 1$  アンチトリプシンが分泌されていること、ヒト肝細胞特異的な薬物代謝産物が存在していること、などが確認されており、移植した hiPSC-LB が機能的なヒト肝臓へ成熟したことが示唆された。すなわち、オルガノイドを移植し、ホストの生体内環境を活用して機能的なヒト臓器へ育てることが可能であることを明らかにした<sup>1)</sup>。

このオルガノイド移植法による治療効果を検証することを目的として、亜急性劇症肝炎モデルを免疫不全マウスを用いて作製し、hiPSC-LB 移植による生存率の改善効果を検討した。その結果、30 日後の生存率は、非移植群では約 30% であったのに対し、移植群では 90% 以上であった。すなわち、オルガノイド移植という新しい治療概念が有効な治療法となりうることが明らかとなった<sup>1,3)</sup>。

## ヒューマン・オルガノイドの新展開

オルガノイドは複数の細胞の集合体であり、その構成要

素である個々の細胞の分化状態などを把握することや、個々の細胞間相互作用の分子の実態を解析することは困難であった。われわれは、オルガノイドを構成する細胞を単離し、それら個々の単一細胞を対象とした RNA シークエンス解析(single cell RNA sequence 解析)を実施した<sup>4)</sup>。その結果、従来の二次元分化誘導系と比較して、オルガノイド作製による三次元分化誘導系では明らかにヒト肝細胞の分化度が向上しており、生体内の胎児肝臓に遺伝子発現シグニチャーが近似することが明らかとなった。さらに、*in silico* においてリガンド-受容体ペアを効率良く同定することにより、オルガノイド内における細胞間相互作用に関連する多様な分子シグナルの活性化について高い確率で推定することを可能とした。このようなオルガノイド解析技術は、それらの機能向上に資するのみならず、オルガノイドを用いた器官形成機構の解明や、疾患モデルの解析に必要な重要な解析ツールを提供するものである。

また、オルガノイドを用いた再生医療の実現のために必要となる安定した製造手法を確立するため、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞や間葉系細胞を分化誘導する手法を確立し、すべてが iPS 細胞に由来するヒト肝臓原基を創出する技術の開発に取り組んだ。その結果、All-iPSC オルガノイドの作製方法を確立し、このオルガノイドを免疫不全マウスに移植すると、移植後数日で血管化された肝組織が再構成され、ヒトアルブミンの分泌や薬剤代謝機能などのヒト肝臓に特徴的な機能が生じることを明らかにした<sup>5)</sup>。さらに、All-iPSC オルガノイドを亜急性肝不全モデルマウスに移植したところ、製造回にかかわらず治療効果が生じることを明らかにした。これにより、臨床応用に向けたオルガノイド製造のための基盤技術を確立したといえる<sup>5)</sup>。

## おわりに

われわれは、ヒト iPS 細胞由来肝内胚葉細胞を材料として、血管内皮細胞と間葉系細胞との共培養による、三次元的なヒューマン・オルガノイドの人為的創出法を開発した。そして、hiPSC-LB 移植による生体内における機能的な肝臓創出が肝疾患に対する有効な治療手法となることを示した。

iPS 細胞から器官原基を創出し、それらを患者の生体内に移植することにより、機能的なヒト臓器を *in vivo* で創出するという新しい治療概念は、肝臓領域だけではなく、他の疾患領域においても有効性が大きいと期待できると考えられる<sup>4)</sup>。例えば、透析患者を対象としたヒト腎臓の人為的

再構成や、糖尿病患者を対象としたヒト膵島の人為的再構成においても、本法のようなヒューマン・オルガノイドの創出とそれらを用いた移植法の開発を強力に推進しなくてはならない。

ドナー臓器を待ちながら治療を続けている数多くの臓器不全患者を救うために、ヒト臓器の工業的製造に向けた研究開発を加速する必要がある。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

1. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, 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* 2013 ; 499 : 481–484.
2. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010 ; 51 : 297–305.
3. 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* 2014 ; 9(2) : 396–409.
4. Camp JG, Sekine K, Gerber T, Loeffler-Wirth H, Binder H, Gac M, Kanton S, Kageyama J, Damm G, Seehofer D, Belicova L, Bickle M, Barsacchi R, Okuda R, Yoshizawa E, Kimura M, Ayabe H, Taniguchi H, Takebe T, Treutlein B. Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* 2017 ; 546(7659) : 533–538.
5. Takahashi Y, Sekine K, Kin T, Takebe T, Taniguchi H. Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation. *Cell Rep* 2018 ; 23(6) : 1620–1629.
6. 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* 2015 ; 16 : 556–565.