

第5回 国際組織工学・再生医療学会
世界会議 2018—京都

Luncheon Seminar 1

“The Era of Organoid Medicine -from screen to therapeutics-”

会場

第1会場
国立京都国際会館
1F メインホール

日時 2018年9月5日(水)
12:10-13:00

会場 第1会場 国立京都国際会館 1F メインホール
〒606-0001 京都府京都市左京区宝ヶ池

座長

東京女子医科大学
先端生命医科学研究所
循環器内科
松浦 勝久 先生



講師

東京医科歯科大学統合研究機構
先端医歯工学創成研究部門／
横浜市立大学大学院医学研究科／
シンシナティ小児病院
武部 貴則 先生



The Era of Organoid Medicine - from screen to therapeutics -

Takanori Takebe

M.D.(Cincinnati Children's Hospital,
Tokyo Medical and Dental University, and also Yokohama City University)

本セミナーでは、iPS細胞からのオルガノイド研究に基づく、創薬・移植応用の最新の研究を紹介したい。なお、本発表の前半部分に関しては、横浜市立大学 谷口教授を中心に進めているオルガノイドの移植医療応用、後半に関しては、シンシナティ小児病院における最近の基礎的なオルガノイドの研究を紹介したい。移植医療は、臓器不全には最も効果的な治療法であり、年々需要が伸びている。米国のUNOS(United Network for Organ Sharing)の統計データによると、ここ数十年で急速に増加しているが、残念なことに実際の移植件数は漸増にとどまっている。この差から、毎年何万人もの人が臓器提供されずに亡くなっていることが類推される。私は、この悲痛な状況を、オルガノイドを応用することに挑戦し、解決したいと考えている。

オルガノイド研究の経緯とこれから

オルガノイドは、幹細胞を用いた、ヒトを構築するモデルとして最先端の技術であり、最近では、完全ではないが臓器の特徴的な機能を再現した小型の臓器を作り上げることも可能である。Dr. Hans Cleversのラボや笹井芳樹先生の業績では、脳や腸のオルガノイド作製技術が、シンシナティ小児病院のDr. James Wellsのラボでは、ES細胞やiPS細胞からユニークな方法でオルガノイドを作製する技術が報告されている。オルガノイドは1990年代はじめに定義されたものの10年間はそこまで業績は多くなく、2000年以降、2011年以降、さらにはここ数年でオルガノイド研究の業績が急激に増えた。この背景に何があったのだろうか。私は、3つの非常に重要な発見が、この発展のプロセスに寄与しているように思う。

一つ目に、1990年台初頭、海洋生物学者として有名であったDr. Wilsonの業績が挙げられる。彼らは、海綿をシングルセルに分離し、球形の組織様の再凝集体を作製した。その研究によって、再凝集のアプローチによってももとの身体をin vitroで完全に再構成できるということが明らかとなった。

二つ目として、基底膜のようなマトリックスによる培養環境のサポートの影響が大きい。先駆的な研究者らによるマトリゲル中のラミニンの発見が、次のステップに進む上で非常に重要であった。マウスES細胞や乳腺、腎造腺等からシングルセルに分離し、ラミニンやマトリゲルに播種し形態形成が進むことを発見されたことによって、in vitroでのオルガノイド研究に大きく貢献した。

そして最後の三つ目の発見としては、幹細胞研究領域の進展であろう。Dr. James ThompsonsのES細胞、山中伸弥先生のiPS細胞、Dr. Hans Cleversのグループによる組織幹細胞やその応用技術が含まれる。これらの発見によって、ヒト幹細胞を用いて様々な臓

器を創り出すことが可能となった。

そしてこの先、「organoid medicine」と呼ばれる主要な柱となる領域が確立されることを期待している。この領域では、培養皿で作製された臓器・組織が、移植治療だけではなく、創薬研究にも応用されるようになるだろう。

この領域を具現化させるべく、シンシナティ小児病院では、幹細胞やオルガノイド治療応用に特化した研究センターを設立し、Dr. Aaron Zornや、Dr. James Wells、Dr. Michael Helmrath、そして私自身がこのプロジェクトをリードしている。彼らは内胚葉のオルガノイド研究の先駆者であり、彼らと一緒にこのセンターで取り組めることが幸せである。私の成果としては、後のスライドで触れるが、幾つかの異なるメカニズムを利用し、このオルガノイド研究を加速させることである。私たちの基礎研究は、多くのラボの研究成果があるからこそ成り立っている。幹細胞研究や細胞編集研究、オルガノイド研究等の周辺研究によって基礎研究が加速している。基礎研究において、幾つかの強みとなる発見の重要性を見いだせれば、それらは応用されるだろう。非臨床試験における治療効果を移植医療に応用したり、ヒトのオルガノイドをスクリーニング実験に利用したりできる。研究段階のものから良い結果が得られるようになると、治療や商業化などの臨床展開にステップアップできるだろう。

iPS細胞を用いたオルガノイドの構築

「どのように幹細胞の培養システムを利用することによって、複雑なオルガノイドを確実な方法で構築するのか?」というのが我々のラボでのプロジェクトの課題である。我々はそのプロセスに関心がある。ヒトのオルガノイドの形成プロセスの制御メカニズムを把握・

定義することができれば、ヒト幹細胞を用いてin vitroでそのプロセスを再現することに挑戦できるだろう。

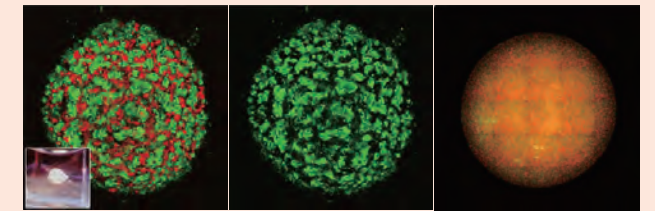
研究の背景を簡単に紹介する。後半部分で触れるが、我々はマウス組織の発達過程に関して研究している。細胞間の相互作用により、組織塊が形成されるプロセスである。我々の検討している内胚葉形成では、通常iPS細胞やES細胞からスタートさせるが、一般的な発達過程では、受精卵から胚になる。原腸内胚葉由来の内胚葉は、前腸・中腸・後腸に枝分かれする。この段階での腸の各々のパートはシンプルな構造であるが、最終的に肝臓や膵臓、十二指腸などの複雑な臓器は、この前腸から形成される。我々がモデルで検討したいことが、このプロセスである。アクチビン刺激によるiPS細胞から中胚葉もしくは内胚葉の段階的の分化が始まると、前腸系列や肝臓特異的あるいは、他の細胞系列のpopulationへと運命づけられていく。我々は、とくに膵臓形成に向かう消化管に関して、実験モデルで評価・検討している。

実験モデルに関して説明する。この非常に複雑な器官形成のプロセスを、いかにシンプルにモデル化できるか仮説を立てた。前述の通り、肝臓は、前腸から形成される。ヒトの原腸形成は約2カ月を要し、この段階においてはシート状の平面構造である。ヒト原腸形成の1.5~2カ月後、それらはLiver bud(肝芽)と呼ばれる立体構造に変化する。この肝芽は、非常に多くの細胞から成る立体構造である。赤血球や横中隔の前駆細胞は肝組織をサポートする間葉細胞である。我々は、これらの器官形成プロセスが2Dから3Dへと大きく形態変化し、3つの異なる細胞集団から成ることから、ヒト幹細胞培養モデルにおいても再現し得ると考えた。この肝芽形成プロセスのモデルを作製できれば、動物に戻しin vivoでかん流ができるようになる。この段階において血液循環はされず、肝芽形成後に、血液が毛細血管を通して流れ、機能的な肝組織へと成熟していく。

我々が行ったことは非常にシンプルで、ヒトiPS細胞もしくはES細胞を使用して、wellの中で3つの異なる系統に直接分化誘導させ、in vitroで器官形成を再現し、それを動物に移植してin vivoで成熟化するかを検討した。具体的には、京都大学iPS細胞研究所から臨床用iPS細胞株を入手し、それらをフィーダーフリー条件下でスライド上にて3つの異なる系統に分化させた。代表的なマーカーで染色した結果、90~95%もの誘導効率で安定的に均一な細胞集団を得ることができた。これらの細胞集団を用いて肝芽形成を行うのだが、コロニーを作製する際は、wellの底面にマトリックスであるマトリゲルをコートし、その上に3種の異なる系統の細胞を播種し立体的な組織形成が行われるか検討した。3Dへの形態変化は、in vitroで効率的に再現できるのである。これは、果たしてシンプルな凝集塊なのだろうか?

共焦点顕微鏡でイメージング解析を行うと、肝オルガノイド形成初期の構造をみることができるが、肝細胞とともに内皮細胞が網状

Fig.A iPS細胞からの肝オルガノイド形成



Provided by Prof. Takebe

構造を形成されている(Fig.A)(Ref.1, 2, 3)。非常に興味深いことに、シングルセル解析を行うと、非常に緻密な血管新生が促進されていることがわかる。少なくともin vivoのような現象がin vitroで起こっており、培養環境下で肝芽形成を再現することができたのである。そこで、このin vitroの血管構造(未成熟なものも含め)は、in vivoでは、血管新生されるのではないかと考えた。

免疫不全マウスにヒトiPS細胞由来の肝芽を移植した結果では、移植2日後において、移植部位全体が血液で円状に満たされ、血管新生が進んでいることがわかる(Fig.B)。一度血管が形成されると、さらに血管新生が進み、より高度な血管が構築されるのである。

また、バイオイメージング解析を行うと、iPS細胞から成る血管形成の全体を確認できる。Fig.Cはマウスの脳の画像で、白色部分はヒト由来の細胞である。これによって血管の大部分はヒト由来の細胞によって形成され、それらが実際に機能していることが確認された。さらに、タンパク産生能や薬剤代謝能をチェックし、移植1,2カ月後において、非常に良い成績が得られた。

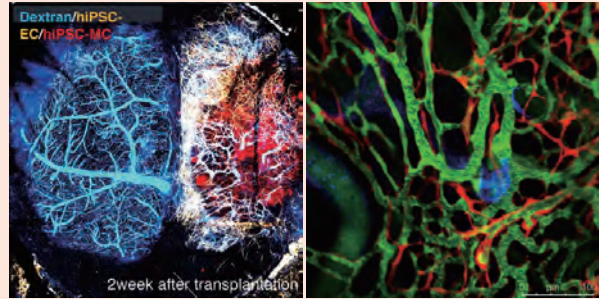
次に、我々は、in vivo肝障害モデルにおいて、機能的に救済できるか検討した。ヒト肝芽を冠状静脈に非常に近い腸間膜に移植した。冠状静脈は肝組織に繋がる主要な血管である。まず冠状静脈の被膜を除去し、血管を露出し、肝臓を適切な場所に再配置させた。非常にシンプルな置換の手順である。そしてフィブリン糊により、これを安定化させ、マウスへの肝芽の移植数を増加させ、肝障害の症状改善を検討した。マウスの行動を見ると、移植群の方が、未処置群

Fig.B マウス移植後の肝芽における血管新生の様子



Provided by Prof. Takebe

Fig.C マウス脳内でのiPS由来オルガノイドの血管形成



Provided by Prof. Takebe

に比べ、明らかな改善傾向が認められた。さらに生存曲線を評価したところ、未処置群の場合、移植30日後で肝機能不全により死亡するが、一方ヒト肝芽移植群では、生存を維持していた。この差は、移植した肝芽が、マウス体内で成熟化し、機能不全となった肝臓に置き換わり機能しているからだと考えられる。

また、私は、前述の成果は他の器官にも適用できると考えている。我々は、マウス胚組織を用いて、免疫機能、腎、心臓、脳、癌に対して、この器官形成システムが機能するか検討している。非常に驚いたのが、腎臓は自己組織化において非常に堅牢なシステムを有している。In vitroで腎芽の再構成を行った後、移植21日目において、微小血管を含む機能的な構造が確認できる(Ref.1, 2, 4)。さらに、再構成された腎の構造体において、尿の産生も確認することができた。

最近では、劇症糖尿病を含む膵臓疾患へのアプローチもしている(Ref.5)。ヒト膵島やマウス膵島を収集した。一方でオルガノイド形成し、血管形成させた。これら膵島やオルガノイドを劇症糖尿病モデルに移植すると、膵島移植群は、未処置群に比べて、生存期間は延長したが、完璧ではなかった。主な原因としては、血管形成が完全ではなかったことが考えられる。一方、血管形成させた膵島オルガノイドの移植群は、膵島単体を移植した群に比べて、生存期間は延長した。このことより、このオルガノイド培養システムを用いた仮説的アプローチによって、臨床における膵島移植はより改善されるのではないかと考えている。非常に興味深くエキサイティングな応用事例である。

オルガノイドの応用研究と将来展望

オルガノイドの創薬応用について簡単に紹介する。イントロダクションで触れたように、オルガノイドは幾つかの画期的な応用によって人々の健康に非常に大きな影響を与えるだろう。製薬業界では、

創薬研究において薬効や毒性評価のために、臓器を利用している。私はもともと臓器不全を治療するために移植医療に関心を持ち始めたが、オルガノイド医療が将来的には最も重要な応用となるかもしれない。我々の肝オルガノイドシステムのアプリケーションで、主に3つのフェーズを想定している。まずフェーズ1として、創薬開発のドロップアウト主要な原因として挙げられる肝毒性の評価を現実的なアプリケーションと考える。フェーズ2として、疾患モデルとして作成したオルガノイドを創薬研究における薬効評価に応用できると考える。そして最後のフェーズ3として、自家のiPS細胞から作成したオルガノイドを患者へ移植し、前述の動物モデルで示した治療効果と同じように疾患を治療できるか検討したいと考えている。

最近では、ヒトオルガノイドに対して、遺伝情報や生活習慣、スクリーニング因子といった非常に複雑な因子を掛け合わせる試みを行っている。我々は将来的に生物工学者たちと、高速スクリーニング解析やイメージング解析、物理学的解析によって硬さや線維化の状態などを評価できるようにしていきたいと考えている。

前述の通り、オルガノイド応用のフェーズ3は将来的に我々が目指している最終形の応用と考えている。オルガノイド移植は、肝臓移植(臓器移植)と肝細胞(細胞)移植の間に位置する、ある種中間的なアプローチだ。オルガノイド移植によって機能的な肝臓を再生するコンセプトを証明したいと考えている。

オルガノイド応用を目指し幾つかのグループが研究しているが、その中で主要な研究機関が、私のまた別のラボのある東京医科歯科大学である。同大学のラボでは、オルガノイド由来の成体幹細胞を炎症性腸疾患の患者に移植し、症状の改善を検討している。

ヒトiPS細胞を用いて肝オルガノイドを大量に作製し移植することで、患者を救うといった、非常にシンプルな戦略ではあるが、非常に多くのハードルがあると考えている。臨床応用するためには、協働する各々の製造者のサポートが必要となる。培地成分一つとっても、移植可能なものでなければならない。この点において、味の素(株)は主要なコラボレーターである。

アクチビンAは、初期の内胚葉分化において非常に重要なサイトカインであるが、実際に味の素(株)から提供していただいている(Fig.D)。臨床応用可能なグレードであるため、内胚葉由来の臓器作製に関心があれば、味の素(株)に問い合わせることを勧める。

横浜市立大学の教授、谷口先生はこのプロジェクトリーダーであり、同大学には臨床グレードの製造施設がある。幾つかのプロセスは自動化されている。肝臓は非常に多くの細胞から成ることからイメージできるように、移植する上で多くの細胞が必要となり、幾つかの製造プロセスは自動化されており、製造効率を上げる上で、この製造機器が役立っている。

Fig.D 味の素社製アクチビン A



将来的な期待として、山中先生から提供頂いたHLAホモのiPS細胞を使って複数の異なる系統に直接分化誘導し、大量培養系で異なるオルガノイドを大量に製造し、安全な方法で患者に移植し、先天性疾患の症状を改善させたいと思う。とくに、我々は、アンモニア代謝酵素を欠損し起こる、尿素サイクル異常症の治療を目指しており、さらにその先は他の疾患の治療も目指したいと考えている。

主要国では年間数万もの人が移植臓器のドナー不足で亡くなっているが、この人数は、オルガノイド移植で治療できる人数だと考える。これは絶対的適応であり、必ずや市場のポテンシャルを拡大できるだろう。オルガノイドの治療応用は実現可能と本当に考えているのだが、実現できたとしても治療費用は非常に高額だろう。大量に肝オルガノイドを創り出すのに大きなコストがかかるのが現状だ。オルガノイド移植を受ける人というのは、費用やリスクの観点から、我々が特定の人たちを選抜する必要がある。症状が末期の場合は、オルガノイド移植を受けるべきであると考えているが、発症前や初期の症状の場合は、オルガノイドを使って効果が認められた医薬品で治療をする方が、より現実的な治療方法であると考えている。

【参考文献】

- 1) Takanori T. et al., Nature. 2013 Jul 25; 499(7459): 481-4
- 2) Takanori T. et al., Cell Stem Cell. 2015 May 7; 16(5): 556-65
- 3) Takanori T. et al., Cell Rep. 2017 Dec 5; 21(10): 2661-2670
- 4) J. Gray Camp et al., Nature. 2017 Jun 22; 546(7659): 533-538
- 5) Takahashi Y. et al., Cell Rep. 2018 May 8; 23(6): 1620-1629



松浦 勝久先生



武部 貴則先生