

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 階層的血管構造を有する3次元臓器の構築
(英語) 3D tissue reconstruction with hierarchical vascular networks

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 田所 友美
(英語) Tomomi Tadokoro

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 公立大学法人横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学
(英語) Department of regenerative medicine, Yokohama City University School of Medicine

II 研究開発の概要

(和文)

臓器移植は臓器不全症に対する唯一の根本的治療法であるが、移植先進国である米国においてもドナー不足のために未だ移植待機患者数が移植実施数を大幅に上回っている状況が続いている。全世界的にはさらにドナー不足が深刻であり、この問題を解決可能な人工臓器創出技術の開発が期待されている。

山中教授による2007年のヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) の開発により、ヒトES細胞が抱えていた倫理的問題は大幅に低減され、人工ヒト臓器創出技術実現への期待が高まっている。実際、日本においては世界に先駆けて加齢黄斑変性症への移植など数々のhiPSC由来細胞・組織の移植手術が実施されている。

2000年代後半からは3次元組織構造を模倣可能なオルガノイド培養技術が上皮細胞オルガノイドを中心に発展してきた。組織は上皮細胞に加えて間葉系組織、血管が組み合わさった複雑な構造を有するため、間葉系組織を含むオルガノイドが開発され、さらに移植後に宿主血管と吻合可能な“血管化オルガノイド創出技術”が開発された (Takebe T *et al.*, Nature, 2013)。血管化オルガノイドは画期的技術であるが、宿主血管との吻合には数日を要し、臓器移植のように即時に血流にアクセス可能で機能を発揮するという段階には到達していない。この技術を元に、研究代表者らは *in vitro* 条件下で細小静脈及び毛細血管レベルの太さの血管構造を含む再構成肝組織の創出に成功している。

本研究においては、このような独自の血管を含む再構成肝組織創出技術をさらに発展させ、血管吻合移植により即時に機能を発揮可能な多階層血管を含む再構成組織構築技術の確立を目指した。

階層的血管構造を有する組織再構成に向け、以下の研究項目について検討を実施した。

1. 血管階層性を区別可能なマーカーの抽出
2. 異なる階層の血管（細小動静脈・毛細血管）を有する再構成肝組織の作製
3. ヒト iPSC 由来大血管再構成法の開発
4. 血管吻合移植可能な大血管付与再構成肝組織の開発

1. 血管階層性を区別可能なマーカーの抽出

肝臓には、血液の流入路である門脈、類洞内皮細胞と呼ばれる 100 nm ほどの有窓構造を持った血管、流出路である中心静脈、酸素供給を担う肝動脈が存在する。多階層性血管を区別可能なマーカーの抽出へ向け、マウス発生期肝臓内血管の階層性構築過程の遺伝子発現データ解析を実施した。解析の精度を上げるため、FACS により血管内皮細胞を濃縮してシングルセル RNA-seq 解析を実施した。その結果、門脈血管内皮細胞 (EC) と中心静脈 EC、類洞内皮細胞を区別可能な新規マーカーを複数抽出することに成功した。

2. 異なる階層の血管（細小動静脈・毛細血管）を有する再構成肝組織の作製

異なる階層の血管を構築するため、静脈系血管内皮細胞の分化誘導プロトコルの開発を行った。hiPSC より BMP シグナル経路と Wnt シグナル経路を活性化させて中胚葉細胞に分化誘導した後、Forskolin や VEGF により血管内皮細胞への分化を惹起した。その後、動静脈分化への関連が報告されている Notch シグナル経路、TGF β シグナル経路、FGF シグナル経路等を最適化し、静脈系血管内皮細胞の高効率な分化誘導系を確立した。項目 1 で抽出した門脈 EC と中心静脈 EC を区別可能なマーカー遺伝子を使用して、作製した hiPSC 由来静脈 EC と従来 EC の比較解析を行った結果、静脈 EC は中心静脈 EC マーカーを多く発現し、従来 EC は門脈 EC マーカーを多く発現していることが明らかとなった。静脈 EC において、従来 EC と比較して類洞 EC マーカー発現も亢進していた。

肝臓中で門脈周囲の肝細胞と中心静脈周囲の肝細胞において異なる代謝能が認められており、Liver Zonation と呼ばれる。例えば、門脈周辺では糖新生が活発に生じ、中心静脈周辺では脂質合成や解糖系が働く。Liver zonation の成立には、中心静脈内皮からのシグナルが重要であることが知られる。我々は、項目 1 で抽出した門脈・中心静脈マーカータンパク質を hiPSC-L0 培養系に添加することにより、門脈・中心静脈周囲に存在する肝細胞を特徴づける遺伝子群の発現上昇を認め、Zonation 形成を促進する培養条件に関する端緒的データを得ることができた。

3. ヒト iPSC 由来大血管再構成法の開発

hiPSC から大血管構成細胞の分化誘導検討を行った。hiPSC 由来血管内皮細胞の誘導法は既に当研究室において確立しているため、血管平滑筋細胞の分化誘導について主に検討を進めた (Takebe T *et al.*, Cell Rep., 2017)。hiPSC より BMP シグナル経路と Wnt シグナル経路を活性化させて中胚葉細胞に分化誘導した後、Activin A と PDGF により間葉系細胞へと分化を進め、Activin A とヘパリンで刺激することで血管平滑筋マーカー ACTA2、TAGLN、CNN1 を発現する血管平滑筋細胞を分化誘導した。次に、hiPSC 由来血管様構造体の作製条件の検討を行い、既存の人工血管足場材料と組み合わせることにより大血管構造を模倣したチューブ状構造体の作製に成功した。さらに、チューブ内腔への hiPSC 由来血管内皮細胞の播種に成功した。hiPSC 大血管の特性評価に向けて、マウス・ヒト iPSC 大血管の特性解析を実施した。マウス発生期大血管の遺伝子発現データを取得し、胎児・新生児・成体マウスの臍帯静脈/門脈に特徴的な遺伝子群を抽出した。また、hiPSC 由来の従来 EC または静脈 EC を播種した hiPSC 大血管とマウス大血管の遺伝子発現データを照合し相関解析を実施した。hiPSC 由来の従来 EC/SMC から構成される大血管は、マウス臍帯静脈に類似していること

が示唆された。

4. 血管吻合移植可能な大血管付与再構成肝組織の開発

hiPSC より分化誘導した肝内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞から構成された3次元肝臓オルガノイド (hiPSC-LO) を形成し、内部に毛細血管 (μm)、細小動静脈 (\sim 数百 μm) が内部に形成することを見出した。次に、hiPSC 肝芽に直径 mm 単位の大血管を付与する方法について検討を行い、大血管付与再構成肝組織 (hiPSC 大血管付与 hiPSC-LO) の作製に成功した。また、ラット由来動脈付与 hiPSC-LO を用いることにより動脈から細小動静脈及び毛細血管への培養液の還流が可能な新規培養法 (還流培養法) を確立し、培養液の還流による組織増大及びアルブミン分泌量の増加を認めた。さらに項目3及び4で開発、作製したヒト iPSC 大血管付与 hiPSC-LO の還流培養を実施し、還流培養群における組織増大及びアルブミン等の複数の機能タンパク質の分泌量の増加、アンモニア代謝能・尿素産生の亢進を認めた。大血管内に墨汁を還流させることで大血管周囲の肝組織内血管への培養液還流が確認された。また、肝臓発生において報告されている還流刺激による組織増殖誘導機構が、我々の開発したヒト iPSC 大血管付与 hiPSC-LO の還流培養系においても認められた (Lorenz et al., Nature, 2018)。

さらに、ヒト iPSC 大血管作製に用いる人工血管用足場材料の改良を行うことにより、ラット大腿動脈へのヒト iPSC 大血管付与 hiPSC-LO の血管吻合移植に成功した。移植直後に、hiPSC-LO 内血管に即座に血流が生じることが確認された。移植1週間後にラット血中におけるヒトアルブミンが検出され、hiPSC 肝組織内の肝細胞における CYP3A4、A1AT など複数の肝機能関連タンパク質の発現が認められたことから、*in vivo*における hiPSC-LO の機能が確認された。

以上より、本研究で目標とした、血管吻合移植により即時に血流へ接続し、機能を発揮可能な多階層血管を含む再構成組織構築技術を確認することに成功した。ラット大腿動脈の血圧は 110-120 mmHg (収縮期血圧)、70-80 mmHg (拡張期血圧) であり、門脈の血圧である 5-10 mmHg を大幅に上回っているため、hiPSC 大血管は門脈への移植が十分に可能な機械的強度を有することが示唆された。

本技術を基盤として、より大型の hiPSC 組織を *in vitro* で構築する技術が発展した先に、移植医療におけるドナー臓器不足を解消し臓器不全症患者の回復を可能とする hiPSC 由来人工臓器作製の実現が期待される。

(英文)

Organ transplantation is the only fundamental treatment for organ failure, but even in the United States, the number of patients waiting for transplantation far exceeds the number of transplants performed due to the shortage of donors. The shortage of donors is becoming more serious worldwide, and the development of artificial organ creation technology is in high demand as an alternative.

With the discovery of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) in 2007 by Professor Yamanaka, the ethical problems of human ES cells have been greatly reduced, and expectations are rising for the realization of artificial human organ creation technology. In fact, several clinical trials have been conducted in Japan using hiPSC-derived cells and tissues, including transplantation for macular degeneration ahead of the rest of the world.

Previously, we developed vascularized liver organoids, which can form human blood vessels and connect to host blood vessels upon transplantation (Takebe T *et al.*, Nature, 2013). Vascularized organoids are a breakthrough technology, however, the connection with the host vessel takes several days after transplantation. In this research, we aim to develop hiPSC-derived liver tissue equipped with a large blood

vessel capable of transplantation by vascular anastomosis.

We investigated the following research items for the generation of hiPSC-liver tissue containing hierarchical vascular structure.

1. Extraction of markers capable of distinguishing a vascular hierarchy
2. Generation of hiPSC-liver organoid containing different types of blood vessels (arteriovenous and capillaries)
3. Construction of hiPSC-derived large vessels
4. Generation of hiPSC-liver tissue with a large blood vessel capable of transplantation by vascular anastomosis

1. Extraction of markers that can distinguish a vascular hierarchy

In the liver, there are several types of blood vessels: the portal vein, which is the inflow channel of blood; sinusoidal endothelial cells, which have fenestrae of about 80-100 nm diameter and are involved in the exchange of molecules between blood and hepatocytes; the central vein, which is the outflow channel; and the hepatic artery, which supplies oxygen. Toward the extraction of markers that can distinguish hierarchical blood vessels, we performed single-cell RNA-seq analysis of liver endothelial cells during mouse development. As a result, we successfully found novel markers that can distinguish between portal vein endothelial cells (ECs), central vein ECs, and sinusoidal ECs.

2. Generation of hiPSC-liver organoid containing different types of blood vessels (arteriovenous and capillaries)

In order to construct different layers of blood vessels, we developed a differentiation protocol for venous ECs. Human iPSCs were differentiated into mesodermal cells by activating the BMP and Wnt signaling pathways, and then differentiated into endothelial cells by Forskolin and VEGF. After that, we optimized the Notch, TGF β , and FGF signaling pathways, which are involved in arteriovenous differentiation, and established a highly efficient induction protocol for venous ECs. Using marker genes found in item 1, a comparative analysis of hiPSC-derived venous ECs and conventional ECs was performed. As a result, venous ECs expressed many central vein EC markers while conventional ECs expressed many portal vein EC markers. Sinusoidal EC marker expression was also enhanced in venous ECs compared with conventional ECs.

In the liver, periportal hepatocytes and pericentral hepatocytes have different metabolic abilities, which is called Liver Zonation. For example, gluconeogenesis occurs actively on periportal hepatocytes, and lipid synthesis and glycolysis are activated on pericentral hepatocytes. It is known that signals from the central vein endothelium are important for the establishment of liver zonation. We found that adding the portal and central vein marker proteins extracted in item 1 to the hiPSC-LO culture system increased the expression of a group of genes that characterize the hepatocytes present around the portal and central veins, respectively.

3. Construction of hiPSC-derived large vessels

We sought to generate large blood vessels from hiPSCs. Since hiPSC-ECs have already been established in our laboratory, we mainly investigated the differentiation of vascular smooth muscle cells (SMCs) (Takebe

T *et al.*, Cell Rep., 2017). Using mesoderm cells, mesenchymal cells were induced with activin A and PDGFBB, followed by stimulation with activin A and heparin resulting in the differentiation of SMCs, which express smooth muscle markers ACTA2, TAGLN, and CNN1. Next, we successfully fabricate tube-like structures that mimic large blood vessels (BV) by seeding SMCs and ECs into scaffolds for artificial vessels. To characterize hiPSC-BVs, we performed characterization of mouse and human iPSC-BVs. We obtained gene expression data of large BVs from fetal/neonatal/adult mouse umbilical/portal veins and hiPSC-derived BVs using SMCs and conventional ECs or venous ECs, and correlation analysis was performed. Results suggested that hiPSC-derived conventional EC/SMC BVs showed similar characteristics with mouse umbilical veins/portal veins.

4. Generation of hiPSC-liver tissue with a large blood vessel capable of transplantation by vascular anastomosis

We developed hiPSC-LOs composed of hepatic endoderm cells, ECs, and mesenchymal cells, and found those contain capillaries and venules inside of organoids. Next, we investigated the method of adding large BVs (mm diameter) into hiPSC-LO and established a perfusion culture method using rat artery-equipped hiPSC-LO, resulting in a size increase and albumin secretion by perfusion of medium through artery to capillaries. We performed a perfusion culture of hiPSC-LO equipped with hiPSC -BVs developed in items 3 and 4 and confirmed tissue enlargement, increased secretion of albumin, enhanced ammonia metabolism and urea production in the perfusion group compared to that in control group..

Finally, we succeeded in transplantation of hiPSC-LO equipped with hiPSC -BVs via anastomosis with rat femoral artery and found human albumin secretion and the expression of several hepatic functional proteins such as CYP3A4 and A1AT, etc. at 1 week after transplantation.

Collectively, we developed the method for adding hiPSC-BVs into organoids which enables us to transplant organoids by vascular anastomosis. If larger hiPSC tissue construction *in vitro* will be achieved based on these findings, it is expected that hiPSC-derived artificial human organs can solve the shortage of donor organs and leads to the recovery of patients suffering from end-stage organ failure.