

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 上皮-間葉相互作用に依拠した、内胚葉組織高度化を実現する基盤的方法論の構築
(英語) A fundamental methodology reproducing epithelial-mesenchymal interaction
to create further advanced tissues of endodermal organs

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高里 実
(英語) Minoru Takasato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人 理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー
(英語) Team leader at RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

II 研究開発の概要

1. 研究開発の目的・意義

本研究では、発生学的位置情報に基づいた分化誘導法によって、胎児体内における空間的特異性（前後、中外、背腹）を正しく付加された内胚葉性上皮及び間葉細胞を作製し、両者を組み合わせる系を用いて、内胚葉組織が高度に発達するための基礎的方法論を構築する。これにより、世界初のヒト多能性幹細胞からの膀胱オルガノイド作製を達成すると共に、高度な組織性を有する内胚葉性臓器オルガノイドを作製する方法論の一般化に貢献することを目指した。

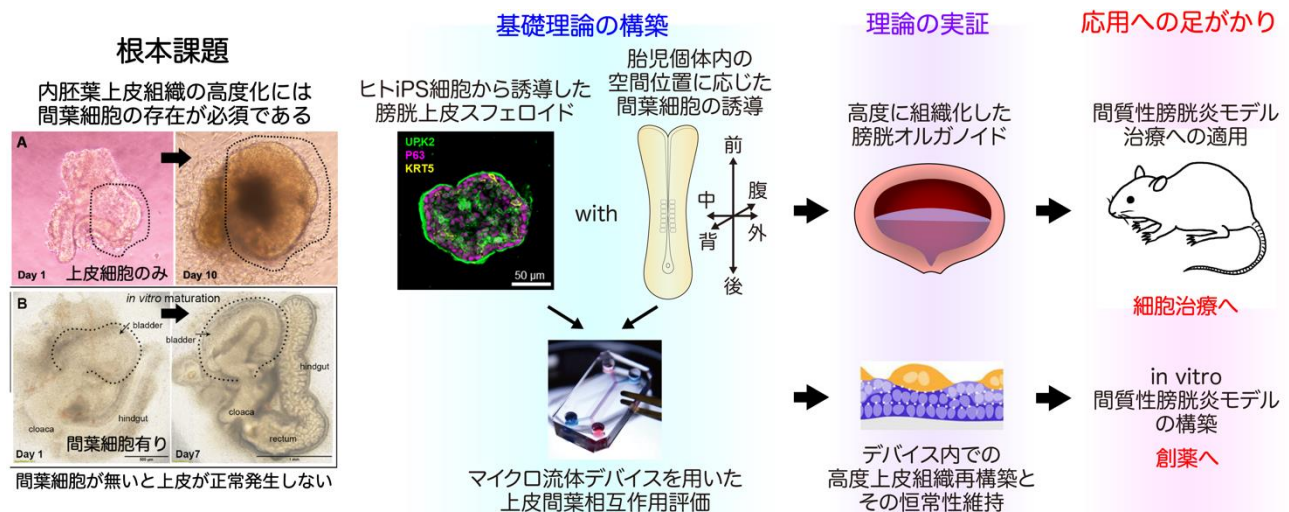
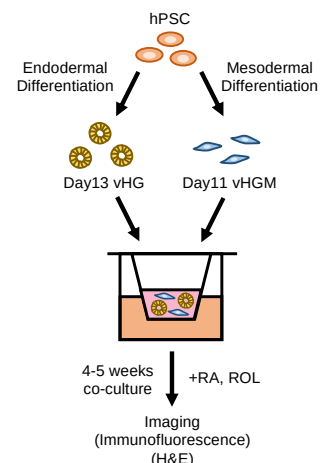
2. 研究開発の背景

気管、消化管、膀胱等の内胚葉性臓器の基本構造は、頂端側に組織された管状の上皮細胞を、基底側の間葉細胞が覆う構造であり、この2者の相互作用によって構造や機能の恒常性が維持されている。内胚葉性臓器オルガノイドを応用利用可能なレベルに高度化するには、その構成細胞として適切な上皮細胞と間葉細胞を準備した上で、両者を相互作用させる必要がある。本研究では、そのターゲット臓器として膀胱を設定し、未だ世界で誰も実現していない膀胱オルガノイド作製に挑んだ。

3. 研究開発の目標

本研究では、以下の3つの研究目標を設定した。

- ① 膀胱上皮に最適な中胚葉性間葉細胞を誘導し、膀胱上皮細胞と組み合わせることで、膀胱上皮組織が高度化することを示す。（高度組織を有する膀胱オルガノイドの作製）
- ② また、上皮-間葉の相互作用による上皮組織の高度化・機能化を評価するために、マイクロデバイス技術（分担者：横川）を導入する。すなわち、2種の細胞を3次的に配置し、高度化した膀胱上皮が発揮するバリア機能を定量評価する。（Bladder-on-a-chip 基盤の開発）
- ③ 更に、作出した膀胱オルガノイドを、難病である間質性膀胱炎の疾患モデル動物の膀胱に移植し、動物の行動薬理学を得意とする大塚製薬が、その治療効果を判定する。これにより、上皮-間質の相互作用を基盤とする上皮組織の高度化が、幹細胞・再生医療に寄与する可能性を示す。（間質性膀胱炎モデル動物への適用）



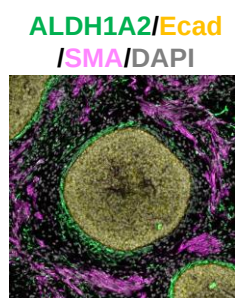
4. 各目標の達成状況

- ① 高度組織を有する膀胱オルガノイドの作製

腹側後腸スフェロイドと、腹側後腸周辺間葉細胞を、それぞれヒト多能性幹細胞から分化誘導し、レチノイン酸を含む培地を用いて、マトリゲル内で4-5週間共培養した（右図）。その結果、膀胱特有の層構造を持ち、SMA陽性の平滑筋に覆われた、膀胱オルガノイドの作製に成功した（下図）。作製した膀胱オルガノイドは、上皮部分に3層構造を有し、CK5陽性基底層、P63陽性中間層、UPK2陽性表層から成る。上皮を囲む間葉部分は、SMA陽性筋層を形成していた。これらを免疫組織学的に確認した。ヒト多能性幹細胞を用いて、高度組織を有する膀胱を作製した成果は世界初である。



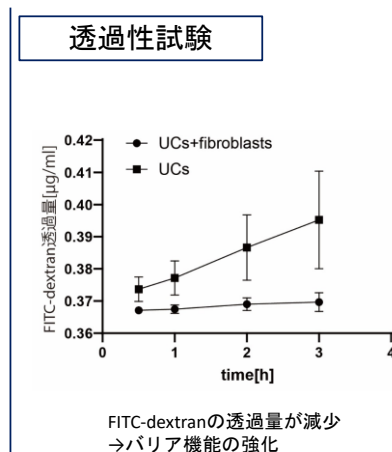
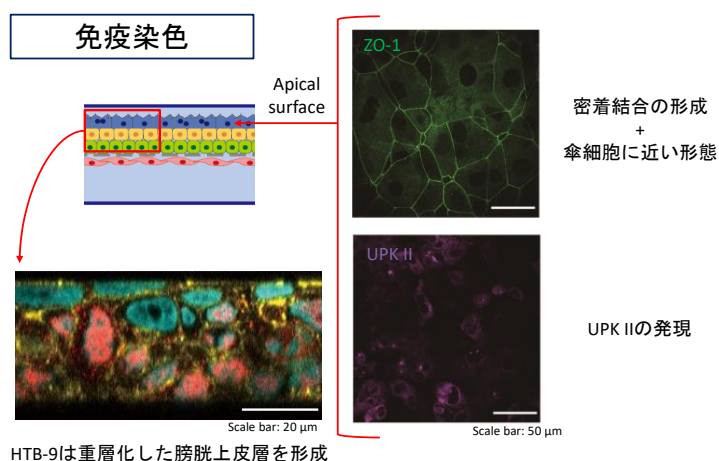
（左）
上皮部分の免疫染色像
UPK1A 陽性の表層細胞
NP63 陽性の基底細胞
Ecad は上皮マーカー



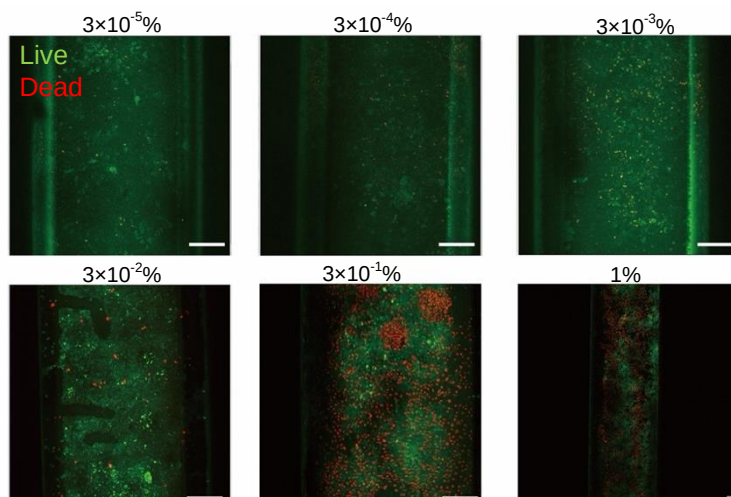
（左）
間葉由来細胞の免疫染色像
SMA1 陽性の平滑筋
ALDH1A2 陽性の間質細胞
Ecad は上皮マーカー

②Bladder-on-a-chip 基盤の開発

ヒト膀胱上皮のプライマリー細胞株（HTB-9）及び、ヒト膀胱間質のプライマリー細胞（HbDSF）を、バイレイヤー流体デバイス内に配置して2週間の共培養を行った。この方法により、上皮細胞の重層化が達成された。（下左図：免疫染色）。また、FITC-dextranの透過量を定量したところ、共培養によりバリア機能の強化が確認された（下右図：透過性試験）。また、TEER値の計測による膀胱のバリア機能の評価も行い、共培養によるバリア機能の強化を示した。

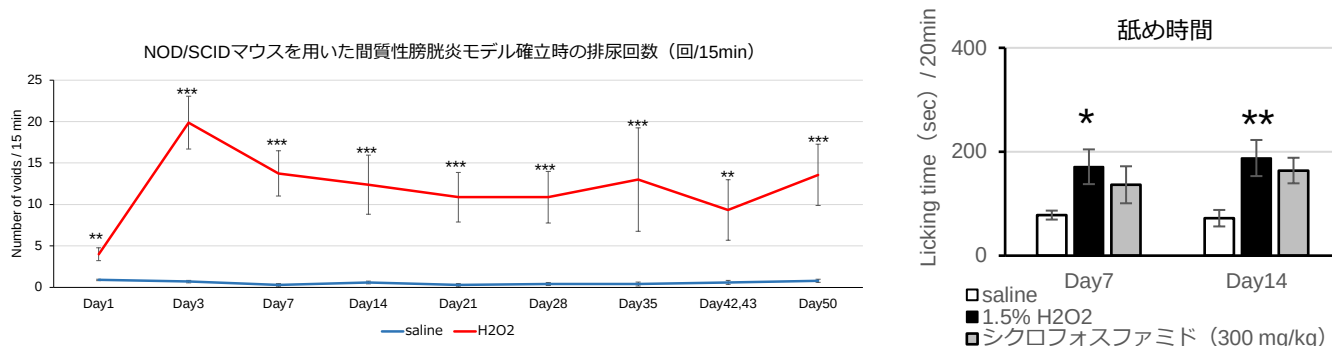


更に、この膀胱デバイスに対して、過酸化水素を様々な濃度で添加し、間質性膀胱炎様の膀胱上皮に対するダメージが見られるかを、死細胞の可視化により観察した。その結果、0.03%濃度を越えたところで、細胞死が観察された（右図：赤）。更に、0.3%濃度を越えたところで細胞剥離によって、穴が形成されており、ハンナ型間質性膀胱炎の再現に適している可能性が示唆された。



③間質性膀胱炎モデル動物への適用

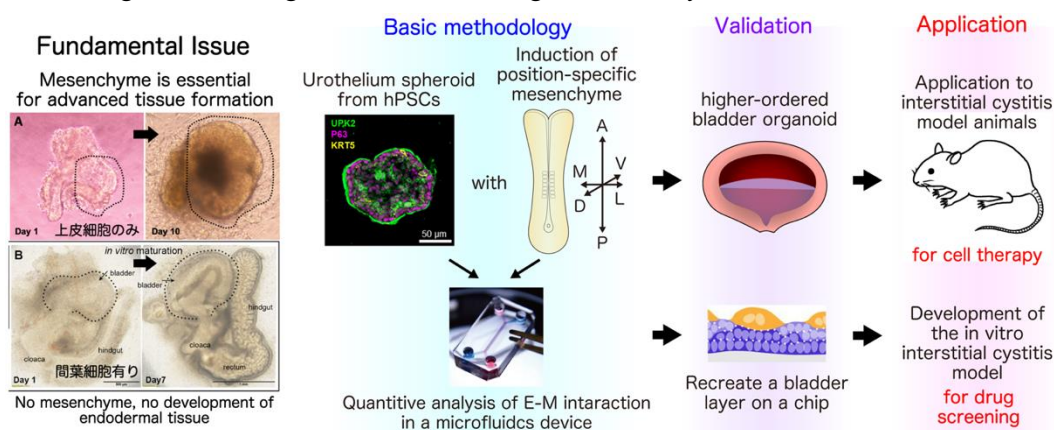
マウスに対して過酸化水素処理を行い、間質性膀胱炎を再現した。このモデルマウスを行動薬理的に解析し、排尿回数、尿量、を元に膀胱炎症状の非侵襲的な定量評価法を開発した。また、細胞移植の方法を検討し、膀胱への生着を確認した。具体的には、免疫不全マウスの膀胱に対して過酸化水素処理を行い間質性膀胱炎を発症させ、その後の長期的な影響を、排尿回数を定量することで評価した（下グラフ）。その結果、処置後 50 日経過後も排尿回数が顕著に増加したままであることが分かった。また、痛み行動として「舐め時間」を計測した、その結果、間質性膀胱炎モデルでは、舐め時間の顕著な増加を観察した。



更に、ヒト iPS 細胞から誘導した膀胱上皮のオルガノイドを、実際に間質性膀胱炎マウスの膀胱に移植する実験を行った。移植 4 日後に膀胱を摘出し、切片を作成して生着の成否をヒト特異的抗体の染色により確認した。その結果、マウス膀胱壁にオルガノイドの由来のヒト細胞が生着できていることを確認した。以上より、間質性膀胱炎マウスの確立、非侵襲的な病態評価法の確立、そして膀胱オルガノイドの移植技術の確立を達成できた。

Purpose and Significance of Research: In this study, we aim to establish fundamental methodologies for the development of highly differentiated endodermal epithelial and mesenchymal cells with spatial specificity (anterior-posterior, medio-lateral, dorsal-ventral) within the fetal body. Our goal is to achieve the world's first creation of bladder organoids from human pluripotent stem cells, contributing to the generalization of methodology for creating endodermal organoids with advanced tissue structure.

Background of Research: The basic structure of endodermal organs such as the trachea, digestive tract, and bladder consists of epithelial tubular structure on the apical side, surrounded by mesenchymal cells on the basal side. The interaction between these two cell types maintains the structural and functional homeostasis. To advance endodermal organoids for practical applications, appropriate epithelial and mesenchymal cells need to be prepared and interacted with each other. In this study, we focused on bladder organoids, aiming to achieve something that has not yet been realized worldwide.



Research Goals: We have set the following three research goals:

Goal 1: Induce optimal mesenchymal cells for bladder epithelium and combine them to demonstrate enhanced bladder epithelial tissue (generation of bladder organoids with advanced tissue structure).

Goal 2: Evaluate the enhanced function of epithelial tissue through epithelial-mesenchymal interactions using microdevice technology (development of bladder-on-a-chip platform).

Goal 3: Transplant the induced bladder organoids into a disease model animal with interstitial cystitis, and assess their therapeutic effects. This will demonstrate the potential contribution of enhanced epithelial tissue based on epithelial-mesenchymal interactions to stem cell-based regenerative medicine (application to interstitial cystitis model animals).

Achievement Status of Each Goal:

Goal 1 (Generation of Bladder Organoids with Advanced Tissue Structure): We successfully created bladder organoids with a specific layer structure, including basal CK5-positive layer, intermediate P63-positive layer, and superficial UPK2-positive layer. The mesenchymal part surrounding the epithelium formed an SMA-positive muscle layer. This achievement represents the world's first generation of bladder organoids using human pluripotent stem cells.

Goal 2 (Development of Bladder-on-a-chip Platform): By co-culturing primary human bladder epithelial cells (HTB-9) and bladder mesenchymal cells (HbDSF) in a bilayer fluidic device for 2 weeks, we achieved epithelial cell stratification. Enhanced barrier function was confirmed through FITC-dextran permeability quantification and TEER measurements.

Goal 3 (Application to Interstitial Cystitis Model Animals): We induced interstitial cystitis in mice by hydrogen peroxide treatment and developed a non-invasive quantitative evaluation method for bladder inflammation symptoms based on urination frequency and volume. We also explored cell transplantation methods and confirmed engraftment in the bladder of immunodeficient mice. Additionally, we successfully transplanted bladder organoids derived from human iPSCs into the bladder of interstitial cystitis model mice, confirming engraftment of human cells. In summary, we achieved the establishment of an interstitial cystitis mouse model, a non-invasive evaluation method for bladder inflammation, and successful bladder organoid transplantation techniques.