

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

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 立体組織の形成過程を最適化するモデルベース培養法の開発  
(英語) Development of a model-based culture method for optimizing three-dimensional tissue formations

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) 奥田 覚  
(英語) Satoru Okuda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授  
(英語) Associate Professor, Nano Life Science Institute, Kanazawa University

## II 研究開発の概要

### 研究開発の目的・ねらい

立体組織の形成過程を予測する技術として、様々な数理モデルが提案され、幹細胞の分化動態を予測する試みが行われている。そこで本研究では、新規のシミュレーション技術を開発し、立体組織の動的な形成過程の定量的な予測をマウス胚性幹細胞から誘導した眼杯オルガノイドに適用することで、大きなバラつきが生じる機構やその鍵となる因子を定量的に予測する。さらに、シミュレーションによる予測に基づいて、培養法の改善につながる組織変形機構の理解を得ることを目指した。

### 研究開発の背景

再生医療を目的とした幹細胞の培養技術の発展により、様々な組織の作製が可能になりつつある。しかし、現在の培養技術では、作製した立体組織のサイズ、各細胞の分化状態や空間分布等が大きくバラつくため、培養組織の定量的な再現性が課題となっている。そこで、立体組織内部の分化細胞の空間分布や組織全体のサイズ等を制御するアプローチの一つとして、計算機シミュレーションによる定量的な予測技術が有用である。

## 研究成果と意義

### 1. 眼杯オルガノイドの形成メカニズムの解明

マウス胚性幹細胞から誘導した眼杯オルガノイドの形成過程において、眼胞と眼杯の数や形態に大きなバラつきが見られる。本研究では、オルガノイドに生じるバラつきを、眼胞・眼杯の形態的バラつきに焦点を当てて解析した。ライブイメージング技術を用いて、眼胞と眼杯の数や形態、および制御因子である **Rx** の発現領域を定量化し、独自開発のシミュレーション技術を適用した。その結果、眼胞・眼杯の形成の有無は、眼領域のマスター遺伝子である **Rx** 陽性組織領域のサイズに依存することが明らかになった。さらに、**Rx** 陽性組織領域のサイズは、各細胞の **Rx** 発現量の可逆的な変化、**Rx** 陽性細胞の移動、**Rx** 陽性組織領域の融合の要因によって動的に変化することが判明した。

### 2. 組織変形メカニズムの理解

眼胞と眼杯の形成は、**Rx** 陽性組織領域における神経上皮組織の曲げ変形によって引き起こされることが判明した。機械操作技術を用いて、上皮組織に曲げ変形を加えた実験により、上皮組織の弾塑性転移現象が明らかになった。具体的には、短時間の変形に対しては弾性的な応答を示し、長時間の変形に対しては塑性的な応答を示した。また、MDCK 細胞を用いた検討の結果、この現象はアクチン細胞骨格と EGFR-PI3k-Akt 経路によって制御されていることが分かった。

### 3. 計算機シミュレーション技術の開発

本研究では、立体組織形成のシミュレーション技術の開発にも取り組んだ。特に、細胞極性と細胞運動を統合した数理モデルを開発し、眼胞形成における **Rx** 陽性組織領域の形成機構を解析した。新たに開発したシミュレーション技術では、各細胞に極性ベクトルを導入し、場の情報に依存した運動方程式を用いて極性ベクトルの動態を記述した。また、極性ベクトルに依存した細胞表面の張力勾配を導入し、細胞集団内部における細胞運動を記述することに成功した。

### 4. バラつきを生じる因子の同定

眼杯オルガノイドの形成過程において、**Rx** の発現量や細胞の運動、眼胞や眼杯の形成に関する動態を定量化するため、多数のオルガノイドをライブイメージングした。その結果、各細胞の **Rx** 発現量の可逆的な変化、**Rx** 陽性細胞の移動、**Rx** 陽性組織領域の融合等の要因がバラつきを生じる主要因であることが判明した。さらに、極性細胞と非極性細胞の相分離によって **Rx** 陽性領域が形成される機構をシミュレーションにより予測した。

## 結論

本研究では、新規のシミュレーション技術を開発し、立体組織の形成過程におけるバラつきを生じる機構と因子を明らかにした。特に、眼杯オルガノイドにおける **Rx** 陽性組織領域の動態と神経上皮組織の弾塑性転移現象を解析し、立体組織の形成と変形の機構を定量的に理解するための重要な知見を得た。この成果は、再生医療における立体組織の精密な制御に向けた基礎的な知見を提供するものであり、今後の応用研究においても大いに期待される。

# **Final Research Report**

## **Purpose and Objectives**

The objective of this research is to develop a novel simulation technology to predict the dynamic formation of three-dimensional tissues. This technology will be applied to optic cup organoids derived from mouse embryonic stem cells. The goal is to quantitatively predict the mechanisms and key factors causing significant variations in tissue formation and to understand the mechanisms of tissue deformation.

## **Background**

Advances in stem cell culture technology for regenerative medicine have enabled the creation of various tissues. However, current techniques often result in significant variability in the size, differentiation state, and spatial distribution of cells in the cultured tissues. To address this issue, quantitative predictive techniques using computational simulations are considered valuable for controlling these variables.

## **Mechanism of Optic Cup Organoid Formation**

In the formation of optic cup organoids, significant variability in the number and shape of optic vesicles and cups was observed. Using live imaging and custom-developed simulation technology, it was found that the presence of optic vesicles and cups is influenced by the size of the Rx-positive tissue regions. These regions dynamically change due to reversible changes in Rx expression, cell movement, and fusion of Rx-positive tissue regions.

## **Understanding Tissue Deformation**

Optic vesicles and cups are formed by bending deformation of neural epithelial tissues in Rx-positive regions. Mechanical manipulation experiments revealed an elastoplastic transition in the tissue: elastic responses to short-term deformation and plastic responses to long-term deformation. This transition is regulated by actin cytoskeleton and the EGFR-PI3k-Akt pathway.

## **Development of Simulation Technology**

A new simulation technology integrating cell polarity and cell movement was developed to analyze the formation mechanisms of Rx-positive tissue regions. This model describes cell dynamics using polarity vectors and tension gradients based on environmental information.

## **Identification of Variability Factors**

Live imaging of multiple organoids revealed that the variability in optic cup formation is influenced by reversible changes in Rx expression, cell movement, and fusion of Rx-positive regions. Additionally, simulation predicted that the separation of polarized and non-polarized cells leads to the formation of Rx-positive regions.

## **Conclusion**

This research developed a novel simulation technology that clarified the mechanisms and factors causing variability in the formation of three-dimensional tissues, particularly in optic cup organoids. The findings provide a quantitative understanding of tissue formation and deformation mechanisms, offering fundamental insights for precise control in regenerative medicine.