

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事業
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) iPS 細胞を用いた自己組織化による複合型機能性ヒト腸管グラフト製造法の開発
(英 語) Research for engineering of iPS cell-derived composite functional human intestinal grafts via self-organization

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 水谷 知裕
(英 語) Tomohiro Mizutani

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京科学大学・大学院医歯学総合研究科消化器病態学分野・講師
(英 語) Senior Assistant Professor, Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute of Science Tokyo

II 研究開発の概要

和文:

本邦において、炎症性腸疾患なかでもクローン病患者は約 5 万人存在し、その 10%は極めて難治の経過を辿り、広汎な腸切除または腸機能喪失に至る。また、ヒルシュスプルング病、非特異的小腸潰瘍症、先天性小腸閉鎖や壊死性腸炎といった小児先天性難病においても、新生児期に小腸大量切除を必要とする。この結果、「短腸症候群・腸機能不全」を来すと極めて重篤な吸収障害等を呈し、永続的な中心静脈栄養が必要となり、時に致命的な経過をたどる。同症候群に対する唯一の根治的治療として小腸移植が実施されているが、ドナー数不足や術後管理の困難さから国内の実施例は年間数例にとどまり、移植グラフト生着率も未だ低率である。上記問題の抜本的な解決手段として、高い生着能と腸特異的機能を備えた腸管グラフトを体外で構築し、これを移植することにより失われた腸機能を再獲得するという新たな再生医療が期待される。しかしながら、ヒト多能性幹細胞・組織幹細胞を用いて体外で管腔臓器としての機能・構造を備えた「腸管グラフト」を構築・製造する技術は実現しておらず、このため現行の小腸移植を代替する治療は未だ存在していない。研究代表者らは、独自に開発したヒト iPS 細胞由来腸スフェロイドを浮遊状態で均一かつ大量に作成する技術確立 (*Cell Reports Methods* 2022) した。その開発の過程で、同浮遊スフェロイドが高い融合指向性を有することを見出した。この融合性を利用し、管腔構造を有する腸管オルガノイドへと構築・融合させ、最終的に生体への移植が可能な「腸管グラフト」を製造可能な技術の開発を行ってきた。さらに腸上皮スフェロイドに、個別分化させた間葉

系細胞を浮遊状態で融合させ、複合的腸スフェロイドを構築する技術を開発してきた。そこで本研究課題では、これら成果を基盤として、ヒト iPS 細胞由来腸スフェロイド浮遊培養と、個別誘導された間葉系細胞・血管内皮細胞・腸神経細胞との自律融合による腸管オルガノイドを作成し、より複雑で成熟した組織構築を有する管腔臓器としての機能性腸管グラフトを樹立することを目的とした。

(1) 個別誘導した三胚葉成分由来の複合型腸スフェロイド製造法の開発

複合型腸スフェロイド構築に向けて、iPS 細胞由来の中胚葉から間葉系細胞への分化誘導法および iPS 細胞由来の外胚葉成分への分化誘導法の確立を行なった。複数ラインでの iPS 細胞株で、内胚葉由来の後腸細胞および中胚葉由来の間葉系細胞への安定的な誘導培養条件を確立した。外胚葉由来の腸神経細胞誘導については、既報を改変することで一定の誘導条件を見出すことができた。加えて、分化誘導因子を培地中に加える事によって、中胚葉由来の血管内皮細胞、外胚葉由来の腸神経細胞を同時に分化誘導する誘導条件の確立を試行し、一定の成果を得た。

次に、既に内胚葉由来の後腸スフェロイドでは確立している特殊低接着ガラスプレートによる浮遊培養での分化誘導・スフェロイド形成を行う「浮遊法」と、浮遊状態の iPS 細胞をバイオリアクターシリンジ内で回転浮遊培養を行いながら、分化誘導・スフェロイド形成を促す「回転浮遊法」の 2 種類の方法を検討したところ、iPS 細胞から別個に誘導した中胚葉由来の間葉系細胞と内胚葉由来後腸スフェロイドを浮遊状態で混合し、複数の胚葉成分がスフェロイドとして融合する「浮遊法」が、複数胚葉由来の細胞の自律融合に最適であることを見出した。上記で最適化した複合型腸スフェロイドの分化誘導・融合法に基づいて複数の iPS 細胞株を用いて検証を行ったところ、内胚葉由来上皮細胞および中胚葉由来間質細胞の融合による複合型腸スフェロイドについては、安定した誘導および融合によるスフェロイド構築を達成した。そこで複数胚葉の融合により構築した浮遊腸オルガノイドを as-HIOs (assembled suspension-Human Intestinal Organoids) と命名した。また作製した複合型腸スフェロイドについて、腸管特異的機能を担う腸上皮分化細胞の存在および腸上皮幹細胞の存在を確認した。さらに、複合型腸スフェロイドの超免疫不全マウス生体の腸間膜上への移植を実施したところ、既存のヒト腸オルガノイドと同様に、生体内環境における機能的成熟・腸組織機能の獲得を確認することができた。

(2) 腸スフェロイドを用いた機能性ヒト腸管グラフト構築・製造法の開発

前項で開発した複合型浮遊腸スフェロイドが有する高い自立融合能を活かし、スフェロイドによって腸組織の形態をデザインするため、個別誘導複合型浮遊スフェロイドの自律的融合による複合型腸管スフェロイド形成法の確立を行なった。管腔構造を形成する手段としては、個別に誘導された三胚葉成分を融合させた複合型腸スフェロイドを管状に融合させる「モジュール法」と、浮遊培養された腸上皮スフェロイドを自律融合させた管状の腸管スフェロイドに対して、個別誘導した間葉系細胞や血管内皮細胞、腸神経細胞の共培養による融合を行う「ビルドアップ法」の 2 種類の方法を検討した。「モジュール法」においては、前項で構築した複合型腸スフェロイドを融合させるために、AGC テクノグラス(株)と協同し、複合型腸管スフェロイド形成に適したトレンチ形状プレートの設計を行ない、Org-SP plate を作製した。「ビルドアップ法」においては、前項で確立した複合型腸スフェロイドにおける各胚葉成分の融合条件、知見を活用し、管状の腸管スフェロイドを静置浮遊培養下において、個別誘導した間葉系細胞や血管内皮細胞、腸神経細胞を連続的に共培養することで、腸組織の層構造再現が可能かを検証した。その結果、「モジュール法」において、複合型腸スフェロイドはトレンチ構造に沿った長軸方向に伸びる紐状のオルガノイドとして融合できるとともに、自立融合によって内胚葉由来の後腸細胞が中心となり、周囲を中胚葉由来の間質細胞が取り巻くように自己組織化することが確認された。そこで、複合型浮遊腸オルガノイドから本手法で構築された管腔状腸組織の培養維持、成熟を図るため、浮遊スフェロイドの培養で培った知見を基盤として、回転式バイオリアクターを用いた回転浮遊培養の条件を検討した結果、構築した組織のサイズおよび細胞配置を維持したまま成熟させる条件を見出すことができた。

次に、in vitro で成熟した管腔状腸管オルガノイドを免疫不全マウスに移植したところ、多腔化した組織へと成

熟する結果を認めたため、上皮細胞と間質細胞の生育バランスが不安定であることで間質組織による隔壁が構築される可能性が考えられた。そこで、as-HIOs を用いた培地条件検討を行い、Wnt シグナル活性を高め、上皮細胞および間質細胞の生育が均衡し、移植後に単一管腔を保持しうる培養条件 (Assembled medium condition) を見出した。この条件により生育した複合型腸管オルガノイドは免疫不全マウスへの移植によって、構築された管腔が維持されることを確認した。

以上より、(1) で確立した複合型腸スフェロイドを特殊プレート上で紐状に融合させる手法を確立し、隔壁の形成を認めず単一管腔を保持した複合型腸管オルガノイドが構築可能な条件を確立した。そこで、この複合型腸管オルガノイドを a-HITs (assembled Human Intestinal Tubules) と命名した。

(3) 機能性腸管グラフト移植技術開発と腸機能の獲得の検証

(1) (2) の開発項目を通じて作出された複合型腸スフェロイド、複合型腸管スフェロイドの移植技術、その評価手法の開発を行なった。既に樹立した大型浮遊腸オルガノイドの免疫不全マウス腸間膜上への移植技術を利用し、複合型腸スフェロイドでの移植実験を行うことで、間葉系細胞を複合させたスフェロイドでより移植生着率が高いことを見出した。また、複数ラインの iPS 細胞株において、移植した複合型腸管オルガノイドが腸組織と同様の成熟した組織構築を達成しうることを確認した。さらに、複合型腸管オルガノイドの腸間膜上への移植技術を確立し、移植によってオルガノイドが成熟した腸管組織へと発育することを確認できた。(1) (2) において、腸神経細胞の融合条件が確立に至らなかったため、移植後腸管オルガノイドにおける神経活動等の腸機能解析は施行できなかった。また、ホスト腸管と端々吻合ないし端側吻合による二期的なグラフト吻合技術の開発については、吻合に適した管腔構造の達成に時間を要したため、一部検討に留まり、吻合術の策定までは施行していない。以上より、本研究で確立した後腸上皮細胞および間質細胞からなる複合型腸管オルガノイドについては、移植によって単一管腔を維持しながら腸組織と同様の成熟した組織構築を達成しうることを確認できた。

ヒト iPS 細胞由来腸スフェロイド浮遊培養と、個別誘導された間葉系細胞との自律融合による複合型腸管オルガノイドを作成し、より複雑で成熟した組織構築を有する管腔臓器としての機能性腸管グラフトを樹立することを目的とした本研究において、既存の技術では達成できなかった大型の管腔オルガノイド作出を可能とし、一定の成果を上げることができた。本研究成果を基盤とし、体外で創出するヒト iPS 細胞由来機能性腸管グラフトによる再生医療技術開発を加速させることを今後の課題としたい。

英文：

In Japan, some patients with Crohn's disease and congenital pediatric intestinal disorders require extensive small intestine resection, leading to short bowel syndrome and intestinal failure. These conditions necessitate lifelong parenteral nutrition and severely diminish quality of life. Although small intestine transplantation is the only curative treatment, its use remains extremely limited due to donor shortages, surgical complexity, and low graft survival rates, with only a few cases performed annually. To overcome these barriers, regenerative medicine approaches have focused on the ex vivo construction of intestinal grafts replicating the native intestine's functional and structural properties. Among these, human induced pluripotent stem cells (iPSCs) offer great promise. However, the creation of functional, tubular intestinal grafts from iPSCs has yet to be achieved. Successful development of such technology could provide a novel therapeutic option, offering hope to patients who currently have few alternatives beyond conventional transplantation.

Our group previously established a method for large-scale, uniform production of human iPSC-derived intestinal spheroids in suspension culture. We discovered that these spheroids exhibit a high tendency to fuse. Utilizing this property, we developed a protocol to create tubular intestinal organoids resembling

intestinal structure. Additionally, we established a technique for integrating mesenchymal cells into intestinal spheroids, aiming to form assembled spheroids with multiple germ layer derivatives.

To construct assembled intestinal spheroids, we optimized protocols for directed differentiation of iPSCs into endodermal hindgut cells and mesodermal mesenchymal cells. Then, mixing mesodermal and endodermal derivatives under static suspension was found to be optimal for autonomous fusion of different germ layer cells. This method consistently produced assembled spheroids across multiple iPSC lines, containing both epithelial and mesenchymal components. We termed these fused organoids "assembled suspension-Human Intestinal Organoids (as-HIOs)."

We next aimed to develop protocol to assemble spheroids into tubular intestinal grafts. The "modular method," where assembled spheroids are aligned and fused into tubular structures using custom-designed trench plate led to longitudinal fusion of spheroids into tube-like structures with organized self-patterning, where endodermal cells formed the luminal center and mesenchymal cells surrounded them. To culture and mature these tubular constructs, we employed rotating bioreactor optimized for size maintenance and cellular organization. Transplantation of the matured constructs into immunodeficient mice resulted in multicavity structures. After optimization of culture condition for improving epithelial-mesenchymal balance, we identified an optimized "Assembled medium condition" that enhanced Wnt signaling and promoted balanced growth of both cell types. Using this condition, transplanted grafts retained a single central lumen. Thus, we successfully established a protocol to create tubular intestinal organoids from as-HIOs, maintaining a single lumen without septation. We termed these structures "assembled Human Intestinal Tubules (a-HITs)."

We next evaluated transplantation techniques and functional maturation of a-HITs. Using our established mesenteric transplantation model, we observed that as-HIOs incorporating mesenchymal cells exhibited higher engraftment rates. Furthermore, we established a protocol for transplanting a-HITs, confirming their capacity to develop into mature intestinal tissue. Although we were unable to evaluate enteric neuronal activity due to incomplete fusion of neural cells, we successfully demonstrated that grafts retained luminal architecture and epithelial/mesenchymal composition post-transplantation. Technical hurdles related to anastomosis with host intestine were partially addressed.

In conclusion, this study established protocols for producing large, functional, and transplantable human intestinal tubular organoid constructs. These constructs demonstrated potential to serve as regenerative alternatives to intestinal transplantation by maintaining a single lumen and achieving tissue maturation *in vivo*.