

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine ,
Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) 歯・外分泌腺などの頭部外胚葉性器官の上皮・間葉相互作用制御による立体形成技術
の開発
(英語) Development of inductive technologies for three-dimensional ectodermal organs including teeth,
exocrine glands and other ectoderm-derived organs through regulations of epithelial and
mesenchymal interactions

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 多細胞システム形成研究センター
器官誘導研究チーム チームリーダー 辻 孝

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Developmental Biology Laboratory for Organ regeneration
Team leader Takashi Tsuji

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) iPS 細胞からの頭部器官誘導の「器官形成場」の立体形成技術の開発
開発課題名： (英語) Development of inductive technology to form "organ formation field" for
inducing head ectodermal organs from iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 多細胞システム形成研究センター
器官誘導研究チーム 研究員 池田悦子

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Developmental Biology Laboratory for Organ regeneration
Researcher Etsuko Ikeda

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 多細胞システム形成研究センター
器官誘導研究チーム 研究員 南出良平

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Developmental Biology Laboratory for Organ regeneration
Researcher Ryohei Minamide

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

本技術開発では、ヒト iPS 細胞から、頭部器官 (外分泌腺) について器官誘導領域の上皮性ならびに間葉性幹細胞を誘導する分化誘導系を確立することを目的とし、頭部器官に特異的な器官誘導の「器官形成場」としての領域を一体形成するための段階的、かつ複合的な分化誘導系の開発を行ってきた。そのために、研究協力機関である大学や技術開発個別課題などの iPS 細胞技術と経験を有する拠点と連携し、最新のヒト iPS 細胞操作技術を導入し、器官再生医療の実現に向け、幹細胞操作技術開発の基盤技術、ならびに三次元化器官を育成しうる培養システムの技術開発を推進してきた。

昨年度までの研究開発において、ヒト iPS 細胞を用いて開発した外胚葉性上皮細胞と神経堤細胞を含む胚様体 (EB) を一体形成培養技術を確立した。そこで、本研究グループが開発した、コラーゲンゲル内に複数の EB を立体的に配置して、生体内に移植することにより誘導段階を評価可能とする Clustering-Dependent embryoid Bodies 法 (CDB 法) を用いて、分化誘導した EB の生体内培養を行ったところ、外分泌腺様構造を有する器官の発生が認められたことから、生体外培養系における誘導条件の検討を進めてきた。

一方、研究協力機関である大学において、マウス ES 細胞からの唾液腺誘導研究が行われ、唾液腺様の組織を誘導された。同グループのマウス ES 細胞からの誘導技術と理化学研究所の一体形成の技術を融合することが本課題におけるヒト iPS 細胞からの外部分泌腺誘導技術の開発を加速すると考え、技術導入をすることとなった。研究協力機関との連携により作製された再生唾液腺は上皮組織のみであったことから、唾液腺発生の成熟過程においては間葉細胞との相互作用が重要であると考え、マウス ES 細胞由来唾液腺上皮組織とマウス胎児唾液腺間葉組織との再構成を作製し、同所性移植により評価を行った。その結果、マウス ES 細胞由来唾液腺の組織の成熟が認められるとともに、口腔内への唾液腺の分泌が確認されたことから、再生唾液腺の生着と機能的再生が明らかとなった。

そこで、マウス ES 細胞からの誘導条件を応用し、サイトカインの濃度や投与時間を検討したところ、EB の表層に上皮組織の形成が認められ、唾液腺の初期発生に重要な遺伝子をアデノウイルスにより発現させたところ、神経細胞や皮脂腺様組織の形成が認められた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞から頭部領域を誘導できたと考えられ、今後、頭部の位置情報を制御し、より下方の口腔領域を誘導することにより唾液腺誘導条件の最適化を進めていく。

(英文)

In our technological development, in order to establish a system to induce epithelial and mesenchymal stem cell differentiation from human iPS cells for inductive field of cranial ectodermal organs for cranial ectodermal organ induction. For the technical development, we have been collaborating with universities and other technological development projects with iPS cell technologies and experiences to introduce the latest human iPS cell manipulation techniques and realize organ regenerative medicine. For this purpose, we will develop basic techniques for stem cell manipulation and promote technological advances for culturing systems capable of developing three-dimensional organs.

In the research and development until last year, we established an integral technique to culture and embryoid bodies (EB) containing neural crest cells and ectodermal epithelial cells that were developed using human iPS cells. In addition, we developed the clustering-dependent embryoid body (CDB) method, which allows the evaluation of induction stages, by three-dimensionally placing multiple EBs in a collagen gel drop and transplanting them *in vivo*. Using this method, differentiated EBs were cultured *in vivo*, demonstrating the

development of exocrine gland-like organs. Thus, we have investigated the induction conditions of the *in vitro* culture system.

Simultaneously, salivary gland-like tissues were generated from mouse ES cells at a collaborative university. We have introduced this technique, because the technique for induction from mouse ES cells of the research group and the integral inductive technologies of RIKEN should be combined to facilitate the development of our technique for exocrine gland induction from human iPS cells. Since only epithelial tissues were prepared as regenerated salivary glands in the joint research with the collaborative organization, their interactions with mesenchymal cells are critical for the maturation during salivary gland development. Thus, the regenerated salivary gland epithelial tissue derived from mouse ES cells and the mesenchyme tissue of the mouse fetal salivary glands were reconstructed, and evaluated by orthotopic transplantation. As a result, the maturation of the salivary gland tissue derived from mouse ES cells and the secretion from the salivary glands into the oral cavity were confirmed, demonstrating the engraftment and functional regeneration of the regenerated salivary glands.

Therefore, the conditions of induction from mouse ES cells were applied to examine the cytokine concentrations and the administration time, resulting in epithelial tissue formation on the surface of EBs. Then, genes critical for the early development of the salivary glands were expressed using an adenovirus vector, resulting in nerve cell and sebaceous gland-like tissue formation. Thus, the craniofacial region could be induced from human iPS cells. In the future, the conditions of salivary gland induction will be optimized by utilizing craniocaudal axis information for downward induction to an oral region.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 2件)

1. Ryoji Takagi, Junko Ishimaru, Ayaka Sugawara, Koh-ei Toyoshima, Kentaro Ishida, Miho Ogawa, Kei Sakakibara, Kyosuke Asakawa, Akitoshi Kashiwakura, Masamitsu Oshima, Ryohei Minamide, Akio Sato, Toshihiro Yoshitake, Akira Takeda, Hiroshi Egusa and **Takashi Tsuji**, Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model, *Science Advances*, 2(4):e1500887, doi: 10.1126/sciadv.1500887, 2016.
2. Chikafumi Ozone, Hidetaka Suga, Mototsugu Eiraku, Taisuke Kadoshima, Shigenobu Yonemura, Nozomu Takata, Yutaka Oiso, **Takashi Tsuji** and Yoshiki Sasai, Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells, *Nature Communications* 7: 10351, doi:10.1038/ncomms10351, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **Takashi Tsuji**, Functional Ectodermal Organ Regeneration by Bioengineered Organ Germs between Epithelial and Mesenchymal Stem Cells, EMBO | EMBL Symposia 2016 Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture, Heidelberg, Heiderberg (Germany), October 14, 2016 (国際)

2. 辻 孝、上皮・間葉相互作用による器官再生の戦略と展開、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター、2017年3月9日（国内）
3. 辻 孝、上皮・間葉相互作用による外胚葉性器官の再生、第21回分生研シンポジウム「発生再生のダイナミズムと細胞間相互作用」、東京大学 弥生講堂一条ホール、2016年12月21日（国内）
4. 辻 孝、未来の歯科治療としての歯の再生、大阪口腔インプラント研究会創設30周年記念講演会、大阪・大阪国際会議場、2016年11月13日（国内）
5. 辻 孝、次世代再生医療としての器官再生の新展開、第25回日本形成外科学会基礎学術集会（特別講演）、大阪・ナレッジキャピタル コングレ・コンベンションセンター、2016年9月16日（国内）
6. 辻 孝、未来の歯科治療としての歯の再生、第49回広島大学歯学会総会（特別講演）、広島・広島大学、2016年7月2日（国内）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当事項なし。

(4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現化拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine ,
Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) 歯・外分泌腺などの頭部外胚葉器官の上皮・間葉相互作用制御による立体
形成技術の開発／上皮性幹細胞と間葉性幹細胞の三次元的な組織からの
頭部器官誘導技術の開発

(英語) Development of inductive technologies for three-dimensional
ectodermal organs including teeth, exocrine glands and other ectoderm-derived organs through
regulations of epithelial and mesenchymal interactions／Development of the inductive technology
for head organs by using the three-dimensional tissue which is consisted of both the epithelial
stem cells and the mesenchymal stem cells

研究開発担当者 (日本語) 株式会社オーガテクノロジーズ 研究開発部 部長 手塚 克成
所属 役職 氏名： (英語) Katsunari Tezuka, Ph.D., Manager, Research&Development, Organ
Technologies Inc.

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- 研究開発代表者：理化学研究所・多細胞システム形成センター・辻孝チームリーダー 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima KE, Ishida K, Ogawa M, Sakakibara K, Asakawa K, Kashiwakura A, Oshima M, Minamide R, Sato A, Yoshitake T, Takeda A, Egusa H, Tsuji T. Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model. *Sci Adv.* 2016, 2(4), e1500887.
2. Ogawa M, Tsuji T. Functional Salivary Gland Regeneration by Organ Replacement Therapy. *Salivary Gland Development and Regeneration*, 193-203. doi: 10.1007/ 978-3-319-43513-8, 2017
3. Ogawa M, Tsuji T. Functional Salivary Gland Regenerative Therapy for Oral Health. *Current Oral Health Reports*, 4(1), 44–50. doi: 10.1007/s40496-017-0123-5, 2017

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. How to Bioengineer Salivary Glands, Symposium, Miho Ogawa, 94th GENERAL SESSION & EXHIBITION OF THE IADR, Jun 24, 2016, SEOUL, Republic of KOREA

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし