

間葉系幹細胞を用いた3次元骨形成モデルの開発と利用

平野 雄（管理栄養学科・教授）

【緒言】

本研究では、骨髄由来のヒト間葉系幹細胞を3次元的に培養し、骨粗鬆症などの骨疾患予防に有用な食品因子を検索するための3次元骨形成モデルの構築を目指した。3次元骨形成モデルとは、即ち、骨組織類似の構造、いわゆる骨オルガノイドを意味する。

骨粗鬆症とは、血中のカルシウム濃度を適正に保つために骨吸収が促進された結果、骨量が減少してしまい、骨折などが起こりやすくなる病態のことである。我が国における骨粗鬆症の患者数は、現在1,300万人と言われ、今後、高齢化に伴い、更に増加すると考えられる。骨粗鬆症に起因する骨折は、その後のADL（日常生活動作）を著しく阻害し、要介護人口の増加を招き、医療費増加に繋がる。骨粗鬆症は予防が重要であり、そのためには栄養学的な介入が不可欠である。

そこで、間葉系幹細胞を用いた3次元骨形成モデルを構築し、その骨芽細胞分化誘導を行なう過程に食品因子を負荷することで、それら食品因子がどのような効果をもたらすのかを検討できれば、効率的に骨粗鬆症予防に有効な食品因子を検索できる。以上の理由で、骨粗鬆症予防に有効な食品因子を検索できる簡便で効率的なシステムの構築を目指した。

これまで、当研究室では、食品因子として大豆イソフラボンのひとつであるゲニステインを用い、骨芽細胞分化に与える効果を2次元の培養細胞レベルで検討してきた（平成27年度・28年度学術研究所研究助成）¹⁾。その研究では、ゲニステインの骨芽細胞分化に対する促進的な効果は確認できたものの、実際に骨形成にどのような影響を及ぼすのかは確認できていなかった。

従来、食品因子の生体に与える影響を調べるためには、ボランティアに目的の食品因子を摂取してもらったり、実験動物に経口摂取させたり、あるいは2次元的に培養した単離細胞（培養細胞）に対象となる食品因子を負荷したりして行なわれてきた。しかし、ヒトや実験動物を用いた調査では、倫理上の問題があり、また培養細胞を用いた研究では、生体との解離があるため、得られる情報に限界があった。従って、ヒトや実験動物を用いずに、倫理問題が発生せず、かつ生体に近い情報が得られるモデルが望まれてきた。即ち、生体を用いずに、生体に近いモデル（以下、臓器類似モデル）を構築する必要があった。

しかし、骨に関しては、現在までのところ、臓器類似モデルは存在していない。そこで、本研究で、骨の臓器類似モデルを新たに作製し、ゲニステインなどの食品因子の骨形成に与える影響を調べる検索システムの構築への足掛かりとした。

近年、iPS細胞などの幹細胞操作技術や応用が進み、人工的な臓器を作り、疾病治療に応用するなどの再生医療が注目されている。その中で、幹細胞を用いた細胞塊を特定の臓器に近いモデルとして構築したものを、単なる細胞塊（スフェロイド）と区別してオルガノイド（organoid）と呼んでいる²⁾。即ち、人為的に創出された器官・臓器に類似した組

織体がオルガノイドなのである。これまでも、すでに様々な臓器オルガノイドが作製され、幅広い研究に応用されている（表1）。オルガノイドの重要な役割は、これまで研究対象とすることが困難であったヒトに対する様々な生命現象や疾患の病態に迫ることにある。近年の研究では、多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞など）や、生体サンプル（生検などによって得られたサンプル）を活用した初代培養細胞などを活用し、ヒトを対象としたオルガノイド研究が精力的に実施されている³⁾。表1に示したように、現在までに再生医療技術の進展に伴い、種々の臓器オルガノイドの作製方法が報告されている。このような最新のオルガノイド作製技術を用いれば骨オルガノイド作製も可能であり、食品因子の骨形成への影響を検索できる有用な3次元骨形成モデルが構築できるものと考えられる。

本研究では、ヒト間葉系幹細胞を用いた骨形成モデル（以下、骨オルガノイド）の簡便かつ効率的な作製方法の開発を目指した。

表1

オルガノイドの種類	概要	参考文献
消化管オルガノイド	各種の消化管組織由来の幹細胞を用いて、細胞増殖および分化を経て形成される消化管上皮の三次元初代培養。動物の組織レベルの生理反応を、 <i>in vitro</i> で再現することが可能。	4、5
肝臓オルガノイド	生物由来のハイドロゲル基盤であるマトリゲルを用いて、未分化な3種類の細胞（内胚葉細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞）を共培養させることで作製される。	6、7
膵臓オルガノイドヒト	ヒト多能性幹細胞から内胚葉を誘導し、複数の因子を段階的に添加することで、機能的なβ細胞の作製が可能である。	8、9、10
肺オルガノイド	多能性幹細胞由来の内胚葉を用いて、FGF経路やBMP経路、TGF-β経路等を制御すると、前腸を経て、肺オルガノイドが形成される。	11、12
腎オルガノイド	胎仔後腎から単離した尿管芽を培養し、樹状分岐を再現したもの。	13、14
眼杯オルガノイド	ES細胞塊を培養すると5日後までに、連続的に形成される眼組織様の上皮構造から眼杯様の構造が形成される。	15、16、17
がんオルガノイド	ヒト大腸がんの培養技術とゲノム編集技術を用いて作製する。	18

【方法】

1. スフェロイド作製方法の選択

現在、知られているスフェロイド作製方法、即ち3次元培養方法には、大きく3つの方

法がある。1つは微細なウェルをプレート上に作製し、その中で細胞を培養することで、細胞塊を形成させる方法、2つめにはプレート底面上で均一のスフェロイドが形成できる工夫をこらしたもので、細胞の接着面に特殊な物質をコーティングすることで細胞浮遊液が表面張力で塊を形成し、その中でスフェロイドを形成させる方法である。3つめが **hanging drop** 法と呼ばれる方法で、適量の細胞浮遊液を細胞培養ディッシュの蓋の裏面に貼付し、そのまま培養を続けると、滴の中で細胞同士が凝集し、細胞塊すなわちスフェロイドが形成する方法である。このように形成されたスフェロイドは、それぞれ特異な条件を与えることで、単なる細胞塊ではなく、各細胞がそれぞれの役割を持った臓器様構造、すなわちオルガノイドを形成することが知られている¹⁹⁾。

本研究では、比較的簡便に実施でき、一度に多くのスフェロイドを効率的に作製することが可能な手法であることから、**hanging drop** 法を採用することにした。

2. 培地の調整

幹細胞にはヒト間葉系幹細胞株 **UBE6T-15** (**HSRRB**、大阪) を用いた。**UBE6T-15** の維持培養には、間葉系幹細胞用培地 **MSCGM** (ロンザジャパン、東京) (以下、**MSCGM** 維持培地) を、骨芽細胞誘導に用いる培地として **Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit** (ロンザジャパン) を添加した **MSCGM** 培地 (以下、**MSCGM** 分化誘導培地) を用いた。

また、実験を開始するまでの段階での細胞培養、即ち、**hanging drop** 法を開始する前のサブカルチャーまでの細胞培養には、**10% FBS** (**GIBCO-BRL**、**Grand Island**、**NY**) 添加 **DMEM** 培地 (**Sigma**、**St. Louis**、**MO**) を用いた。

3. 生細胞数の測定

細胞生存率の測定はトリパンブルー色素排除試験法 (**0.5%トリパンブルー** 溶液) (ナカライテスク、京都) により行なった。回収した細胞を、トリパンブルーと培地とを **1 : 1** の割合で混合した溶液に浮遊させ、ビルケルチュルク血球計算盤を用いて生細胞数をカウントした。サンプル毎に4分画の測定を行ない、その平均値を生細胞数とした。

4. ヒト間葉系幹細胞のサブカルチャー

10% FBS 添加 **DMEM** 培地で調整し増殖させた **UBE6T-15** を、**10% FBS** 添加 **MSCGM** 維持培地中に浮遊させ、培養ディッシュに **2.5 X 10⁴ cells / mL** の細胞密度で播種した。コンフルエントに達する直前にトリプシン溶液 (ナカライテスク) を用いて回収し、至適細胞数に調整した後、**hanging drop** 法に供した。

5. **hanging drop** 作製に必要な至適細胞数の検討

適正細胞数を決定するための予備実験を実施した。その結果、**hanging drop** を作製するために最適な細胞密度は、**1 X 10⁵ cells / mL** であった。以後、**hanging drop** を作製する際にはこの細胞密度を採用した。

6. **hanging drop** 法

骨オルガノイドの作製には hanging drop 法を用いた。サブカルチャーした10% FBS 添加 DMEM 培地中の UBE6T-15 を回収し、10% FBS 添加 MSCGM 分化誘導培地に培地交換した後、 1×10^5 cells / mL に調整した。この細胞浮遊液を、 $15 \mu\text{L}$ ずつ、100 mm ディッシュの裏に貼付した (hanging drop 作製、図 1 A)。1 枚のディッシュ蓋に貼付する hanging drop はおよそ 30 滴とした。また、乾燥予防目的で、ディッシュに 3 mL 程度の Phosphate Buffer Saline (PBS) を添加した。hanging drop は作製後、 CO_2 インキュベーター (37°C) 内に 9 日間静置した。hanging drop 内のスフェロイドの様子は随時、光学顕微鏡で観察した (図 1 B)。

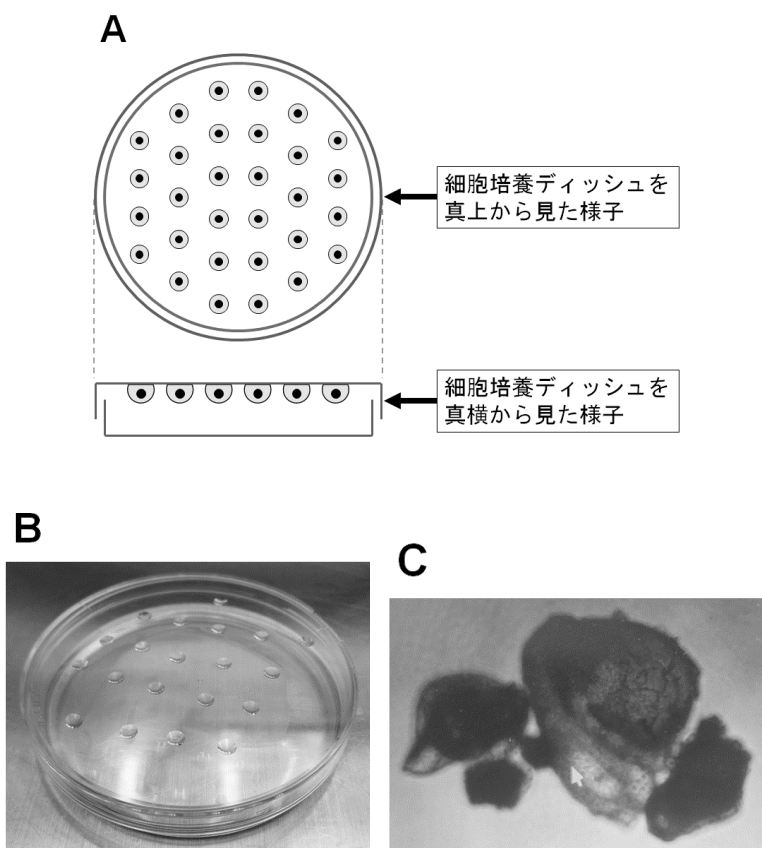


図 1 A: Hanging drop 法の模式図：細胞培養ディッシュの蓋の裏面に最大30滴程度の細胞浮遊液の貼付が可能である。細胞浮遊液の細胞密度は 1×10^5 cells / mL であり、各滴の容量は $15 \mu\text{L}$ である。B: 実際の hanging drop。このケースでは、20滴の drop を貼付している。C: 実際に作製された細胞塊 (矢印)。

7. 骨形成のための分化誘導

骨組織への分化誘導は、hanging drop 内で行なった。即ち、hanging drop 内でスフェロイドを形成する過程で骨組織に分化するように、hanging drop に用いる培地に Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit の Ascorbic acid、Hydrocortisone、 β -Glycerophosphate を添加した。

8. スフェロイドの観察

作製したスフェロイドを光学顕微鏡（ECLIPSE TS100、ニコン、東京）下で観察した。細胞塊の像は CCD camera（DP50、OLYMPUS、東京）を用いてモニター上に映し出し、写真撮影した。

9. スフェロイドの24穴プレートへの移植

作製したスフェロイドを、パストールピペットを用いて、注意深く24穴プレートに移植した。24穴プレートには予め、Ascorbic acid、Hydrocortisone、 β -Glycerophosphate をそれぞれ1%（v / v）、0.2%（v / v）、2%（v / v）添加した間葉系幹細胞分化誘導培地を各ウェル1 mL ずつ分注してあり、移植後も引き続き分化誘導を行なった（図2A）。

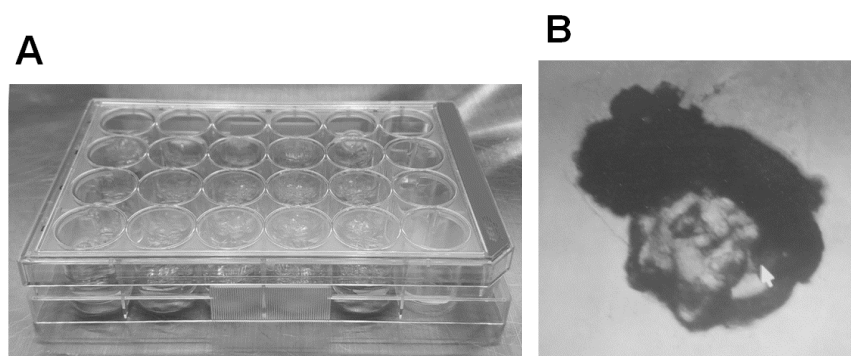


図2 A: hanging drop 法で作製した細胞塊を移植した24穴プレート。各ウェルに1個ずつ細胞塊を移植してある。B: 24穴プレートに移植後に9日間培養後の細胞塊（矢印）。

10. スフェロイドの最終確認

24穴プレートに移植後、9日めまで経時的に観察を続け、その形態を光学顕微鏡（ECLIPSE TS100）下で観察した。細胞塊の像は CCD camera（DP50、OLYMPUS）を用いてモニター上に映し出し、写真撮影した。

【結果】

1. スフェロイドの形成について

図1に示したように、hanging drop 内で球状の細胞塊の形成が確認された（図1C）。hanging drop 作製時には細胞密度は 1×10^5 cells / mL であった。予備実験では、この細胞密度以上でも、以下でも、適切な細胞塊は形成されなかった。本実験においては、ほぼすべての hanging drop 内で細胞塊が形成された。

2. スフェロイドの維持について

図2に示したように、hanging drop 内で形成された細胞塊は、24穴プレートに移植後もその形態を維持し続けることが確認された（図2B）。これまでに実施したマウス胚性幹細胞（Embryonic Stem cells、ES細胞）を使った実験では、hanging drop 法で作製した細胞塊を平面プレートに移植すると底面に接触し、そこから周囲に浸潤してしまい、細胞塊

を維持することができなかった¹⁹⁾。しかしながら、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞を用いた本実験では、移植した後も培地中で底面に接着せず、細胞塊を維持していた。

【考察】

筆者のこれまでの研究上の経験より、**hanging drop**法で作製した細胞塊は、平面ディッシュに移動させると、底面に接着し、その場所で広がりをもった2次元の浸潤面を作ってしまう、3次元の細胞塊を維持することは困難であった。

例えば、筆者が過去に実施したマウスES細胞を用いた研究では、**hanging drop**内で細胞塊を形成させることはできても、平面プレートに移植すると、底面に接着してしまい、その後、2次元的な浸潤面が広がるばかりで、3次元構造は次第に失われていった¹⁹⁾。

しかし、食品因子などの作用を検討するには、3次元構造を維持させておく必要があり、単純に**hanging drop**法を使用するだけでは目的を達成することができない。従って、どこまで平面的な広がりを抑えて、球状の細胞塊を維持できるかが、本研究の鍵であった。この点は技術的な問題があり、解決がかなり困難であると予想された。しかしながら、予想に反し、骨髄由来のヒト間葉系幹細胞で作製した細胞塊は、平面プレート移植後もその形状を容易に維持していた。

前述したように、マウスES細胞では平面プレート上で2次元的な広がりを見せたが、それに対し、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞では球状の細胞塊を容易に維持できた。その理由は不明だが、用いた2つの細胞間の分化度の違いによるものと考えられた。即ち、より未分化なマウスES細胞は、平面プレートという**hanging drop**とは異なった環境に移されるという刺激で、様々な分化の方向を示してしまい、平面環境に適応した細胞へと分化してしまったと考えられる。一方、ある程度の分化度のある間葉系幹細胞は、置かれた環境が異なっても、そのこと自体が大きな、分化への刺激となることは無く、球状の細胞塊を維持できたのではないかと考えられた。

いずれにしろ、本研究で採用した方法で、球状の細胞塊を維持できることが確認できた。以前の研究（平成27年度・28年度学術研究所研究助成）¹⁾では、平面プレート上で骨髄由来ヒト間葉系幹細胞を骨組織に分化誘導することができた。今回の実験でも、その分化条件は同様に設定したため、出来上がった球状の細胞塊は骨組織に分化した骨オルガノイドであると考えられる。

オルガノイドとは、人為的に創出された器官類似の組織体である²⁾。オルガノイドを作製する方法は、これまでにもいくつかの臓器で報告されている。例えば、消化管、肝臓、膵臓などの消化器系で報告があり、栄養素の吸収や薬物代謝、ホルモン分泌などの生体モデルとしての応用が試されている⁽⁴⁻¹⁰⁾。また、肺^(11, 12)、腎^(13, 14)、眼杯⁽¹⁵⁻¹⁷⁾などの報告もあり、それぞれの臓器に関わる病気の発症原因の解明や治療方法の確立、評価に用いられようとしている。がんオルガノイドの報告もあり¹⁸⁾、発がんメカニズムの解明やがん治療への応用が期待されている。特に、大腸がんのオルガノイド形成は、ゲノム編集技術を組み合わせることにより、がん遺伝子やがん幹細胞の生物学的な実態の解明に繋がることが予想され、大いに期待が集まっている²⁰⁾。しかしながら、本研究で対象とした骨組織に関してはこれまでに報告は無く、本実験での取り組みが、今後の骨オルガノイドの研究に寄与できるものと考えられる。

今後の展望としては、今回の研究で確立できた骨オルガノイドを用いて、骨分化誘導を促進する食品因子の検索が行なえるような条件設定を行ない、実際にそのような食品因子の検索を実施しようと考えている。具体的には、組織切片を作製し、詳細な分化状態を確認することで、そのようなシステムの構築が可能なのではないかと思われる。そのための次段階の実験として、骨オルガノイド内部の組織学的な観察がある。**Hanging drop**法を用いた場合、**drop**内で形成された細胞塊をそのままパラフィン包埋することは極めて困難であり、これまでの方法では **hanging drop**内に形成された細胞塊を一旦、平面プレート上に移して、培養を続行した後に、包埋する手法が取られていた¹⁹⁾。しかし、この方法では完全な3次元構造を維持することができないため、組織形態観察が必ずしも適切な状態で行なわれることができなかった。今回の研究では、パラフィン包埋まで至ることはできなかったが、24穴プレートで3次元構造を維持した骨オルガノイドの培養続行が可能であったことから、パラフィン包埋は比較的容易に実現できるのではないかと思われた(図3)。今後、この点を活かし、組織学的な観察を含めた、更なる研究を続けていきたい。

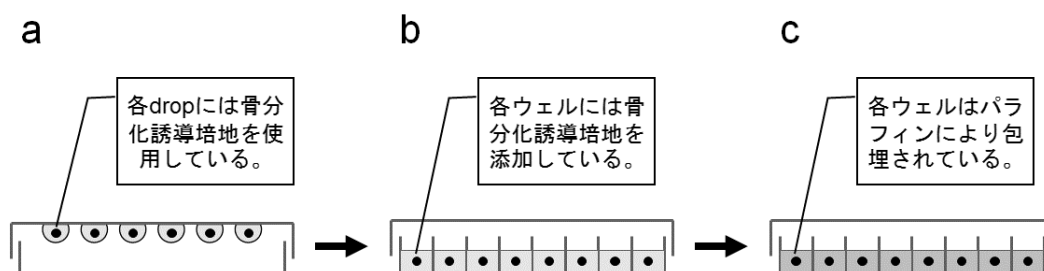


図3 Hanging drop法で作製した細胞塊(a)は、そのままではパラフィン包埋が困難である。しかし、24穴プレートに移植した場合(b)は、細胞塊が3次元構造を維持したまま培養続行が可能であるため、各プレートの培地を除去した後、熔解したパラフィンを流し込めばよいのでパラフィン包埋(c)は容易であり、この方法で作製したパラフィン切片を観察することで、更に内部構造の詳細も観察可能となる。

【結語】

本研究では、3次元骨形成モデルの作製方法として **hanging drop**法を採用し、骨芽細胞分化を誘導することで、ヒト間葉系幹細胞を単なるスフェロイドではなく、臓器類似構造体である骨オルガノイドの作製を試みた。その結果、骨組織を分化誘導する食品因子の検索に有効な骨オルガノイドを作製することができた。

【文献】

1. 平野雄 ゲニステインによる間葉系幹細胞分化制御の解析 鎌倉女子大学 学術研究所報 第17巻、57 - 64、2017
2. 武部貴則 オルガノイド4.0時代 次世代のオルガノイド研究のデザイン 実験医学 vol. 35、2678 - 2682、2017
3. Sasai Y. Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture. Nature 493, 318 -

- 326, 2013
- 4 . Mahe M.M., Aihara E., Schumacher M.A., Zavros Y., Montrose M.H., Helmrath M.A., Sato T., Shroyer N.F. Establishment of gastrointestinal epithelial organoids. *Curr Protoc Mouse Biol* 3, 217 - 240, 2013
 - 5 . Mahe M.M., Sundaram N., Watson C.L., Shroyer N.F., Helmrath M.A. Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *J Vis Exp* 97, e52483, 2015
 - 6 . Takebe T., Sekine K., Enomura M., Koike H., Kimura M., Ogaeri T., Zhang R.R., Ueno Y., Zheng Y.W., Koike N., Aoyama S., Adachi Y., Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481 - 484, 2013
 - 7 . Takebe T., Enomura M., Yoshizawa E., Kimura M., Koike H., Ueno Y., Matsuzaki T., Yamazaki T., Toyohara T., Osafune K., Nakauchi H., Yoshikawa H.Y., Taniguchi H. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell* 16, 556 - 565, 2015
 - 8 . Pagliuca P.W., Millman J.R., Gürtler M., Segel M., Van Dervort A., Ryu J.H., Peterson Q.P., Greiner D., Melton D.A. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell* 159, 428 - 439, 2014
 - 9 . Toyoda T., Mae S., Tanaka H., Kondo Y., Funato M., Hosokawa Y., Sudo T., Kawaguchi Y., Osafune K. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Res* 14, 185 - 197, 2015
 - 10 . Kim Y., Kim H., Ko U.H., Oh Y., Lim A., Sohn J.W., Shin J.H., Kim H., Han Y.M. Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep* 6, 35145, 2016
 - 11 . Barkauskas C.E., Chung M.I., Fioret B., Gao X., Katsura H., Hogan B.L. Lung organoids: current uses and future promise. *Development* 144, 986 - 997, 2017
 - 12 . Chen Y.W., Huang S.X., de Carvalho A.L.R.T., Ho S.H., Islam M.N., Volpi S., Notarangelo L.D., Ciancanelli M., Casanova J.L., Bhattacharya J., Liang A.F., Palermo L.M., Porotto M., Moscona A., Snoeck H.W. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 19, 542 - 549, 2017
 - 13 . Qiao J., Sakurai H., Nigam S.K. Branching morphogenesis independent of mesenchymal-epithelial contact in the developing kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7330 - 7335, 1999
 - 14 . Rosines E., Sampogna R.V., Johkura K., Vaughn D.A., Choi Y., Sakurai H., Shah M.M., Nigam S.K. Staged *in vitro* reconstitution and implantation of engineered rat kidney tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20938 - 20943, 2007
 - 15 . Eiraku M., Takata N., Ishibashi H., Kawada M., Sakakura E., Okuda S., Sekiguchi K., Adachi T., Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472, 51 - 56, 2011
 - 16 . Nakano T., Ando S., Takata N., Kawada M., Muguruma K., Sekiguchi K., Saito K., Yonemura S., Eiraku M., Sasai Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 10, 771 - 785, 2012

17. Hasegawa Y., Takata N., Okuda S., Kawada M., Eiraku M., Sasai Y. Emergence of dorsal-ventral polarity in ESC-derived retinal tissue. *Development* 143, 3895 - 3906, 2017
18. Fujii M., Shimokawa M., Date S., Takano A., Matano M., Nanki K., Ohta Y., Toshimitsu K., Nakazato Y., Kawasaki K., Uraoka T., Watanabe T., Kanai T., Sato T. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 18, 827 - 838, 2016
19. Yamashita A., Asahi J., Takaki M., Nakashima T., Kamiwada K., Watanabe S., Murakami D., Hirano T. Effects of ethanol on mouse embryonic stem cell differentiation. *Int J Pharm Pharm Sci* 7, 5, 2015
20. 佐藤俊朗、下川真理子、太田悠木 がんオルガノイド×*Human Cancer Biology* オルガノイドが切り拓く新しい大腸がん生物学 実験医学 vol. 35、2689 - 2694、2017