

## オルガノイド研究の基礎とトレンド Challenges of Organoid Research -Basics and Trends in Organoid Research

野村 淳 NOMURA Jun

神戸大学大学院医学研究科 生化学・細胞生物講座 生理学分野 助教  
Division of Physiology, Department of Physiology and Cell biology,  
Graduate School of Medicine, Kobe University



「オルガノイド」は、「in vivo 組織・器官の複雑な構造・機能の側面を、細胞ベースで三次元 (3D: 3- dimension) で展開・再現した in vitro モデルであり、ヒト組織における発生、再生、疾患モデリング、そして創薬、診断、個別化医療への基礎研究に資するものである (Zhao et al., Nat. Rev. Methods Primers, 2022)」と定義されている。「オルガノイド」という単語自体は 1946 年、Smith と Cochrane がカナダ内科学会のジャーナルである Canadian Medical Association Journal (CMAJ) に発表した "CYSTIC ORGANOID TERATOMA" と題された論文が最初と考えられるが、本論文は患者の類皮嚢胞 (dermoid cysts) の良性腫瘍、テラトーマ形成に関する論文であった。現在は、腫瘍生物学分野における患者由来組織を用いた「がんオルガノイド」とともに、幹細胞生物学をベースとし、器官（の一部）を再現したオルガノイドなど、in vitro でありながら in vivo 様の器官として解析可能なテクノロジーとして広がりを見せている。現在も継続的に、器官（およびその一部）の形態・遺伝子発現様式が近いオルガノイドモデルを実現すべく、新規のプロトコルの開発、そして既存のプロトコルの改変・最適化が全世界レベルで行われている。中でも、胚性幹 (ES) 細胞、人工多能性幹 (iPS) 細胞、組織幹細胞を軸としたオルガノイドは、器官の発生・分化・再生との親和性が高いことから、発表論文数は非常に多くなっている。なお、臨床研究の面においては、特に肺オルガノイドを用いた新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染モデルが、ウイルス感染の分子メカニズム、患者の病態解明に大きく貢献した事が記憶に新しい。また、オルガノイドを用いたハイスループットスクリーニングによる創薬面での貢献も目覚ましく、今後のオルガノイドの有用性・可能性を提示した好例といえる (Chen et al., Nat. Cell Biol., 2021)。

本講義 (ミニレクチャー) では、オルガノイドの基礎、オルガノイド研究により新たに明らかとなった事、そして最近のオルガノイド研究のトレンド、さらには今後のオルガノイド研究の展望についても知見を共有したいと考えている。

Organoids are cell-based, three-dimensional (3D) in vitro models mimicking functional aspects of tissues and organs in vivo. So far, organoids have contributed to basic medical research such as development, regeneration, disease modeling, and drug discovery (Zhao et al., Nat. Rev. Methods Primers, 2022). In particular, current SARS CoV-2 issue, researchers accomplished disease modeling using lung organoids as infected human lung models. In addition, the organoids were used for high-throughput screening as drug discovery which is a good example of the usefulness and potential of organoids in the future (Chen et al., Nat. Cell Biol., 2021). Although the term "organoid" was used for the first time by Smith and Cochrane in their paper entitled "Cystic organoid" published in 1946 in the Canadian Medical Association Journal (CMAJ), the term is widely used in basic medical research now,

Currently, to realize in vitro organoids that mimic in vivo organs, protocols are being developed, modified, and optimized by researchers all over the world. In this lecture (mini-lecture), I'd like to share the basics of organoid research, new findings and trends in organoid research, and future perspectives on organoid research.

## 患者由来オルガノイドを用いた早期膵がんの病態解明 Establishment of patient-derived organoids from early pancreatic cancer

児玉 裕三 KODAMA Yuzo

神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 消化器内科学分野 教授

Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine



膵臓がんは極めて予後不良であり、その予後を改善するには早期診断と早期治療介入が極めて重要である。膵がんは正常膵上皮に複数の遺伝子異常が加わり、前がん病変である Low grade pancreatic intraepithelial lesion (LG-PanIN)、および非浸潤性の上皮内癌である High grade PanIN (HG-PanIN) を経て多段階に浸潤がんへと至る。これまでの臨床的な観察により、HG-PanIN は主膵管の狭窄および尾側膵管拡張をきたすことや、膵実質の限局性の萎縮 (Focal pancreatic parenchymal atrophy; FPPA) を伴う可能性が示されてきた。一方病理学的には、HG-PanIN 周囲における腺房細胞の脱落、脂肪組織による置換、線維化、免疫細胞浸潤などが示され、膵がんが極めて初期段階から著明な腫瘍微小環境を形成していることが示唆されている。このような超早期の膵がんの病態解明は、膵がんの予防や早期診断マーカーの確立に重要である。しかし、超早期膵臓がんの希少性、さらには切除病変の微細性により、十分な研究ツールを得られないことが大きな障壁となってきた。これらの課題を解決すべく、我々は超早期膵がんの診断時における、膵液細胞診の余剰サンプルよりオルガノイドの樹立を試みている。本カンファレンスでは、超早期膵臓がんオルガノイドの樹立とその応用の可能性に関する最近の知見を紹介したい。

Pancreatic cancer remains a malignancy with a poor prognosis, and early diagnosis along with prompt therapeutic intervention are crucial to improve the prognosis. Non-invasive pancreatic carcinoma in situ is pathologically referred to as high-grade intraepithelial neoplasm (HG-PanIN). Based on previous clinical evidence, HG-PanIN is thought to be associated with pancreatic duct stenosis and caudal pancreatic duct dilation. Recent imaging studies have demonstrated that a certain proportion of HG-PanIN can cause focal pancreatic parenchymal atrophy (FPPA). Pathologically, HG-PanIN is surrounded by cancer-associated fibroblasts and immune cells, and FPPA is characterized as acinar cell loss and replacement by adipose tissue, suggesting that pancreatic cancer forms a distinct tumor microenvironment at very early stages. Understanding these very early lesions of pancreatic cancer is crucial for elucidating the pathogenesis of early pancreatic cancer, including identification of early diagnostic markers. However, there are currently no tools available to study human early pancreatic cancer. Therefore, we have tried to establish organoids from pancreatic juice cytology specimens from patients suspected of early-stage pancreatic cancer. In this conference, we will present our recent findings regarding the establishment of early pancreatic cancer organoids and their potential applications.

## 多能性幹細胞由来オルガノイドを用いた眼の再生治療法の開発 Development of regenerative therapy for the eye using pluripotent stem cell-derived organoids.

林 竜平 HAYASHI Ryuhei

大阪大学大学院医学系研究科 幹細胞応用医学 寄付講座教授

Department of Stem Cells and Applied Medicine,

Osaka University Graduate School of Medicine



眼は異なる細胞系譜の原基より構成される複雑な器官である。例えば、網膜は神経外胚葉に由来する眼胞から発生し、角膜上皮は表面外胚葉由来の眼表面上皮、虹彩や角膜内皮、実質は神経堤が起源である。近年、我々はヒト多能性幹細胞から、角膜上皮や網膜の原基細胞などの眼の細胞系譜が多帯状に規則正しく配行し 2 次元のオルガノイドである SEAM (Self-formed Ectodermal Autonomous Multi-zone) を誘導することに成功した (Hayashi R. Nature 2016, Nature Protoc. 2017)。この SEAM における各原基発生は、生体での初期眼発生のパターンを良く模倣しており、平面培養でありながらオルガノイドとしての性質を有していた。さらに誘導した角膜細胞の単離法を確立し、2019 年には角膜上皮幹細胞疲弊症患者に対する世界初となるヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞シート移植に成功した。一方、SEAM をヒト眼発生のオルガノイドモデルとして用いることで、ヒト眼組織の発生機構について検討を行い、これまでよく理解されていなかったヒトの眼表面構成細胞 (角膜、結膜、涙腺等) の発生機構を明らかにしてきた (Shibata S. Cell Rep. 2018, Nomi K. Cell Rep. 2021)。さらに、これらの細胞の共通原基となる「眼表面上皮原基」を用いて、マトリゲル内で浮遊培養を行うことで、機能的な涙腺オルガノイドを作製することに成功した (Hayashi R. Nature 2022)。本講演では多能性幹細胞を用いた角膜再生医療の実現化に向けたこれまでの取り組みと、オルガノイド技術を用いた最近の取り組みについて話したい。

The eye is a complex organ composed of distinct cell lineages. For instance, the retina originates from the neuroectoderm, while the corneal epithelium is derived from the surface ectoderm, and the iris, corneal endothelium, and stroma originate in the neural crest. In recent years, we have successfully induced 2D eye-like organoids named SEAM (Self-formed Ectodermal Autonomous Multi-zone), consisting of various ocular cell lineages, such as corneal and retinal progenitor cells in a well-organized manner from human pluripotent stem cells (PSCs) (Hayashi R. Nature 2016, Nature Protoc. 2017). The developmental patterns in SEAM closely recapture early eye development in vivo, indicating it has characteristics of an organoid despite being cultivated in a 2D. Furthermore, we established a method for isolating induced corneal cells, and in 2019, achieved the world's first successful transplantation of human iPSC-derived corneal epithelial cells to treat patients with corneal epithelial stem cell deficiency. On the other hand, by utilizing SEAM as an organoid model for human eye development, we have investigated the mechanisms underlying the development of human ocular surface cells (cornea, conjunctiva, lacrimal gland, etc.), shedding light on previously poorly understood aspects (Shibata S. Cell Rep. 2018, Nomi K. Cell Rep. 2021). Additionally, we have successfully induced ocular surface epithelium, which serves as a common primordium for these cells and produced functional 3D lacrimal gland organoids by a culture in Matrigel (Hayashi R. Nature 2022). In this presentation, I will talk about our past efforts towards realizing regenerative therapy for the cornea using iPSCs, as well as recent initiatives employing organoid technology

オルガノイドを用いたヒト発生・病態メカニズムの解明と治療への応用

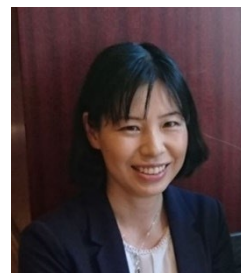
Using organoids to elucidate the mechanisms of human development and diseases and apply them to treatment

小柳（青井）三千代 KOYANAGI-AOI Michiyo

神戸大学大学院医学研究科 未来医学講座 幹細胞医学分野 特命助教

Division of Stem Cell Medicine, Department of Future Medical Science,

Kobe University Graduate School of Medicine



ほんの一昔前まで、ヒトの発生や病態メカニズムを解明するためには、培養皿の上でヒト細胞株を二次元的に培養し、興味のある遺伝子を強制発現させ、遺伝子の機能や細胞の変化を調べるか、あるいは興味のある遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作成し、得られた表現型をヒトに外挿することしかできませんでした。ヒト ES/iPS 細胞などの多能性幹細胞の登場と、マトリゲルやラミニンなどの細胞外マトリックスの普及により、培養皿の上であっても三次元的に臓器(organ)もどき(-oid)である組織を培養できるようになり、より生体内に近い形で細胞や組織を扱えるようになりました。

当研究室では、これまでにヒト iPS 細胞から様々な組織への分化誘導を行ってきました。培養方法を工夫することで、粘膜筋版を伴った胃のオルガノイドの作成に成功し、粘膜筋版形成に関わる複数の因子を同定しました（上原ら、Stem cell reports 2022）。さらに、胃のオルガノイドに転写因子 CDX2 を強制発現させることで、腸上皮化生のメカニズムの一端を明らかにしました（古出ら、iScience 2022）。また、藤田医科大学との共同研究で、福山型筋ジストロフィーの患者由来の iPS 細胞から大脳皮質オルガノイドを作成し、健常者由来と比較して疾患メカニズムの解明にも挑んできました（池田ら、iScience 2021）。

また、神戸大学食道胃腸外科との共同研究で、大腸がん患者からの複数の大腸がんオルガノイドの樹立を行い、治療への応用を目指して(1)新規治療薬候補の効果の検証、(2)ヒト iPS 細胞から作成した免疫細胞である $\gamma\delta$ T 細胞の細胞傷害性の検討なども行っています。

本演題では当研究室でのオルガノイドを用いた実験について紹介するとともに、自身が感じている三次元培養のメリット・デメリットについてもお話ししたいと思います。

Until recently, in order to elucidate the mechanisms of human development and various diseases, we cultured human cell lines two-dimensionally on culture plates, overexpressed the genes of interest and examined the cellular changes and functions of genes. Or we created transgenic mice or knockout mice of the genes of interest, and then extrapolated the resulting phenotypes to humans. With the advent of pluripotent stem cells such as human ES/iPS cells and the spread of extracellular matrix such as Matrigel and laminin, it is possible to create three-dimensional organ-like structures even on culture plates. It has become possible to culture and handle cells and tissues in a form that more closely resembles that of living organisms.

In our laboratory, we have tried differentiation of human iPS cells into various tissues. By optimization of differentiation protocol, we succeeded in creating gastric organoids with muscularis mucosa, and identified epithelial-derived factors involved in muscularis mucosa formation (Uehara et al., Stem cell reports 2022). Furthermore, by forcing expression of the transcription factor CDX2 in gastric organoids, we partially clarified the mechanism of intestinal metaplasia (Koide et al., iScience 2022). In addition, in joint research with Fujita Health University, we have created brain organoids from iPS cells established from patients with Fukuyama muscular dystrophy, and have attempted to elucidate the disease mechanism by comparing them with those derived from healthy individuals (Ikeda et al., iScience 2021).

In addition, in joint research with the Department of Esophageal and Gastrointestinal Surgery at Kobe University, we have established multiple colorectal cancer organoids from colorectal cancer patients, with the aim of applying them to treatment (1) verifying the effects of new therapeutic drug candidates; 2) We are also investigating the cytotoxicity of  $\gamma\delta$ T cells, which are immune cells created from human iPS cells.

In this presentation, I would like to introduce experiments using organoids in our laboratory, and also talk about the advantages and disadvantages of three-dimensional culture that I think.

## 神経オルガノイドによって可能となる回路レベルの ヒト神経活動評価およびオルガノイド医学としての展望 Network-level analysis of human neural function using neural organoids and the future perspective of neural organoid technology as organoid medicine

坂口 秀哉 SAKAGUCHI Hideya

理化学研究所生命機能科学研究センター 理研 BDR-大塚製薬連携センター坂口研究室  
上級研究員

Neural Organogenesis Laboratory, BDR-Otsuka Pharmaceutical Collaboration Center,  
RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research



大脳や海馬を含む終脳は中枢神経の中でも特に複雑な構造と機能を有する部位にあたり、大脳の損傷は運動麻痺や認知機能障害などを含む重度の機能障害を、海馬の損傷は記憶障害を引き起こし、大脳・海馬における神経活動の機能障害はさまざまな精神神経疾患を引き起こすことが知られている。このような神経領域の障害を対象とした研究は数多く進められているが、特にヒト細胞・組織を対象とした研究は生体のヒト神経組織へのアプローチが困難であるため難しく、信頼出来るヒト神経モデルの創出が望まれる。この問題に対して、ヒトの神経領域を 3 次元組織として多能性幹細胞から分化誘導できれば、複雑なヒトの脳発生のモデルを提供できるだけでなく、疾患メカニズムなどの解析や、移植による細胞治療へも応用できると考えられる。

我々はこれまでに、主に胚性幹細胞(ES 細胞)を用いた 3 次元培養系によって中枢神経系の組織発生の再現に挑戦し、ヒト ES 細胞から大脳皮質、内側外套、脈絡叢、脊髄などの組織の分化誘導に成功してきた(Eiraku et al. 2008, Kadoshima et al. 2013, Sakaguchi et al. 2015, Ogura and Sakaguchi et al. 2018, Sakaguchi et al. 2019)。このような生体内の 3 次元構造を保って分化誘導された神経組織は神経オルガノイドと呼ばれるようになった。神経オルガノイドという解析可能な 3 次元ヒト神経組織は、これまでに研究対象とすることが難しかったヒト神経組織およびその機能へのアプローチを可能とする新たな基盤となり得る。

本講演では、当該分野の歴史を俯瞰しつつ、我々が確立した無血清凝集浮遊培養法による神経オルガノイドの分化誘導とその神経機能解析等の研究内容を紹介する。神経オルガノイド技術の将来的な神経精神疾患への応用展開に関する利点と限界点、およびオルガノイド医学としての将来展望を共有したい。

The developing telencephalon includes cerebrum and the hippocampus. Cerebrum is concerning several higher brain functions and hippocampus is crucial for learning and memory formation, and their dysregulation is associated with several neuropsychiatric disorders. Since it had been difficult to study human neural tissues, the generation of reliable models of human neural tissue has been desirable. Towards this problem, one possible solution is the differentiation of neural tissues from human pluripotent stem cells that make it possible to study the developmental process of human neural tissues as well as the mechanisms of several neuropsychiatric diseases.

Using human embryonic stem cells, we have succeeded in the generation of three dimensional (3D) nervous tissues including cerebral cortex, medial pallium, choroid plexus, and spinal cord (Eiraku et al. 2008, Kadoshima et al. 2013, Sakaguchi et al. 2015, Ogura and Sakaguchi et al. 2018, Sakaguchi et al. 2019). These 3D tissues are currently called as neural organoids, and the neural organoid technology enables to study several aspects of neural development including neural function/dysfunction of human. Thus, neural organoids are thought to become a novel platform to approach the complex mechanisms of human neuropsychiatric disorders.

In this presentation, we first overview the history of neural organoid technology, and then introduce our achievements of the generation of regionalized neural organoids. We also discuss about the merit and limitation of neural organoid technology toward modeling neuro-psychiatric disorders, and lastly we will share future perspectives of neural organoid technology from a view point of organoid medicine.

### 生殖細胞と性分化過程の再構築と操作

### Reconstitution and control of germ cell development and sex determination.

林 克彦 HAYASHI Katsuhiko

大阪大学大学院医学系研究科・生殖遺伝学分野・教授

Department of Genome Biology, Osaka University Graduate School



生殖腺の主な機能は次世代に遺伝情報を伝える配偶子を産生する生殖機能と、性ホルモンの分泌により成長や恒常性を制御する内分泌機能に分かれる。生殖腺の異常は不妊や性分化疾患の原因となるほか、加齢による生殖腺の機能低下は更年期障害なども引き起こす。これらの疾患の多くは予見や予防が難しく、生殖腺の発生過程や加齢性変化の理解にもとづいた新しい治療法が求められている。生殖腺の主要な分化過程は胎児期に集中していることから、これらを理解するためには発生の時間軸に沿った生殖腺の再構成系（生殖系オルガノイド）が重要となる。生殖腺は生殖細胞系列と生殖腺体細胞系列という発生学的に大きく異なる細胞系列で構成されていることから、そのオルガノイドの構築にはこれら2つの細胞系列を個別に再構成して評価する必要がある。

我々はこれまでにマウスのES細胞およびiPS細胞から機能的な卵子を分化誘導する体外培養法を開発した。この培養系における卵母細胞系列の形態的变化や遺伝子発現変動は体内でのそれらをほぼ踏襲しており、実際に得られた卵子の一部は受精により個体にまで発生する。また最近では、生殖細胞系列の性分化や配偶子形成を支持する生殖巣（精巣や卵巣の原基）の体細胞の再構築にも成功している。

これらの一連の再構築系の開発により、生殖細胞や生殖巣の分化過程を培養レベルで解析することが可能になってきた。本講演では、これらの研究の紹介とそれらを通じて見えてきた課題や生殖細胞の分化メカニズムの新しい知見について紹介したい。

The main functions of the gonads are divided into reproductive functions to produce gametes that transmit genetic information to the next generation and endocrine functions to control growth and homeostasis by secreting sex hormones. Abnormalities in the gonads can cause infertility and disorders of sex development (DSDs). In addition, age-related decline in gonadal function can lead to a variety of disorders associated with menopause. Many of these diseases are difficult to predict and prevent, and new treatment methods based on an understanding of the developmental process and age-related changes in the gonads are needed. Since most differentiation processes of the gonads take place during the fetal period, gonadal reconstitution systems (gonadal organoids) are needed to deepen our understanding. Since the gonads are composed of two distinct cell lineages, germ cells and gonadal somatic cells, it is necessary to reconstitute and evaluate these two cell lineages separately in order to faithfully construct gonadal organoids.

Recently, we have developed an in vitro culture method to induce functional oocytes from mouse pluripotent stem cells. The processes of oogenesis in this culture system largely follow those in vivo, and some of the oocytes yielded in culture had a potential to develop into individuals. We have also succeeded in reconstructing the gonadal somatic cells that support germ cell development and recapitulate the sexual differentiation process. The development of these series of reconstitution systems allows us to analyze the differentiation process in culture. In this conference, I will update recent advances of reconstitution of germ cell lineage and gonadal somatic cells using pluripotent stem cells.

## オルガノイドによる消化器がんの理解 Understanding Gastrointestinal Cancers using Organoid Technology

佐藤 俊朗 SATO Toshiro  
慶應義塾大学医学部医化学教室 教授  
Department of Organoid Medicine, Keio University School of Medicine



我々の身体の細胞は、シーケンスによってその内部情報を取り出すことができるが、実際の生物学的な振る舞いを理解することは難しく、細胞株や動物研究に頼らざるを得なかった。オルガノイド技術は、様々なヒト成人の組織細胞を体外で培養し、立体的な組織構造を形成させる技術である。私達の研究チームは、様々な疾患組織由来細胞からオルガノイドを樹立し、病気の成り立ちや治療法の開発などの研究を行ってきた。本講演では、オルガノイド技術開発の基礎的な部分から、最先端研究応用まで、発表したい。

Advancements in sequencing technology have led to rapid progress in genomic research on human diseases. However, the question remains: how do genomic abnormalities translate into the clinically observed disease phenotypes? Traditionally, the correlation between such genomic abnormalities and disease phenotypes has been explored through mouse gene engineering models in biomedical research. However, the complexity of human diseases, often involving multiple genetic variants and environmental exposures, presents challenges for disease recapitulation in vitro.

In recent years, the development of organoid culture technology and CRISPR-Cas9 genome editing has started to overcome these limitations in human disease research. Organoid technology enables the cultivation of tissue stem cells in an environment closely resembling the in vivo state by leveraging niche factors that support tissue stem cell maintenance. Initially designed for culturing mouse intestinal epithelium, this technique has been successfully adapted to various organs across multiple species. Moreover, it has found applications in the cultivation of both normal human tissues and diseased tissues, facilitating the observation of the biological behavior of diseased tissues.

Furthermore, the integration of genome editing technology allows the introduction of disease-related gene abnormalities into normal tissue cells. This establishes a novel research methodology for studying Genotype-Phenotype correlations using human tissue cells, distinct from conventional genetically modified mouse models. Through this combined research approach, utilizing disease tissue models and genome-edited organoids, human disease research has entered a new phase. This presentation aims to showcase the latest research findings, based on insights gleaned from the development of organoid technology and the investigation of diseased tissues.