

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01355

研究課題名(和文) マイクロファイバー型肝オルガノイド移植による肝不全治療の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic modality for liver failure using hepatocyte-based liver organoid transplantation approach

研究代表者

大橋 一夫 (OHASHI, KAZUO)

大阪大学・薬学研究科・招へい教授

研究者番号：40364062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、肝細胞を用いてマイクロ肝オルガノイド組織体を作製して実験動物体内に移植を行い、生体内に新しい補助肝臓組織を作製することを目的とする。マウス肝不全モデルでの治療研究を行い、肝不全病態に対する新しい細胞再生療法の開発を目指している。肝不全を誘導するマウスにおいて、マイクロ肝オルガノドを腹腔内に移植する実験において、急性肝不全に対する生存期間の延長効果を確認した。本研究成果は、マイクロ肝オルガノドの移植という治療アプローチが肝不全という肝臓移植が唯一の治療選択肢となっている重篤な病態に対して新たな治療法となり得ることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝不全を含む末期肝疾患では、肝臓移植が現存する唯一の治療手段である。臓器移植には、深刻かつおそらく解決され得ないドナー不足の問題、多数の医療関係者の関与が必要なこと、臓器提供における社会的課題などの解決すべき課題が伴っている。これらのことから、新規医療の開発は極めて重要な研究開発テーマである。研究代表者の大橋はこれまでに肝細胞を用いた治療的組織作製において世界初の技術開発を数々行ってきた。本研究では、肝不全という病態に焦点を絞り、肝細胞を用いた組織体(肝オルガノド)を用いた新しい治療開発が目標である。細胞レベルでの肝臓病治療開発に成功すれば、移植医療とともに医療貢献が極めて大きいものとなる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to establish a novel approach for liver failure using hepatocyte-based liver micro organoid creation. We have utilized hepatocytes isolated and purified from adult mouse livers. Hepatocytes and non-parenchymal cells were used for liver micro organoid creation. The organoid was then transplanted into the mouse subcutaneous space, kidney capsule space, omental pouch, or intra-abdominal space and liver functions derived from the implanted organoid were investigated. The investigation revealed that intra-abdominal space is a suitable site for their functional survival. When we transplant the liver micro organoid into the mice that subsequently induced severe acute liver failure, the liver micro organoid transplantation was found to provide therapeutic value. From these data, transplantation of hepatocyte-based liver micro organoid could be a valuable therapeutic tool for liver failure status.

研究分野：再生医療 消化器外科 遺伝子治療

キーワード：肝細胞移植 肝不全 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝不全や末期肝臓疾患に対する最終治療手段として、肝臓移植は多くの患者の救命をもたらしている。日本での肝臓移植は、約 400 例/年で推移しており、肝臓移植の施行は肝病態患者のごく一部に限られている。そして、臓器提供ドナーの絶対的不足という、解決することがほぼ不可能な世界的問題から、肝臓移植を受けることができない多数の患者への対応はなされないままの状況にある。また、肝臓移植は、臓器売買や臓器を求めての医療ツーリズム等の国際問題も抱えており、2008 年 5 月イスタンブールサミットでの Istanbul 宣言において「各国においては必要数の臓器確保と、臓器提供の自給自足のための努力をすべき」という宣言がなされた。これらの観点から、肝不全に対する新規治療法の確立は急務である。その中で着目されている細胞レベルにおける治療開発を加速させることが肝要である。この観点において、本研究では、微小なマイクロ肝オルガノイドという、肝細胞で構築される移植可能な小肝組織ユニットを作製し、マイクロ肝オルガノイド移植によって肝不全病態を治療するという全く新しい概念による細胞再生治療の確立を目指すものである。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、挑戦的萌芽研究(平成 26-27 年度)で開発したマイクロファイバー型肝オルガノイドを用いた移植実験をマウス肝不全モデルにて展開することにより、肝不全病態に対する新しい細胞再生療法の開発を目的とする。申請者のこれまでの肝組織工学研究において、高機能な肝組織作製には、生体肝臓の微細構造ユニットである肝細胞索に類似する細胞配列をなすことが重要課題であることが判明していることから、本研究で用いる肝オルガノイド作製においても、細胞配列や細胞外マトリックス構成から肝細胞索類似性を有する組織作製を基盤とする。それ故、作製組織においては、即時的な肝機能発現および肝不全病態での治療効果の発揮が大いに期待される。生体内に機能的な組織を組み上げるアプローチは、再生医療分野における次世代展開を担う重要なテーマである。本研究は、肝不全という肝臓移植が唯一の治療選択肢となっている重篤な病態に対して、肝組織作製を新基軸とした細胞再生医療開発を目指す戦略的研究である。

### 3. 研究の方法

本研究プロジェクトでは、分離肝細胞単独あるいは分離肝細胞と iPS 細胞由来 m などの非実質細胞を用いて、細胞配置が生体肝臓の微細構造ユニットである肝細胞索に類似するマイクロ肝オルガノイドを作製し、肝オルガノイドの移植によって肝不全に対する治療効果を発揮する肝組織をマウス体内に作製することを目的とする。簡便な移植手技によって、体内に治療用小肝組織を作製するという、これまでにない全く新しい肝不全治療選択肢の創出を目指す開発研究である。

#### (1) 肝細胞充填マイクロ肝オルガノイドの作製

マウス分離肝細胞単独、または、肝細胞と血管内皮細胞や iPS 細胞から分化誘導したマクロファージ(iPS-m)を用いて、肝臓微細構造ユニットである肝細胞索を模倣したマイクロ肝オルガノイドを作製する。これまでに開発してきた細胞をマトリゲルに懸濁させて至適濃度でマウス腎被膜下に注入移植する方法(Ohashi K, et al, *Nat Med*, 2000, *Nat Med* 2007, *Cell Transplant* 2012)や、マイクロフルイディクスを基盤としたマイクロ流路デバイスを用いて、直径が 60-300 $\mu$ m の間で任意の直径を有するマイクロファイバー内部に、肝細胞を中央に縦列充填配置した超細径肝オルガノイドを作製する方法(*Biomaterials* 33: 8304, 2012. *J Biosci Bioeng* 116: 761, 2013)を基盤として肝オルガノイドを作製する。また、肝細胞周囲に血管内皮細胞や iPS-m を配置した肝オルガノイドも作製する。これらの技術を応用し、マウス体内に異なった組織圧または直径を有する(60-300 $\mu$ m)肝オルガノイドを作製する。マウス内移植した肝オルガノイドの発現機能レベルの観点で、細胞注入密度、マイクロファイバー径や、ゲル硬度の至適化を行う。

#### (2) 生体内肝組織作製による肝不全治療効果の検討

上記で作製したマイクロ肝オルガノイドのマウス内移植にてなされる生体内肝組織作製が急性肝不全病態に与える治療効果を明らかとする。上記[1]にて作製したマイクロ肝オルガノイドを移植したマウスに急性肝不全を誘導し、生存率等を検討する(詳細を以下に記載)。得られた結果を随時フィードバックさせ、肝オルガノイド作製法をさらに改良する実験を平成 29/30 年度に計画する。

移植部位：皮下、肝表面、大網内、腹腔内

移植肝細胞数： $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  細胞/マウス ~ (ファイバー 0.5 ~ 2m 相当/マウス)

肝不全の誘導：大量肝切除(マウス肝臓の中葉と外側葉の摘出及び右門脈の結紮。このモデ

ルで、48 時間以内に全てのマウスが死亡する程度の急性肝不全が推測される。)

肝不全治療効果判定：生存率の評価

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝細胞充填マイクロ肝オルガノイドの作製

マイクロ肝オルガノイド作製技術法の至適化については、既報告 (Biomaterials 33, 8304, 2012, J Biosci Bioeng 116, 761, 2013) に従って、細胞注入密度、細胞注入速度の観点で至適化を行った。作製マイクロ肝オルガノイドを培養皿実験に用い、生存細胞を確認できたことから、移植にも耐え得るオルガノイドであることを確認した。また、iPS細胞からのマクロファージ細胞の分化誘導については、胚葉体形成を介して分化誘導を行った。その後、血液前駆細胞に分化誘導がすすんだことを血液前駆細胞マーカー (CD34, CD43) 陽性にて確認の後に、M-CSF添加料と添加タイミングの至適化を通じて、分化マクロファージへの誘導を行った。その結果、マクロファージとしての表面

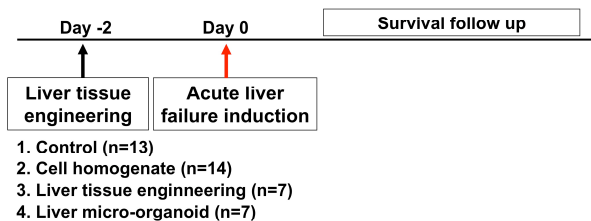
マーカー (CD14, HLA-DR) が検出されたことから iPS細胞からマクロファージへの分化誘導が可能であることを明らかとした。肝臓から分離した血管内皮細胞や分化マクロファージを非実質細胞用いてマイクロ肝オルガノイドを作製して検討した結果、血管内皮細胞を充填したオルガノイドが機能的に優位であることが判明したため、肝細胞と血管内皮細胞のペアリングにて移植実験を行った。

##### (2) 生体内肝組織作製による肝不全治療効果の検討

###### 移植部位検討

マイクロ肝オルガノイドを単純にマウス体内へ移植する実験を行い、オルガノイドが発揮する肝機能を肝臓から分泌するタンパクの血中濃度測定にて評価した。その結果、皮下部位は機能発現に適していないことが明らかとなった。また、肝表面および大網内部位は、空間的な問題から、移植組織を安定させることが困難であり、次の治療効果の評価する実験には適していないことが判明した。腹腔内への肝オルガノイド移植は、手技的にも安定した実験が可能で、かつ、肝機能発現も他群と比較して良好であった。これらの結果から、肝不全治療効果の評価実験は、腹腔内へのオルガノイド移植実験を中心に評価を行い、研究者がこれまでに開発してきた、腎被膜下への肝細胞移植による肝組織作製との対比を行うことにより、治療効果を判定した。

- > Hepatocyte: hA1AT<sup>+</sup> mouse hepatocytes
- > Tissue engineering : 1.2x10<sup>6</sup> hepatocytes mixed with Matrigel were injected into bilateral subrenal capsule space (for liver tissue engineering group). 2.4x10<sup>6</sup> hepatocytes and macrophage filled into the arginic acid-based micro-organoid were transplanted into the abdominal space (for liver micro-organoid group).
- > Induction of acute liver failure: 2/3 partial hepatectomy and ligation of right portal pedicles



マウス体内への肝マイクロオルガノイド作製による肝不全治療効果を検討する実験のプロトコールを示す

###### 移植肝細胞数

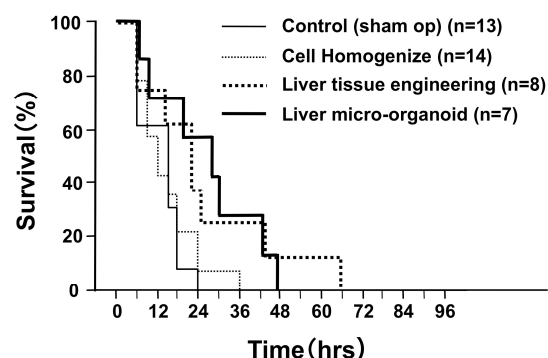
肝細胞および非実質細胞が 2.4x10<sup>6</sup> 個の細胞を充填した肝オルガノイドが機能的にも実験評価的にも適切であることが判明した。そのため、肝不全治療効果の評価実験は、2.4x10<sup>6</sup> 個の細胞によるオルガノイド移植実験を行った。

###### 肝不全の誘導

マウス肝臓の中葉と外側葉の摘出を行った後に右門脈を結紮して肝不全を誘導したところ、全てのマウスが 24 時間以内に死亡することを確認した。この結果を受けて、本手法により肝不全を誘導し、マイクロ肝オルガノイドの治療効果を検討する実験を行った。

###### 肝不全治療効果判定

肝細胞を用いないコントロールマウスでは全例が 24 時間以内に死亡した。



マウス体内への肝マイクロオルガノイド作製による肝不全治療効果。本研究において開発した肝細胞を用いた組織体を体内に作製するアプローチは、急性肝不全における治療延命効果を発揮し得るが明らかとなった。

用いる肝細胞のホモジェネートをマウスに注入した群においては 14 匹中 13 匹が 24 時間以内に死亡した。肝細胞のみを用いて腎被膜下に Matrigl とともに注入することで肝オルガノイドを作製する群 (図 Liver tissue engineering) およびマイクロ肝オルガノイドを腹腔内に移植する群 (図 Liver micro-organoid) において、24 時間での死亡率は約 50%であった。36 時間以上生存する肝不全マウスも散見され、これらの両手法は肝不全病態において治療効果を発揮することを確認した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 9 件)

Miki T, Vazquez L, Yauaria L, Lopez O, Garcia I, Ohashi K, Rodriguez N. Induced pluripotent stem cell derivation and *ex vivo* gene correction using a Mucopolysaccharidosis Type 1 disease mouse model. *Stem Cells International*, 査読有 2019 in press.

Matsumura M, Imura T, Inagaki A, Ogasawara H, Fukuoka K, Fathi I, Miyagi S, Ohashi K, Unno M, Kamei T, Satomi S, Goto M. A simple and useful predictive assay for evaluating the quality of isolated hepatocytes for hepatocyte transplantation. *Scientific Reports* 査読有 9: 6166, 2019.

Okamoto R, Takayama K, Akita N, Nagamoto Y, Hosokawa D, Iizuka S, Sakurai F, Suemizu H, Ohashi K, Mizuguchi H. Human iPS cell-based liver-like tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a new cell therapy for hemophilia B. *Cell Transplant*. 査読有 27: 299-309, 2018.

Utoh R, Komori J, Kuge H, Tatsumi K, Yamada M, Hirohashi S, Tsutsumi M, Amanuma T, Yoshioka A, Nakajima Y, Wake K, Okano T, Lagasse E, Ohashi K. Adult hepatocytes direct liver organogenesis through non-parenchymal cell recruitment in the kidney. *J Hepatol* 査読有 68: 744-753, 2018.

Fukuoka K, Inagaki A, Nakamura Y, Matsumura M, Yoshida S, Imura T, Igarashi Y, Miyagi S, Ohashi K, Enosawa S, Kamei T, Unno M, Ohuchi N, Satomi S, Goto M. The optimization of short-term hepatocyte preservation before transplantation. *Transplant Direct*. 査読有 2017 Jun 19;3(7):e176. doi: 10.1097/TXD.0000000000000687. eCollection 2017 Jul.

Iizuka S, Sakurai F, Tachibana M, Ohashi K, Mizuguchi H. Neonatal gene therapy for hemophilia B by a novel adenovirus vector showing reduced leaky expression of viral genes. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 査読有 6: 183-193, 2017.

辰巳公平、大橋一夫 細胞シート工学を用いた血友病新規治療 *Froniers in Haemophilia* 査読無 4: 19-24, 2017.

Nagamoto Y, Takayama K, Ohashi K, Okamoto R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Enhancement of survival rate by human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation in acute liver failure mice. *J Hepatol*, 査読有 64: 1068-1075, 2016.

土谷博之、大橋一夫 アルコール性高ホモシステイン血症に対する核内受容体 SHP 欠損による抑制作用 *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 査読有 51: 323-334, 2016.

### 〔学会発表〕(計 9 件)

大橋一夫. ギリシャ神話(ゼウスの教え)の再考から読み解く肝臓病治療の未来 住吉区医師会講演会 2019 大阪 (招待講演).

大橋一夫、鶴頭理恵、辰巳公平、岡野光夫、中島祥介、久下博之、Eric Lagasse、小森淳二. 臓器幹細胞としての肝細胞がおりなす肝臓創生 第 25 回肝細胞研究会 2018 東京(招待講演).

鶴頭理恵、岡野光夫、大橋一夫. 高チロシン血症 1 型モデルマウスの腎被膜下における肝非実質細胞の動員を伴う肝臓創生 第 17 回日本再生医療学会総会 2018 神戸.

松村宗幸、猪村武弘、小笠原弘之、福岡健吾、稲垣明子、宮城重人、大橋一夫、海野倫明、亀井尚、里見進、後藤昌史. 移植前肝細胞におけるviability評価法としてのADP/ATP assay の有用性に関する検証 第44回日本臓器保存学会 2017 大阪

松村宗幸、猪村武弘、福岡健吾、稲垣明子、宮城重人、大橋一夫、大内憲明、里見進、後藤昌史. 肝細胞移植における新規肝細胞移植前評価法の確立 第 17 回日本再生医療学会総会 2017 横浜

大橋一夫、鵜頭理恵、小森淳二、Eric Lagasse、中島祥介. 肝細胞がおりなす肝オルガノエンジニアリングと展望 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016 大阪

山下信吾、大橋一夫、鵜頭理恵、後藤祐一郎、山本雅一. 経肝静脈的肝細胞移植法による障害肝中心静脈域 (zone3) への領域選択的肝細胞移植の実験的検討 第116回日本外科学会定期学術集会 2016 大阪

Yoshida S, Ohashi K, Goto M, et al. The investigation on target matrix of collagenase G for achieving tailor-made islet isolation. 26th International Congress of the Transplantation Society 2016 Hong Kong

Fukuoka K, Ohashi K, Goto M, et al. Optimization of procedures for short-time hepatocyte preservation prior to transplantation. 26th International Congress of the Transplantation Society 2016 Hong Kong

〔図書〕(計 1 件)

大橋一夫 その他の組織・臓器の開発 バイオ・医療への 3D プリンティング技術の開発最前線 シーエムシー・リサーチ 2016、230

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：川端健二

ローマ字氏名：KENJI KAWABATA

所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所

部局名：幹細胞制御プロジェクト

職名：プロジェクトリーダー

研究者番号 (8 桁)：50356234

(2) 研究協力者

なし