

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K15942
研究課題名（和文）新規iPS由来肝細胞・肝オルガノイド系を用いた肝発癌モデルによる発癌機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of hepatocarcinogenesis mechanism using gene-edited iPSCs and iPSC-derived hepatic organoid system

研究代表者
三好 正人（Masato, Miyoshi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20844385
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）：研究代表者は、本研究において肝細胞性を高く保持したヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイド培養系を構築すること、及び遺伝子編集iPS細胞を用いた肝細胞発癌過程の解明を目的として、本研究を行った。iPS細胞から肝細胞を誘導する方法及び、その後の3D培養条件の最適化により、肝細胞性を高く保持した培養系を開発した。更には、肝細胞癌で同定したHBVインテグレーションを再現するiPS株の樹立に成功した。樹立したiPS細胞株を肝細胞系譜へ分化させると増殖能亢進を認め、肝発がんのメカニズムの一端を模倣した病態モデルの作成に成功し、そのメカニズム解明から治療標的の探索を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来では不可能であった肝細胞性を高く保持しながら維持培養が可能である新規ヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイド培養系を構築することができた。増殖する肝細胞という新規プラットフォームの有用性の高さから、学術集会で主題演題としての発表を行うなど高い評価を得た。また、HBVインテグレーションを再現したiPS細胞を解析することで肝細胞癌におけるHBVインテグレーションのメカニズムの解明を行った。同様に複数の学会で発表し、学会賞を受賞するなど高い評価を得た。

研究成果の概要（英文）：The two aims of this study are to establish a culture system of human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived hepatocyte organoids with high phenotype of hepatocyte and to investigate the process of hepatocarcinogenesis using gene-edited iPSCs.

Through optimization of the hepatocyte induction method from iPSCs and subsequent 3D culture conditions, we successfully developed a culture system that maintains proliferation and hepatic phenotype. Additionally, iPSC lines were generated that replicate the HBV integration identified in hepatocellular carcinomas in our in-house database. After differentiation into the hepatocyte lineage, these established iPSC-derived hepatic cells exhibited enhanced proliferative capacity. As a result, a pathological model was successfully created that partially mimics the mechanism of hepatocarcinogenesis. Our research team is currently identifying therapeutic targets based on the elucidation of the mechanism underlying this enhanced proliferation.

研究分野：肝再生、肝細胞癌

キーワード：iPS由来肝細胞 オルガノイド 肝細胞癌 HBVインテグレーション

1. 研究開始当初の背景

急性肝不全やウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を背景とした非代償性肝硬変などから至る致死性肝不全に対する現時点での根本的治療は肝移植のみである。依然としてドナー不足の早急な解決は困難である一方で肝細胞を用いた細胞医療も試みられているが、臨床応用までは至っていない。その一つの理由として、ヒト肝細胞の安定的供給が困難であることが挙げられる。ヒト初代肝細胞は、in vitro 系において形質を保持して培養することが困難であり、近年では複数の小分子化合物の組み合わせにより、肝細胞形質を保持させる報告や、肝前駆細胞を誘導し増殖させる報告が認められる。しかしながら、肝細胞の形質を保ちつつ、長期間の増殖培養を行うことは未だ不可能である。

そこで肝細胞の安定的供給を目指し、近年ではヒト iPS 細胞から分化誘導されたヒト iPS 由来肝細胞 (iPS-Heps) が注目されてきた。しかしながら iPS-Heps も、iPS 細胞より分化誘導される過程で、その増殖性は失われ、更には形質を保持した長期培養も困難であるなど、初代肝細胞と同様の表現型を呈する。そのため、多くの研究において、iPS 細胞や分化誘導の中途段階から樹立される前駆細胞を用いた戦略がとられている。申請者らの研究グループは、同様の戦略に基づき、ヒト iPS 細胞から肝細胞を誘導する途中の肝芽細胞段階より CD13 high/CD133 high 分画を FACS により純化し Feeder 細胞上で培養することで得られた iPS 由来肝前駆細胞 (iPS-HPCs) を用い、遺伝子編集技術:CRISPR/CAS9 を組み合わせることで、新規 B 型ウイルス (HBV) 感染系や、先天性肝線維症モデルによる病態解明を行ってきた。

申請者は、肝細胞形質を保持した培養系の確立が、肝細胞のソースとしてのみならず、ヒト肝疾患モデル研究において有用であると考え、申請者は 3D オルガノイド培養系に着目した。近年、マウス・ヒトでの肝細胞オルガノイド培養系の構築が初めて報告された、しかし iPS-Heps を肝細胞オルガノイド系に用いた報告は未だなく、申請者らはヒト iPS 由来肝細胞を 3D オルガノイド培養することで肝細胞形質を保持した培養系を可能とし、肝細胞の再生医療への応用や薬剤スクリーニングのみならず、種々の疾患モデルを用いた病態解明、新規治療戦略の開発につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究の目的を以下の 1) 誘導したヒト iPS 由来肝細胞を用いた新規肝細胞オルガノイド培養系を構築すること、2) 肝細胞癌における遺伝子変異を再現した遺伝子編集ヒト iPS 細胞から誘導した肝細胞オルガノイドを用いた解析により、新規肝細胞癌発癌メカニズムを明らかとすることである。更には、3) 既に申請者が独自に開発したヒト iPS 細胞由来星細胞を始めとした肝臓構成細胞を組み合わせた生体内肝環境を再現した肝オルガノイドを構築し、肝細胞-星細胞連関を始めとした細胞連関が発癌過程に与える影響を解析することで、肝細胞のみの解析では見つけられない治療候補分子の同定、新規治療への展開を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) ヒト iPS 由来肝細胞を用いた新規肝細胞オルガノイド培養系の構築

ヒト iPS 細胞から分化誘導を行う際には、4step protocol の他、用いる液性因子条件などが異なった誘導法が今までに報告されているため、より効率的な成熟 iPS 由来肝細胞を誘導できる方法の探索を行った。iPS-Heps を長期に肝細胞の形質を保った状態で培養しうるヒト iPS 肝細胞オルガノイド培養法の確立を進める。しかし、preliminary data においては、肝細胞性の維持が十分でないなどの問題点が存在することから、肝再生に関連する液性因子を添加するなど培養系の条件検討を進める。それにより肝細胞マーカーが高いレベルで維持しうる培養条件を探索するとともに、長期間の培養体維持能についても検証した。

2) 肝癌関連遺伝子変異 iPS 細胞を用いたオルガノイド系による新規肝発癌メカニズムの解明

申請者らのグループがもつ独自肝細胞癌データベースに基づき、実際の患者における遺伝子変異や HBV integration (HBV ゲノム組み込み) を忠実に再現した iPS 細胞株を作成する。申請者はヒト iPS 細胞の CRISPR/Cas9 System やレンチウイルスを用いた遺伝子編集/改変の技術的な基盤を保持しており、目的とした遺伝子変異 (具体的には、TERT、TP53、CTNNB1 といった遺伝子変異や TERT promoter や MLL4 領域への HBV ゲノム組み込み) を正確に再現した遺伝子編集を CRISPR/CAS9 を用いて遂行することが可能である。樹立した遺伝子編集ヒト iPS 細胞を、肝細胞系譜へ分化させ解析するとともに、本研究で構築した新規ヒト iPS 細胞由来肝細胞オルガノイド培養系へと導入する。増殖性や遺伝子発現の解析を行う。更にはマイクロアレイなどを用いた網羅的解析により、遺伝子変異に伴う発現変化、Signaling Pathway の変動を明らかとし、新規治療候補となる分子の同定を目指す。

3) ヒト iPS 由来肝構成細胞を組み合わせたヒト iPS 細胞由来肝オルガノイド系の構築とそれを用いた肝細胞-他細胞連関の発癌過程における解析

前述のヒト iPS 由来肝細胞オルガノイドを始めとした肝系譜細胞、申請者が独自に樹立した iPS-HSCs、その他 iPS 由来胆管細胞や類洞内皮、血管内皮細胞、クッパ細胞など、肝臓を構成する複数細胞種を利用した培養系の構築を行い、より生体内の肝微小環境を模した iPS 細胞由来肝オルガノイドの樹立を試みる。具体的には、既に独自の誘導法が確立できている iPS-HSCs と肝細胞オルガノイド系を組み合わせ、癌形質における星細胞-肝細胞間連関の解析を行い、2) と同様に網羅的解析を経て新規治療候補分子を

同定する。他細胞種連関についても同様の解析を行う。

4. 研究成果

1) ヒト iPS 由来肝細胞を用いた新規肝細胞オルガノイド培養系の構築

iPS 細胞由来肝細胞の誘導法について、従来の 4step protocol に加え、Cellaritis® Differentiation kit と及び Ang et al による誘導法の 3 方法を比較したところ、後者 2 つの方法が分化誘導の完遂率が高く、従来の 4step protocol を基盤として条件を改良した結果と考えられた。更に後者 2 方法による分化誘導後の iPS-Heps について比較を行った所、Cellaritis® Differentiation kit による誘導のほうが肝細胞マーカーの Alb(アルブミン)の発現が高値であることがわかり、以降のオルガノイド培養系構築においては主に Cellaritis® Differentiation Kit による iPS-Heps を用いた。

続いて、分化誘導した iPS-Heps を用いて 3 次元培養を行った。ヒト胎児肝細胞オルガノイド培養の既報に基づいた培地条件(Fetal Hepatocyte Organoid condition : FO)によって培養を行うと、iPS-Heps は増殖し、オルガノイドとしての培養が可能であった。一方で遺伝子発現を解析すると、培養を継続するにつれて Alb 発現が低下してしまい、3 次元培養開始時の iPS-Heps に比べて 1/100 まで低下することが分かり、当初の目的である肝細胞性を保持したオルガノイド培養系の構築には至っていないと考えた。

そこで、肝再生に関連する液性因子を始めとした条件をリストアップし、培養条件の比較検討を詳細に行ったところ、数か月単位で、特定の形態を示すオルガノイドを培養する条件を見出した。

同培養条件で培養されるオルガノイドはアルブミンの高発現状態を維持し、肝細胞性を高く保持したことから iPS-Hep Organoid condition : iHO と名付け、新規肝細胞オルガノイド培養系の構築に成功したと考えた。培養した iHO の構成細胞の種類や遺伝子発現プロファイルを RNA シークエンス、シングルセル RNA シークエンスで詳細に解析するとともに、同培養系を用いた疾患モデルの創出をすすめ、それらの結果を取りまとめ、学術集会で発表した(第 58 回日本肝臓学会、第 29 回肝細胞研究会で発表)。今後は、次年度以降の研究課題で研究を進展させてゆきたいと考えている。

2) 肝癌関連遺伝子変異 iPS 細胞を用いたオルガノイド系による新規肝発癌メカニズムの解明

当施設における肝細胞癌より見出した MLL4 領域への HBV インテグレーションを、iPS 細胞に遺伝子編集を加えることで忠実に再現を行った。また、MLL4 hetero/KO-iPS 細胞も作成し解析に用いた。未分化な iPS 細胞の状態においては、MLL4 KO 細胞において有意な細胞増殖低下を認めるのみで、HBV インテグレーションの影響は認めなかった。しかし、肝細胞系譜へ分化誘導し、増殖能を見るために iPS 由来肝前駆細胞をそれぞれの iPS 株から樹立すると、HBV インテグレーション株で有意な細胞増殖の亢進を認めた。細胞増殖亢進のメカニズムをマイクロアレイを始めとした網羅的解析などを行うことで解析を行った一連の結果を学術集会で発表し、2021 年、22 年の第 28 回ならびに第 29 回肝細胞研究会での優秀演題賞を 2 年連続で受賞するなど、有望な結果を得ており、構築したオルガノイド培養系での表現型を解析することを行っている。今後は、次年度以降の研究課題で研究を進展させてゆきたいと考えている。

3) ヒト iPS 由来肝構成細胞を組み合わせたヒト iPS 細胞由来肝オルガノイド系の構築とそれを用いた肝細胞-他細胞連関の発癌過程における解析

上記肝細胞オルガノイド培養系の培養条件を基盤として、iPS 由来肝細胞/肝細胞オルガノイドと iPS 由来肝星細胞の 3 次元共培養系の構築に取り掛かり、既に共培養する各細胞数や培地などの条件を定めたことから、今後 HBV インテグレーションのみならず、その他の肝細胞癌に関連する遺伝子の変異株を用いた細胞間相互作用の解析を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneko Shun, Asahina Yasuhiro, Nakagawa Mina, Murakawa Miyako, Miyazaki Yasunari, Asakage Takahiro, Fukuda Shohei, Namiki Takeshi, Kano Yoshihito, Nagata Masashi, Tsuchiya Jun, Miyoshi Masato, Kitahata Kawai Fukiko, Nitta Sayuri, Itsui Yasuhiro, Kakinuma Sei, Okamoto Ryuichi	4. 巻 53
2. 論文標題 Factors associated with liver injury and prognosis in advanced cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 450-459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr/13878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三好正人、柿沼 晴、朝比奈靖浩.
2. 発表標題 新規ヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイド系の構築と肝疾患研究
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋淳, 三好正人, 紙谷聡英, 志水太郎, 新田沙由梨, 北畑富貴子, 渡壁慶也, 持田知洋, 村川美也子, 中川美奈, 東正新, 朝比奈靖浩, 朝比奈靖浩, 岡本隆一, 柿沼晴.
2. 発表標題 ヒトiPS細胞培養系を利用したB型肝炎ウイルスゲノム組み込みによる発癌プロセスの解析.
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mina Nakagawa, Masato Miyoshi, Fukiko Kawai-Kitahata, Miyako Murakawa, Sayuri Nitta, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Yasuhiro Asahina
2. 発表標題 Factors associated with HCC development and patients' survival in patients with an SVR
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志水 太郎、三好 正人、柿沼 晴、土屋 淳、持田 知洋、渡壁 慶也、北畑 富貴子、新田 沙由梨、村川 美也子、井津井 康浩、東 正新、中川 美奈、朝比奈 靖浩、岡本 隆一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイドの樹立と疾患モデルへの応用.
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 沙由梨、柿沼 晴、持田 知洋、渡壁 慶也、志水 太郎、土屋 淳、三好 正人、北畑 富貴子、村川 美也子、井津井 康浩、中川 美奈、東 正新、朝比奈 靖浩
2. 発表標題 TERT領域へのHBVゲノム挿入が癌形質獲得に与える影響
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水太郎、三好正人、朝比奈靖浩、岡本隆一、柿沼 晴
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイド培養系の確立と形質解析
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋淳、三好正人、朝比奈靖浩、岡本隆一、柿沼晴
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を利用したMLL4領域へのB型肝炎ウイルスゲノム挿入による肝発癌メカニズムの解析
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿沼 晴、渡壁慶也、三好正人、中川美奈、朝比奈靖浩
2. 発表標題 NF 関連シグナルを介した肝星細胞の活性化調節機構の解析
3. 学会等名 第36回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三好正人, 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩
2. 発表標題 iPS細胞由来肝構成細胞を用いた肝線維化モデルと分子機構の解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三好正人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 iPS細胞培養技術がもたらす肝疾患診療の変革	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト肝細胞オルガノイド作成法について	発明者 朝比奈靖浩、柿沼 晴、三好正人、志水 太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、申請中につき未記入	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------