

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19476

研究課題名（和文）自己組織化に依存しない多細胞人工発癌オルガノイドモデルの開発と細胞連関解析

研究課題名（英文）Development of hepatocyte and multicellular artificial organoids for prospective analysis of oncogenic process

研究代表者

朝比奈 靖浩（Asahina, Yasuhiro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：00422692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プロスペクティブな病態解析を可能とする、生理的な肝細胞の形質を保持しつつ長期培養可能な肝細胞オルガノイドの三次元培養法を見出し、形態学的、および網羅的遺伝子発現解析等から、本オルガノイドの形質を明らかとした。さらに、ヒトiPS細胞において、肝癌の臨床検体で認められたゲノム情報を忠実に再現するヒトiPS細胞を樹立し、肝細胞系譜細胞に分化誘導した際の形質を解析し、癌化の初期段階の機序を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで病態形成に関わる遺伝子異常の候補をプロスペクティブに解析可能とするin vitroモデルはなかったが、本研究ではヒトiPS細胞を用いて、長期培養が可能かつ生理的肝細胞の形質を保持するという相反する条件を満たす培養条件の探索に成功した。また、ヒトiPS細胞にプロスペクティブに候補遺伝子異常を再現することで、癌化の初期段階を明らかとすることができた。従って、本研究の成功により発癌や病態形成機構のさらなる解明が進行するのみならず、本成果は臓器幹細胞が未だ同定されていない臓器の研究において応用可能な知見となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found a three-dimensional culture method of hepatocyte organoids that can be cultured for a long period of time while maintaining physiological hepatocyte characteristics, which enables prospective pathological analysis. Furthermore, we established human iPS cells that faithfully reproduce the genomic information found in clinical specimens of hepatocarcinoma, and analyzed their traits when induced to differentiate into hepatocyte lineage cells. As a result, the mechanism of the early stage of hepatocarcinogenesis was clarified.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ヒトiPS細胞 肝細胞オルガノイド 発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の肝癌患者数は5万人を超え、われわれは、これらの病態形成に標的細胞における体細胞変異の蓄積やヒトゲノムへのウイルス遺伝子挿入が関与することを示してきた。しかし、多くの癌腫同様、発癌をレトロスペクティブに捉えているこれら網羅的ゲノム解析からのみでは、遺伝子変異が如何なる機序で発癌や病態形成に関わるかの解明は困難である。

一方、われわれは、病態形成のリスクとして背景肝における肝線維化と脂肪化が重要であることを明らかとしており、肝発癌や肝病態形成及び治療反応性には、肝細胞における後天的遺伝子異常の蓄積と、炎症や線維化・脂肪化を担う各種細胞との細胞連関が関与すると考えられる。しかし、この解析を可能とする、長期培養可能なヒト生理的成熟肝細胞株は存在せず、さらに特定の標的細胞に遺伝子改変を加えかつ構成細胞の均質化と定量化が可能な多細胞培養体がないために十分な知見は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、長期培養可能なヒト成熟肝細胞株を樹立し、これに病態形成に関わる後天的遺伝子変異群を順次導入することにより、発癌過程をプロスペクティブに再現しうる人工的発癌モデルを構築する。さらに発展的には、これと臓器を構成する各種細胞とを用いて、既報とは全く異なる自己組織化に依存しない多細胞オルガノイドを開発し、構成細胞の均質化と定量化が可能な *in vitro* モデルの構築を進める。これら病態を忠実に再現する革新的病態解析オルガノイドにおいて、肝炎ウイルス感染や炎症・脂肪化刺激等により惹起される表現型の解析から、ゲノム要因や代謝要因等が関わる病態を形成する細胞連関の本質解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変ヒト iPS 細胞シリーズの樹立

人工的に発癌過程を再現するためには、長期培養可能な正常細胞が必要である。臓器幹細胞がその候補となるが、ヒト肝臓など幹細胞が未同定な臓器では不可能である。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞を用いる。CRISPR/Cas9 により申請者らが明らかとしてきた癌ゲノム変異やウイルス遺伝子を順次ノックインした遺伝子改変 iPS 細胞シリーズを樹立する。

(2) 長期継代可能な iPS 細胞由来肝細胞株の樹立

肝細胞の成熟化と長期培養とを可能とすることは、互いに trade-off の関係にあるとされ、これまで成功例はない。われわれは、CD13、CD133 陽性細胞の FACS 分離を繰り返すことで、半永久的に継代が可能なヒト iPS 細胞由来肝芽細胞の培養法を確立している。本研究ではヒト iPS 由来終末肝細胞の 3 次元培養条件の網羅的探索から、成熟化と長期培養との双方を可能とする培養法を同定し、最適化を進める。

(3) 自己組織化に依存しない多細胞肝臓オルガノイドの作成

上記で樹立した長期培養可能な iPS 誘導性肝細胞と、同じくヒト iPS 細胞から誘導した各構成細胞(胆管細胞、星細胞、内皮細胞、免疫細胞等)との 3 次元共培養系を構築し、肝組織を模倣し肝病態を再現する培養体の開発を進める。樹立したオルガノイドについて、single-cell 解析により構成細胞の質的・定量的解析を行い、最適化と均質化を進める。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞を肝細胞系譜細胞に誘導し、種々の培養条件の探索を行った結果、肝細胞の形質を保持しつつ長期培養可能な肝細胞オルガノイドの三次元培養法を見出した。得られた肝細胞オルガノイドについて形態学的、網羅的遺伝子発現解析、および一細胞解析等を用いて分析したところ、本オルガノイドの肝細胞としての形質を確認し、明らかとした。さらに、本オルガノイドの成立に寄与する分子機構の解析を進め、肝細胞系譜の分化と再生に関わる分子機構の候補を明らかとした。

また、肝癌切除例を対象とした deep sequence により臨床例における宿主-ウイルス遺伝子挿入の詳細を明らかとし、この遺伝子構造を CRISPR/Cas9 系を用いたゲノム編集により忠実に再現するヒト iPS 細胞を複数樹立した。これら癌化の初期段階と考えられる遺伝子異常を再現した遺伝子改変ヒト iPS 細胞について、肝細胞系譜細胞に分化誘導した際の形質を解析した。特に宿主へのウイルスゲノム挿入が関与することでトランスクリプトーム・バリエーションを生じ、宿主遺伝子のエピゲノム制御の攪乱を惹起することで、癌化の初期段階に関わることを明らかとした。

さらに発展的に、癌化の次のステップに関わる遺伝子異常の網羅的探索を進めるとともに、同じくヒト iPS 細胞から誘導した肝星細胞の分化・誘導法の最適化を行い、肝細胞三次元培養体と

の共培養系の構築を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishido Shun, Asahina Yasuhiro, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Utility of Comprehensive Genomic Profiling in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 719 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15030719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Naoki, Asahina Yasuhiro, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112165 ~ 112165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112165	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 -

1. 著者名 Keitoku Taisei, Asahina Yasuhiro, et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Effect of fatty liver and fibrosis on hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B who received nucleic acid analog therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 297 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.13805	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 -

1. 著者名 Kaneko Shun, Asahina Yasuhiro, et al.	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 -

1. 著者名 Nakagawa Mina, Asahina Yasuhiro, Kakinuma Sei, Okamoto Ryuichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Impact of eradication of hepatitis C virus on liver-related and -unrelated diseases: morbidity and mortality of chronic hepatitis C after SVR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01940-1	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 -

1. 著者名 Matsumoto Hiroaki, Asahina Yasuhiro, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical Usefulness of Monitoring Muscle Volume during Atezolizumab Plus Bevacizumab Therapy in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3551 ~ 3551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14143551	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 -

1. 著者名 Tahata Yuki, Asahina Yasuhiro, et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 Liver-related events after direct-acting antiviral therapy in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01845-5	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 -

1. 著者名 Sekiguchi Shuhei, Tsuchiya Kaoru, Yasui Yutaka, Inada Kento, Kirino Sakura, Yamashita Koji, Hayakawa Yuka, Osawa Leona, Higuchi Mayu, Takaura Kenta, Maeyashiki Chiaki, Kaneko Shun, Tamaki Nobuharu, Nakanishi Hiroyuki, Itakura Jun, Takahashi Yuka, Asahina Yasuhiro, Okamoto Ryuichi, Kurosaki Masayuki, Izumi Namiki	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical usefulness of geriatric assessment in elderly patients with unresectable hepatocellular carcinoma receiving sorafenib or lenvatinib therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cnr2.1613	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 -

1. 著者名 Tahata Yuki, Hikita Hayato, Yasuhiro Asahina, et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 Liver-related events after direct-acting antiviral therapy in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01845-5	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 -

1. 著者名 Hayakawa Yuka, Tsuchiya Kaoru, Yasuhiro Asahina, et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Early experience of atezolizumab plus bevacizumab therapy in Japanese patients with unresectable hepatocellular carcinoma in real-world practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 392 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-021-01185-4	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 -

1. 著者名 Sekiguchi Shuhei, Tsuchiya Kaoru, Yasuhiro Asahina, et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Clinical usefulness of geriatric assessment in elderly patients with unresectable hepatocellular carcinoma receiving sorafenib or lenvatinib therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cnr2.1613	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 -

1. 著者名 Sapena Victor, Reig Maria, Yasuhiro Asahina, et al.	4. 巻 71
2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma recurrence after direct-acting antiviral therapy: an individual patient data meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 593 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-323663	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 該当する

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Asahina Y
2. 発表標題 HCC development and surveillance after SVR.
3. 学会等名 JDDW 2022 JSH-AASLD joint symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asahina Y
2. 発表標題 Hepatocellular carcinoma after hepatitis C viral eradication.
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asahina Y
2. 発表標題 Biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Gane E, Asahina Y, et al.
2. 発表標題 Efficacy and safety of siRNA JNJ-73763989, capsid assembly modulator JNJ-56136379, nucleos(t)ide analog (NA), and pegylated interferon alpha-2a (PegIFN- 2a) for treatment of chronic hepatitis B (CHB)
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡壁 慶也, 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩
2. 発表標題 TNF 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44回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 淳, 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩
2. 発表標題 ヒトiPS由来細胞を利用したB型肝炎ウイルスゲノム挿入による発癌プロセスの解析
3. 学会等名 第108回日消化器病学会総会
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回日消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 淳, 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスのMLL4領域へのintegrationによる発癌メカニズムの解析
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 沙由梨(東京医科歯科大学 検査部), 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いたHBV integrationモデルの樹立と悪性形質獲得に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水 太郎, 三好 正人, 朝比奈 靖浩
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疾患モデルへの展開
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 淳, 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスのMLL4 領域へのintegration による肝発癌のメカニズム
3. 学会等名 B型肝炎ウイルスのMLL4 領域へのintegration による肝発癌のメカニズム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水太郎、柿沼晴、朝比奈靖浩
2. 発表標題 網羅的遺伝子解析によるヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイドの形質解析
3. 学会等名 第108回日消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakagawa M, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Asahina Y.
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 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tahata, Y, Hikita, H, Asahina Y, et al.
2. 発表標題 The real-world impact of direct-acting antiviral treatment on liver-related event in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝比奈靖浩 .
2. 発表標題 抗ウイルス療法の進歩と新たなる課題 .
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加納嘉人、北畑富貴子、村川美也子、柿沼晴、東正新、中川美奈、井津井康浩、新田沙由梨、三好正人、田邊稔、三宅智、池田貞勝、岡本隆一、朝比奈靖浩 .
2. 発表標題 肝内胆管癌の病態と網羅的がんゲノム解析の有用性 .
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋淳, 柿沼晴, 朝比奈靖浩.
2. 発表標題 トiPS細胞を利用したHBV関連肝細胞におけるMLL4の機能的意義の検討.
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村川美也子, 中川美奈, 朝比奈靖浩.
2. 発表標題 核酸アナログによるウイルス制御下のB型慢性肝疾患における肝発癌および病態進展に関わる臨床因子の検討.
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志水太郎, 柿沼晴, 朝比奈靖浩.
2. 発表標題 疾患モデルへの応用を目指したヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイドの樹立.
3. 学会等名 2021年6月17日.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好正人, 柿沼晴, 朝比奈靖浩.
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝細胞系譜細胞を利用した肝細胞癌発生におけるMLL4の機能解析.
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田沙由梨、柿沼晴、朝比奈靖浩.
2. 発表標題 HBV genome integration肝細胞癌における遺伝子発現の特徴と発癌機序の検討.
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
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, 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 張春, 米山鷹介, 三好正人, 北畑富貴子, 新田沙由梨, 赤星径一, 田邊稔, 柿沼晴, 朝比奈靖浩, 武部貴則
2. 発表標題 ヒト肝臓プライマリオルガノイドからのiPS細胞樹立と肝疾患研究への応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 朝比奈靖浩	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 331
3. 書名 別冊系統看護学講座	

1. 著者名 朝比奈靖浩	4. 発行年 2023年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 392
3. 書名 最新ガイドラインに基づく 消化器疾患診療指針 2021-23'	

1. 著者名 朝比奈靖浩.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 宇宙堂八木書店	5. 総ページ数 472
3. 書名 臨床検査のガイドラインJSLM2021.	

1. 著者名 朝比奈靖浩.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 331
3. 書名 臨床薬理学	

1. 著者名 朝比奈靖浩.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 365
3. 書名 最新ガイドラインに基づく 消化器疾患診療指針2021-22'	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肝細胞オルガノイド及びその製造方法	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、特願2023- 89697	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
研究分担者	柿沼 晴 (Kakinuma Sei) (30372444)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	岡本 隆一 (Okamoto Ryuichi) (50451935)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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
---------	---------