

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20717

研究課題名(和文)創薬に資する高機能なヒト肝臓オルガノイド培養技術の開発

研究課題名(英文)Development of functional hepatocytes from human liver organoids for pharmaceutical research

研究代表者

植山 由希子(鳥羽由希子)(Ueyama, Yukiko)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：10904930

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文):創薬研究や再生医療に資する新たな肝細胞源として、肝臓オルガノイドが期待されている。肝臓オルガノイドは長期的な増殖を示す一方で、その肝機能は著しく低い。そこで、肝臓オルガノイドの機能向上が可能な培養条件の探索を行った。本研究では、汎用性を考慮し二次元培養での高機能化を試みた。液性因子を添加した培地を段階的に作用させ、二次元培養において高機能な肝細胞(Org-HEPs)の作製に成功した。Org-HEPsにおけるalbumin遺伝子の発現量は、肝臓オルガノイドの約875倍まで増加した。また、薬物代謝酵素活性はヒト肝細胞と同等であった。以上より、創薬応用への応用が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
一般的なオルガノイド培養状態では、種々の被検化合物が細胞外マトリクスに捕捉されることが懸念され、創薬研究への利用には不向きであった。そこで、汎用性の高い肝細胞を肝臓オルガノイドから得るために、二次元培養にて分化・成熟化を試みた。その結果、二次元培養にてヒト肝細胞と同等の高い機能を持った肝細胞の作製に成功した。本研究で開発した肝細胞は、創薬研究への応用が実現可能であり、医薬品開発の加速化に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文): Human liver organoids are expected to be the new hepatocyte source used for preclinical in vitro studies of drug metabolism and disposition. Although they showed long-term proliferation, their hepatic functions were low. Therefore, it is necessary to enhance hepatic functions of human liver organoids. Here, we propose a novel method for 2D-cultured hepatic differentiation from human liver organoids. The gene expression level of albumin in human liver organoids-derived hepatocytes (Org-HEPs) increased to about 875-fold of human liver organoids. Metabolic activities of major Cytochrome P450 (CYP) enzymes were examined. The metabolic activities of CYP1A2, CYP2C8, CYP2E1 and CYP3A4 were at a level comparable to that of PHHs-48hr. These results suggested that human liver organoids could be differentiated into highly functional hepatocytes in 2D culture. In this study, we succeeded in developing the differentiation method from human liver organoids into functional hepatocytes.

研究分野：分子生物学

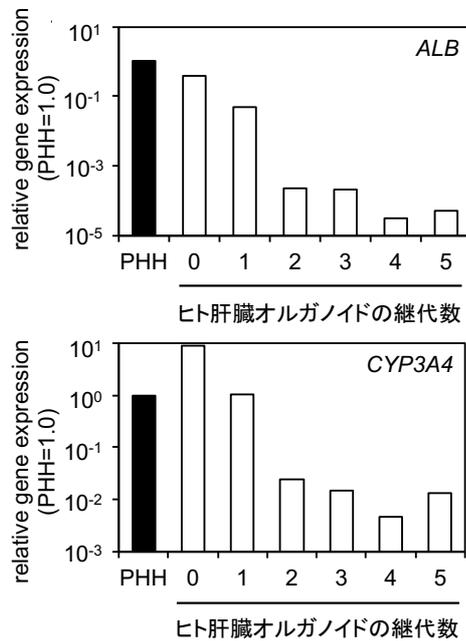
キーワード：肝細胞 オルガノイド 薬物代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

多くの薬物は肝臓において代謝されるため、ヒト肝細胞を用いた安全性評価は創薬研究に必要不可欠である。しかし、汎用されているヒト凍結肝細胞は増殖能を有さず、同一ロットの供給に制限があり長期培養により肝機能が大幅に低下するため、大規模かつ高精度な安全性評価を実施することは困難である。高い増殖能を有した高機能なヒト肝細胞が開発できれば、新薬開発の効率化に資する有用なツールになると考えられる。

近年、オルガノイド培養技術が注目されている。オルガノイドとは、臓器に類似した特徴と増殖能を有した三次元培養細胞を意味する。特に、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体5 (lucine-rich orphan G-protein-coupled receptor 5; LGR5) を発現する体性幹細胞から作製された三次元培養体である。ヒト肝細胞は特定の増殖因子存在下で培養することにより、体性幹細胞様の細胞が出現し肝臓オルガノイドとして増殖能を獲得する。ヒト肝臓オルガノイドは、肝生検から容易に採取でき、遺伝的に安定なまま何年も拡大培養が可能であるため、組織工学や細胞治療のための自家細胞源として新しい可能性を秘めている細胞である¹⁻⁴。しかし、ヒト肝臓オルガノイドは肝機能が十分に高くない(図1)ことが課題であり、創薬への応用可能性は全く検討されていない。このような問題を克服し、創薬研究に利用可能なオルガノイド由来肝細胞を開発することが、本研究の問いである。

図1. ヒト肝臓オルガノイド培養に伴う遺伝子発現変動

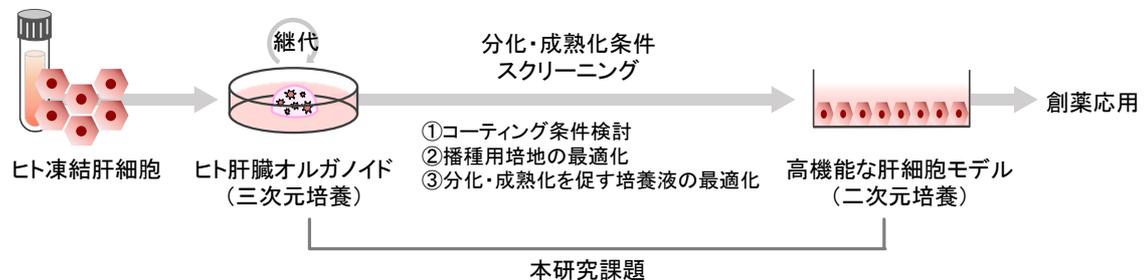


PHH, ヒト凍結肝細胞
ALB, albumin; CYP3A4, Cytochrome P450 3A4

2. 研究の目的

新たなヒト肝細胞モデルとなるような、高機能なヒト肝臓オルガノイドの培養技術の確立を目的とする(図2)。本研究の最大の特徴は、二次元培養に切り替える点である。ヒト肝臓オルガノイドは三次元培養体であり、マトリゲル(基底膜マトリックス製品)に包埋した状態で培養される。三次元培養状態では、平面培養に用いられてきた実験手法により細胞を評価することが困難である。また、種々の被験化合物がマトリゲルに捕捉されることが懸念され、利用可能な実験系が限定されていた。そこで、ヒト肝臓オルガノイドをマトリゲルから取り出し、二次元培養にて高機能な肝細胞へと分化・成熟化させる戦略をとることにより、汎用性の高い肝細胞の創成が実現すると考えられる。

図2. 本研究内容の概略



3. 研究の方法

これまで報告されたヒト肝臓オルガノイド樹立例は、生検組織から単離した肝細胞を用いていた。本研究では、倫理的に障壁の少ない市販のヒト凍結肝細胞を資材としたヒト肝臓オルガノイドを使用した。既報¹の通りの培地組成により、ヒト肝臓オルガノイドを培養した。肝細胞への分化・成熟化を促す手法を効率的に確立するため、以下の3つの段階を設定した。①播種時のコーティング条件、②播種用培地の組成、③細胞接着後、分化・成熟化を促す培養液の組成、について最適化を行う(図2)。肝機能向上の目的を達成するためには③の検討で十分と思われるが、①や②の検討にて分化・成熟化への土台を作ることによって、より高効率に高機能な

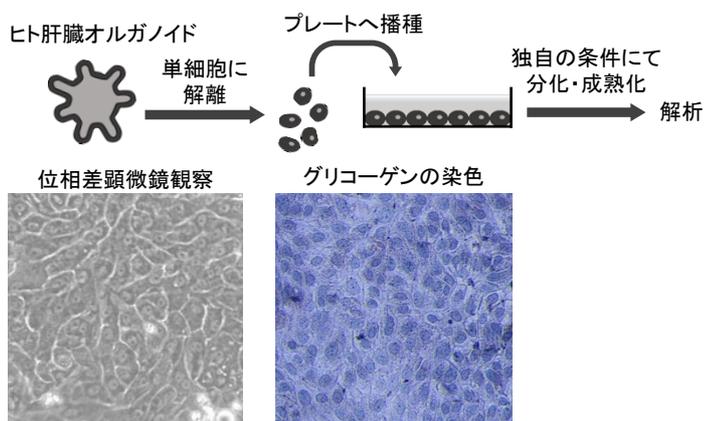
肝細胞への分化・成熟化が可能となると考えた。様々な条件で培養した細胞について、肝細胞マーカー遺伝子の発現量解析や主要な薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) 3A4 活性測定などを行い、最適な条件の決定を試みた。

4. 研究成果

2021 年度 (2 年計画の 1 年目) では、播種時のコーティング条件の検討、および播種用培地の組成の検討、分化・成熟化を促す低分子化合物のスクリーニングを実施した。また、計画時には想定していなかったが、細胞密度が肝細胞の分化を制御している可能性も考えられたため播種密度の検討も実施した。多方面から、段階的に 100 条件以上の比較検討を行なった。その結果、肝臓オルガノイドから大幅に肝機能が回復した肝細胞の作製に成功した。2022 年度 (2 年計画の 2 年目) では、作製した細胞の詳細な機能解析を行った。

まず、独自に開発した手法による成熟化の効率を評価するために、肝細胞マーカー (Albumin (ALB) および Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α)) の陽性細胞率を測定した。その結果、ヒト肝臓オルガノイドでは約 5% の ALB 陽性および約 40% の HNF4 α 陽性を示したが、分化後の細胞ではいずれの肝細胞マーカーも 90% 以上の高い値を示した。したがって、本研究で開発した分化法では、高い成熟度の細胞を均質に得られることが示唆された。また、位相差顕微鏡を用いた観察の結果、作製した細胞

図3. 分化後の細胞の形態学・機能解析



は、肝細胞特有の敷石状の構造を有していた (図 3 左)。細胞内のグリコーゲンの染色を試みた結果、作製した細胞は肝細胞の機能の一つであるグリコーゲンの貯蔵能を有していることが示された (図 3 右)。遺伝子発現解析の結果、薬物動態試験に関わる遺伝子群 (薬物代謝酵素である CYP 分子種や、抱合酵素である UDP glucuronosyltransferase (UGT) 分子種) の発現が増加した。さらに、医薬品の代謝に関わる主要な薬物代謝酵素・抱合酵素の活性を LC-MS/MS により測定した。その結果、CYP3A4 や UGT1A1 などの酵素活性は、ヒト凍結肝細胞に匹敵する高い値を示した。医薬品開発過程では、候補化合物の長期投与に起因する肝毒性を評価する必要があるため、高い機能を有した肝細胞を長期間維持する必要がある。そこで、最後に、本研究で開発した細胞において、長期的に肝機能が維持可能か評価した。その結果、CYP3A4 の活性は分化開始から 30 日目の細胞においても維持されていた。肝細胞マーカー遺伝子の一部の発現も、分化開始から 30 日目の細胞において高く発現していた。これらの結果から、申請時にはヒト肝細胞に匹敵する高い機能を最低 7 日間は維持可能な培養技術の開発を目標としており、これを達成できたと考える。

以上より、本研究で開発した培養技術は、肝臓オルガノイドの創薬応用を可能にする新たな技術であると考えられる。

参考文献

1. Huch, M. *et al.* Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell* **160**, 299–312 (2015).
2. Broutier, L. *et al.* Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat. Protoc.* **11**, 1724–1743 (2016).
3. Hu, H. *et al.* Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell* **175**, 1591-1606.e19 (2018).
4. Peng, W. C. *et al.* Inflammatory Cytokine TNF α Promotes the Long-Term Expansion of Primary Hepatocytes in 3D Culture. *Cell* **175**, 1607-1619.e15 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 植山(鳥羽)由希子、仝嫫然、今村千春、村井一裕、下田彬允、疋田隼人、渡士幸一、江口英利、竹原徹郎、水口裕之 |
| 2. 発表標題 肝臓オルガノイドからの高機能な肝細胞の作製法開発とその応用 |
| 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 Yukiko Ueyama-Toba, Yanran Tong, Hiroyuki Mizuguchi |
| 2. 発表標題 Generation of functional hepatocytes from human liver organoids |
| 3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|