

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08952

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞肝芽移植のB型肝炎治療への適応拡大に向けた基礎的検討

研究課題名(英文) Generation of human iPSC-derived liver buds resistant to hepatitis B virus infection

研究代表者

上野 康晴 (Ueno, Yasuharu)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：60375235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、B型肝炎ウイルス(HBV)に感染耐性を示すヒト肝臓組織の創出に向け、HBV感染受容体候補因子をノックアウトしたヒトiPS細胞を樹立し、肝細胞および肝臓オルガノイドにおいてHBV感染耐性評価を実施した。NTCPを欠損したヒトiPS細胞は肝細胞への分化能を有し、NTCPを欠損した肝細胞はHBVに対して感染耐性を示した。さらに、NTCPを欠損した肝細胞から、肝臓オルガノイドの作製が可能であり、NTCP欠損型ヒト肝臓オルガノイドがHBVに対して感染耐性を示すことを明らかにした。以上より、ヒトiPS細胞を用いてHBVに感染耐性を示す肝臓組織を創出するための基盤技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVはヒト肝細胞に選択的に感染し、核内で安定的な微小環状ゲノム(cccDNA)に変換される他、一部は宿主細胞のゲノム内に組み込まれる。これまでにHBV感染細胞からcccDNAを排除する手法等が検討されてきたが、未だ有効な手法は確立されていない。本研究では、新規アプローチによるHBVの新規治療法開発に向け、肝臓の再生医療への応用が期待されているヒトiPS細胞由来肝臓オルガノイドにHBV感染耐性を付与するための手法の検討を実施した。ヒトiPS細胞を用いてHBVに感染耐性を示す肝臓組織を創出するための基盤技術が確立されたことにより、新たなB型肝炎治療法の研究開発の加速が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to create human liver tissues resistant to hepatitis B virus (HBV) infection, we investigated the generation of hepatocytes and liver organoids lacking the HBV infection receptor by genome editing of human iPS cells. In human iPS cells, NTCP, a candidate factor for HBV infection receptor, was knocked out, and hepatocytes and liver organoids were induced to evaluate resistance to HBV infection. human iPS cells lacking NTCP had the ability to differentiate into hepatocytes, and hepatocytes lacking NTCP showed resistance to infection with HBV. NTCP-deficient hepatocytes were resistant to HBV infection. Furthermore, we demonstrated that liver organoids can be generated from NTCP-deficient human iPS cells and that NTCP-deficient human liver organoids are resistant to infection against HBV. In conclusion, we have established a basic technology for generating liver tissue resistant to HBV infection using human iPS cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：B型肝炎ウイルス ヒトiPS細胞 ゲノム編集 肝臓オルガノイド HBV感染

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染者は世界中で20億人、HBV関連疾患の死者数は年間50-70万人と推定され、有効な治療法の確立が世界的に急務となっている。HBVはヒト肝細胞に選択的に感染し、肝細胞の核内で安定的な微小環状ゲノム (covalently-closed circular DNA: cccDNA)に変換される他、一部は宿主細胞のゲノム内に組み込まれる。これまでに、HBV感染細胞からcccDNAを排除するための方法、感染細胞のゲノム内に挿入されたHBVゲノムを排除する方法は確立されておらず、化学療法・免疫抑制時におけるHBVの再活性化が問題となっている。HBVの根治療法を確立するためには、従来の治療概念を大きく超える新たなアプローチの開発が必要となっている。

一方で申請者らは、世界に先駆けてヒトiPS細胞から肝臓オルガノイドを人為的に再構成する手法を開発している(Nature 2013, Nature Protocols 2014, Cell reports 2017)。また、HBVがヒトiPSC肝臓オルガノイドに感染することを確認し、HBVの感染評価系を構築している(EBioMed. 2018)。

## 2. 研究の目的

本研究は、HBVの感染・維持に関与が示唆される分子群を欠損したヒトiPS細胞を樹立し、このヒトiPS細胞を用いてHBV感染耐性を示すiPS細胞由来肝臓オルガノイドの創出技術を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・ HBV 感染受容体を欠損したヒト iPS 細胞の樹立

本研究では、肝細胞で発現し、HBVのエントリーに関与が示唆される胆汁酸輸送トランスポーター(NTCP)に着目し、NTCPを欠損するヒトiPS細胞の樹立を試みた。ヒトiPS細胞のゲノム編集は、iCRISPR/Cas9システムを用いて実施し、サンガーシーケンスによりNTCPの第一エクソンにSTOPコドンが挿入されたクローンを選定し、NTCP欠損ヒトiPS細胞を樹立した。

### ・ NTCP 欠損ヒト iPS 細胞から肝内胚葉細胞への分化誘導、肝臓オルガノイドの作製

ヒトiPS細胞から肝内胚葉細胞および肝臓オルガノイドへの分化誘導は、先行報告に基づき実施した(Nature 499:481-484:2013, Nature Protocols 9:396-409:2014, Cell reports 20:2661-2670:2017, Sci Rep. 10(1):17937:2020)。

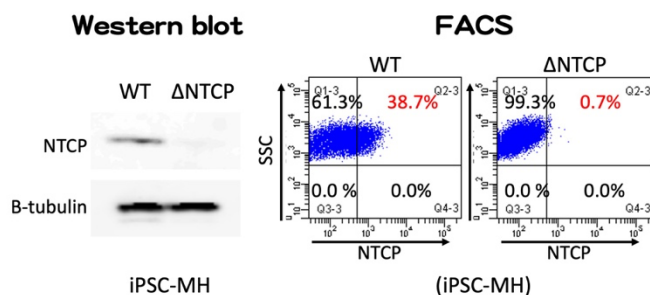
### ・ HBV 感染評価

ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞あるいは肝臓オルガノイドの培養液中に、二次感染能欠損型HBVを添加し、PCR法等によりHBVの感染量を測定した(EBioMed. 35:114-123, 2018)。

## 4. 研究成果

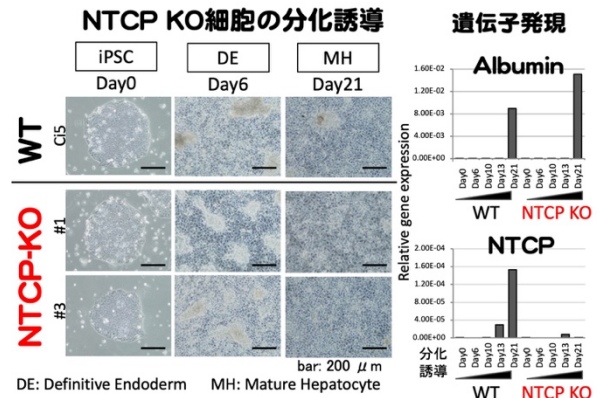
### ・ HBV 感染受容体を欠損したヒト iPS 細胞の樹立

ヒトNTCPの第一エクソン内のPAM配列に対するgRNAを用いて、Non-homologous end joining (NHEJ)による組み替えを誘導し、STOPコドンが両アリルに挿入されたヒトiPS細胞株を取得した。NTCP欠損ヒトiPS細胞( $\Delta$ NTCP-ヒトiPS細胞)は野生型ヒトiPS細胞と同様のコロニー形態を示し、肝細胞への分化誘能を有していた。 $\Delta$ NTCP-ヒトiPS細胞から肝細胞を分化誘導し、Western Blotおよびフローサイトメトリーにより、NTCPのタンパク質発現を検討した。その結果、 $\Delta$ NTCP-ヒトiPS細胞肝細胞では、NTCPがタンパク質レベルで欠損していることが確認された(右図)。以上より、NTCPを欠損するヒトiPS細胞を樹立した。



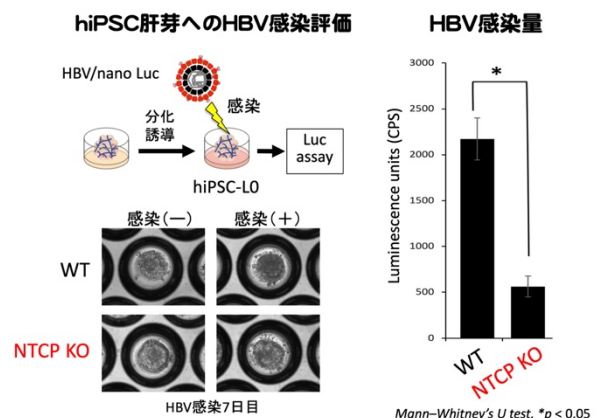
### ・ $\Delta$ NTCP-ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導および HBV 感染評価

ΔNTCP-ヒト iPS 細胞の肝細胞(MH)への分化誘導能を検討した。独自に確立した分化誘導系を用いてヒト iPS 細胞から肝細胞を分化誘導し、ΔNTCP-ヒト iPS 細胞由来肝細胞の特性を評価した。ΔNTCP-ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、野生型ヒト iPS 細胞に由来する肝細胞と同様にアルブミン等の肝細胞マーカーを発現しており、肝細胞に特徴的な形態を示した(右図)。ΔNTCP-ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞が HBV に対して感染耐性を示すか否かを検討したところ、野生型ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞と比べて HBV 感染が有意に抑制されていた。以上より、NTCP を欠損したヒト iPS 細胞から肝細胞が分化誘導できること、さらに、NTCP を欠損した肝細胞は HBV に対して感染耐性を示すことが明らかとなった。



#### ・ ΔNTCP-ヒト iPS 細胞を用いた肝臓オルガノイド再構成および HBV 感染評価

これまでの複数の報告より肝細胞移植の組織置換効率は低く、ホスト肝臓内で HBV 感染耐性を示す肝臓組織を再構成するためには、オルガノイド移植等の新たな移植手法の開発が重要と考えられた。そこで、ΔNTCP-ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞等を用いて肝臓オルガノイドを作製し、肝臓オルガノイドの分化状態や HBV 感染耐性についての検討を進めた。独自に確立したヒト iPS 細胞を用いた肝臓オルガノイドの創出技術を活用し、ΔNTCP-ヒト iPS 細胞から肝内胚葉細胞を分化誘導し、野生型ヒト iPS 細胞に由来する血管内皮細胞・間葉系細胞と共培養を行った。その結果、NTCP を欠損する肝細胞を有したヒト iPS 肝臓オルガノイドが再構成できることが確認された(右図)。NTCP 欠損型ヒト iPS 肝臓オルガノイドにおいて、肝細胞マーカーの発現を評価したところ、野生型ヒト iPS 由来肝臓オルガノイドと同程度の発現が検出された。NTCP 欠損型ヒト iPS 肝臓オルガノイドの HBV に対する感染耐性を評価したところ、ΔNTCP-ヒト iPS 肝臓オルガノイドは野生型ヒト iPS 肝臓オルガノイドに比べて有意に HBV 感染が抑制されることが明らかとなった(右上図)。以上より、ヒト iPS 細胞を用いて HBV に感染耐性を示す肝臓オルガノイドを作製する手法を確立した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Koike Naoto, Tadokoro Tomomi, Ueno Yasuharu, Okamoto Satoshi, Kobayashi Tatsuya, Murata Soichiro, Taniguchi Hideki	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of the nervous system in mouse liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4254/wjh.v14.i2.386	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 Sekine K, Tsuzuki S, Yasui R, Kobayashi T, Ikeda K, Hamada Y, Kanai E, Camp JG, Treutlein B, Ueno Y, Okamoto S, Taniguchi H.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Robust detection of undifferentiated iPSC among differentiated cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66845-6.	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 該当する

1. 著者名 Takada K, Aizawa Y, Sano D, Okuda R, Sekine K, Ueno Y, Yamanaka S, Aoyama J, Sato K, Kuwahara T, Hatano T, Takahashi H, Arai Y, Nishimura G, Taniguchi H, Oridate N.	4. 巻 148
2. 論文標題 Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 193 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33315	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 下瀬川 徹、渡辺 守（上野康晴、谷口英樹）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 736
3. 書名 専門医のための消化器病学 第3版（ヒト癌オルガノイド再構成技術を活用した薬剤感受性評価）	

〔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
研究 分 担 者	谷口 英樹  (Taniguchi Hideki)  (70292555)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	

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