

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K19490
研究課題名（和文）胆管オルガノイドと流体デバイスを用いたハイスループット創薬スクリーニング系の構築

研究課題名（英文）Construction of high-throughput drug discovery screening system using bile duct organoids and fluid devices

研究代表者
紙谷 聡英（KAMIYA, Akihide）
東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30321904
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自己凝集能を用いたヒトiPS細胞由来肝組織の形成法の確立、ゲノム編集技術を用いて多発肝のう胞症を模倣する疾患ヒトiPS細胞由来肝組織系の構築を行った。肝前駆細胞の成熟化に関する転写調節因子の探索を進め、KLF15など肝前駆細胞の成熟肝機能を誘導する転写調節因子を同定した。また流体デバイスを用いた凝集培養系の構築の検討を行った。これらを元に、肝のう胞を制御する遺伝子変異と病態との関係を解析できる培養系の確立を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
多発肝のう胞は難治性の希少疾患であり、根治療法としては肝移植があげられる。しかし、ドナー不足などの問題点も多い。またヒトとマウスの変異遺伝子の機能の種差の違いから、実験動物を用いた病態モデルの構築も進んでいない。本研究で示したヒト多能性幹細胞とゲノム編集技術を用いたin vitro肝のう胞病態解析モデルは、今後の新規原因遺伝子の探索を含めて病気治療の新たな開発に向けた貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a method to culture human iPS cell-derived liver tissue using self-aggregation ability, and the genome editing method to construct a human iPS cell-derived liver tissue system that mimics polycystic liver diseases. In addition to searching for transcriptional regulatory factors related to the maturation of liver progenitor cells, we constructed an aggregation culture system using a fluidic device. We found that Klf15 and other transcription factors were important for in vitro maturation of hepatic progenitor cells. Based on these findings, we are working to establish a culture system to analyze the correlation between genetic mutations that control hepatic cysts and pathological conditions.

研究分野：肝臓病学

キーワード：ヒト多能性幹細胞 多発肝のう胞 流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

本研究では、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) と Polydimethylsiloxane (PDMS) 流体デバイスを用いて、肝疾患のハイスループット評価システムを作製する (図1)。ヒト iPS 細胞は体内のあらゆる臓器に分化可能で、難治性希少疾患などの治療法が確立されていない疾患の創薬・病態解析の有用なツールであり、その基盤技術の確立を本研究の目的とする。

肝臓ではウイルス感染やメタボリックシンドロームによる過剰な脂肪蓄積、アルコールの過剰摂取などにより慢性的な肝細胞死が誘導され炎症状態となり、肝線維化・肝硬変・肝癌等の原因となる。このような重篤な肝疾患に対しては肝臓移植が根治療法となるが、ドナー不足などの問題点が多い。また、肝細胞以外にも胆管細胞等の障害も肝疾患につながる。多発肝のう胞症は肝臓内に胆管細胞に由来するのう胞が多発する希少疾患であり、のう胞の巨大化による周囲の臓器の圧迫に伴う呼吸困難や運動制限とともに肝不全などを併発し、治療介入を必要とする疾患である。肝のう胞には、腎のう胞を伴う常染色体優性多発性嚢胞腎と、腎のう胞を伴わない常染色体優性多発肝のう胞症があり、後者の家系解析から、Protein Kinase C substrate 80K-H (PRKCSH)、小胞体膜たんぱく質 SEC63 などが病因遺伝子として報告されている (Drenth et al., 2003, Davila et al., 2004)。その原因として、肝内胆管細胞の遺伝子変異による細胞の異常増殖などが考えられている。PRKCSH や SEC63 は胆管上皮細胞に存在する 1 次繊毛 (primary cilia) を構成する Polycystin1 といった蛋白の細胞内輸送や下流の蛋白修飾に関係しており、1 次繊毛を介した細胞周期制御などが疾患を制御することが予想されるが肝嚢胞の形成メカニズムは不明な点が多く、根本的な治療法が存在しない。

我々は、以前に同定した肝前駆細胞マーカー CD13 および 133 を用いてヒト iPS 細胞からの肝幹・前駆細胞の分離・培養を行っている (Yanagida et al., PLoS One 2013, Tsuruya et al., Stem Cells Dev. 2015)。この培養過程で、肝前駆細胞マーカー CD13 を消失した胆管様前駆細胞が出現することを見出した。この細胞をゲル包埋培養することで胆管様構造体が誘導できる。さらに、ゲノム編集技術による遺伝子改変によりヒト多発性肝のう胞症の原因である PRKCSH の患者遺伝子変異を再現した胆管様構造を誘導し、病態の *in vitro* 再現が可能なることを示した (図2, Kamiya et al., Stem Cell Res. 2018)。

以上のように、申請者は一貫して肝前駆細胞の性状解析やその分化誘導系の構築に関する研究を進め成果をあげている。その技術的基盤を元に、治療法の不明な肝疾患に対する創薬スクリーニング系を構築することを目的とした。

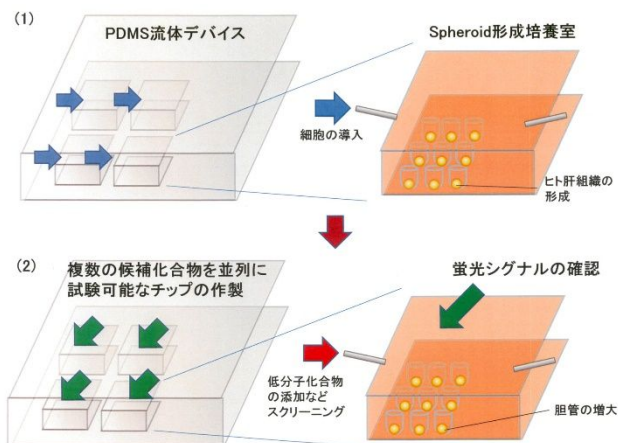


図1 薬物スクリーニング用PDMS流体デバイスの作製
(1)ミニ肝臓Spheroidを多数形成可能な窪みを持つ培養室を複数持つPDMSデバイスの作製。独立した各室に細胞を充填し、自己凝集によりミニ肝臓を作製する。
(2)チップ上のミニ肝臓を培養した各培養室にそれぞれ候補化合物を作製し胆管増大等を与える影響を解析する。

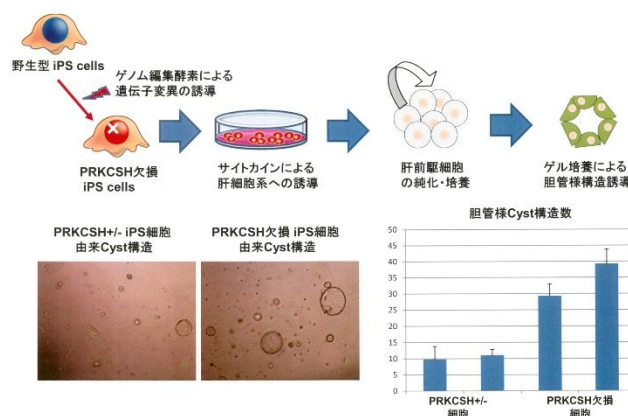


図2 ヒトiPS細胞の遺伝子改変による多発肝のう胞症の病態の *in vitro* 再現系
PRKCSHを欠損させたiPS細胞由来の培養系では胆管様のCyst構造が多数出現する。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞はその多能性や自己複製能から再生医療や新規創薬の有望なツールとみられている。特に、近年のゲノム編集技術の進歩はヒト iPS 細胞の遺伝情報を書き換え、試験管内でヒトの病態を再現することが可能になった。本研究では、当研究室で研究を続けてきた流体デバイス技術を組み合わせ、胆管系を保持したヒト肝組織を *in vitro* でハイスループットに作製し解析まで一体となって遂行できる on chip 創薬スクリーニング系を開発する。

本研究では、これら肝疾患のメカニズム解析・創薬スクリーニングに向けて、ヒト iPS 細胞から肝臓組織への分化誘導系を駆使した次の研究項目を推進する。

- (1) 自己凝集能を用いたヒト iPS 細胞由来肝組織の形成法の確立
- (2) 多発肝のう胞症を模倣する疾患ヒト iPS 細胞由来肝組織系の構築
- (3) PDMS 流体デバイスを用いた、ハイスループット評価システムの作製

3. 研究の方法

(1) 自己凝集能を用いたヒト iPS 細胞由来肝組織の形成法の確立

我々はヒト iPS 細胞から継代培養可能な肝前駆細胞や成熟した肝機能を保持した肝細胞の誘導に成功している (Tsuruya et al., 2015 など)。このヒト iPS 細胞由来肝細胞は 3 次元培養法を用いた自己凝集によってミニ肝組織様の構造を形成でき、平面培養に比べて強い肝機能発現を示す。一方で、この肝組織は肝細胞のみで構成されており、胆管組織を保持していない。申請者は、ヒト iPS 細胞から胆管前駆細胞、さらには胆管様構造を効率的に純化・誘導できる系を確立した (Kamiya et al., 2018)。そこで、本研究では iPS 細胞から肝細胞や胆管細胞を誘導し混合培養を行うことで in vitro ミニ肝臓を誘導する。この培養系における胆汁酸の分泌や肝毒性などを測定する。

(2) 多発肝のう胞症を模倣する疾患ヒト iPS 細胞由来肝組織系の構築

上記のヒトミニ肝臓を用いて多発肝のう胞の治療スクリーニング系を構築する。我々は既に、多発肝のう胞症の原因遺伝子 PRKCSH の変異 iPS 細胞をゲノム編集技術により作製し胆管前駆細胞へと分化させ解析することで、う胞を構成する胆管細胞の分化等が PRKCSH 変異によって誘導されることを見出している (Kamiya et al., 2018)。本研究ではより生体に近い病態モデル作製を目的とし、上記 1 の研究成果を元に多発性肝のう胞症の関連遺伝子変異を持つ in vitro ヒト肝組織を作出する。野生型 iPS 細胞由来肝前駆細胞と、PRKCSH 変異 iPS 細胞由来胆管前駆細胞を混合し、胆管細胞のみ多発肝のう胞症の変異遺伝子を持つミニ肝臓を作製する。このミニ肝臓を解析することで、患者で見られるような胆管の異常拡張を再現し、病態解析を行う。

(3) PDMS 流体デバイスを用いた、ハイスループット評価システムの作製

ヒトミニ肝臓の作出や多発性肝のう胞の病態解析を簡便に行うために、加工性や酸素透過性に優れた PDMS 製流体デバイスを用いる。培養表面に約直径 300 μ m 程度の窪みを多数持つような PDMS デバイスを作成し、LIPIDURE コート処理によってデバイス表面を細胞非吸着性に加工する。この時、独立に仕切られた培養部屋およびそこに培養液等を供給する流路を多数持つデバイス設計を行う。各流路上記の細胞サンプルを注入し、静止培養でミニ肝臓を作成する。各流路を介して様々な候補薬物を注入した後に、ミニ肝臓内の胆管細胞 (事前に胆管マーカーである Keratin7 の遺伝子座に蛍光タンパク質遺伝子導入などを行い標識する) の変化を観察し、胆管の異常拡張を抑制可能な試薬等を探索する。

上記の細胞生物学・肝臓病学・生体工学的な技術をハイブリッドさせることで、in vitro 肝組織を用いた肝疾患病態モデルの構築や創薬スクリーニング法の基盤技術を確立する。

4. 研究成果

(1) 自己凝集能を用いたヒト iPS 細胞由来肝組織の形成法の確立

ヒト iPS 細胞を液性因子の添加により肝臓系細胞へと分化誘導した後に、ラミニン 511 コート培養皿で継代培養を続けることで、長期増殖能をもつ肝前駆細胞を分離した。この細胞は細胞外マトリクス添加などにより成熟肝細胞様への分化誘導が可能であり、また凍結保存が可能である。そこで、この細胞を拡大培養した後に、成熟肝細胞、胆管細胞へと効率的に分化誘導する系の構築を進めた。

胎児期と成体の肝細胞の網羅的発現解析比較から、肝機能を制御する転写調節因子の候補を同定した。それらを肝前駆細胞にレトロウイルスを用いて強制発現させることで、肝機能酵素などの遺伝子発現に影響を与えるか解析した。その結果、転写因子 Kruppel-like factor 15 (Klf15) の強制発現によってヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の細胞周期を制御し、成熟肝細胞様への分化を誘

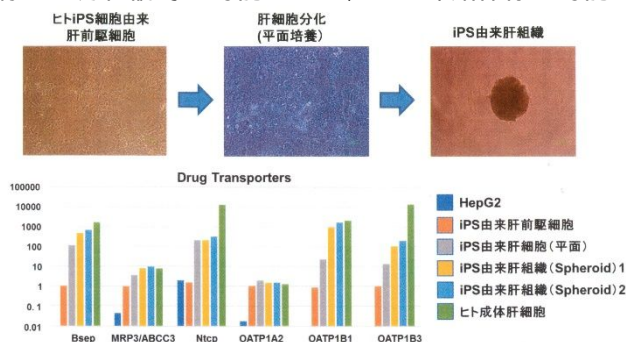


図3 ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞からの試験管内肝組織構築
肝前駆細胞を細胞外マトリクス重層などにより肝細胞へと成熟化させたのちに自己凝集培養によりミニ肝臓を作出する。得られた肝組織は平面培養時と比べて薬物トランスポーターなどの肝機能遺伝子の高い発現能を持つ。

導することを見出した (Anzai et al., Sci. Rep., 2021)。さらに KLF15 に加えて複数の肝機能制御転写因子を強制発現させることで、より肝機能が上昇することを見出している。これらの転写因子群は肝細胞の成熟化過程に重要な役割を果たしていると考えられ、in vitro での肝組織形成に有用と思われる。また、胆管細胞の機能を制御する転写因子群が知られている。そこで、それらを強制発現させたうえで胆管系への分化誘導を行ない、胆管系への分化を促進する転写調節因子のスクリーニングを行った。その結果、Grhl2 を強制発現させることで胆管様 Cyst 構造の形成が誘導できることを見出した。

さらに、これらの肝前駆細胞を凝集培養することで肝機能を向上できることを見出している (図 3)。肝前駆細胞を低吸着性の培養皿で培養し凝集体を作らせることで、平面培養時に比べて肝機能遺伝子や細胞膜タンパク質の発現が上昇することを見出している。

(2) 多発肝のう胞症を模倣する疾患ヒト iPS 細胞由来肝組織系の構築

胆管の異常増殖によって生じる多発肝のう胞の原因としては肝幹・前駆細胞から胆管系への分化・増殖促進が考えられる。そこで、肝のう胞の原因遺伝子として知られる PRKCSH や PKHD1 の欠損 iPS 細胞を作製し、肝前駆細胞・胆管細胞へと in vitro 分化培養することで遺伝子の機能を解析する系を構築している。これらの遺伝子は一次繊毛の構造や機能に重要な役割を果たしており、胆管細胞の分化や増殖と繊毛との関連が示唆される。そこで、本研究ではヒト iPS 細胞から繊毛構造を持つ in vitro 胆管培養系の構築を行った。ヒト iPS 細胞から肝前駆細胞を分化誘導し、細胞外マトリクス包埋培養を行った。サイトカインなどの添加条件によって、繊毛構造を持つ Cyst 構造を形成できることが明らかとなった。そこで、これらの系とゲノム編集による遺伝子改変を組み合わせることで、in vitro で繊毛関連タンパク質の機能解析を可能とした。

(3) PDMS 流体デバイスを用いた、ハイスループット評価システムの作製

肝前駆細胞などを凝集培養することで 3 次元的なミニ肝臓を作り出せることが知られている。そこで我々は、PDMS 流体デバイス内で高効率に凝集培養を可能とする系の構築を行った。

まずヒト肝癌細胞株 HepG2 などスフェロイド形成や培地交換の自動化などを進めた。PDMS で複数のドット上の培養スペースを作製したものに、定吸着性の素材をコートすることで非接着培養を可能とした。マイクロ流路とモーターを用いて培養液を自動的に交換できるようなシステムを利用することで長期間における、HepG2 由来スフェロイドの培養を可能とした。さらにヒト iPS 由来肝前駆細胞でも同様の培養が可能か検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Irie T, Matsuda T, Hayashi Y, Matsuda-Ito K, Kamiya A, Masuda T, Prinz M, Isobe N, Kira JI, Nakashima K	4. 巻 120
2. 論文標題 Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA.	6. 最初と最後の頁 e2307972120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2307972120.	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 Akiyama S, Saku N, Miyata S, Ite K, Nonaka H, Toyoda M, Kamiya A, Kiyono T, Kimura T, Kasahara M, Umezawa A	4. 巻 199
2. 論文標題 Drug metabolic activity as a selection factor for pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Prog Mol Biol Transl Sci	6. 最初と最後の頁 155-178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.pmbts.2023.02.009.	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 Akiyama Saeko, Saku Noriaki, Miyata Shoko, Ite Kenta, Toyoda Masashi, Kimura Tohru, Kuroda Masahiko, Nakazawa Atsuko, Kasahara Mureo, Nonaka Hidenori, Kamiya Akihideo, Kiyono Tohru, Kobayashi Tohru, Murakami Yasufumi, Umezawa Akihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Drug metabolic activity is a critical cell-intrinsic determinant for selection of hepatocytes during long-term culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-022-02776-5	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 Kamiya Akihideo, Ida Kinuyo	4. 巻 11
2. 論文標題 Liver Injury and Cell Survival in Non-Alcoholic Steatohepatitis Regulated by Sex-Based Difference through B Cell Lymphoma 6	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3751 ~ 3751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11233751	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 Shida Yukari, Endo Hitoshi, Owada Satoshi, Inagaki Yutaka, Sumiyoshi Hideaki, Kamiya Akihide, Eto Tomoo, Tatemichi Masayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Branched-chain amino acids govern the high learning ability phenotype in Tokai high avoider (THA) rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02591-7	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 Anzai Kazuya, Tsuruya Kota, Ida Kinuyo, Kagawa Tatehiro, Inagaki Yutaka, Kamiya Akihide	4. 巻 11
2. 論文標題 Kruppel-like factor 15 induces the development of mature hepatocyte-like cells from hepatoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97937-6	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 -

1. 著者名 AlOgayil Najla, Bauermeister Klara, Galvez Jose Hector, Venkatesh Varun S., Zhuang Qinwei Kimwee, Chang Matthew L., Davey Rachel A., Zajac Jeffrey D., Ida Kinuyo, Kamiya Akihide, Taketo Teruko, Bourque Guillaume, Naumova Anna K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct roles of androgen receptor, estrogen receptor alpha, and BCL6 in the establishment of sex-biased DNA methylation in mouse liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93216-6	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 Tsuneishi Ruri, Saku Noriaki, Miyata Shoko, Akiyama Saeko, Javaregowda Palaksha Kanive, Ite Kenta, Takashima Nagisa, Toyoda Masashi, Kimura Tohru, Kuroda Masahiko, Nakazawa Atsuko, Kasahara Mureo, Nonaka Hidenori, Kamiya Akihide, Kiyono Tohru, Yamauchi Junji, Umezawa Akihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Ammonia-based enrichment and long-term propagation of zone I hepatocyte-like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90708-3	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 Hamada Takashi, Nakamura Anna, Soyama Akihiko, Sakai Yusuke, Miyoshi Takayuki, Yamaguchi Shun, Hidaka Masaaki, Hara Takanobu, Kugiyama Tota, Takatsuki Mitsuhiisa, Kamiya Akihide, Nakayama Koichi, Eguchi Susumu	4. 巻 16
2. 論文標題 Bile duct reconstruction using scaffold-free tubular constructs created by Bio-3D printer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 81 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.02.001	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 荒木琢磨、紙谷聡英、近田裕美、井田絹代
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いたin vitro脂肪肝炎解析系の構築
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山圭子、井田絹代、紙谷聡英
2. 発表標題 肝特異的ゲノム編集マウスを用いた肝臓の性差制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紙谷聡英、近田裕美、井田絹代
2. 発表標題 転写抑制因子Bcl6を介した非アルコール性脂肪肝炎を制御する新規メカニズムの解明
3. 学会等名 第7回肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙谷 聡英
2. 発表標題 肝臓の性差制御因子を介した非アルコール性脂肪肝炎の病態変化
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------