

ヒト iPS 細胞から胆汁排泄能を備えた肝組織の作製に成功 －創薬研究や肝疾患研究への応用に期待－

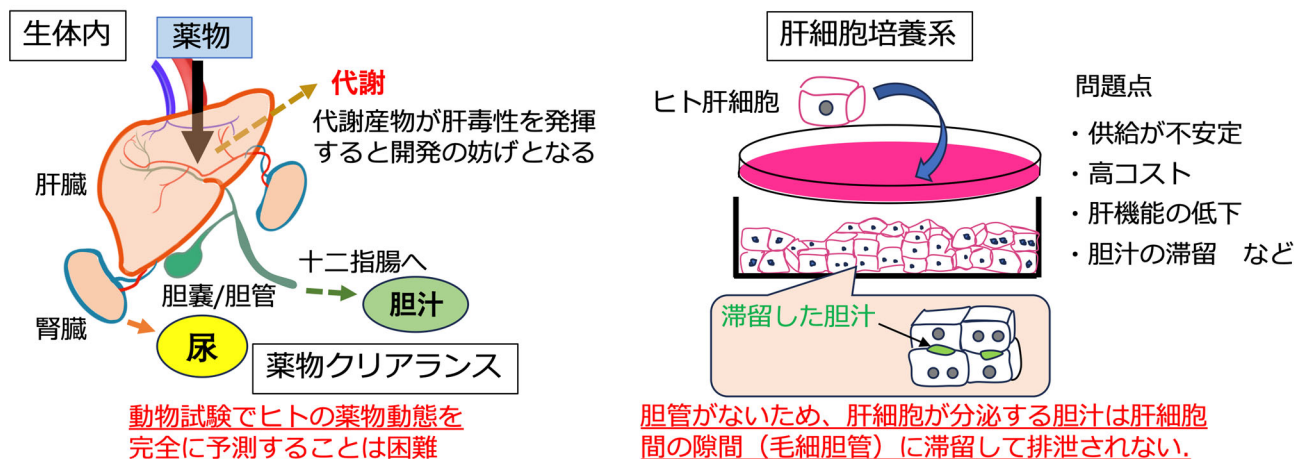
【研究成果のポイント】

肝臓は薬物代謝の中枢を担う臓器であり、ADMET（薬物が体内に取り込まれてから排出されるまでの過程や肝毒性）に関する情報は製薬企業が新薬を開発する上で必要不可欠な情報となります。それらの情報を得るために、これまでは動物試験やヒト肝細胞の初代培養系などが用いられてきましたが、動物試験では、ヒトの ADMET を完全に予測することはできないこと、ヒト肝細胞培養系では、胆管が備わっていないことから胆汁排泄の流れを再現できない等の問題がありました。

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター（略称：NCGM）細胞組織再生医学研究部の田中稔室長と東京大学大学院新領域創成科学研究科 王路遥（ワン ルーヤウ）大学院生らの研究グループは、同大学定量生命科学研究科 木戸丈友特任講師、宮島篤特任教授、同大学大学院薬学系研究科 楠原洋之教授、同大学大学院工学系研究科 酒井康行教授らの研究グループとの共同研究により、胆汁排泄を再現することが可能なヒト肝組織平面培養系を作製することに初めて成功しました。本研究では、ヒト iPS 細胞から肝細胞と胆管細胞を同時に分化・融合させることにより、ヒト肝組織を模倣する肝胆オルガノイド（hHBO）を作製しました。さらに、既存薬を用いた解析から、胆汁排泄や肝毒性を予測できる可能性を示しました。今回開発された hHBO は、今後、創薬のための薬物動態試験や肝疾患研究に応用されることが期待されます。

【研究の背景】

肝臓は、薬物の代謝や解毒において重要な役割を果たしており、服用した医薬品の多くは肝臓内で毒性の低い水溶性物質に変換され、尿や胆汁の形で体外に排出されています。そのため、薬がどの程度の期間、体内に留まり、肝臓でどのように代謝され、どのような経路で最終的に体外に排出されるのか、といった ADME^{※1}に関する情報は薬の治療効果を予測する上で極めて重要な情報となります。一方、創薬において、薬が肝臓で代謝されることで毒性を発揮し、副作用が発現した場合、新薬の開発は中止に追い込まれるため、ADMET の予測は製薬企業にとっては必要不可欠な情報となります。このような薬物の体内動態を調べるために、これまで主に動物試験が行われてきました。しかし、動物とヒトでは肝臓の代謝能力に種差があるため、ヒトでの薬物動態を完全に予測することは困難であるという問題がありました。その代替法として、ヒト肝細胞を用いた培養系が利用されてきましたが、安定供給やコスト、機能面で問題があるだけでなく、胆汁排泄を担う胆管が備わっていないために、胆汁の流れを再現できないといった問題がありました（下図）。



【研究内容と結果】

本研究では、前述した創薬研究における様々な問題点を解決することを目的とし、ヒト iPS 細胞から胆汁排泄を可能とする肝組織を作製することを目指しました。私たちは以前に肝臓の元となる肝芽細胞^{※2}を iPS 細胞から誘導することに成功していました(1)。この肝芽細胞は肝細胞と胆管にそれぞれ分化できることは分かっていましたが(図 1A)、今回、この細胞から肝細胞と胆管を同時に分化・融合させることにより、肝細胞層の上部に胆管構造が配置されたヒト肝胆オルガノイド(hHBO)を作製することに成功しました(図 1B)。

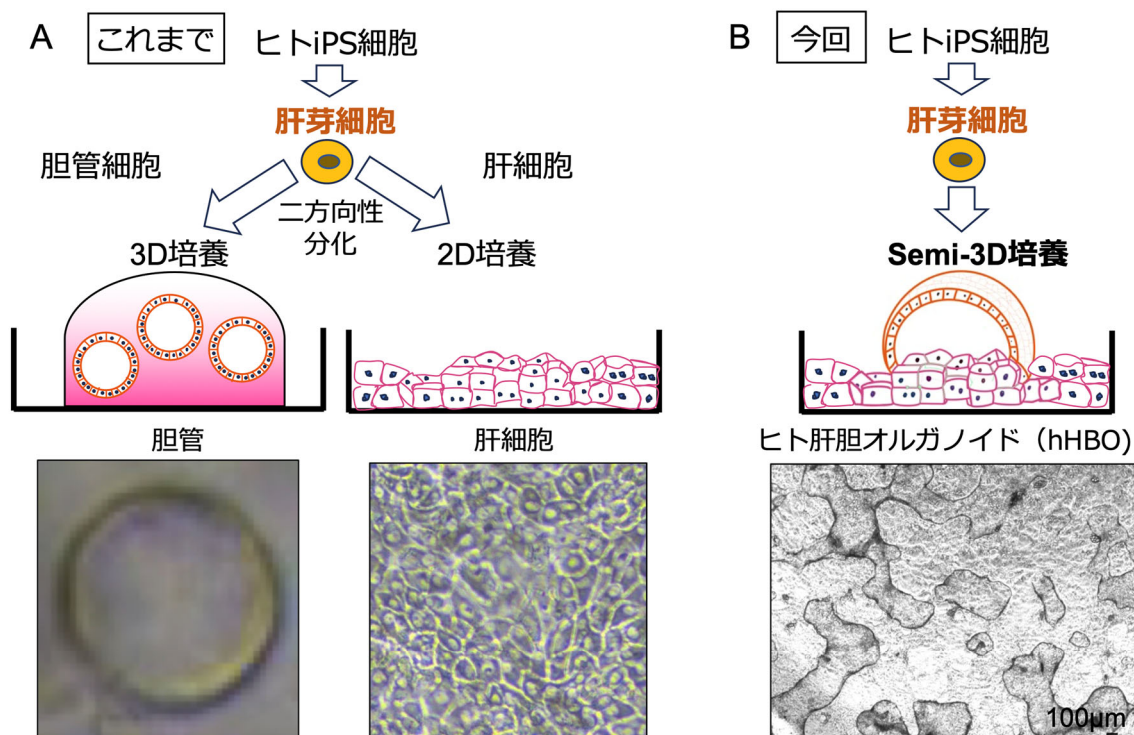


図1 ヒトiPS細胞に由来する肝芽細胞の二方向性分化能

- (A) 肝芽細胞は3次元(3D)培養では胆管細胞に、平面(2D)培養では肝細胞に分化させることができる。(Stem Cell Reports 2015)
- (B) 肝芽細胞をSemi-3D培養により同時に分化させると、肝細胞層を覆うように胆管構造が形成される。

さらに、hHBO が胆汁排泄能を有するのか調べるために、底部の肝細胞に胆汁排泄に働く分子が発現しているかを調べたところ、複数の胆汁酸トランスポーター^{※3}が発現していることが確認されました(図2)。さらに、蛍光胆汁酸アナログである CLF^{※4}を hHBO に添加すると、肝細胞に取り込まれた CLF が胆管内に蓄積していく様子が観察され、hHBO は胆汁の流れを再現できることがわかりました(図3)。

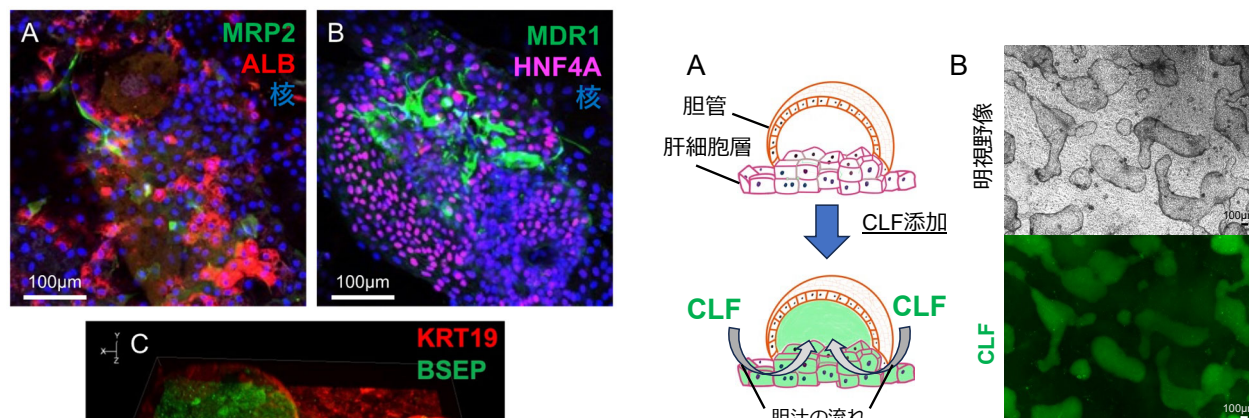


図3 CLFを用いたhHBOにおける胆汁の流れの可視化
(A) hHBOの構造と胆汁の流れの模式図
(B) CLF添加24時間後の明視野像(上)と蛍光像(下)

図2 免疫組織化学的染色による胆汁酸トランスポーターの発現解析

- (A) hHBOのMRP2(緑)とアルブミン(赤)の共染色像
(B) hHBOのMDR1(緑)とHNF4A(マゼンタ)の共染色像
(C) hHBOのBSEP(緑)とKRT19(赤)の共染色の三次元再構築像

最後に、hHBO がヒトの肝臓と同様の胆汁排泄を再現しているのかを調べました。胆汁中に排泄されることが分かっている実薬としてオルメサルタンとバルサルタンを hHBO に添加したところ、それらが胆管構造内に排泄されていることを示す結果が得られました。さらに、重篤な肝毒性の副作用を理由に販売中止となった2型糖尿病治療薬トログリタゾンを、hHBO に添加して肝毒性の評価を行ったところ、胆汁の流れが阻害される胆汁うっ滞とともに肝細胞が死ぬことが確認されました(図4)。トログリタゾンが実験動物を用いた安全性試験では肝毒性を示さなかったことを考えると、この結果は、hHBO がヒト肝臓としての応答性を発揮した結果と言えます。私たちは、iPS 細胞から胆汁排泄の流れを再現できるヒト肝組織平面培養系を作製し、肝代謝、薬物クリアランス、肝毒性を予測できる可能性を示しました。

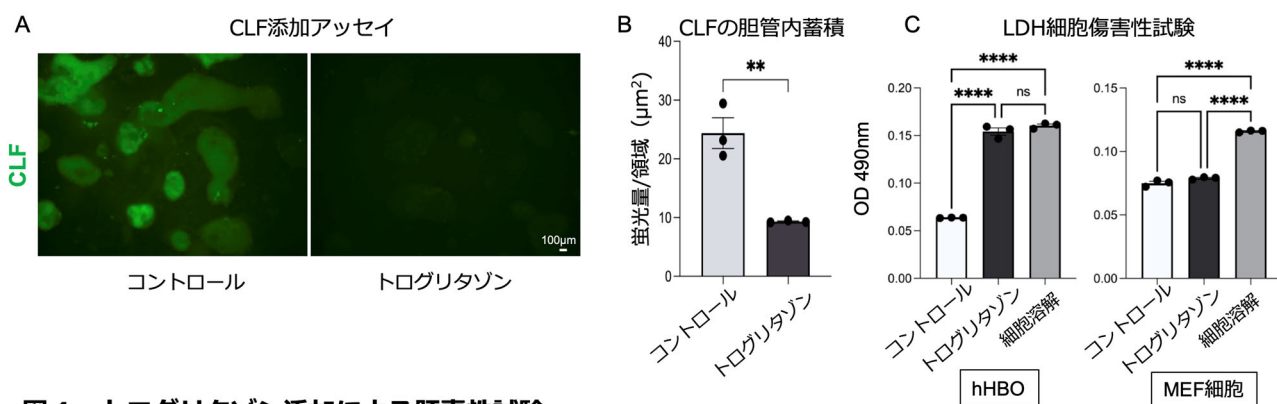


図4 トログリタゾン添加による肝毒性試験

- (A,B) トログリタゾン処置の有無によるCLF添加後の蛍光像 (A) と胆管内に蓄積したCLFの測定量(B)
トログリタゾン処置により胆管内への胆汁の流入は阻害された。
(C) LDH細胞傷害性試験による肝毒性の評価。hHBOではトログリタゾン処置により肝細胞は傷害され、細胞内のLDHが培地中に放出されるが、マウスのMEF細胞を処置しても細胞死は誘導されない。

【コメント】

米国環境保護庁（EPA）は 2035 年までに動物実験を全廃することを提言しており、ヒト ADMET を正確に予測できる代替法の開発は喫緊の課題となっています。今回の成果は、ヒト iPS 細胞由来の肝組織を薬物動態試験に利用していくための第一歩と捉えており、生体模倣システム（MPS）への応用も見据え、創薬研究のためにさらなる改良を進めています。また、hHBO を基盤技術とし、慢性肝炎から肝硬変に至る過程を再現可能な「肝疾患モデル培養系」の確立にも取り組んでおり、新規治療法開発のために役立てていきたいと考えています。

【参照】

（1）Kido T, Kou Y, Suzuki K, Kobayashi A, Miura Y, Chen EY, Tanaka M, Miyajima A*: CPM is a useful cell surface marker to isolate expandable bi-potential liver progenitor cells derived from human iPS cells. **Stem Cell Reports** 5: 508-515, 2015. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.08.008. PMID: 26365514; PMCID: PMC4624956.

【用語解説】

※ 1 ADME

薬物が投与されてから体外に排出されるまでの過程“吸収（**A**bsorbance）-分布（**D**istribution）-代謝（**M**etabolism）-排泄（**E**xcretion）”の頭文字を並べた略語。毒性（**T**oxicity）の頭文字を加えて ADMET とも呼ばれる。薬の副作用を抑え、十分な効果を発揮させるためには、ADMET の最適化が重要な鍵となる。

※ 2 肝芽細胞

胎児で肝臓が発生する過程で出現する前駆細胞。肝芽細胞は肝機能の大部分を担う肝細胞と肝細胞が分泌する胆汁を十二指腸に排出するための胆管細胞の二方向に分化することができる。

※ 3 胆汁酸トランスポーター

胆汁酸の輸送に関わるタンパク質。肝細胞では細胞膜上に Bile salt export pump (BSEP)などの胆汁酸トランスポーターが発現することが知られている。その機能を阻害する薬物は胆汁の流れを妨げるため、胆汁うっ滞を引き起こす可能性がある。

※ 4 CLF

Cholyl-Lysyl-Fluorescein (CLF)は蛍光物質が付加された胆汁酸の類縁体。培養肝細胞や動物実験において胆汁を可視化するために用いられている。

【発表雑誌】

雑誌名：Biomaterials

論文タイトル：Establishment of human induced pluripotent stem cell-derived hepatobiliary organoid with bile duct for pharmaceutical research use

著者：Wang L, Kou Y, Kanegae K, Kido T, Tamura-Nakano M, Yabe S, Tai K, Nakajima Y, Kusuvara H, Sakai Y, Miyajima A, Okochi H, Tanaka M*.（*責任著者）

掲載日：日本時間 5 月 29 日（水）

DOI：10.1016/j.biomaterials.2024.122621

URL：<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122621>

【研究助成】

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）「革新的先端研究開発支援事業」（AMED-CREST）（JP18gm1210002）、「再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた基盤技術開発事業」（JP21be0304201）、「再生医療実用化研究事業」（JP21bk0104136）、国際医療研究センター開発費（23A1005）、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）（JP23ama121051）の支援を受けて実施されました。

【お問合せ先】

（研究に関すること）

国立国際医療研究センター研究所 細胞組織再生医学研究部

細胞療法開発研究室長

（氏名）田中 稔（たなか みのる）

電話：03-3202-7181

（取材に関すること）

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 企画戦略局 広報企画室

電話：03-3202-7181

E-mail:press@hosp.ncgm.go.jp

国立大学法人 東京大学 定量生命科学研究所 総務チーム

電話：03-5841-7813

E-mail:soumu@iqb.u-tokyo.ac.jp

国立大学法人 東京大学 大学院薬学系研究科 庶務チーム

電話：03-5841-4702

E-mail:shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp