



Title	ヒト肝臓オルガノイドを基盤とした創薬研究に資する新規肝細胞モデルの開発
Author(s)	全, 嫣然
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105576
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 全 嬌 然 ）	
論文題名	ヒト肝臓オルガノイドを基盤とした創薬研究に資する新規肝細胞モデルの開発
論文内容の要旨 新薬の開発には10年以上に及ぶ長い年月が必要とされるが、その開発成功率は約30,000分の1と低く、莫大なコストと労力が伴う。そのため、候補化合物の安全性を創薬初期段階で正確に予測することは、医薬品開発の効率化に直結する重要な課題である。肝臓は、薬物およびその代謝物の取り込み・代謝・排泄において重要な役割を担い、薬物性肝障害（DILI）の影響を受けやすい臓器である。DILIは、医薬品候補化合物の開発中止や承認済み医薬品の市場撤退の主要因であり、実際に臨床試験中止の約22%、市場撤退の約32%がDILIに起因する。現在、非臨床試験で汎用されるヒト初代培養肝細胞（PHH）には、ロット間差や同一ロットの供給量制限、培養に伴う肝機能低下といった課題が存在し、大規模な薬物動態・毒性試験を正確に実施するには限界がある。さらに、米国食品医薬品局が2025年7月に動物実験の段階的廃止に向けた方針を発表したことを契機として、動物実験代替法への注目は一層高まっている。以上の背景から、DILIを正確に予測可能なヒト肝細胞モデルの確立に対する需要は急速に拡大している。 オルガノイドとは、生体組織に類似した機能的特徴を示す三次元培養体であり、遺伝的に安定なまま長期にわたり維持培養が可能である。また、分化を経ることで特定の体細胞を大量に供給できるため、創薬研究に資する新規細胞供給源として期待されている。本研究では、入手が容易で倫理的な問題の少ない市販のPHHからヒト肝臓オルガノイドを樹立し、その分化技術の開発を通じて、汎用性と機能を兼ね備えた肝細胞モデルの創出に取り組んだ。 第一章では、まず市販PHHからヒト肝臓オルガノイドを樹立し、その機能を解析した。ヒト肝臓オルガノイドでは、増殖・幹細胞マーカー（<i>Ki67</i>, <i>LGR5</i>）の遺伝子発現量がPHHと比較して増加した一方、肝細胞マーカー（<i>ALB</i>, <i>HNF4α</i>, <i>CYP3A4</i>）の発現量は低下した。免疫蛍光染色法による解析では、大部分の細胞が胆管上皮・幹細胞マーカーであるCK19陽性であり、<i>HNF4α</i>および<i>Ki67</i>陽性細胞は一部に限られていた。すなわち、ヒト肝臓オルガノイドは幹細胞の表現型を示すことが明らかとなった。次に、ヒト肝臓オルガノイドの肝細胞への分化法として、合成化学品由来の三次元細胞培養基材「HYDROX」を用いた検証を行った。HYDROX上で形成されたオルガノイド（Org-HYDROX）では、薬物代謝関連マーカー（<i>CYP3A4</i>, <i>CYP2C9</i>, <i>CYP2C19</i>）の遺伝子発現および代謝活性レベルがヒト肝臓オルガノイドと比較して有意に向上し、その機能は培養28日目まで維持された。さらに、Org-HYDROXがDILI予測に利用可能か評価するため、肝毒性薬物を暴露し、細胞生存率に基づいて細胞毒性を解析した。その結果、Org-HYDROXはPHHと同程度の精度で毒性予測が可能であることが示された。Org-HYDROXはPHHと比較して長期にわたり維持培養が可能であり、利便性に優れることから、PHHに代わる肝細胞モデルとして期待される（Tong <i>et al.</i>, <i>Sci. Rep.</i>, 2024）。 胆汁鬱滞型のDILIは全体の約50%を占める毒性であり、薬物が胆汁酸の取り込み・排泄に与える影響を高精度に評価する手法の確立は、創薬研究において極めて重要である。当研究室で開発した二次元培養下におけるヒト肝臓オルガノイド由来肝細胞（Org-Heps）では、毛細胆管の形成が困難であるため胆汁鬱滞型肝毒性の予測が難しいという課題があった（Ueyama <i>et al.</i>, <i>iScience</i>, 2024）。そこで第二章では、毛細胆管を形成可能なOrg-Hepsの創出を目的とし、5種類の市販培地を比較して最適な培養条件を探索した。胆汁酸モデル蛍光基質CDFDAを用いた排泄試験の結果、市販培地BCEMで培養したOrg-HepsにおいてMRP2を介したトランスポーター活性が確認され、高い毛細胆管形成能を有することが示唆された。さらに、免疫蛍光染色法によりOrg-HepsにおけるMRP2の局在を評価した結果、MRP2陽性領域は細胞膜マーカーであるZO-1陽性領域と重なり、MRP2が胆管側膜に局在することが明らかとなった。次に、本培養系が薬物誘発性胆汁鬱滞型肝毒性の予測に利用可能かを検証した。Org-Hepsに胆汁鬱滞型肝毒性が報告されている薬物を暴露し、細胞上清中に放出された乳酸脱水素酵素活性に基づいて細胞毒性を評価した。その結果、一部薬物では偽陰性が認められたものの、多くの薬物において胆汁酸依存的な肝毒性の検出できることが確認された。今後は、Org-Hepsにおける胆汁鬱滞型肝毒性予測に寄与した要因を解明した上で培養条件の改良を進め、肝毒性予測精度のさらなる向上を図りたい。 生体肝臓では、肝細胞が形成する毛細胆管を介して胆汁酸が肝内胆管へ流入し、最終的に肝外へ排出される。管内胆管は胆管上皮細胞によって構成され、毛細胆管は胆管と構造的・機能的に接続している。このため、複数の細胞種	

から構成される *in vitro* 評価系の構築が望まれている。本研究の展望として、市販PHH由来ヒト肝臓オルガノイドから分化誘導により得られる肝細胞および胆管上皮細胞を用いて、毛細胆管と胆管が接続した細胞モデルの確立を目指した。ヒト肝臓オルガノイドの胆管上皮細胞への分化に関しては十分な検討が行われていない背景を踏まえ、第三章ではその分化可能性を検証した。既報の分化プロトコルを参考にヒト肝臓オルガノイドを胆管上皮細胞へ分化させた結果、ヒト肝臓オルガノイド由来胆管上皮細胞（Org-BECs）では、胆管上皮細胞マーカー遺伝子（*EpCAM*、*CK7*、*AQPRI*、*CFTR*）の発現量が分化に伴い有意に増加した。さらに、P糖タンパク質の基質であるrhodamine 123を用いた輸送試験では、Org-BECsはヒト肝臓オルガノイドよりも多くのrhodamine123を管腔内へ輸送し、薬物輸送活性を有することが示された。生体の胆管上皮細胞は単層培養において強固な上皮バリア機能を示すことが知られている。そこで、ヒト肝臓オルガノイドの単層培養系における胆管上皮細胞への分化を試みた。Org-BECsをセルカルチャーインサート上で5日間培養し、バリア機能の指標である経上皮電気抵抗（TEER）の値を測定した結果、Org-BECsでは十分に高いTEER値を示した。以上の結果から、ヒト肝臓オルガノイドは三次元および単層培養のいずれの条件下でも、機能的な胆管上皮細胞へ分化できることが示された（Tong *et al.*, *Biochem. Biophys. Rep.*, 2023）。今後は、本研究で得られた知見を基盤として、毛細胆管と胆管が連結した新規培養系の構築に取り組みたい。

本研究の成果は、再生医療分野においても有益な知見を提供するものと考ええる。肝移植は末期肝疾患に対する唯一の根治治療法であるが、深刻なドナー不足が依然として大きな課題となっており、その代替療法として肝細胞移植が提案されている。近年では、大量作製が可能であり、肝障害治療に有効な肝細胞移植の新規細胞源として、ヒト肝臓オルガノイドを含む肝幹細胞が注目されている。本論で報告したヒト肝臓オルガノイド培養技術および分化技術がさらに発展し、実用化へとつなげることで、創薬および再生医療研究の加速化・高度化に寄与することを期待する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （ 全 然 ）			
	（職）		氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授	水口 裕之
	副 査	教 授	近藤 昌夫
	副 査	教 授	池田 賢二
	副 査	講 師	神宮司 健太郎

論文審査の結果の要旨

新薬の開発には、10年以上もの長い年月が必要とされる。しかし、その開発成功率は約30,000分の1と極めて低く、莫大なコストと労力が伴う。そのため、候補化合物の安全性リスクを創薬研究の初期段階で正確に予測することは、医薬品開発の効率化と成功確率の向上に直結する重要な課題である。

肝臓は、薬物およびその代謝物の取り込み、代謝、排泄において極めて重要な役割を担っており、薬物性肝障害（DILI）の影響を受けやすい臓器である。DILIは、医薬品候補化合物の開発中止や、承認済み医薬品の市場撤退の主要因であり、実際に臨床試験中止の約22%、市場撤退の約32%がDILIに起因する。現在、非臨床試験で汎用されるヒト初代培養肝細胞（PHH）には、ロット間差や同一ロットの供給量制限、培養に伴う肝機能低下といった課題が存在し、大規模な薬物動態・毒性試験を正確に実施するには限界がある。さらに、アメリカ食品医薬品局が2025年7月に動物実験の段階的廃止に向けた方針を発表したことで、動物実験代替法が一層注目されるようになった。以上の背景から、DILIを正確に評価可能な*in vitro*モデルの開発が強く望まれている。

近年、自己複製能と多分化能を有するヒト胚性幹細胞やヒト人工多能性幹細胞に代わる新たな肝細胞供給源として、ヒト肝臓オルガノイドが注目されている。オルガノイドとは、生体組織に類似する機能的特徴を示す三次元培養体であり、*in vitro*で増殖可能で、遺伝的安定性を維持したまま長期にわたり継代培養できる点が特徴である。さらに、分化・成熟化を経ることで特定の体細胞を均質かつ大量に供給できるため、医薬品開発過程における有用な*in vitro*評価系の構築に資することが期待されている。

本研究では、入手が容易で倫理的な問題の少ない市販のPHHからヒト肝臓オルガノイドを樹立し、その分化技術の開発を通じて、汎用性と機能を兼ね備えた肝細胞モデルの創出に取り組んだ。

本検討により以下の結果を得た。

- 肝幹細胞の表現型を示すヒト肝臓オルガノイドに対し、合成化学品由来の細胞培養基材「HYDROX™」を適用することで、肝細胞への分化誘導に成功し、DILI 予測モデルとしての有用性を示した。
- 創薬研究において汎用性の高い二次元培養系を基盤とし、5種類の市販培地を比較して最適条件を探索した結果、高い肝機能と毛細胆管形成能を併せ持つヒト肝臓オルガノイド由来肝細胞の創出に成功し、胆汁鬱滞型 DILI 予測モデルとしての利用可能性を示した。
- 生体肝臓の複雑な特徴を再現し得る *in vitro* 培養系の構築を見据え、三次元および単層培養条件下におけるヒト肝臓オルガノイドの胆管上皮細胞への分化可能性を明らかにした。

本研究成果は、医薬品開発における主要なボトルネックの一つであるDILI評価に対し、生体構造を精緻に再現したヒト肝臓オルガノイド培養・分化技術を確立することで、世界を先導してきた*in vitro*ヒト肝臓モデルを一層高度に発展させ、その社会実装性を大きく高めた点で、学術的・社会的意義は極めて大きい。以上の理由から、本論文は博士(薬科学)の学位論文として十分に値するものと認める。