Osaka University Knowledge Archive

Title	新規肝細胞モデルの確立を目指した幹細胞からの肝細胞分化誘導技術の開発
Author(s)	植山, 由希子
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92117
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　植山（鳥羽）由希子　）	
論文題名	新規肝細胞モデルの確立を目指した幹細胞からの肝細胞分化誘導技術の開発

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薬物動態・安全性評価などの非臨床試験は医薬品開発に必要不可欠な試験である。しかし、現在汎用されているヒト初代培養肝細胞はロット間差や価格、培養に伴う肝機能低下などの課題を有するため、大規模な動態・毒性試験を実施することは困難である。したがって、新薬開発過程の低コスト化・効率化を実現させるためには、均質かつヒトの生体に近い性質を有した肝細胞を供給できる基盤技術が必要である。これらの理由から、ヒト初代肝培養細胞に代わる新しい肝細胞供給源の創出が試みられてきた。特に、細胞増殖性を有した幹細胞は、分化・成熟化を経ることにより特定の体細胞を均質かつ大量に供給可能な細胞であり、医薬品開発過程に有用であると考えられている。すなわち、新薬開発過程の早期の段階で幹細胞由来モデル細胞を用いて薬効や毒性、薬物動態を評価することができれば、医薬品安全性の確保や開発コストの削減などが期待される。

本研究では、創薬研究に資する新たな肝細胞モデルの確立を目的とし、幹細胞から肝細胞への分化誘導技術の改良と開発を行った。研究対象として用いた幹細胞は、ヒトinduced pluripotent stem（iPS）細胞とヒト肝臓オルガノイドである。ヒトiPS細胞由来肝細胞の作製手法は2010年以降から大幅に進歩し、肝機能や分化誘導効率の向上などが達成されてきた。しかし、その機能はヒト初代培養肝細胞にわずかに劣ることや、胎児型の表現型を有することなどが課題である。そこで、第一章では、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化途中段階にある肝幹前駆細胞に着目し、高効率に肝幹前駆細胞を作製する技術の開発を通して、高機能な肝細胞の作製を試みた。従来のヒトiPS細胞から肝幹前駆細胞への分化誘導法ではFibroblast growth factors（FGFs）とBone morphogenic proteins（BMPs)を併用することが一般的であったが、FGFsを添加しないことにより高効率に肝幹前駆細胞を分化誘導できることを示した。さらに、BMP4単独作用により分化誘導した肝幹前駆細胞は、従来法より高機能な肝細胞へと分化することを明らかにした。第二章では、肝細胞培養用の培地やサプリメントが多数販売されていることに着目し、ヒトiPS細胞由来肝細胞の成熟化と機能維持を可能にする培地の選定を試みた。5種類の市販の培地を比較検討した結果、ヒトiPS細胞由来肝細胞の成熟化と維持にはHepatocyte culture medium（HCM, Lonza社）が最適であることを示した。培養に用いる培地によって、代表的な肝機能であるアルブミン産生能や薬物代謝酵素活性が大きく変動したことから、培地に含まれる成分がヒトiPS細胞由来肝細胞の機能に大きな影響を与えることが示唆された。なお、HCMを用いた場合、ヒトiPS細胞由来肝細胞における一部の肝細胞マーカー遺伝子の発現は約3週間維持することが可能であった。また、ヒト初代培養肝細胞の培養は、HCM およびWilliam's E medium（WEM, Thermo Fisher Scientific社）が最適であることを明らかにし、ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた検討と同様に、使用する培地によって肝機能が大きく変動することを示した。第三章では、新たな生体材料であるHYDROXを応用し、三次元培養を導入することでヒトiPS細胞由来肝細胞の機能向を試みた。HYDROXに播種した細胞は凝集体を形成し、HYDROX培養したヒトiPS細胞由来肝細胞スフェロイドはアルブミン産生能や薬物代謝酵素活性などの肝機能をより高く保持することが示唆された。また、HYDROXはヒト初代培養肝細胞にも使用することができ、HYDROXで培養したヒト初代培養肝細胞は、従来のコラーゲンコートプレート上で培養した細胞より、薬物代謝酵素活性などが優れていることを示した。さらに、HYDROXの原料であるPSar-PLLAポリマーの濃度を変化させることによりHYDROXの粘弾性を調節し、特性の異なる微小環境を提供できる可能性を示した。最後に、第四章では、新たに開発されたオルガノイド培養技術に着目し、ヒト肝臓オルガノイドの高機能化を試みた。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できるため、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。しかし、このヒト肝臓オルガノイドは培養に伴い肝機能が著しく低下したため、汎用性と機能を兼ね備えたヒト肝臓オルガノイド由来肝細胞の作製法の開発に取り組んだ。三次元状態で培養されたヒト肝臓オルガノイドをコラーゲンコートプレートへと播種し、二次元培養条件下にて肝細胞への成熟化を可能とする条件を探索した。スクリーニングにより決定したヒト肝臓オルガノイドの成熟化条件により得られた肝細胞（ヒト肝臓オルガノイド由来肝細胞, Org-HEPs）は、肝細胞マーカーや薬物代謝・抱合酵素を発現し、その一部

はヒト初代培養肝細胞に匹敵する水準であった。さらに、Org-HEPsは長期培養が可能であること、薬物誘発性肝障害のスクリーニングに応用可能であることを示した。

以上の結果から、ヒトiPS細胞培養技術やオルガノイド培養技術を駆使し、従来法より高い機能を有した幹細胞由来肝細胞の作製に成功した。今後、幹細胞から得られる肝細胞が実用化され、創薬研究の加速化や高度化が実現することを期待する。また、幹細胞由来の肝細胞は医薬品開発過程だけでなく、肝炎ウイルスや再生医療などの研究分野においても有用な細胞源である。幹細胞の培養技術とその分化技術がより一層発展し、幅広い研究分野への応用と社会への貢献を期待したい。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（植山（鳥羽）由希子）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	水口　裕之
	副 査	教授	近藤　昌夫
	副 査	教授	深田　宗一朗

論文審査の結果の要旨

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薬物動態・安全性評価などの非臨床試験は医薬品開発に必要不可欠な試験である。しかし、現在汎用されているヒト初代培養肝細胞はロット間差や価格、培養に伴う肝機能低下などの課題を有するため、大規模な動態・毒性試験を実施することは困難である。したがって、新薬開発過程の低コスト化・効率化を実現させるためには、均質かつヒトの生体に近い性質を有した肝細胞を供給できる基盤技術が必要である。これらの理由から、近年、ヒト初代培養肝細胞に代わる新しい肝細胞供給源の創出が試みられてきた。特に、細胞増殖性を有した幹細胞は、分化・成熟化を経ることにより特定の体細胞を均質かつ大量に供給可能な細胞であり、医薬品開発過程に有用であると考えられている。すなわち、新薬開発過程の早期の段階で幹細胞由来モデル細胞を使用することにより、薬効や毒性、薬物動態を確実にスクリーニングできれば、医薬品の安全性が確保され、開発コストが削減されることなどが期待される。

創薬研究に資する新たな肝細胞モデルの確立を目的とし、幹細胞から肝細胞への分化誘導技術の改良と開発を行った。研究対象として用いた幹細胞は、ヒトinduced pluripotent stem（iPS）細胞とヒト肝臓オルガノイドである。ヒトiPS細胞を用いた研究では、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化途中段階にある肝幹前駆細胞に着目し、高効率に肝幹前駆細胞を作製する技術の開発を通して、高機能な肝細胞の作製を試みた。さらに、ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞（ヒトiPS細胞由来肝細胞）の成熟化と機能維持を可能にするため、適切な培地の選択を試みた。また、新たな生体材料であるHYDROXによる三次元培養を取り入れることで、ヒトiPS細胞由来肝細胞の高機能化を目指した。ヒト肝臓オルガノイドを用いた研究では、汎用性と機能を兼ね備えた肝細胞の作製法の開発に取り組んだ。

本検討により以下の結果を得た。

1. 従来のヒトiPS細胞から肝幹前駆細胞への分化誘導法ではFibroblast growth factors（FGFs）とBone morphogenic proteins（BMPs）を併用することが一般的であったが、FGFsを添加しないことにより高効率に肝幹前駆細胞を分化誘導できることを示した。さらに、BMP4単独作用により分化誘導した肝幹前駆細胞は、従来法より高機能な肝細胞へと分化することを明らかにした。
2. 5種類の市販の培地を比較検討した結果、ヒトiPS細胞由来肝細胞の成熟化と維持にはHepatocyte culture medium（HCM, Lonza社）が最適であることを示した。
3. HYDROX上に播種した細胞は凝集体を形成し、HYDROX培養したヒトiPS細胞由来肝細胞スフェロイドはアルブミン産生能や薬物代謝酵素活性などの肝機能をより高く保持することが示唆された。
4. 独自のスクリーニングにより決定したヒト肝臓オルガノイドの成熟化条件により得られた肝細胞は、肝細胞マーカーや薬物代謝・抱合酵素を発現し、その一部はヒト初代培養肝細胞に匹敵する水準であった。さらに、ヒト肝臓オルガノイド由来肝細胞は薬物誘発性肝障害のスクリーニングに応用可能であること、長期培養が可能であることなどを示した。

以上、本成果はヒトiPS細胞由来肝細胞や肝臓オルガノイドの社会実装の実現へ向けた道筋を示したことから極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。