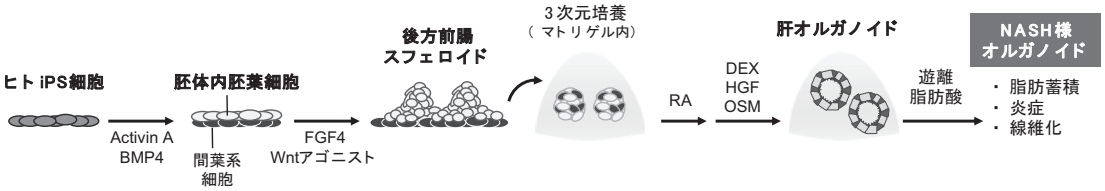
161　オルガノイドを用いた脂肪肝炎の多細胞連携基盤の解明	米山　鷹介

【目的】近年、生活習慣病や糖尿病を背景として急増している非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：NASH）は、単純な脂肪肝から発展して、炎症や線維化を伴う進行性の慢性疾患である。NASH は高頻度で肝硬変や肝がんを発症するため、治療介入が必須であるものの、現在までに有効性の高い治療法が存在しないことが問題となっている。NASH に関する従来の研究は、主にモデル動物を用いて行われてきたが、ヒトの病態を十分に再現できないために、病態メカニズムの理解や薬剤開発には至っておらず、炎症や線維化などの複雑な病態を再現できるヒト肝臓モデルの開発は喫緊の課題となっている。NASH の病態は、肝細胞の脂肪蓄積、クッパー細胞が起点となって惹起される炎症反応、肝星細胞による細胞外基質の産生、といった複数種類の細胞の応答が連鎖して形成される。したがって、このようなヘテロな細胞間相互作用の観点から、NASH 発症機構をヒトレベルで理解することは、治療開発を前進させる上で極めて重要と考えられる。そこで本研究では、1. ヒト iPS 細胞から、NASH 病態に特徴的な脂肪蓄積、炎症、線維化を誘導できる多細胞系肝臓オルガノイドを創出するための培養システムを開発するとともに、2. ヒト肝臓オルガノイドを用いて、NASH の病態進展の起点となる細胞間相互作用の破綻をシグナル分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト iPS 細胞から、胚体内胚葉細胞、後方前腸を経て、非実質細胞群を含む多細胞系の肝臓オルガノイドを誘導した。構築したオルガノイドの構成細胞種を、免疫染色法および遺伝子発現解析によって評価した。脂肪蓄積を起点とした炎症・線維化を誘導するために、肝臓オルガノイドを遊離脂肪酸で処理し、シングルセルトランスクリプトームを含む遺伝子発現解析と免疫組織学的解析により、炎症マーカーおよび線維化マーカーの発現を評価した。

【結果】炎症や線維化を再現可能な肝臓オルガノイドを創出するために、ヒト iPS 細胞から、肝細胞に加えて、クッパー細胞や肝星細胞などの複数種類の細胞を同時に分化させる手法をとった。すなわち、前腸内胚葉の形成や、マクロファージ・肝星細胞の分化に重要とされるレチノイン酸シグナルに着目し、オルガノイドの形成初期にレチノイン酸を一過的に導入することで、複数系譜の細胞を同時に創出する手法を確立した。この肝臓オルガノイドに遊離脂肪酸を長期間暴露すると、肝細胞内への脂肪蓄積に引き続き、炎症性サイトカインの発現が上昇するとともに、線維化を示す病理的変化が起こることを見出した。この NASH に類似した表現型が引き起こされる多細胞連携基盤を明らかにするために、オルガノイドに発現する分泌因子をスクリーニングした結果、成長因子 X が抗線維化活性を有すること、また遊離脂肪酸処理によってその発現が顕著に抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、本手法によるヒト肝臓オルガノイドをモデルとして、成長因子 X シグナルの異常が炎症・線維化の起点となっている可能性が示唆されるとともに、本成果は NASH 治療に対して臨床病態への外挿性に優れた創薬ツールを提供でき、治療法の開発に今後大きく貢献すると考えられる。

NASH における多細胞連携基盤に対する、ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドを用いたアプローチ



161. オルガノイドを用いた脂肪肝炎の多細胞連携基盤の解明

米山　鷹介

東京医科歯科大学 統合研究機構 先端医歯工学創成研究部門 創生医学コンソーシアム

Key words：オルガノイド，非アルコール性脂肪性肝炎，線維化，iPS 細胞，細胞間相互作用

緒　言

近年、生活習慣病や糖尿病を背景として、多量飲酒歴が無いにも関わらず肝臓に脂肪が蓄積してしまう非アルコール性の脂肪性肝疾患が急増している。脂肪性肝炎の中でも、非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：NASH）は、単純な脂肪肝から発展して、肝臓の炎症や線維化を伴う進行性の慢性疾患である。NASH は高頻度で肝硬変や肝がんを発症するため、治療介入が必須であるものの、現在までに有効性の高い治療法が存在しないことが問題となっている［1］。NASH に関する従来の研究は、主にモデル動物を用いて行われてきたが、ヒトの肝炎・線維化病態を十分に再現できないために、ヒト NASH 病態の理解や薬剤開発には至っていない。また、脂肪肝から NASH へ移行する進展度合いには大きな個人差があることが知られており［2］、個々の患者で起こる炎症や線維化などの病態を再現できるヒト肝臓モデルの開発は喫緊の課題となっている。

NASH の病態は、肝細胞の脂肪蓄積、肝臓常在性マクロファージ であるクッパー細胞が起点となって惹起される炎症反応、肝星細胞による細胞外基質の産生、といった複数種類の細胞の応答が連鎖して形成される。したがって、このようなヘテロな細胞間相互作用の観点から、NASH 発症機構をヒトレベルで理解することは、治療開発を前進させる上で極めて重要と考えられる。本研究では、体内環境を模した三次元培養系において、iPS 細胞などのヒトの幹細胞からミニ臓器を構築するオルガノイド技術を活用することで、1. ヒト iPS 細胞から、NASH 病態に特徴的な脂肪蓄積、炎症、線維化を誘導できる多細胞系肝臓オルガノイドを創出するための培養システムを開発するとともに、2. ヒト肝臓オルガノイドを用いて NASH の病態進展の起点となる細胞間相互作用の破綻をシグナル分子レベルで明らかにすることを目的とした。

方　法

1.　ヒト iPS 細胞から肝臓オルガノイドへの分化誘導

ヒト iPS 細胞の培養は、フィーダーフリーの条件にて行った。ヒト iPS 細胞から肝臓オルガノイドへの分化誘導は、以下のように行った。すなわち、ヒト iPS 細胞に Activin A、BMP4、ウシ胎児血清を添加することにより、胚体内胚葉細胞を誘導した［3］。その後、Wnt アゴニスト、FGF4、BMP 経路阻害剤を添加することにより、後方前腸スフェロイドを得た［4］。得られた後方前腸スフェロイドを Matrigel へ包埋し、レチノイン酸を含む培地で培養した。次に、HGF、Oncostatin M、Dexamethason を添加した肝細胞培養用の培地 HCM（Lonza）で培養することで、肝細胞分化を促進し、最終的に非実質細胞を含む肝臓オルガノイドを構築した。

2.　ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドの免疫染色と、透過型電子顕微鏡による解析

肝臓オルガノイドをパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン切片を作製し、各種マーカー抗体を用いた免疫染色を行った。また、オルガノイドを構成する細胞の形態的特徴を解析するために、固定したオルガノイドの超薄切片を作製し、透過電子顕微鏡（TEM）によって観察した。

3.　ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドにおける遺伝子発現解析

肝臓オルガノイドからトータル RNA を抽出した後、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。各標的遺伝子に対するプライマーを用いて、SYBR Green インターカレーター法による定量 PCR を行った。

4.　ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドのシングルセルトランスクリプトーム解析

肝臓オルガノイドを酵素処理によって単一細胞化した後、合計約 20,000 細胞から 10X Genomics Chromium プラットフォームを用いて、シングルセル RNA-seq ライブラリを作製した。Illumina HiSeq X を用いてライブラリのシーケンスデータを取得した後、Cell Ranger パイプラインによってリードプロセシングを実施した。細胞／遺伝子のフィルタリング、データ統合、スケーリング、クラスタリングおよびデータ可視化は、Seurat v3 を用いて実施した。

結　果

1. ヒト iPS 細胞からの多細胞系肝臓オルガノイドの創出

炎症や線維化を再現可能な肝臓オルガノイドを創出するために、ヒト iPS 細胞から、上皮系の肝細胞に加えて、炎症を惹起するクッパー細胞や線維化を誘導する肝星細胞などの複数種類の細胞を同時に分化させる手法をとった。すなわち、肝臓の発生起源である前腸内胚葉の形成や、マクロファージ・肝星細胞の分化に重要とされるレチノイン酸シグナルに着目し、オルガノイドの形成初期にレチノイン酸を一過的に導入することで、複数系譜の細胞を同時に創出する手法を確立した（図 1a）[5]。各細胞種マーカーの発現解析の結果、構築されたオルガノイドには、肝細胞（Albumin、E-cadherin 陽性）に加えて、クッパー細胞（CD68、CD11b 陽性）や肝星細胞（Vimentin、Desmin 陽性）に類似した細胞群が含まれていることが明らかとなった（図 1b）。さらに、シングルセルトランスクリプトーム解析の結果からも、本オルガノイド系における肝臓特異的な多細胞系譜の存在が裏付けられた。

次に、肝臓オルガノイドの機能的構造が発達しているかどうかを明らかにするために、TEM を用いた微細構造の観察を行った。その結果、肝細胞間には、分泌された胆汁を胆管へ運搬するための毛細胆管が形成されていること、また、肝星細胞には、その特徴であるビタミン A 貯蔵脂肪滴を内包し、コラーゲン分泌能を有していることが明らかとなった（図 1c）。他の結果も併せ、本手法で創出されるヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドは、免疫系細胞を含む非実質細胞が含まれた多細胞系のヒト肝臓モデルであると考えられた。

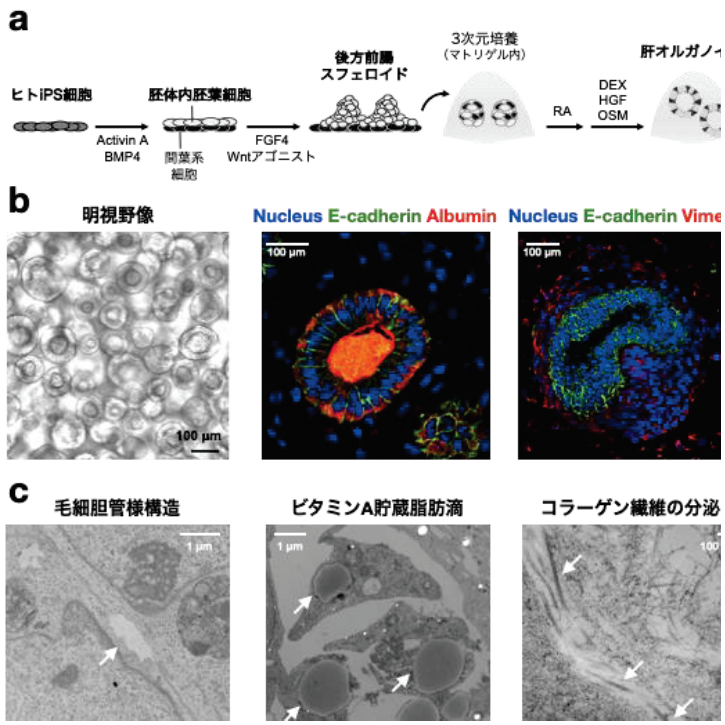


図 1.　ヒト iPS 細胞からの多細胞系肝臓オルガノイドの創出

a）オルガノイドの創出方法の概略図。

b）創出された肝臓オルガノイドの明視野像と蛍光免疫染色像。

c）TEM を用いた肝臓オルガノイドにおける微細構造の観察。

2. ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドへの炎症・線維化の誘導

次に、ヒト肝臓オルガノイドに NASH の特徴である炎症や線維化を誘導するための培養条件を、遊離脂肪酸を中心に検討した。その結果、オレイン酸の添加により、肝臓オルガノイド中に脂肪滴が顕著に蓄積し、その後、TNF-αや IL-8 などの炎症性サイトカインの発現が上昇することを見出した（図 2a、b）[5]。さらに、オレイン酸を添加して 1～2 週間後には、I 型コラーゲン陽性線維が細胞外に蓄積する様子が観察され（図 2c）、*in vitro* において NASH の病態に重要な炎症および線維化を経時的にヒト肝臓オルガノイドに誘導可能であることが示された。

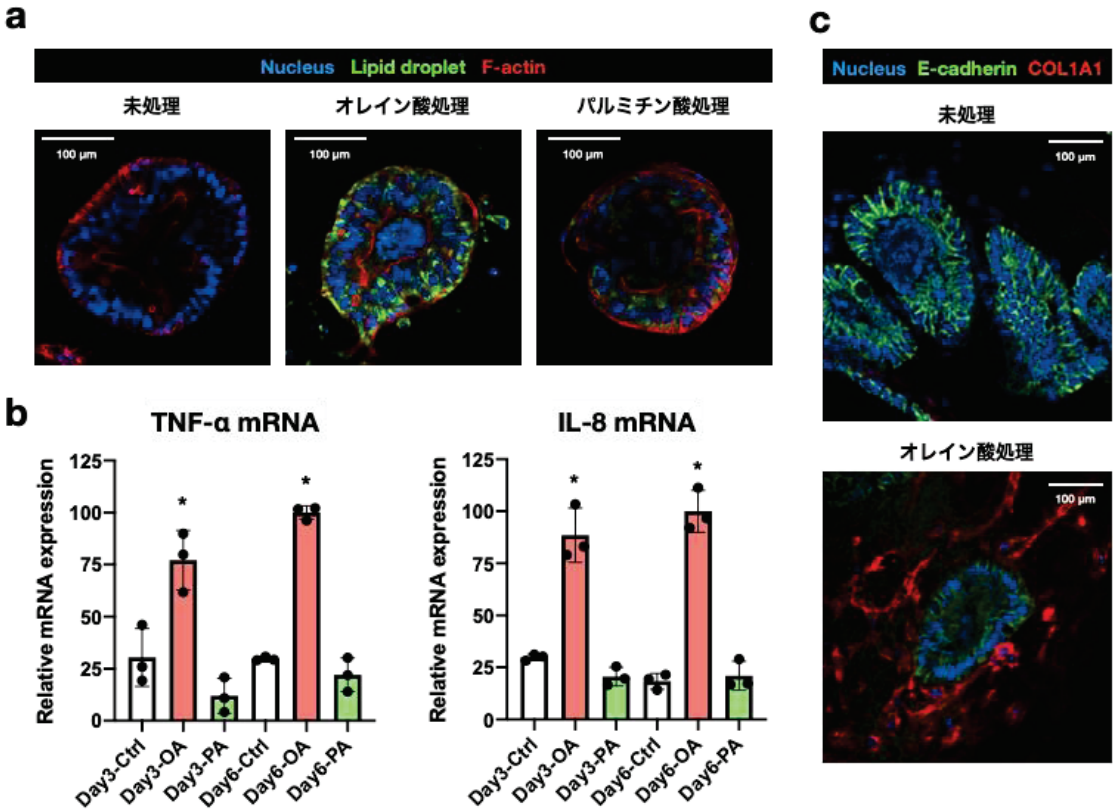


図 2. ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドへの炎症・線維化の誘導

a) オレイン酸、またはパルミチン酸を処理した肝臓オルガノイドにおける、BODIPY を用いた脂肪蓄積の可視化。

b) オレイン酸（OA）、またはパルミチン酸（PA）を処理した際の炎症性サイトカインの遺伝子発現量（ANOVA & Tukey's test、*P＜0.05）。

c) オレイン酸を処理した肝臓オルガノイドにおける COL1A1 染色による線維化の可視化。

3. NASH の病態進展の起点となる細胞間相互作用異常の探索と同定

本 NASH の病態進展に関与する多細胞間相互作用を同定することを目的として、オルガノイド中に発現する分泌因子のうち、オレイン酸処理によって発現が変動するものを、定量 PCR 法によってスクリーニングした。その結果、成長因子 X がオレイン酸の処理によって顕著に減少することを見出した（図 3a）。さらに、オレイン酸処理とともにリコンビナント X を添加すると、オレイン酸単独処理群と比較して、オルガノイド中の脂肪蓄積が低減すること、また、線維化が顕著に抑制されることが示された（図 3b）。成長因子 X の細胞レベルでの作用を詳細に明らかにするために、オレイン酸を処理したオルガノイド、オレイン酸と X を同時処理したオルガノイド、および陰性対象として未処理のオルガノイドをサンプルとして、シングルセル RNA-seq 解析を実施した。現在、各サンプルデータの統合とクラスターの細胞種同定まで完了しており（図 3c）、刺激依存的な遺伝子発現の差を抽出することによって、成長因子 X がどの細胞種にどのような応答を引き起こす結果、線維化が抑制されているのか、分子レベルでのメカニズム解析を進めている。

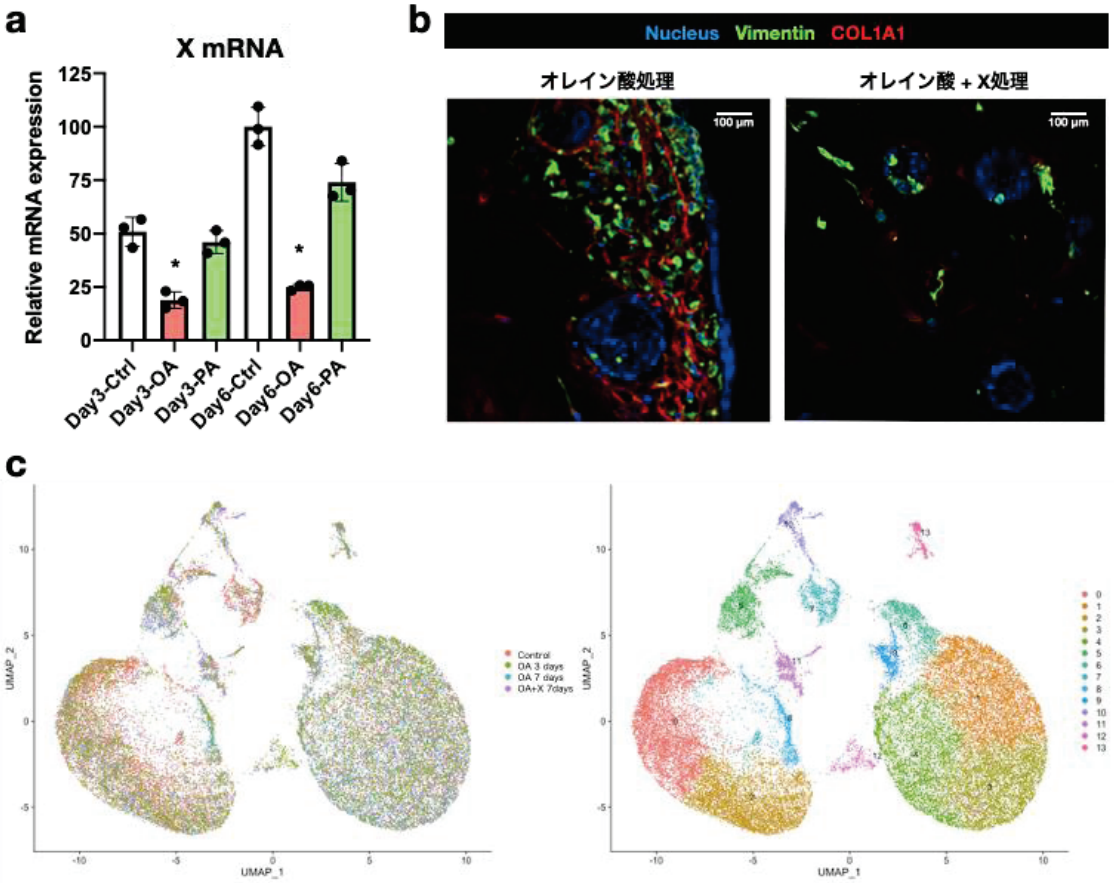


図 3. ヒト肝臓オルガノイドを用いた NASH における多細胞連携基盤の解析

a） オレイン酸（OA）、またはパルミチン酸（PA）を処理した際の X 遺伝子発現量（ANOVA & Tukey's test、*P＜0.05）。

b） オレイン酸または X を処理した肝臓オルガノイドにおける線維化の変化。

c） オレイン酸または X を処理した肝臓オルガノイドのシングルセル RNA-seq 解析。処理ごと（左）、あるいはクラスターごと（右）に色分けした UMAP を示した。

考　察

これまでに、ヒト iPS 細胞から肝星細胞やクッパー細胞を二次元培養系で分化誘導する手法［6, 7］や、ヒト肝細胞と非実質細胞を共培養する手法［8］が報告されているが、いずれも脂肪蓄積・炎症・線維化といった複数の病態が関与する脂肪性肝炎の表現型を再現するには至っていない。それに対して、本研究において開発した肝臓オルガノイドシステムでは、肝星細胞や免疫系細胞などの非実質細胞を含む多細胞系譜を同時に分化させるアプローチをとることにより、様々なヒト iPS 細胞株から肝臓オルガノイドを再現性よく構築することが可能となった。また、NASH に特徴的な炎症や線維化の初期病態を *in vitro* で誘導でき、細胞間相互作用の観点から NASH の病態進展の詳細を分子生物学・細胞生物学的に追跡可能なヒト肝臓モデルとなることが期待される。

本手法の肝臓オルガノイドを用いた分泌因子スクリーニングの結果、成長因子 X が肝臓の線維化を抑制するユニークな活性を有していることが見出された。今後、X の抗線維化作用の基軸となる細胞種や責任シグナル分子が特定されれば、本研究の成果はヒト NASH 治療に対して臨床病態への外挿性に優れた創薬ツールを提供でき、治療法の開発に今後大きく貢献すると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学リサーチコアセンターの酒巻有里子氏、同大学名誉教授の和氣健二郎博士、同大学統合研究機構教授の武部貴則博士である。本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategeies. Nat Med. 2018 Jul;24(7):908-922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9. PMID: 29967350

2) Reimer KC, Wree A, Roderburg C, Tacke F. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic. Hepatol Int. 2020 Jan;14(1):8-23. doi: 10.1007/s12072-019-10001-4. PMID: 31802390

3) D'Amour K, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat Biotechnol. 2005 Dec;23(12):1534-41. doi: 10.1038/nbt1163. PMID: 16258519

4) McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, Tsai YH, Mayhew CN, Spence JR, Zavros Y, Wells JM. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. Nature. 2014 Dec 18;516(7531):400-4. doi: 10.1038/nature13863. PMID: 25363776

5) Ouchi R, Togo S, Kimura M, Shinozawa T, Koido M, Koike H, Thompson W, Karns RA, Mayhew CN, McGrath PS, McCauley HA, Zhang RR, Lewis K, Hakozaki S, Ferguson A, Saiki N, Yoneyama Y, Takeuchi I, Mabuchi Y, Akazawa C, Yoshikawa HY, Wells JM, Takebe T. Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. Cell Metab. 2019 Aug 6;30(2):374-384.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.007. PMID: 31155493

6) Buchrieser J, James W, Moore MD. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Macrophages Share Ontogeny with MYB-Independent Tissue-Resident Macrophages. Stem Cell Reports. 2017 Feb 14;8(2):334-345. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.12.020. PMID: 28111278

7) Coll M, Perea L, Boon R, Leite SB, Vallverdú J, Mannaerts I, Smout A, El Taghdouini A, Blaya D, Rodrigo-Torres D, Graupera I, Aguilar-Bravo B, Chesne C, Najimi M, Sokal E, Lozano JJ, van Grunsven LA, Verfaillie CM, Sancho-Bru P. Generation of Hepatic Stellate Cells From Human Pluripotent Stem Cells Enables In Vitro Modeling of Liver Fibrosis. Cell Stem Cell. 2018 Jul 5;23(1):101-113.e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.027. PMID: 30049452

8) Feaver RE, Cole BK, Lawson MJ, Hoang SA, Marukian S, Blackman BR, Figler RA, Sanyal AJ, Wamhoff BR, Dash A. Development of an in Vitro Human Liver System for Interrogating Nonalcoholic Steatohepatitis. JCI Insight. 2016 Dec 8;1(20):e90954. doi: 10.1172/jci.insight.90954. PMID: 27942596