

主 論 文 要 旨

報 告 番 号	① 乙 第	号	氏 名	五 十 嵐 亮
主 論 文 題 名				
Generation of human adult hepatocyte organoids with metabolic functions (代謝機能を保持した成人肝細胞オルガノイドの樹立法の確立)				
(内 容 の 要 旨)				
肝臓は薬剤や栄養の代謝など、生体の恒常性維持に重要な臓器である。薬剤の開発や病気の理解のために体外培養系は重要なツールであるが、従来成人の肝細胞は増殖困難であり、また培養後数日で肝細胞としての形質を消失するため、試験管内で機能の再現は困難であった。一方、iPS (induced pluripotent stem cell) 由来や胎児肝細胞由来オルガノイドは全般的な機能の成熟は不十分とされている。本研究では成人肝細胞オルガノイドの増殖培養法を確立するとともに、試験管内での分化誘導とともに肝細胞オルガノイドの機能解析系の確立、また肝障害マウスへの生着性を評価することを目的とした。 肝細胞の増殖因子としてOncostatin Mを同定し、凍結初代ヒト肝細胞から成人肝細胞オルガノイドの3ヶ月以上にわたる増殖を可能とした。Oncostatin Mは、体内の定常状態の肝細胞とは異なる上皮細胞様の細胞極性を誘導し、細胞外基質との相互作用に重要なIntegrin-β4を発現していた。また従来の報告通り、YAPの活性化は肝細胞の増殖に寄与するが、胆管上皮化生により肝細胞の形質を消失した。一方、Oncostatin MはYAPによる増殖効果に相乗的に働くとともに、胆管上皮化生を抑制し、肝細胞の形質を維持したままの増殖が可能であった。 分化誘導として増殖に関わるWntやSTAT3を除去し、機能化に重要なホルモンの添加、さらに培地からインスリンやグルコースを除くファスティングを行った。薬剤代謝や蛋白合成、糖新生と尿素の産生、胆汁酸合成などの肝細胞の多様な機能を評価する方法を確立し、分化型肝細胞オルガノイドは生体内に匹敵する機能であることを実証した。これらの機能は3ヶ月以上の長期培養においても維持されていた。また増殖時は上皮細胞様の構造を呈したが、分化誘導により生体内に近似した毛細胆管構造を形成した。 続いて疾患モデルの構築を行った。ゲノム編集により、G6PC (<i>glucose 6-phosphatase alpha</i>) やOTC (<i>Ornithine transcarbamylase</i>) ノックアウトオルガノイドを作成し、先天性代謝性疾患の試験管内での機能の再現を実証した。脂肪性肝疾患の試験管内モデルも構築し、薬剤による反応性も確認できた。 さらに、肝障害を誘導した免疫不全マウスへの移植を行い、短期培養のオルガノイドは生着を認め、移植した肝細胞オルガノイドは毛細胆管構造を再現するとともに、マウス体内における肝臓の部位別の代謝機能の再現を免疫染色で確認した。 本研究は機能を保持したまま肝細胞オルガノイドの長期培養を可能とし、さらに分化誘導により、生体内に匹敵する試験管内での機能解析系を確立した。				