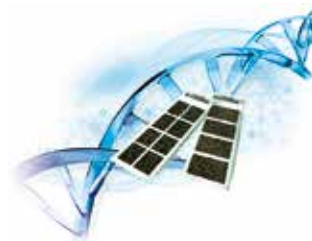




## オルガノイド・臓器原基

iPS 細胞がいよいよ再生医療の分野で使われ始め、大きな進展を見せています。昨今テレビなどでも iPS 細胞を用いた再生医療研究の進展について、京都大学の山中伸弥教授が丁寧に分かりやすく解説されていました。ヒト iPS 細胞から分化させた細胞を用いて加齢黄班変性や心不全の治療を目指す取り組み、ヒト疾患 iPS 細胞モデル、患者が少ない難病の治療薬の開発、これらに続いて取り上げられたのが、iPS 細胞から「ミニ臓器」を作り出す試みです。番組では人体の化学工場と言われる肝臓を立体的な構造として作り出す方法が取り上げられていました。



「ミニ臓器」は専門用語では「organoid (臓器に似た立体構造体)」「organ bud (臓器原器、臓器の芽、器官の原器)」等と記述され、今、最も熱い視線を注がれているといっても過言ではありません。この分野では日本の研究者が世界中で活躍しており、2015 年の Nature のニュース「RISE OF THE ORGANOID<sup>1)</sup>」の中で 10 の論文(2008 年から 2015 年までに報告されたもの)が引用されましたが、そのうち 6 つの論文は日本人が主著となっています。サイエンスの書籍を取り扱う出版社からは 3 次元的な組織構造の再構築を伴う分化誘導の日本語プロトコールも提供されています<sup>2)</sup>。オルガノイドに人為的変異を CRISPR-Cas9 で導入して癌化させる研究の報告も見られるようになりました<sup>3)</sup>。

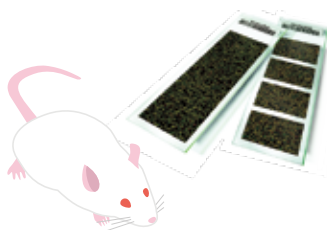
アジレント社は、比較的最新の疾患やがんデータベースの知見を基にプローブ密度を上げた CGH カタログマイクロアレイ、miRNA や lncRNA のデータベースに対応させた高密度カタログアレイ、オリジナリティの高い基礎研究を進めていただくためのカスタムアレイの提供を行っています。今回は、オルガノイド・臓器原基の中から、アジレント社の遺伝子発現マイクロアレイ製品を使用した例を中心に、これらの解析結果を報告した論文をご紹介します。

1) Nature. 2015 Jul 30;523(7562):520-2. Willyard C,

2) 2014 年 羊土社「ES・iPS 細胞実験スタンダード」Ⅲ -11

3) Nature. 2015 May 7;521(7550):43-7 Drost J, et al.,

## 肝障害モデルマウスから肝臓のオルガノイドを創る(網羅的遺伝子発現解析)



Wnt シグナルの標的遺伝子 Lgr5 (ロイシンを豊富に含む G タンパク質共役受容体)は小腸や大腸、胃、毛包内の自己複製組織において活発に分裂している幹細胞のマーカーです。単一の Lgr5 陽性幹細胞クローンを長期培養(毎週継代して 12 ヶ月以上維持)することで、移植可能なオルガノイドを得ることができます。本研究において Huch M *et al.* は、臓器損傷によって Wnt シグナル伝達が強く活性化するとともに Lgr5 陽性細胞が胆管近傍に発現することを見出しました。アジレント遺伝子発現マイクロアレイ解析により、Lgr5 を含む Wnt6 やいくつかの R-spondin および既に腸の陰窩細胞で特徴づけられている多くの Wnt シグナルの標的遺伝子の誘導が認められました。注目すべきことに、静脈周囲の肝細胞では Wnt 標的遺伝子(Gli1/Slc1a2/Rhbg/Cyp1a2)の発現は減少し、静脈周囲の肝細胞の外側で Wnt が活性化されました。

次に彼らは臓器損傷を引き起こす四塩化炭素を投与したマウスからフローサイトメーターで選別した Lgr5-LacZ 陽性細胞由来の単一細胞クローンの培養を行いました。特殊な増殖培地で培養した細胞は急速に分裂し、嚢胞様の構造物を形成し 8 ヶ月以上維持されました。クローンおよび 8 ヶ月後の多くの細胞(約 85%)が正常な染色体数を持つことが核型解析で確認されました。Lgr5 細胞系譜を評価するために、再びアジレントマウス遺伝子発現マイクロアレイを用いてクローン性のオルガノイドの網羅的な遺伝子発現解析が行われ、クローン性のオルガノイドの発現プロファイルが成体肝臓に似ていることが示されました。免疫蛍光染色では Hnf4- $\alpha$ 、アルブミン、側底膜タンパク質 Mrp4 および、タイトジャンクション構成タンパク質 ZO-1 の発現が確認されています。さらに彼らは、肝疾患の遺伝性高チロシン血症 I 型モデルであるフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ (Fah<sup>-/-</sup>) 変異マウスにオルガノイドを移植しています。今回の報告によって、Lgr5 が組織損傷によって活性化される幹細胞あるいは前駆体の程度に応じたマーカーとなりうることを示されました。これらの知見は、臓器から得られる成体幹細胞や前駆細胞を用いた再生医療戦略の発展のために役立つと期待されます。

Nature. 2013 Feb 14;494(7436):247-50. Epub 2013 Jan 27. Huch M, Clevers H.,





## 肝細胞の長期培養とヒト肝臓オルガノイドの作製



肝臓は、主に肝細胞と胆管細胞で構成されていますが、生体内では複製能力があるにもかかわらず肝細胞は1週間を超える長期培養には向いていません。Huch M. *et al.* は最近、成体マウスの腸、胃、肝臓、膵臓の幹細胞を1年以上、培養できたことを報告しており、Lgr5 は、これらマウス組織の成体幹細胞のマーカースとなります。著者らは今回、ヒト肝臓原基を長期培養する方法を確立しました。まずマウス肝臓用培地でヒト肝臓細胞を培養したところ、2, 3 週間しか維持できず、その遺伝子発現プロファイルより、高活性 Tgf- $\beta$  シグナルが高発現していることを見出しました。そこで Tgf- $\beta$  の小分子阻害剤 A8301 を添加すると、6, 7 週間維持すること、コロニー形成効率も高まることを確認しました。さらに Forskolin (cAMP pathway agonist) の添加で、Lgr5 および胆管細胞マーカー KRT19 の発現が上昇し、6 か月間維持することができました。次に著者らはオルガノイドを作製するため EpCAM (上皮細胞接着分子) を用いて、胆管細胞 (EpCAM+) と肝細胞 (EpCAM-) を選別しました。選別した肝細胞からはオルガノイドは形成されませんが、胆管細胞からは約 30% の効率でオルガノイドが形成されました。オルガノイドは正常な染色体数を維持したまま 3 か月培養されましたが (核型分析により確認)、培養あたり 1000 前後の変異が次世代シーケンサ解析により検出され、そのうちの一部は 3 か月の培養中に発生していました。したがって、検出された変異の大部分はその前の組織段階あるいはオルガノイド形成後に発生したことが示唆されています。3 か月の培養中に生じた変異は、iPS 細胞からの分化で一般的に生じる変異の 1/10 に抑えられました。形成されたオルガノイドは成熟肝細胞のマーカース遺伝子を発現していなかったため、機能を持った肝細胞に分化させるため、分化培地で培養すると細胞は多角形の細胞形態を含む明白な肝細胞の形態を獲得しました。アジレント遺伝子発現ヒトマイクロアレイを用いた解析でアルブミン、チトクロム、アポリポタンパク質、補体因子などの肝細胞マーカーが高発現していることを確認しました。作製した肝臓オルガノイドは HepG2 細胞の系統の標準細胞もしくはヒトリアランス細胞と比較すると、強い肝細胞機能を持つことが示されました。生体内での機能を検証するため、肝臓障害を誘導したヌードマウスに肝臓オルガノイドを移植しました。ヒト KRT19 陽性の胆管細胞に似た細胞が移植後に観察され、さらに 7 ~ 14 日で安定したヒトアルブミンの生産を確認しました。また患者由来のオルガノイドも、その疾患特有の変異を保ったまま作製することに成功しました。これらの技術が肝臓疾患のメカニズム解明、薬物試験や肝臓疾患の治療に役立つことが期待されます。

“Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver.” *Cell*. 2015 Jan 15;160(1-2):299-312 Huch M. *et al.*,

## iPS 細胞から organ bud を樹立する手順



Fig. アジレント遺伝子発現ヒトマイクロアレイを用いた、肝細胞特異的な 83 遺伝子のクラスタリング

ALT (30yr) : ヒト成人 (30 歳) の肝臓組織  
 FLC-LB : ヒト胎児肝細胞由来 liver bud  
 iPSC-LB : ヒト iPS 細胞由来 liver bud  
 GSE46631 を弊社 GeneSpring GX で表示。

臓器不全に陥った際、臓器移植は有効な治療方法ですが、移植可能な臓器は圧倒的に不足しています。臓器不足を解消するため、多能性幹細胞の利用が期待されており、現在では iPS 細胞を用いることで患者自身もしくは免疫型が適合した多能性幹細胞を作製できるようになりました。しかし幹細胞から完全に機能する細胞を作製することに成功したプロトコルはありません。Takebe T. *et al.* はこれまで、ヒト iPS 細胞由来肝性内胚葉細胞 (iPSC-HEs) を臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) および間葉系幹細胞 (MSCs) と共に培養することで立体的な organ bud (iPSC-LB : liver bud) ができることを報告しています。今回のプロトコルはヒト iPS 細胞から肝臓の原基を作製する手順と様々な部位への移植についてまとめています。二段階の手順を踏み iPSC-HEs を樹立し、前駆細胞では発現が低く肝細胞特異的に発現する遺伝子 HNF4A などの発現を確認することで、肝細胞への分化を確認しています。著者らは iPS 細胞の分化段階で免疫染色や遺伝子発現解析を行い、分化状態を確認することを強く推奨しています。また移植後に適切な血管新生が進むよう、HUVECs および MSCs の培養に注意を払う必要があることも指摘しています。iPSC-HEs を HUVECs および MSCs とともに特殊なゲルで培養すると、細胞は数時間以内に 3D 組織化を開始し、48 時間以内に 3D 肝芽が形成されます。前報<sup>\*</sup> ではアジレント遺伝子発現ヒトマイクロアレイを用い、このようにして作製された iPSC-LB の網羅的な遺伝子発現解析を行っています。著者らは iPSC-LB を免疫不全マウスに移植し、48 - 72 時間で移植した iPSC-LB の脈管に血液が流れていることを確認しました。またマウスの様々な部位に移植した iPSC-LB がヒト特異的アルブミンを生産していることも確認し、臓器の一部機能を有していることを示しました。今後、臓器不全に対する治療に変革がもたらされることが期待されます。

※ *Nature*. 2013 Jul 25;499(7459):481-4. Takebe T. *et al.*  
 “Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.” *Nat Protoc*. 2014 Feb;9(2):396-409. Takebe T. *et al.*,

アジレントゲノミクス関連製品サイト : <http://AgilentGenomics.jp>



[ お問い合わせ窓口 ]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1  
 ●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111  
 mail : email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。  
 ※本資料掲載の製品は全て研究用です。  
 その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://AgilentGenomics.jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2016  
 Printed in Japan, June, 20, 2016

