iPS 細胞由来の肝臓オルガノイドを用いた 酵素補充療法の開発

東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究センター 再生医学分野^{*1)}・横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学^{*2)}

上野康晴^{*1)}・谷口英樹^{*1,2)}

Development of enzyme replacement therapy using liver organoids derived from human iPS cells

Ammonia is a toxic substance that results from the metabolism of proteins. The liver is responsible for the metabolism of ammonia, which can be harmful to the body. Within hepatocytes, toxic ammonia is converted into urea, by the action of the multiple enzymes involved in the urea cycle, and subsequently excreted in urine. However, patients with gene mutations in their urea cycle enzymes have abnormal ammonia metabolism, which leads to hyperammonemia. While liver transplantation is the best option for treating urea cycle disorders, it is limited by donor availability. Following the advances in stem cell technology, a new method has been developed to create a three-dimensional tissue (an organoid) with functional liver characteristics. Because this organoid is generated from human iPS cells, using it avoids donor availability issues. In this paper, we outline the research progress on urea cycle disorders and discuss the possibility of treating them using organoids derived from human iPS cells.

肝臓は生体に有毒なアンモニアの代謝を担う重要な臓器である。アンモニアは肝細胞の尿素サイクル(Urea Cycle)において、複数の酵素の働きにより無毒な尿素へと変換され、尿に排出される。しかしながら、尿素サイクルを構成する酵素に遺伝子変異をもつ患者では、アンモニア代謝に異常が生じ、高アンモニア血症を示す。現時点において尿素サイクル異常症の唯一の根治療法は生体肝移植であるが、ドナーの負担が大きい課題が存在する。一方、幹細胞研究の発展により、ヒト iPS 細胞等の多能性幹細胞を用いてオルガノイド(organoid)と呼ばれる生体組織と類似した三次元組織を人為的に形成する技術が開発され、移植医療の新たな細胞源として注目されている。本稿では、尿素サイクル異常症に対する研究進展を概説するとともに、ヒト iPS 細胞由来オルガノイドを用いた新たな再生医療の可能性について論じる。

Yasuharu Ueno^{*1)}, Hideki Taniguchi^{*1,2)}

Keywords: human iPS cell, Organoid, Urea Cycle disorder, Organoid transplantation

1. 肝臓におけるアンモニア代謝の意義

成人の身体の約15%はタンパク質で構成されており、タンパク質の新生・分解は生体の恒常性維持において重要な役割をもつ。成人では、1日に約200 gのタンパク質を合成しており、この量と見合うタンパク質が毎日分解され、アミノ酸が生成される¹⁾。これにより、余剰なタンパク質の処理や新た

なタンパク質の新生が進行している¹⁾。生体内でのアミノ酸の供給源としては、生体を構成するタンパク質に由来するもののほか、食事由来のアミノ酸があり、これらは生体内でアミノ酸プール(細胞質および体液中の遊離アミノ酸)を形成している。アミノ酸プールは、タンパク質新生以外にも糖新生や尿素合成に利用され、エネルギー代謝や核酸代謝などさまざまな代謝に利用されている。

アミノ酸の代謝過程(異化過程)はアミノ基の除去と炭素骨格の除去の2段階に分類されるが、このうちアミノ基の分解過程においては余剰窒素から神経毒性を有するアンモニアが生成される。そこで、生

^{*1)} Division of Regenerative Medicine, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

^{*2)} Department of Regenerative Medicine, Graduate School of Medicine, Yokohama City University

体はアンモニアを速やかに無毒な物質に変換するための機構や生体外に排出するための機構を備えている²⁾。骨格筋などの末梢組織において生じるアンモニアの多くは、グルタミン合成酵素によりグルタミン酸と結合して無毒なグルタミンに変換され、血液を介して門脈より肝臓に運搬される。肝臓では門脈周囲の肝細胞がグルタミナーゼや尿素サイクルを構成する酵素を発現し、グルタミンからのアンモニア生成、尿素サイクルを介した尿素生成が進行する³⁾。尿素サイクルが機能するためにはATPを必要とするが、ラットを用いた検討からは、全身で消費されるATPの約15%が尿素産生に使用されていることが明らかとなっている⁴⁾。尿素サイクルによるアンモニア代謝は、生体の恒常性維持において重要な機能を担っている。

2. 尿素サイクル異常症

尿素サイクルは複数の酵素の一連の反応により進行する⁵⁾。尿素サイクルは主に5つの酵素で構成さ

れ、肝細胞のミトコンドリアおよび細胞質でアンモニア代謝が進行する(図1)。

尿素サイクルの最初の反応は、カルバミルリン酸合成酵素1(CPS1)により進行し、アンモニアと重炭酸からカルバミルリン酸が生成される。その後、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)の働きにより、カルバミルリン酸とオルニチンからシトルリンが生成される。その後、アルギニノコハク酸合成酵素1(ASS1)およびアルギニノコハク酸リアーゼ(ASL)によりアルギニンが生成され、アルギナーゼ(ARG)の作用により、尿素とオルニチンが生成される。オルニチンはOTCによるカルバミルリン酸からシトルリンを生成する際に利用され、一連の回路が形成されている。アンモニアを尿素に変換するためには尿素サイクルを構成するすべての酵素が機能する必要があるが、いずれかの酵素に遺伝子変異が生じるとアンモニアや代謝前駆体が蓄積し、尿素サイクル異常症を示す。尿素サイクル異常症患者においては、血中アンモニア値の増加とともに変異を受けた遺伝子ごとに特徴的な代謝異常が認められる

図1 尿素サイクル

表1 尿素サイクル異常症における代謝異常

疾患	代謝異常
カルバミルリン酸合成酵素1 (CPS1) 欠損症	血中アンモニア濃度増加 血中シトルリン濃度低下
オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症	血中アンモニア濃度増加 血中シトルリン濃度低下 尿中オロト酸濃度増加
アルギニノコハク酸合成酵素1 (ASS1) 欠損症	血中アンモニア濃度増加 血中シトルリン濃度増加
アルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) 欠損症	血中アンモニア濃度増加 血中アルギニノコハク酸濃度増加 血中シトルリン濃度増加
アルギナーゼ (ARG) 欠損症	血中アンモニア濃度増加 血中アルギニン増加 血中オルニチン低下

(表1)。例えば、CPS1欠損症やOTC欠損症患者においては、アンモニア値の増加に加えてシトルリン量の低下が観察される。

また、OTC欠損症患者においては、カルバミルリン酸からシトルリンの生成が低下し、代謝前駆体となるオロト酸(Orotic Acid)値の増加が認められる。これらの代謝物、代謝前駆体の値は尿素サイクル異常症の診断において有益な指標となる。なお、尿素サイクル異常症の臨床症状は、高アンモニア血症により生じる脳水腫やそれに伴う嗜眠、食欲不振、過換気または低換気、低体温、痙攣、神経学的異常姿勢、昏睡などである。尿素サイクル異常症の多くは新生児期に発症するが(新生児期発症型)、乳児期以降に高タンパク食の摂取や感染を契機に症状が現れる(遅発型)。尿素サイクル異常症の発生頻度は1/80,000人程度であり希少疾患であるが、特に新生児期発症のOTC欠損症、CPS1欠損症では死亡例が少なくないため、治療法の確立が急務である⁶⁾。

3. 尿素サイクル異常症に対する治療法

3-1. 尿素サイクルの活性化促進、代謝代替経路の賦活化促進による治療法

尿素サイクル異常症は尿素サイクルを構成する酵素活性の機能不全に起因することから、治療においては、原因となるアンモニア量を低減しながら酵素機能を補充する必要がある。臨床においては、生体内におけるアンモニア生成を抑制する目的で、低タ

ンパク質・高カロリー食による食事制限が行われる。また、酵素活性を賦活化するための薬剤投与が行われる。例えば、尿素サイクルを構成する酵素のうち、カルバミルリン酸合成酵素1(CPS1)は、N-アセチルグルタミン酸(NAG)を補酵素として用いることが知られている。そこで、NAGの構造類似体であるカルグルミン酸(薬剤名：カーバグル)を投与し、CPS1活性を亢進させる治療が試みられている⁷⁾。

一方、尿素サイクルに依存しないアンモニアの排出経路(代謝代替経路)の存在が見出されている。例えば、アンモニアの材料となるグルタミンは、フェニル酪酸と結合することで尿移行性を示すフェニルアセチルグルタミンに変換されることが示されている。また、アンモニアの代謝中間物質であるグリシンは、安息香酸と結合し、尿移行性を示す馬尿酸に変換されることが明らかとなっている。そこで、フェニル酪酸(薬剤名：ブフェニール)や安息香酸ナトリウム(未承認薬)などの経口投与薬が開発されている⁸⁾。

これらの代謝代替経路の賦活化は尿素サイクル異常症に対して一定の効果を示すものの、急性期の高アンモニア血症の治療には十分ではなく、治療効果が限定的である。また、食事療法の併用や生涯にわたる服用が必要であり、患者負担が大きい課題がある⁹⁾。

3-2. 肝細胞移植

コラゲナーゼ灌流により、肝臓組織より肝細胞を

分離する手法が開発されて以来、欧米を中心として肝疾患に対する肝細胞移植治療が検討されている。これまでに、UDP グルクロン酸転移酵素欠損ラットを対象とする同種同系の正常肝細胞移植が行われ、移植後に血清ビリルビン値が軽減することが確認されている¹⁰⁾。さらに、OTC欠損症やCrigler-Najjar症候群1型等のヒトの先天性代謝異常症等を対象とする約100例の肝細胞移植が報告されている¹¹⁾。しかしながら、肝細胞を肝臓内で長期間生着させることは困難である等の課題があり、肝細胞移植は肝臓移植までの間の症状悪化の防止(移植までの橋わたし)を目的とした治療となっている。

尿素サイクル異常症を対象とする肝細胞移植については、2010年時点において、OTC欠損症で6例、CPS1欠損症で1例、ASL欠損症で1例の移植の報告がなされており、これらの患者で移植後にアンモニア値の低下が報告されている^{12,13)}。また、国内においても笠原らにより OTC欠損症患者への肝細胞移植が実施されている¹⁴⁾。これらの臨床研究では、各患者に対して肝細胞移植が2~15回施行され、門脈を介して計 $0.56\sim4\times10^9$ cells/bodyの肝細胞が肝臓内に移植されている。アンモニアアタックを回避するためには1時間あたり、アンモニア $2\mu\text{mol/kg}$ の代謝が必要であることが報告されており、成体肝細胞数として 1.75×10^7 cells以上の数の肝細胞を移植する必要があると考えられている¹⁵⁾。これらの移植に用いる肝細胞は主に生体肝移植時の残余組織が用いられているが、本邦では生体ドナーからの肝細胞供給数に限りがあり、代謝機能を有するヒト肝細胞の安定的な入手に課題がある。ヒト肝細胞の供給源を拡大するため、iPS細胞等の多能性幹細胞を用いた再生医療の発展が求められている。

3-3. 遺伝子治療

尿素サイクル異常症は単一酵素の遺伝子欠損に起因することから、肝細胞を対象とした遺伝子治療の開発が試みられている。アデノウイルス(AV)ベクターを用いた遺伝子治療はその黎明期から進められ、複数の臨床試験が実施されている。しかしながら、1997年のペンシルバニア大学における OTC欠損症患者を対象とした臨床試験において、AVの

生体毒性に起因する有害事象が発生し、安全性の確保が重要な課題として浮き上がっている¹⁶⁾。その後、生体毒性が低いアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子治療の開発が進められ、肝臓に感染指向性を示す AAV のセロタイプが同定されたことなどにより、肝疾患治療への応用が進められている。2011年には血友病Bを対象とする AAVを用いた遺伝子治療で有効性が確認されている¹⁷⁾。AAVベクターは肝疾患を対象とする遺伝子治療用ベクターとして優れた特性をもつと考えられている。

しかしながら、AAVベクターは感染細胞において主に染色体外に存在するため、感染細胞の細胞分裂に伴いコピー数が低下する課題がある¹⁸⁾。また、ベクター投与後に AAV のキャプシド等に対する中和抗体が形成され、反復投与が困難である等の課題がある。遺伝子治療の実用化のためには、これらの課題を解決する必要がある。

3-4. 生体肝移植

現時点において肝移植は尿素サイクル異常症の唯一の根治療法である。これまでに、肝移植は世界で39,000例以上、国内においても2018年末までに成人・小児を合わせて延べ9,600例以上の肝移植が実施されている^{17,18)}。尿素サイクル異常症患者を対象とする肝移植においては、2012年時点で OTC欠損症に対して51例、CPS1欠損症に対して12例の生体肝移植が行われ、良好な成果が得られている^{19,20)}。これらの臨床研究では肝移植後の10年生存率が90%以上であることや、重篤な高アンモニア血症の発生頻度の低減が示されている²¹⁾。

一方、生体肝移植では、グラフトを受け入れるための腹腔容積が必要であるため、生後約半年以降の患者に適応が限定される課題がある。腹腔容積が確保できるまでの間はブリッジ治療を行う必要がある。食事制限や薬剤治療により病態の悪化を抑える必要がある。なお、尿素サイクル異常症は遺伝性の疾患であるため、親がキャリアである可能性が高い。生体肝移植のドナーは親族となることが多いが、キャリアからの肝臓採取にはリスクが伴うため、ドナーの選択に制約が生じる課題もある。生体肝移植

は著明な治療効果を得ることができる反面、治療開始時期の制約やドナー負担の課題が存在する。生体肝移植の代替手法の確立に期待が寄せられる。

4. ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドを用いた尿素サイクル異常症の治療法開発

4-1. ヒト iPS 細胞オルガノイド再構成技術の開発

ヒト iPS 細胞は自己複製能と分化多能性を併せもち、再生医療の細胞源として期待されている。一方で、プライマリ細胞等を用いたこれまでの検討において、細胞移植は臓器移植と比べて移植後の生着・機能発現に課題が存在する。ヒト iPS 細胞を用いた移植医療の実現化のためには、組織・臓器の再構成技術の確立が重要となっている²²⁾。

筆者らのグループは、肝臓の発生過程において生じる複数の系譜の細胞の相互作用に着目し、ヒト iPS 細胞を用いて肝臓の発生過程を再現することを試みた(図2)^{23,24)}。すなわち、肝発生初期における前腸内胚葉細胞、未分化血管内皮細胞、間葉系幹細胞の細胞間相互作用を *in vitro* で再現し、肝臓の器官原基(肝芽)を人為的に再現するための培養系を開発した。ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝内胚葉細胞を間葉系細胞、血管内皮細胞とともに三次元的に共培養したところ、培養早期より自立的な凝集が生じ、立体的な肝臓原基(ヒト iPSC 肝芽)が再構成されることが明らかとなった(図2)。また、ヒト iPSC 肝芽を肝不全を背景にもつ免疫不全マウスに移植すると、このモデル動物の生存率が著しく改善されることが確認された²³⁾。さらに、ヒト iPS 細

立体的なヒト肝臓原基の形成過程

図2 iPS 細胞を用いた肝臓の発生過程の再現

図3 代謝フラックス解析に基づく OTC 酵素活性評価系の構築と解析結果

胞より間葉系細胞(MC)や血管内皮細胞(EC)を分化誘導する培養法を開発し、すべてが iPS 細胞に由来するヒト iPSC 肝芽を再構成する手法を確立した²⁵⁾。すべてがヒト iPS 細胞に由来するヒト iPSC 肝芽は免疫不全マウスの生体内で長期間維持され、肝不全マウスへの移植時に生存率を改善する効果が確認された。ヒト iPSC 肝芽は尿素サイクル異常症などの肝疾患に対する再生医療のための新たな細胞源として期待される。

4-2. ヒト iPS 細胞オルガノイドの代謝特性の検討

ヒト iPSC 肝芽移植による尿素サイクル異常症の治療法開発においては、ヒト iPSC 肝芽のアンモニア代謝機能を正確に評価する必要がある。尿素サイクルは複数の代謝酵素の働きにより、アンモニアがさまざまな代謝中間物質に変換され、代謝が進行する。尿素サイクルの代謝状態を評価するためには、肝細胞内での各代謝物質の濃度を測定することが有効であり、比色法²⁶⁾や HPLC 法²⁷⁾による定量が行われている。しかしながら、これらの手法では尿素サイクルの代謝状態の全体像を捉えることができない

課題がある。そこで、筆者らは、質量分析装置を用いて尿素サイクルのさまざまな代謝中間物質を網羅的に定量し、尿素サイクルを対象とする包括的なメタボローム解析系を構築してきた。

筆者らは、タンデム四重極型質量分析装置を用いて、尿素サイクルを構成する 20 以上の分子を特異的かつ定量的に解析する評価系を構築した。また、解析対象とする酵素の基質となる分子の安定同位体を用いて、尿素サイクルの律速酵素の酵素活性を感度よく定量するための代謝フラックス解析系を構築した(図3)。これらの代謝評価系を用いることにより、ヒト iPS 細胞より創出された肝細胞や肝芽のアンモニア代謝能を高感度に評価することが可能となり、数千個程度の細胞や少数の肝芽を対象として代謝評価が可能となった。代謝フラックス解析の結果、ヒト iPSC 肝芽は成体肝細胞の約 1/3 の OTC 活性、約 1/2 のアンモニア代謝機能を有することが明らかとなった(図3)。ヒト iPSC 肝芽は OTC 欠損症をはじめとする尿素サイクル異常症の治療のための移植細胞に必要な代謝特性を有することが確認された。

5. 今後の展望

肝臓オルガノイド移植に基づく 尿素サイクル異常症治療法の確立への期待

ヒト iPSC 肝芽はアンモニア代謝機能を有しており、尿素サイクル異常症に対する酵素補充を目的とした移植細胞源として有益である。ヒト肝細胞を対象とした試算より、尿素サイクル異常症のアンモニアアタックを回避するためには1時間あたり、アンモニア2 $\mu\text{mol/kg}$ の代謝が必要であることが示されている⁹⁾。ヒト iPSC 細胞のアンモニア代謝機能が成体肝細胞の約1/2であることから、患者の体重1 kg あたり、肝内胚葉細胞数として 3.5×10^7 cells 以上の数の肝細胞(肝芽数として7万個/kg)を移植する必要があると考えられる。そのため、ヒト iPSC 肝芽を安定的かつ大量に製造するための製造体系の整備が重要である。筆者らの研究グループは、すでに乳幼児時期の尿素サイクル異常症患者への移植に必要な肝芽を臨床グレードで製造するための基盤構築を完了しており、臨床試験の準備を進めている。尿素サイクル異常症患者に対するヒト iPSC 肝芽移

植の実現に向けた研究開発を強力に推進している。

ヒト iPSC 肝芽は複数の系譜細胞により構成される独自性の高いオルガノイドである。ヒト iPSC 肝芽は肝臓機能に重要なさまざまなタンパク質を産生するほか、肝臓が有する複数の代謝機能を有しており、尿素サイクル異常症以外の肝疾患への応用も期待される。ヒト iPSC 肝芽の分化誘導技術や移植技術の最適化を進めることにより、他の疾患への適応拡大が望まれる。肝疾患においては、肝硬変症や非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis : NASH)など、多くの罹患者をもつ疾患で有効な治療法が確立されていない課題がある。ヒト iPSC 肝芽はこれらの疾患に対する新たな移植細胞源として期待が寄せられる。なお、ヒト iPSC 細胞は高い増殖性を示し、ゲノム編集の対象として好適である。ゲノム編集技術は近年目覚ましい発展を遂げ、安全性が向上しつつある。ゲノム編集により特性改変を施したヒト iPSC 細胞は、酵素補充等を目的とするさまざまな疾患の治療に有効である可能性がある。ヒト iPSC 細胞を用いたオルガノイド創出技術の臨床応用に大きな期待が寄せられる。

文献

- 1) Mizushima N., *Cell Death Differ.*, **2**, 1535-1541 (2005)
- 2) Matsumoto S., *et al.*, *J. Hum. Genet.*, **64**, 833-847 (2019)
- 3) Ben-Moshe S., *et al.*, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 395-410 (2019)
- 4) Schneider W., *et al.*, *Cell Biochem. Funct.*, **8**, 227-232 (1990)
- 5) In: *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. 2003 Apr 29 [updated 2017 Jun 22]
- 6) Kido J., *et al.*, *World J. Hepatol.*, **9**, 343-348 (2017)
- 7) Chapel-Crespo C.C., *et al.*, *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.*, **11**, 467-473 (2016)
- 8) Lichter-Konecki U., *et al.*, *Mol. Genet. Metab.*, **103**, 323-329 (2011)
- 9) Enosawa S., *et al.*, *Cell Med.*, **3**, 13-18 (2012)
- 10) Matas A.J., *et al.*, *Science*, **192**, 892-894 (1976)
- 11) Hughes R.D., *et al.*, *Transplantation*, **93**, 342-347 (2012)
- 12) Dhawan A., *et al.*, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 288-298 (2010)
- 13) Enosawa S., *et al.*, *Liver Transpl.*, **20**, 391-393 (2014)
- 14) Lehrman S., *Nature*, **401**, 517-518 (1999)
- 15) Nathwani A.C., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **365**, 2357-2365 (2011)
- 16) Mingozzi F., *et al.*, *Annu. Rev. Virol.*, **4**, 511-534 (2017)
- 17) Optn.transplant.hrsa.gov and OPTN/SRTR Annual Report <https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics/data.html> (最終閲覧日: 2020年8月25日)
- 18) 2019臓器移植ファクトブック <http://www.asas.or.jp/jst/pdf/factbook/factbook2019.pdf> (最終閲覧日: 2020年8月25日)
- 19) 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業(平成25年度難治性疾患克服研究事業)「先天代謝異常症に対する移植療法の確立とガイドラインの作成に関する研究 ガイドライン Ver1.0 <http://jlts.umin.ac.jp/images/guidelinesver1.0.pdf> (最終閲覧日: 2020年8月25日)
- 20) Wakiya T., *et al.*, *Pediatr. Transplant.*, **16**, E196-200 (2012)
- 21) Kido J., *et al.*, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **35**, 777-785 (2012)
- 22) Takahashi Y., *et al.*, *Cell Rep.*, **23**, 1620-1629 (2018)
- 23) Takebe T., *et al.*, *Nature*, **499**, 481-484 (2013)
- 24) Takebe T., *et al.*, *Nat. Protoc.*, **9**, 396-409 (2014)
- 25) Takebe T., *et al.*, *Cell Rep.*, **21**, 2661-2670 (2017)
- 26) Harris M.L., *et al.*, *Clin. Chem.*, **26**, 473-479 (1980) PMID 7363468
- 27) Ohba S., *et al.*, *Chromatogr.*, **568**, 325-332 (1991)