

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15434

研究課題名(和文) マイクロ流体デバイスを用いたヒト多能性幹細胞由来胆管疾患解析系の構築

研究課題名(英文) Establishment of human pluripotent stem cell-derived bile ductal disease analysis system using microfluidic device

研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30321904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は生体の代謝維持の中心臓器であり、ヒト多能性幹細胞からミニ肝臓を試験管内で再構成する方法が開発され注目されている。一方で、生体肝臓に必須な胆管等の構造を持たない欠点がある。本研究では、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞から胆管様構造を誘導する系の構築を通じて、ヒト胆管疾患の解析や治療等に適用可能な培養系の構築や流体デバイスを用いたミニ肝組織の効率的な培養法の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：The liver is the central organ of maintenance of the metabolism of the living body, and a method of reconstituting the mini-liver from human pluripotent stem cells in vitro has been developed. On the other hand, it has a disadvantage that it does not have a structure of the functional bile duct network which is important for the function of the liver. In this study, we are developing a culture system that can be applied to the analysis and treatment of human bile duct disease, by constructing a system that induces bile duct like structures from human iPS cell-derived hepatic progenitor cell. We also analyzed about the efficient culture system of mini-liver tissue using fluid devices.

研究分野：肝細胞生物学

キーワード：ヒト多能性幹細胞 肝分化

1. 研究開始当初の背景

胆管は胆汁酸分泌を担う肝臓内の重要な非実質細胞であり、その遺伝子異常や機能破綻は多発性肝嚢胞や胆汁酸性肝障害、胆管癌といった種々の病変を引き起こす。しかし、胆管の発生や機能に関する解析系はマウス等が主で、ヒト肝組織を用いた研究は困難であった。申請者らは、ヒト iPS 細胞から肝前駆細胞を介して胆管様組織を誘導する系を既に構築している。また、ゲノム編集酵素を用いて、ヒト iPS 細胞のゲノム上に任意の変異・遺伝子欠損の誘導を可能としている。

肝臓等の 3 次元組織の血液流路の再構成のためにマイクロデバイスを用いた共培養系が構築されている。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞および胆管細胞をマイクロ流体デバイス内で培養することで、胆管系を保持したヒト肝組織の構築と病態解明を目的とする。

2. 研究の目的

肝臓は、その機能を担う肝実質細胞以外に胆管細胞や類洞血管細胞、星細胞などさまざまな非実質細胞から構成されている。In vitro でこれらの細胞を再構成し人工的な肝臓を再構成する方法がいくつかのグループから報告されており、当研究室でもマイクロ流体デバイス内でヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞等の再構成系の構築を進めている。また、ゲノム領域の任意の配列を切断できる人工ヌクレアーゼによる高効率なヒト ES、iPS 細胞の遺伝子組換え技術が近年確立された。そこで本研究では、これらの技術を組み合わせることで、in vitro 肝臓系を用いたヒト胆管構造形成の分子メカニズム解析や胆管疾患解析への応用を目指す。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞および胆管細胞をマイクロ流体デバイス内で培養することで、胆管系を保持したヒト肝組織の構築と病態解明を目的とする。このために必要な胆管系構築を目的とした培養法の確立を目指す。そこで、マトリックス生物学、生体材料工学、デバイス工学などの技術を用いることで、目的細胞への分化を誘導する新規因子探索系や 3 次元構造の人工的再現系の構築を行う。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ヒト iPS 細胞の作製と疾患モデルの解析

ヒト iPS 細胞に CRISPR/Cas9 システムによって多発性肝嚢胞等の疾患を再現する変異を導入する。得られたヒト iPS 細胞を胆管系の細胞へと分化誘導することで、肝嚢胞様の症状が見られるか解析する。

(2) 肝前駆細胞を用いた流体デバイス内肝組織の構築

肝前駆細胞等を流体デバイスに播種し培養することで、肝機能の変化等を観察する。最終的には、血管や間葉系細胞が混在した組織化肝臓の構築をめざし、まず初めは肝細胞および胆管細胞を持つミニ肝組織の 3 次元培養系の構築を行う。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ヒト iPS 細胞の作製と疾患モデルの解析

我々はヒト iPS 細胞にサイトカインを連続的に添加し、特異的な表面抗原で分画することで肝前駆細胞を純化できることを報告している (Yanagida et al., 2013)。ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞のより詳細な性状解析を表面抗原の網羅的スクリーニング法によって行い、IGF 受容体や EGF 受容体などの下流のシグナルが肝前駆細胞部の増殖に重要なことを見出した (Tsuruya et al., 2015)。そこでこれらの方法によって分化・増殖させたヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞からの胆管誘導系の構築を行った。

我々は上記の研究の過程で、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞が CD13+CD133+分画に濃縮される一方で、長期培養過程でその一部が CD13 の発現を失うことを見出した。そこで、CD13 + 細胞および CD13 - 細胞にフローサイトメーターを用いて分画した後に細胞外マトリクスに播種して培養した結果、CD13 - 細胞分画でのみ、特徴的な Cyst 構造が得られた。この Cyst 構造は肝細胞マーカーである α -feto protein は陰性で胆管マーカーである keratin 7 は陽性である。さらに胆管上皮細胞の特徴である Cilia 構造を持つなど、胆管系へと分化していることが示された(図1)。そこで次に多発

性肝嚢胞の原因遺伝子をゲノム編集技術によりノックアウトしたヒト iPS 細胞を用いて同様の実験を行った。最近のゲノム編集技術の進歩からヒト iPS 細胞でのゲノム改変(特定遺伝子の欠損へ変異挿入)が可能となった。我々は肝嚢胞に関係する遺伝子群のノックアウト iPS 細胞の作製を行い、PRKCSH や PKHD1 の欠損 iPS 細胞を作製した。ここでは、肝臓のみでの多発性肝嚢胞が見られる PRKCSH に関して解析を行った。

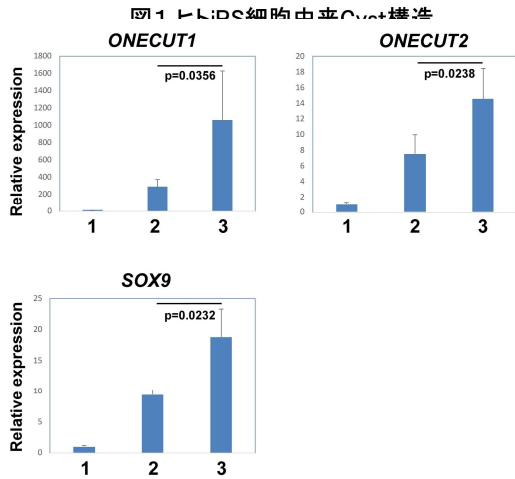
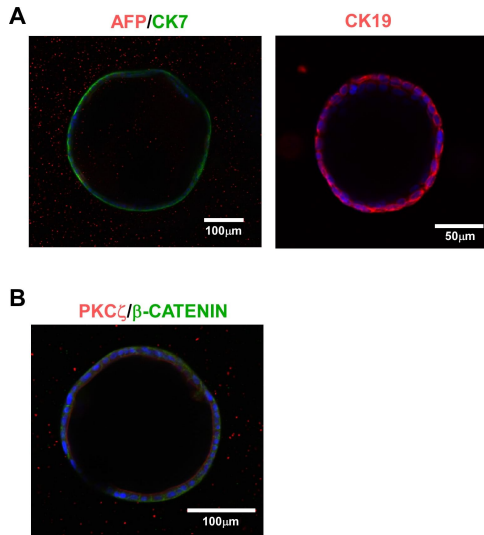


図2 PRKCSH欠損による胆管細胞関連転写因子の発現誘導
 1: CD13+CD13+ cells derived from PRKCSH +/+ iPS cells,
 2: CD13+CD13- cells derived from PRKCSH +/+ iPS cells,
 3: CD13+CD13- cells derived from PRKCSH -/- iPS cells.

PRKCSH 欠損ヒト iPS 細胞を、サイトカイン添加によって肝前駆細胞・胆管細胞へと分化誘導した結果、PRKCSH 欠損により胆管細胞に重要ないくつかの遺伝子群の発現が誘導された(図2)。さらに、この細胞をマトリクス包埋によって培養した結果、胆管様 Cyst 構造の数が増加することから、PRKCSH 欠損により胆管系への分化が促進することが示された。そこで、

PRKCSH 欠損 iPS 細胞に PiggyBac トランスポゾンベクターを用いて野生型 PRKCSH 遺伝子を導入し、薬物(ドキシサイクリン)添加により PRKCSH を発現誘導可能な細胞を作製した。この細胞を用いて肝前駆細胞、胆管細胞を誘導しゲル包埋培養を行った。その際にドキシサイクリン添加により PRKCSH 欠損をレスキューした細胞では、PRKCSH 欠損により上昇した胆管様 Cyst 構造の数が減少することがわかった。以上の結果から、PRKCSH 欠損と胆管系の分化・組織構造の誘導との関連性が示唆され、この系が多発性肝嚢胞症などのヒト細胞を用いた新規解析系になりうると考えられる。

(2) 肝前駆細胞を用いた流体デバイス内肝組織の構築

肝臓は肝機能を司る肝細胞やその他の非実質細胞が3次元的に配列した複雑な構造をしており、試験管内での平面培養ではその機能的な構造が失われることから、高い肝機能等が発揮できないことが知られる。我々は流体デバイス技術を用いて in vitro で生体の機能・構造を再現可能か検討している。

本研究では、肝臓の3次元組織化法にして上皮系細胞の自己集合能を利用した凝集塊作製法(Spheroid 培養法)を用いた。これは低吸着性の培養皿等で肝細胞を培養し、非接着細胞が自己凝集し組織化することを利用したものである。この方法を用いて、マウス胎仔由来の肝前駆細胞を特異的抗体によって純化後に非接着性培養皿で培養したところ、高効率に Spheroid を形成した。さらに、胎仔肝前駆細胞では発現の低い成熟肝機能遺伝子群の発現が強く誘導されることを見出し、3次元構造による組織化が胎仔肝細胞の成熟化を誘導できることが分かった。一方で、この培養系では、細胞の非接着性のために培地交換が困難で長期培養に不向きである。そこで、細胞非接着型の流体培養デバイス装置を用いることで、肝組織化培養の自動化が可能か検討を行った。

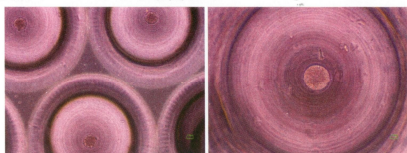
細胞培養用の流路としては、酸素透過性の高い PDMS を成型加工した後にコーティング剤である Lipidure-CM5206 によって培養皿表面を処理することで細胞非接着性にした流体培養用デバイスを用いている(アークレイ社製)。このデバイスを自動制御可能なポンプシ

ステムを持つデバイス培養装置に接続し、断続的に培地を循環しつつ培養を行うことが可能である。

マウス胎生 13 日肝臓より肝前駆細胞を分離・培養した結果、非吸着性培養皿を用いた静置培養時と同様に自己組織化による Spheroid が形成されることが分かった(図3)。分離直後の肝前駆細胞や平面培養した細胞と比較して、Spheroid 培養によって非常に高い肝機能遺伝子(Tyrosine aminotransferase, Carbamoyl phosphate synthetase)の発現が誘導された。この際、静置培養に比べて流体デバイス装置を使用した場合でも同等以上の高い肝成熟化の促進が見られた。今後、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞を用いて同様の実験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

Spheroid形成流体デバイスによる培養(2d)



96well非吸着プレートによる静置培養(2d)

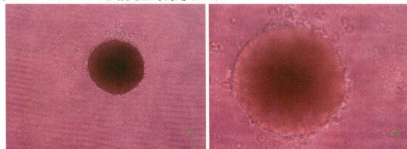


図3 流体デバイスを用いたマウス胎仔肝前駆細胞の組織化培養

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

(1) Nakano Y, Nakao S, Sumiyoshi H, Mikami K, Tanno Y, Sueoka M, Kasahara D, Kimura H, Moro T, Kamiya A, Hozumi K, Inagaki Y., Identification of a novel alpha-fetoprotein-expressing cell population induced by the Jagged1/Notch2 signal in murine fibrotic liver. Hepatol Commun. 27, 215-229, 2017. doi: 10.1002/hep4.1026. (査読有)

(2) Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Asano Y, Nagata H, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S,

Nakauchi H, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Iwamoto M, Watashi K, Wakita T, Watanabe M. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. Sci Rep. 6, 29358, 2016 (査読有)

(3) Anzai K, Chikada H, Tsuruya K, Ida K, Kagawa T, Inagaki Y, Mine T, Kamiya A*. Foetal hepatic progenitor cells assume a cholangiocytic cell phenotype during two-dimensional pre-culture. Sci Rep. 6, 28283, 2016. (*Corresponding Author) (査読有)

[学会発表](計 2 件)

(1) 紙谷聡英, 安齋和也、鶴谷康太、近田裕美 肝前駆細胞の成熟化を誘導する転写調節機構 第 17 回日本再生医療学会 2018 3/21-23 神奈川・パシフィコ横浜

(2) 紙谷聡英, 安齋和也、近田裕美、峯徹哉 肝発生過程における肝前駆細胞の胆管様細胞への分化誘導機構 第 23 回肝細胞研究会 2016 0708-09 大阪大学中之島センター・大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

紙谷 聡英(KAMIYA,Akihide)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 30321904

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

()