

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18975

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝組織を用いたハイスループットスクリーニング系の構築

研究課題名(英文) Development of high throughput screening system using human iPS-derived hepatocytes

研究代表者

木戸 丈友 (KIDO, Taketomo)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：00401034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓の発生過程において、肝前駆細胞は、類洞内皮細胞や星細胞といった非実質細胞と相互作用することで成熟肝細胞へ分化する。本研究ではヒトiPS細胞から機能的な肝細胞を誘導するため、肝前駆細胞と非実質細胞を用いた共培養系を構築した。我々は、胎児肝臓から分取した類洞内皮細胞、星細胞の増殖、分化にはTGFβシグナル、Rhoシグナルが関与することを明らかにした。マウスにおいて得た結果をもとに、ヒトiPS細胞から類洞内皮細胞、星細胞を樹立した。これらの細胞は、増殖因子や細胞外基質を発現することで、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の増殖、成熟化を支持した。

研究成果の概要(英文)：During liver development, liver progenitor cells (LPCs) differentiate into mature hepatocytes through interactions with hepatic non-parenchymal cells (NPCs) such as liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and hepatic stellate cells (HSCs). In this study, to induce functional hepatocytes from hiPSCs, we established a co-culture system of LPCs and NPCs. We show that TGFβ and Rho signaling pathways, respectively, regulate the proliferation and maturation of LSECs and HSCs isolated from mouse fetal livers. Based on the results in mice, we established the hiPSC-derived LSECs and HSCs. They could support proliferation and maturation of hiPSC-derived LPCs by expressing numerous hepatic mitogens and extracellular matrix proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：肝臓 肝細胞 類洞内皮細胞 星細胞

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、代謝、解毒、恒常性の維持などの機能を有する高度に発達した臓器であり、これらの多彩な肝機能を実質的に担う肝実質細胞(肝細胞)と肝非実質細胞(胆管上皮細胞、肝類洞内皮細胞、肝星細胞など)から構成されている。特に、肝細胞は種々の代謝酵素を発現し、肝機能の中心を担うことから、近年、創薬研究や再生医療研究への応用を目的として、ヒト iPS 細胞から肝細胞を誘導する試みが活発に行われている。しかし、既報の iPS 細胞からの肝細胞分化の問題として、様々なサイトカインによる多段階かつ長期間の分化誘導を必要とすること、また、全ての iPS 細胞を均一な成熟肝細胞に分化させることは困難であるといった問題がある。我々は、これまでに、ヒト iPS 細胞から自己複製能と肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有する肝前駆細胞に分化誘導し、それらを純化・増幅した後に、肝細胞へと分化成熟させる「二段階の分化誘導法」の樹立に取り組んだ。その結果、新規肝前駆細胞マーカーとしてカルボキシペプチダーゼ M (CPM) を同定し、ヒト iPS 細胞由来 CPM 陽性肝前駆細胞の純化・増幅培養系の樹立に成功した。さらに、そこから、簡便で効率的に肝細胞、胆管上皮細胞を作製することを可能にした (Kido et al. Stem Cell Reports 2015)。この方法で誘導した肝細胞は、従来法で誘導した肝細胞と比較し高いアルブミン産生能や薬物代謝酵素活性を示したが、成体の成熟肝細胞には及ばなかった。

2. 研究の目的

本研究では、創薬研究用のハイスループットスクリーニング系として応用可能な高機能性のヒト肝細胞 / 肝組織を作製するために、ヒト iPS 細胞由来の肝前駆細胞、類洞内皮細胞、星細胞を用いた肝組織の再構築系を開発する。

3. 研究の方法

(1) 類洞内皮細胞、星細胞の分化メカニズムの解析：マウス胎児肝臓を採取し、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ消化し、細胞懸濁液を調製する。次に、既存の類洞内皮細胞、星細胞の各種マーカー分子の発現を指標に、それぞれの細胞の分取に有用な細胞膜タンパク質の組み合わせを明らかにする。さらに、分取した細胞の増幅培養系を樹立し、その分化・成熟メカニズム解析を行う。

(2) ヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞、星細胞の作製：マウスの肝発生過程の解析から明らかになった類洞内皮細胞、星細胞の分化過程を iPS 細胞の分化誘導系に応用し、ヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞、星細胞を樹立する。

(3) ヒト肝臓モデルの開発：本研究で作製したヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞、類洞内皮細胞、

星細胞を用いた共培養系を樹立し、高機能性のヒト肝細胞 / 肝組織を作製する。

4. 研究成果

(1) 類洞内皮細胞、星細胞の分化メカニズムの解析

フローサイトメトリー解析および遺伝子発現解析の結果、マウス胎児肝臓由来の類洞内皮前駆細胞、星前駆細胞はそれぞれ、FLK1⁺CD31⁺CD34⁺画分、Alcam^{high}画分に濃縮されることが明らかとなった。分取した細胞は、培養系において増殖した。さらに、各種サイトカイン類やインヒビター類を用いた簡易的なスクリーニング解析の結果、その分化、成熟には、それぞれ TGFβ シグナル、Rho シグナルが関与することを見出した。

(2) ヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞、星細胞の作製

マウス肝発生過程の解析から明らかとなった各非実質細胞の前駆細胞の分離法や増幅・成熟化培養系をヒト iPS 細胞からの分化誘導に応用し、ヒト iPS 細胞由来の類洞内皮細胞、星細胞を樹立した。遺伝子発現解析の結果、ヒト iPS 細胞由来肝類洞内皮細胞は STAB2 や F8 等の特異的のマーカー分子を高発現した。また、免疫組織化学的解析の結果、F8 については、タンパク質レベルで検出可能であった。一方、ヒト iPS 細胞由来星細胞は NGFR や LRAT 等のマーカー分子を高発現した。星細胞の特徴的な機能の一つであるビタミン A の取り込み能を評価したところ、一部の細胞で取り込みが認められた。さらに、網羅的な遺伝子発現解析の結果、ヒト iPS 細胞由来の類洞内皮細胞、星細胞は HGF, FGF, BMP, LAM, COL といった肝前駆細胞の増殖や肝細胞への分化・成熟に関与する分子を高発現することが明らかとなった。

また、これらの iPS 細胞由来の非実質細胞はゲル内で包埋培養することで、CD31 で可視化される三次元的な血管網の構築能を示した。以上の結果から、作製した iPS 細胞由来非実質細胞は、成熟肝細胞の誘導や三次元肝組織の構築に有用である可能性が示唆された。

(3) ヒト肝臓モデルの開発

肝前駆細胞の増殖に対する iPS 細胞由来非実質細胞の影響を解析するため、非実質細胞をフィーダー細胞として、その上部に肝前駆細胞を播種し、培養した。コントロールとして、ヒト骨髄由来間葉系細胞 MSC とヒト臍帯由来内皮細胞 HUVEC を用意した。非実質細胞をフィーダー細胞とした培養系において、培養 14 日で、肝前駆細胞はコロニーを形成し増殖した。遺伝子発現解析の結果、肝前駆細胞のマーカーである HNF4a, AFP, ALB といった分子が高発現した。

さらに、高機能性のヒト肝細胞を作製するために、コラーゲンゲル上にヒト iPS 細胞由来の肝前駆細胞、類洞内皮細胞、星細胞を播種

し、二次元高密度共培養系を作製した。機能的な肝細胞マーカーである CYP3A4 活性を経時的に測定したところ、10 週間かけて徐々に増加が認められた。RNAseq 解析の結果、肝前駆細胞を比較し、約 60 種類の肝代謝マーカーの発現が顕著に増加することが明らかとなった。

次に肝組織を構築するため、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞とマウス胎児由来類洞内皮細胞、星細胞の三次元培養系を樹立した。iPS 細胞由来肝前駆細胞のみの単独培養系と比較し、星細胞を加えた共培養系において、効率的な組織形成を認めた。さらに、平面共培養系と比較し、三次元共培養系において、肝細胞のマーカーである ALB の発現は促進した。以上より、三次元共培養の樹立が、肝前駆細胞の高機能化に重要であることが示唆された。

現在、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞、類洞内皮細胞、星細胞を用いた肝組織構築を進めている。今後は、構築したヒト肝臓モデルを肝線維化やウイルス感染系などの肝疾患モデルへ応用し、肝疾患に対する新たな予防・診断・治療薬の開発へ応用を目指す。

引用文献

Kido T, Kouji Y, Suzuki K, Kobayashi A, Miura Y, Chern EY, Tanaka M, Miyajima A. CPM Is a Useful Cell Surface Marker to Isolate Expandable Bi-Potent Liver Progenitor Cells Derived from Human iPS Cells. Stem Cell Reports 2015, 5, 508-515.

5. 主な発表論文等

(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 1 件)

Kouji Y, Kido T*, Ito T, Oyama H, Chen SW, Katou Y, Shirahige K, Miyajima A*. An In Vitro Human Liver Model by iPSC-Derived Parenchymal and Non-parenchymal Cells. Stem Cell Reports. 2017, 9, 490-498. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.010 査読有り
*Corresponding authors

[学会発表](計 13 件)

ヒト iPS 細胞由来肝星細胞の活性化制御、厚井悠太、木戸丈友、大山裕棋、Chen Shin-Wei、姫野(黒木)美沙緒、宮島篤、第 17 回日本再生医療学会総会、2018

機能的胆管様構造の導入による肝組織の構築、大山裕棋、木戸丈友、厚井悠太、Chen Shin-Wei、姫野(黒木)美沙緒、宮島篤、第 17 回日本再生医療学会総会、2018

胆汁酸の排出機構を備えた肝組織の構築、

大山裕棋、木戸丈友、姫野(黒木)美沙緒、厚井悠太、Chen Shin-Wei、宮島篤、第 28 回日本肝臓医生物学研究会、2018

Development of a human liver model using iPSC-derived parenchymal and non-parenchymal cells, Yuta Kouji, Taketomo Kido, Hiroki Oyama, Shin-Wei Chen, Atsushi Miyajima, Cold Spring Harbor Asia Conference Liver Biology, Diseases & Cancer, 2017

iPS 細胞由来肝類洞壁細胞の作製とその応用、木戸丈友、厚井悠太、大山裕棋、Chen Shin-Wei、宮島篤、第 31 回肝類洞壁細胞研究会学術集会、2017

胆管様構造を備えた肝構築系の開発及びヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞の誘導、大山裕棋、木戸丈友、厚井悠太、チェンシンウェイ、宮島篤、第 24 回肝細胞研究会、2017

肝発生過程に基づいたヒト iPS 細胞由来肝非実質細胞の誘導と肝組織モデルへの応用、厚井悠太、木戸丈友、大山裕棋、Chen Shin-Wei、宮島篤、第 24 回肝細胞研究会、2017

Development of an in vitro human liver model by iPSC-derived parenchymal and non-parenchymal cells, Yuta Kouji, Taketomo Kido, Hiroki Oyama, Shin-Wei Chen, Atsushi Miyajima, ISSCR annual meeting 2017, 2017

Development of HBV infection model using iPSC-derived hepatic cells, Chen Shin-Wei, 木戸丈友、厚井悠太、大山裕棋、杉山真也、溝上雅史、宮島篤、第 16 回日本再生医療学会総会、2017

肝組織構築に向けた効率的なヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞分化誘導系の樹立、大山裕棋、木戸丈友、厚井悠太、Chen Shin-Wei、宮島篤、第 16 回日本再生医療学会総会、2017

ヒト iPS 細胞由来肝非実質細胞の樹立、厚井悠太、木戸丈友、大山裕棋、Chen Shin-Wei、宮島篤、第 16 回日本再生医療学会総会、2017

ヒト iPS 細胞由来肝類洞壁細胞の樹立、木戸丈友、厚井悠太、大山裕棋、Chen Shin-Wei、宮島篤、第 30 回肝類洞壁細胞研究会学術集会、2016

ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HBV 感染、木戸丈友、杉山真也、厚井悠太、小林彩香、大山裕棋、Chen Shin-Wei、溝上雅史、宮島篤、第 23 回肝細胞研究会、2016

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木戸 丈友 (KIDO, Taketomo)

国立大学法人東京大学・分子細胞生物学研
究所・助教

研究者番号：00401034