

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08116

研究課題名(和文) 3Dプリンターを用いたイヌiPSおよび体性幹細胞由来立体人工肝臓の構築

研究課題名(英文) Developing a 3D-printed artificial liver derived from canine induced pluripotent or somatic stem cells

研究代表者

根尾 櫻子 (Neo, Sakurako)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：50532107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞は単層で培養すると、本来の薬物代謝能を発揮できないばかりでなく、わずか数日しか生存維持ができない。本研究では薬物代謝能を持った生体外肝組織の構築を目指すことを最終目標とした。犬肝細胞(cHep)または犬骨髄由来肝様細胞(ciHep)、ヒト臍帯静脈内皮細胞、イヌ間葉系幹細胞(At-MSc)を混合し、約500umの大型細胞凝集塊を作製した。ciHepと比較してcHepを細胞ソースとした凝集塊はより高いレベルでCYP450遺伝子を発現した。細胞凝集塊を3Dプリンターで積層して作成した人工肝組織は、中心が肝細胞でその周囲をAt-MScが囲む3次元構造が構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた細胞凝集塊作製条件を用いて犬人工肝組織を作製することに成功すれば、創薬の毒性試験に應用が期待でき、動物実験代替法ともなる。「動物実験数の大幅削減」を求める現代社会の動きに対応するだけでなく、「信頼性の高い薬物動態や毒性試験の結果が求められる」という難題に直面している医学・創薬および獣医学研究における有力な解決策の一つになる。

研究成果の概要(英文)：One disadvantage of the conventional human hepatocyte monolayer culture method is that resulting cells exhibit a shorter lifespan and are unable to stably maintain liver-specific functions, including cytochrome P450 (CYP450) activity. This study thus aimed to develop an ex vivo artificial liver exhibiting sustained CYP450 activity. Canine primary cultured hepatocyte (cHep) or bone marrow stem cell (cBMSC)-derived hepatocyte-like cells (ciHep) were co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) to generate 500 μm spheroids. Relative to spheroids containing ciHep, those containing cHep maintained a higher day-three level of CYP450 gene expression. Spheroids were inserted into the “Kenzan” using a 3D bio-printer (Rejenova®) and cultured in a perfusion chamber for seven days to prepare artificial liver structures. Histologically, hepatocytes were MSC-coated.

研究分野：犬肝再生、獣医臨床病理学

キーワード：細胞凝集塊 肝細胞 犬 3Dプリンター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

創薬プロセスの途中で開発中止になる原因として最も多いのは、「肝毒性」である。多くの製薬会社では、初代培養肝細胞を用いて毒性試験を行っているが、薬物代謝などの機能は2-3日で激減する。また、非臨床試験では、マウス・ラットよりも生物学的にヒトに近いイヌが安全性試験に供されてきたが、動物愛護の観点から世界的にイヌを実験動物として扱うことが大幅に制限され、早急に代替法を開発する必要性が訴えられている。したがって、「培養肝細胞を用いた薬物代謝試験法の確立」は、緊急かつ最重要課題であると考えられた。

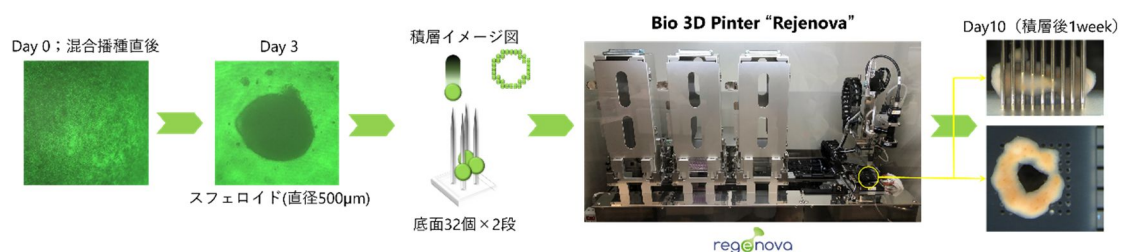
2012年には、医薬品基盤研究所でヒト iPS や多能性幹細胞由来の薬物代謝能を持つ肝細胞が分化誘導され Nakamori et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; Yanagihara et al., *Stem Cells*, 2016; )、また、未熟な肝細胞の性質を持つ小型肝細胞が、薬物代謝能を持つ肝細胞に分化することが分かった (Takayama et al., *Drug Metab Pharmacokinet.* 2017; Tanimizu et al., *Stem Cells*, 2016)。これらはすでに製品化され、今後の新薬開発における毒性評価や薬物動態試験への早期の応用が期待されている。また、生体内と同等の機能を維持する臓器を構築するためには、医工学との連携が必須であるといわれている。最近では、工学技術を用いたバイオ 3D プリンターで作製したヒト肝臓構造体が、高い薬物代謝機能を長期間持続すると報告された (第 136 回全日本薬学学会)。このような経緯で、イヌ肝細胞作製ノウハウを発展させ、医工学を用いて、生体外で医薬品の薬物代謝や毒性診断が可能な「**生体外肝組織**」を作製する計画をたてた。

### 2. 研究の目的

イヌにおいても肝機能を有した肝臓構造体を作製することを目的として本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

3D プリンター技術を活用して肝臓構造体を作成するためには、約 500um の大型細胞凝集塊 (スフェロイド) を作製する必要がある。スフェロイドを作製するための細胞には、イヌ初代培養肝細胞 (cHep) または犬骨髄由来肝様細胞 (canine iHep)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Ad-MSC) の 3 種類を用いて、低吸着 96 ウェル U 底プレートに混合播種し、スフェロイドの作製を試みた。培地は、肝細胞増殖培地 (HGM)、内皮細胞増殖培地 (ECGM)、間葉系幹細胞像触媒地 (MSC-GM) を 3:1:1 の比率で使用し、ネコ遺伝子組み換え肝細胞増殖因子 (rf-HGF) を 10ng/ml 培地に添加した。作製したスフェロイドはバイオ 3D プリンター (Rejenova®) の技術を用いて剣山に積層した。積層後は灌流培養器に入れて7日間培養し、



肝臓構造体を作製した。作製したスフェロイドと肝臓構造体は 10%ホルマリンに一晩浸漬し、パラフィン切片を作製した後、HE 染色を行った。

解凍直後の犬肝細胞、スフェロイド、肝臓構造体、10日間単層培養した肝細胞に関して、肝関連遺伝子 (Albumin, CYP3A12, CYP2E1) の定性的 RT-PCR とリアルタイム PCR を行い、肝関連遺伝子発現解析を行った。

さらに、細胞ソースの比較検討のために cHep、HUVEC、AdMSC を混合または canine iHep、HUVEC、AdMSC を混合してスフェロイドを作成し、肝関連遺伝子である、フェトプロテイン、アルブミン、1アンチトリプシン (1-AT)、チロシナーミノトランスフェラーゼ (TAT)、トランススレニン (TTR)、カドヘリン (CDH1)、シトクロム P450 (CYP2E1, CYP3A12) に関して遺伝子発現の比較検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (A) スフェロイドの組織学的検討

cHep、HUVEC、Ad-MSC を、以下の割合で混合することで、培養3日目には3Dプリンターで積層するために必須である500umで、円形のスフェロイドを作製することに成功した。スフェロイドは中心部にcHepが、また、cHep周囲は紡錘形の細胞(MSC)で囲まれて肝細胞の周囲は紡錘形の細胞(MSC)で囲まれていた



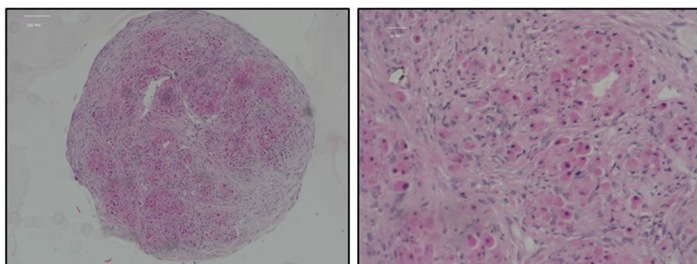
- 肝細胞 :  $1.0 \times 10^4$  cells/well
- HUVEC :  $0.7 \times 10^4$  cells/well
- MSC :  $0.3 \times 10^4$  cells/well

Yanagi ら (2017 年) の報告によると、肝細胞はスフェロイドの周囲に位置していたが、犬の肝細胞を用いると、スフェロイド内部の細胞配置が異なることが分かった。

### (B) 肝臓構造体の組織学的検討

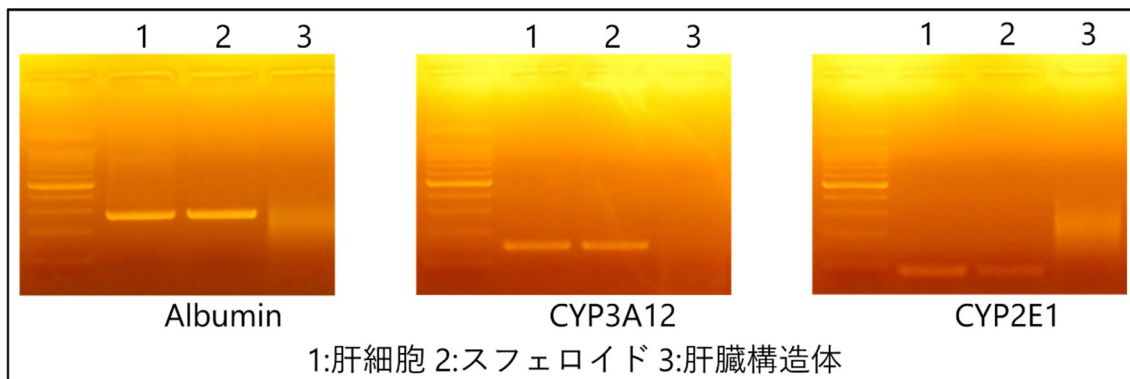
作衛下肝臓構造体に関しては、ほとんどの cHep は核を保持していたが、細胞質が好酸性に染まり、アポトーシス様の細胞の割合が高かった。おそらくスフェロイド内の肝細胞は周囲を MSC で取り囲まれ、より酸素に乏しい環境に置かれることから、細胞死を起こしやすい可能性が考えられた。

肝臓構造体 (低倍率)      肝臓構造体 (高倍率)



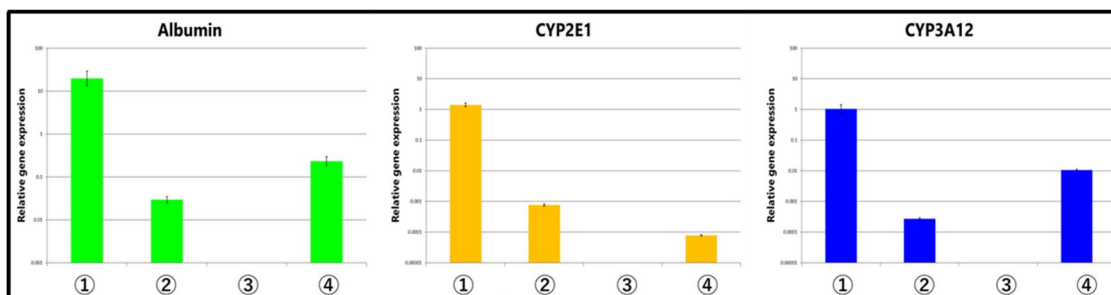
### (C) 肝関連遺伝子の発現検討(定性的 RT-PCR)

cHep、スフェロイド、肝臓構造体に関してアルブミン、CYP3A12、CYP2E1 の発現を定性的 PCR にて確認したところ、スフェロイドでは Alb, CYP の発現が確認されたが、肝臓構造体では Alb, CYP の発現は確認されなかった。



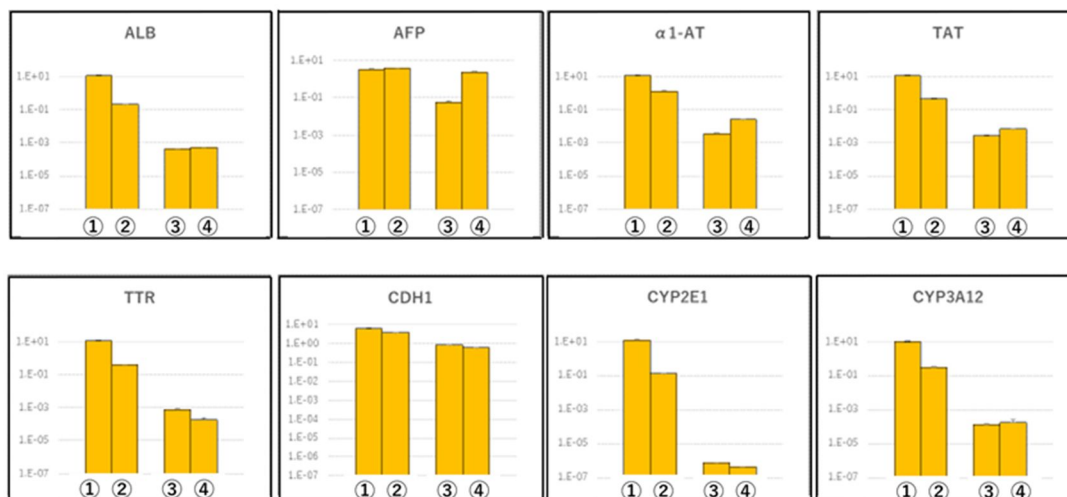
### (D) 肝関連遺伝子の発現検討(定量的 RT-PCR)

cHep (Day0)、スフェロイド (day3)、肝臓構造体 (Day10)、cHep (Day10) に関してアルブミン、CYP3A12、CYP2E1 の発現を定量的 PCR にて確認したところ、スフェロイドでは cHep の発現量からは減少はするが、アルブミン、CYP2E1、CYP3A12 の発現を保っていたが、肝臓構造体ではこれらの発現が見られなかった。組織学的検討でも肝細胞の多くがアポトーシス様変化を呈していたことから、肝関連遺伝子を発現する肝臓構造体を作製するためには更なる検討が必要であることが分かった。



### (E) 肝関連遺伝子の発現検討(定量的 RT-PCR)

スフェロイドを作製するための細胞ソースの比較検討のために cHep、HUVEC、AdMSC を混合、または canine iHep、HUVEC、AdMSC を混合してスフェロイドを作成し、肝関連遺伝子である、フェトプロテイン、アルブミン、 $\alpha$ 1アンチトリプシン( $\alpha$ 1-AT)、チロシニアミノトランスフェラーゼ(TAT)、トランススレニン (TTR)、カドヘリン(CDH1)、シトクロム P450(CYP2E1, CYP3A12)に関して定量的 RT-PCR によって遺伝子発現量の検討を行った。その結果、イヌ肝細胞を細胞ソースとした方が cytochrome P450 (CYP)の発現を高く保つことが分かった。また、フェトプロテインとカドヘリンは高いレベルでの維持が可能であった。将来的に新薬開発における毒性評価や薬物動態試験に有効に用いるためには、肝細胞をソースとしたスフェロイドを作製し、肝臓構造体を構築する条件の検討を行うことが望ましいことが明らかになった。



### 参考文献

1. Nakamori D, Takayama K, Nagamoto Y, Mitani S, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Hepatic maturation of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells by ATF5, c/EBP $\beta$ , and PROX1 transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 15;469(3):424-9.
2. Yanagihara K, Liu Y, Kanie K, Takayama K, Kokunugi M, Hirata M, Fukuda T, Suga M, Nikawa H, Mizuguchi H, Kato R, Furue MK. Prediction of Differentiation Tendency Toward Hepatocytes from Gene Expression in Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2016 Dec 15;25(24):1884-1897.
3. Tanimizu N\*, Ichinohe N, Ishii M, Kino J, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes in vitro and repopulate liver tissue. *Stem Cells*, in press (2016)
4. Takayama K, Mizuguchi H. Generation of human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity screening. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2017 Feb;32(1):12-20. doi: 10.1016/j.dmpk.2016.10.408.
5. Yanagi Y, Nakayama K, Taguchi T, Enosawa S, Tamura T, Yoshimaru K, Matsuura T, Hayashida M, Kohashi K, Oda Y, Yamaza T, Kobayashi E. In vivo and ex vivo methods of growing a liver bud through tissue connection. *Sci Rep*. 2017 Oct 26;7(1):14085.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nitta S, Kusakari Y, Yamada Y, Kubo T, Neo S, Igarashi H, Hisasue M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Conversion of mesenchymal stem cells into a canine hepatocyte-like cells by	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 165-176.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.01.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新田 卓、堀口 優、山田 陽子、根尾 櫻子、久末 正晴
2. 発表標題 イヌ骨髄由来間葉系幹細胞由来肝細胞様細胞の3次元培養による機能向上
3. 学会等名 日本獣医再生医療学会 第15回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suguru Nitta, Yuto Kusakari, Yu Horiguchi, Yoko Yamada, Takeaki Kubo, Hirotaka Igarashi, Sakurako Neo, Masaharu Hisasue
2. 発表標題 Direct reprogramming of mesenchymal stem cells into canine hepatocyte-like cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor in ASIA Liver, Biology, Diseases & Cancer（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	中山 巧一  (Nakayama Koichi)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柳 佑典  (Yanagi Yusuke)		