

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19657

研究課題名(和文)肝障害・肝疾患研究に資するzone特異的肝細胞の創出技術の開発

研究課題名(英文)Generation of zone-specific hepatocyte for study of liver injury and diseases

研究代表者

高山 和雄(Takayama, Kazuo)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10759509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝障害は、肝臓がびまん性に障害を受けるものと、不均一に障害を受けるもの、の2種に大別される。肝障害にzone特異性が生じる原因は、肝細胞がzoneに応じた特異な機能を有することにあるが、肝障害研究に使用される既存のヒト肝細胞モデルはzone特異的な機能を持たない。そこで、zone特異的な機能を有するヒトiPS細胞由来肝細胞の作製を試みた。肝臓を構成する細胞が織りなすネットワークを手掛かりにzone特異的肝細胞を作製した。その結果、Wnt7Bがzone3肝細胞、WIF-1がzone1肝細胞形成に重要であることを見出した。本研究成果により、zone特異的な機能を有する肝細胞を作製可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品の毒性判明による市場撤退・開発中止のうち、多くの事例で肝障害が認められることから、肝障害の高精度な予測技術は不可欠である。しかし、多くの肝障害にzone特異性が見られるものの、既存の創薬ではzone特異的なヒト肝細胞モデルが存在しないため、zonation情報を考慮した毒性予測試験が実施できなかった。本研究成果を応用することにより、肝臓を構成する肝細胞の不均一性を加味した医薬品の安全性試験を初めて実施できる可能性があり、従来の創薬プロセスを大きく進歩させる潜在性を有する。

研究成果の概要(英文)：The function of hepatocytes largely depends on their position in the liver lobule. Although the method of differentiating hepatocytes from human pluripotent stem cells has been largely improved over the past decade, there remains no technique for generating hepatocyte-like cells (HLCs) with zone-specific hepatic properties. In this study, we searched for the factors that promote acquisition of zone-specific properties of HLCs. Here, we identified that WNT7B and WNT8B play important roles in achieving perivenous zone-specific characteristics, such as the enhancement of glutamine secretion, citric acid cycle, cytochrome P450 (CYP) 1A2 metabolism, and CYP1A2 induction capacities. We also found that WNT inhibitory factor (WIF-1) was necessary for achieving periportal zone-specific characteristics, such as the enhancement of urea secretion and gluconeogenesis capacities. Therefore, WNT signal modulators conferred zone-specific hepatic properties onto HLCs.

研究分野：幹細胞学

キーワード：肝細胞 毒性 薬物代謝 zonation ヒトiPS細胞 ヒトES細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は糖新生や異物代謝(薬物代謝を含む)、血漿蛋白質合成などの様々な機能を有しており、生命活動における「肝」の臓器として働く。そのため、肝障害の予防法や治療技術がヒトの健康維持には不可欠である。肝障害は、①肝臓がびまん性に障害を受けるものと、②不均一に障害を受けるもの、の2種類に大別される。②の例として、門脈域に位置する zone1 肝細胞が障害を受けるウイルス性肝炎、中心静脈域に位置する zone3 肝細胞が障害を受ける非アルコール性脂肪性肝炎・薬物誘発性肝障害などの数多くの不均一な肝障害、すなわち、『zone 特異的な肝障害』がある。zone 特異的な肝障害が生じる原因は、肝細胞が zone に応じた特異的な機能を有していることにあるが、肝障害研究に使用される既存のヒト肝細胞モデルは zone 特異的な機能を有していない。そのため、現行の創薬技術では、肝臓の不均一性を加味した肝障害の予防法や治療技術の開発が実施できない。そのため、zone 特異的な機能を有する肝細胞の作製技術の開発が期待されている。なお、肝機能には種差があるためヒト細胞を用いたモデル構築が不可欠である。

### 2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに、ヒト多能性幹細胞(ヒト ES 細胞)やヒト人工多能性幹細胞(ヒト iPS 細胞)から肝細胞への分化誘導技術の開発を行い、ヒト初代培養肝細胞に匹敵する機能を有するヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の作製に成功した。しかし、ヒト初代培養肝細胞もヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞も zone 特異的な機能を有していない。そこで本研究では、zone 特異的な機能を有するヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の作製法を開発に挑戦する。現時点では、肝臓の zonation 形成機構はほとんど明らかになっていないが、本研究では肝臓を構成する種々の細胞が織りなす相互ネットワークを手掛かりに zone 特異的な肝細胞の作製を目指した。本研究で作製した zone 特異的な肝細胞を用いて、これまでの技術では不可能だった「肝臓の不均一性を加味した肝障害研究」を実現し、肝障害の新規予防法や治療技術の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の4ステップで行った。

- ① zonation 形成因子候補の探索：門脈周囲に存在する胆管上皮細胞からの距離に応じて肝細胞の zone が決まっていることに着目し、胆管上皮細胞から産生される液性因子等の中から、zonation 形成に関与する因子を探索した。
- ② 候補因子の機能確認：ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に対して候補因子を作用/阻害することにより、実際に zonation 形成に関与するかどうか検証した。
- ③ zone 特異的な肝細胞の作出：同定した zonation 形成因子を駆使して zone 特異的な肝細胞を作製した。
- ④ 創薬への応用： zone 特異的な肝細胞を用いて zone 特異的な肝障害を再現できるか検証した。再現できた場合、zone1 肝細胞と zone3 肝細胞の比較解析を通して、zone 特異的な肝障害の原因を追究し、新規創薬標的因子の探索を行った。

### 4. 研究成果

これまでに、研究代表者らは、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を肝細胞の培養上清を用いて培養することにより zone3 肝細胞、胆管上皮細胞の培養上清を用いて培養することにより zone1 肝細胞を作製できることを見出していた。平成 29 年度は、胆管上皮細胞および肝細胞の培養上清に含まれる液性因子等の中から、zonation 形成に関わる因子の同定を試みた。胆管上皮細胞および肝細胞において、肝臓の zonation 形成に関与すると言われている Wnt シグナルに関連する因子の発現プロファイルを取得し、zonation 形成因子の絞り込みを実施した。その結果、胆管上皮細胞および肝細胞において Wnt7B と Wnt8B が高発現しており、胆管上皮細胞のみで WNT inhibitory factor 1 (WIF-1) が高発現していることを見出した。また、ヒト肝臓の生検サンプルを用いた免疫染色実験を実施したところ、胆管上皮細胞が WIF-1 を高発現していることが確認できた。

次に、Wnt7B と Wnt8B、WIF-1 が、肝細胞の zone 特異的な機能の獲得に関与するかどうか調べた。Wnt7B と Wnt8B、WIF-1 をノックダウンした胆管上皮細胞および肝細胞の培養上清を用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞の培養を行い、zone 特異的な肝機能を解析した。その結果、肝細胞における Wnt7B と Wnt8B をノックダウンすることにより、zone3 特異的な機能が消失すること、胆管上皮細胞における WIF-1 をノックダウンすることにより、zone1 特異的な機能が消失することを確認した。以上のことから、肝細胞が産生する Wnt7B と Wnt8B が zone3 肝細胞形成に関与し、胆管上皮細胞が産生する WIF-1 が zone1 肝細胞形成に関与することが示唆された。これらの研究成果は、論文公表済みである (Mitani S., [Takayama K.](#), et al. Human ESC/iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Achieve Zone-Specific Hepatic Properties by Modulation of WNT Signaling. *Molecular Therapy*, 2017 Jun 7;25(6):1420-1433.)。

平成 29 年度までに、肝細胞同士の相互作用解析により Wnt7B および Wnt8B が zone3 肝細胞の形成に関与し、肝細胞—胆管上皮細胞間の相互作用解析により WIF-1 が zone1 肝細胞の形成に関与することを見出した。平成 30 年度は、Wnt7B や Wnt8B、WIF-1 を過剰発現することにより、さらに zone 特異性を高めた肝細胞の作製を実施した。ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の zone

特異的肝機能獲得に関与する Wnt シグナル関連因子は培養液中で不安定である。そのため、本研究では、zonation 形成因子を搭載したファイバー改変型アデノウイルスベクターの作製を行い、zonation 形成因子をヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に遺伝子導入する実験を行った。その結果、Wnt7B あるいは Wnt8B を過剰発現することにより薬物代謝能などの zone 3 機能が向上し、WIF-1 を過剰発現することにより、尿素産生能などの zone 1 機能が向上した。続いて、zone 特異的ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いて、zone 特異的な肝障害を予測できるか検討した。薬物代謝能が向上している zone 1 および zone 3 ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に対して、アセトアミノフェンを作用させたが、細胞生存率に顕著な差が認められなかった。現在、アセトアミノフェンの代謝物の量を測定することにより、細胞生存率に差が生じなかった原因を究明中である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Toba Y., Kiso A., Nakamae S., Sakurai F., **Takayama K.**, Mizuguchi H., FGF signal is not required for hepatoblast differentiation of human iPS cells, *Scientific Reports*, 2019 Mar 6;9(1):3713.
2. Matoba N., Yamashita T., **Takayama K.**, Sakurai F., Mizuguchi H., Optimal human iPS cell culture method for efficient hepatic differentiation, *Differentiation*, 2018 Sep 24;104:13-21.
3. **Takayama K.**, Hagihara Y., Toba Y., Sekiguchi K., Sakurai F., Mizuguchi H. Enrichment of high-functioning human iPS cell-derived hepatocyte-like cells for pharmaceutical research. *Biomaterials*. 2018 Apr;161:24-32.
4. Nakamae S., Toba Y., **Takayama K.**, Sakurai F., Mizuguchi H. Nanaomycin A Treatment Promotes Hepatoblast Differentiation from Human iPS Cells. *Stem Cells Dev.*, 2018 Mar 15;27(6):405-414.
5. Yamashita T., **Takayama K.**, Sakurai F., Mizuguchi H. Billion-scale production of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Feb 19;496(4):1269-1275.
6. **Takayama K.**, Akita N., Mimura N., Akahira R., Taniguchi Y., Ikeda M., Sakurai F., Ohara O., Morio T., Sekiguchi K., Mizuguchi H. Generation of safe and therapeutically effective human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells for regenerative medicine. *Hepatology Communications*, 2017 Oct 12;1(10):1058-1069.
7. Mitani S., **Takayama K.**, Nagamoto Y., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Mizuguchi H. Human ESC/iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Achieve Zone-Specific Hepatic Properties by Modulation of WNT Signaling. *Molecular Therapy*, 2017 Jun 7;25(6):1420-1433.
8. Sakurai F., Mitani S., Yamamoto T., **Takayama K.**, Tachibana M., Watashi K., Wakita T., Iijima S., Tanaka Y., Mizuguchi H. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Scientific Reports*, 2017 Apr 4;7:45698.

[学会発表] (計 7 件)

1. **高山和雄**、iPS 細胞技術とゲノム編集技術を用いた肝疾患に対する創薬研究、日本薬学会第 139 年会、千葉、2019 年 3 月 20-23 日 (口頭発表)
2. **Takayama K.**, Mizuguchi H. Generation of hepatocytes from human ES/iPS cells for medicinal sciences, 日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 26-28 日 (招待講演)
3. **高山和雄**、水口裕之、高機能かつ高純度なヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と創薬応用、日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 26-28 日 (口頭発表)
4. **高山和雄**、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞のゲノム編集と創薬研究への応用、第 17 回日本再生医療学会総会、横浜、2018 年 3 月 21-23 日 (招待講演)
5. **Takayama K.**, Sakuma T., Sakurai F., Yamamoto T., Mizuguchi H. Enrichment of high-functioning human ES/iPS cell-derived hepatocyte-like cells for pharmaceutical research by using genome editing technology, 第 9 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、武田薬品研修所 (吹田)、2018 年 2 月 7 日-8 日 (ポスター発表)
6. **Takayama K.**, Sakurai F., Mizuguchi H. GENERATION OF HUMAN IPS CELL-DERIVED HEPATOCYTE-LIKE CELLS UNDER THE CHEMICALLY DEFINED CONDITION FOR PHARMACEUTICAL RESEARCH, 日本薬物動態学会第 32 回年会、東京、2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日 (口頭発表)
7. **高山和雄**、櫻井文教、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞における高効率なゲノム編集技術の開発と肝細胞研究への応用、第 24 回肝細胞研究会、旭川、2017 年 6 月 30 日-7 月 1 日 (口頭発表)

[図書] (計 2 件)

1. 三谷成二、**高山和雄**、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞の創出と創薬研究への応用、月刊 PHARMSTAGE (【特集 2】ヒト iPS 細胞を用いた候補薬物の安全性評価)、2018 年 5 月号
2. 三谷成二、**高山和雄**、水口裕之；zone 特異的性質を有するヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の作製法の開発、肝細胞研究会 HP・研究交流 (<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu42.html>) (2017)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：<https://www.seika.site/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

該当なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：水口裕之

ローマ字氏名：Hiroyuki Mizuguchi

研究協力者氏名：今川和生

ローマ字氏名：Kazuo Imagawa

研究協力者氏名：三谷成二

ローマ字氏名：Seiji Mitani

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。