

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22614

研究課題名(和文) in vitro肝炎モデルの構築

研究課題名(英文) Development of a hepatitis model

研究代表者

木戸 丈友(Kido, Taketomo)

東京大学・定量生命科学研究所・特任講師

研究者番号：00401034

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)：肝臓は肝細胞、星細胞、類洞内皮細胞等によって構成され、恒常性維持に寄与する。病因によらず慢性的肝障害は線維化を引き起こし、しばしば肝硬変や肝がんに至る。我々はこれまで、ヒト肝臓モデルに応用可能な星細胞や類洞内皮細胞をiPS細胞から樹立してきた。本研究ではiPS細胞からマクロファージを作製した。分化16日でCD45、CD14共陽性細胞を確認した。CD14陽性細胞はM-CSFにより、マクロファージへ分化した。これらの細胞はM1誘導、M2誘導が可能であった。共培養系において、iPS細胞由来マクロファージの線維化促進作用を評価したところ、マクロファージとの共培養系において星細胞活性化が促進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在開発中の肝疾患治療薬の多くは主に肝細胞を対象としており、線維化の主体である星細胞を対象としていない。各種の肝構成細胞を用いたin vitro肝炎モデルが開発されれば、肝細胞への障害を起点として誘導される星細胞の活性化を定量的に評価するスクリーニング系を開発することが可能である。よって、本研究は肝細胞のみを標的とした従来の薬剤探索法のブレークスルーとなることが期待でき、肝細胞と星細胞の両方を標的とした新たな肝疾患治療薬の開発に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：The liver is a central organ for metabolism and homeostasis, and consists of parenchymal hepatocytes and non-parenchymal cells, such as hepatic stellate cells (HSCs) and liver sinusoidal endothelial cells (LSECs). Regardless of etiology, chronic liver injury induces fibrosis that often proceeds to cirrhosis and cancer. We have already established a protocol to generate HSCs and LSECs from iPSCs, which can be used to develop human liver model. In this study, we generated macrophages from iPSCs using the 2D culture method previously reported, with minor modifications. iPSC-derived CD45+CD14+ cells were found after 16 days of differentiation. CD14+ cells were induced into macrophages (M0) by M-CSF stimulation. These cells were polarized to the M1 or M2 state by LPS and IFN $\gamma$ , or IL4. We evaluated the ability of iPSC-derived macrophages to promote fibrosis in a co-culture system. HSC activation was observed by co-culture with iPSC-derived macrophages.

研究分野：細胞生物学

キーワード：肝臓 肝細胞 星細胞 類洞内皮細胞 肝疾患

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞は種々の薬物代謝酵素を発現し、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。我々はヒト iPS 細胞から肝細胞を誘導するにあたり、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着目し、肝前駆細胞マーカーとして Carboxypeptidase M (CPM) を同定し、その発現を指標に iPS 細胞から肝前駆細胞の分離と増幅培養系の樹立に成功している。これにより、ヒト iPS 細胞から低コストかつ効率的に肝細胞を誘導することが可能となった (Kido et al. Stem Cell Reports 2015)。しかし、CPM 陽性肝前駆細胞から誘導した肝細胞は、従来法で誘導したヒト iPS 細胞由来の肝細胞と比較して、アルブミン産生能や薬物代謝酵素活性が上昇していたが、生体内の成熟肝細胞には及ばなかった。生体の肝発生過程において、肝前駆細胞は各種の非実質細胞と三次元的に相互作用し、肝細胞へ分化・成熟することから、我々は、培養系における肝細胞の高機能化には、非実質細胞との三次元的な組織化が重要であると考え、ヒト iPS 細胞から類洞内皮細胞や星細胞といった非実質細胞を樹立した。さらに、各種の肝構成細胞を使用した二次元共培養系において非実質細胞が肝前駆細胞の増殖や肝細胞への分化・成熟を促進することを明らかにしてきた (Koui et al. Stem Cell Reports 2017, Kido and Koui., Methods Mol Biol, 2019, 特許「肝細胞及び肝非実質細胞、並びにそれらの調製方法」)。従って、肝構成細胞を用いた共培養系の樹立により、ヒト iPS 細胞から肝組織モデルの構築が可能となりつつあるが、肝疾患の予防・診断・治療薬の開発に有用な肝炎モデルの構築には至っていない。

### 2. 研究の目的

肝臓は、肝機能の本質を担う実質細胞（肝細胞）と非実質細胞（類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞等）から構成され、生体の恒常性維持に寄与する臓器である。種々の肝炎ウイルスの感染やアルコールの乱用等の病因によらず、肝炎は慢性化すると星細胞は活性化し、コラーゲン等の線維を産生することで、肝硬変へと進行し、やがて肝がんへと至る。この過程において、肝特有のマクロファージの一種であるクッパー細胞は、肝細胞への障害に応答し、星細胞を刺激し、活性化させる司令塔としての役割を担い、肝炎の進行を制御している。従って、肝疾患の予防・診断・治療薬の開発には、*in vitro* 肝炎モデルが必要であり、開発が進められている。我々はこれまでに、ヒト iPS 細胞から肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞の作製に成功している。しかしながら、iPS 細胞からマクロファージやクッパー細胞といった免疫細胞を作製した報告は少ない。そこで、本研究ではヒト iPS 細胞からマクロファージあるいはクッパー細胞の分化誘導系を樹立し、既に我々が樹立に成功している肝構成細胞と組み合わせることで、*in vitro* 肝炎モデルの構築を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

クッパー細胞は、肝特有のマクロファージの一種であり、その分化過程は未だ不明な点が多く残されている。これまでに報告されている iPS 細胞からマクロファージの分化誘導系をもとに、マクロファージの分化誘導を試みる。誘導したマクロファージの機能、分化能について、特異的な細胞膜表面抗原、サイトカインの発現を指標に評価する。誘導したヒト iPS 細胞由来マクロファージと、マウス由来肝構成細胞あるいはこれまでに作製に成功しているヒト iPS 細胞由来の肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞との共培養系を樹立し、肝組織モデルを作製する。作製した肝組織モデルに、LPS、四塩化炭素やアセトアミノフェンといった肝障害物質を添加し肝細胞を障害する。肝障害に応答し活性化するマクロファージから産生される炎症性サイトカインを定量し、*in vitro* 肝炎モデルとして確立する。また、星細胞の線維化マーカーの発現を解析することで、肝細胞の障害、マクロファージの応答、星細胞の活性化を再現可能な培養系の樹立を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) iPS 細胞からマクロファージ分化誘導

マクロファージは中胚葉由来の細胞である。ヒト iPS 細胞から中内胚葉細胞を誘導するため、フィーダーフリー培養系で増幅したヒト iPS 細胞を回収、分散し、培養系に各種サイトカイン、インヒビターを添加し、マクロファージへ分化誘導した (図 1)。

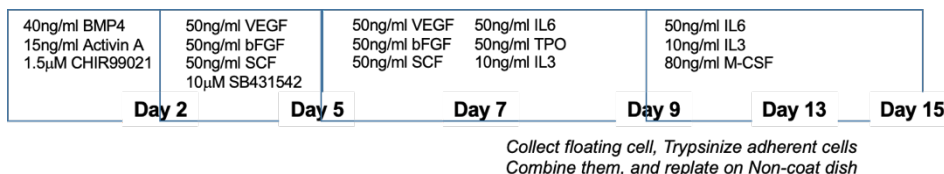


図1. iPS細胞からマクロファージの分化誘導系

分化の進行を確認するため、培養5日目、培養16日目でフローサイトメトリー解析を行った。その結果、培養5日目にはCD73-CD34+造血内皮細胞様細胞を確認でき、培養16日目でCD45+CD14+単球様細胞の出現が認められた(図2)。今回、皮膚線維芽細胞由来と造血幹細胞由来ヒトiPS細胞を用いたが、造血幹細胞由来ヒトiPS細胞で分化誘導効率は高かった。

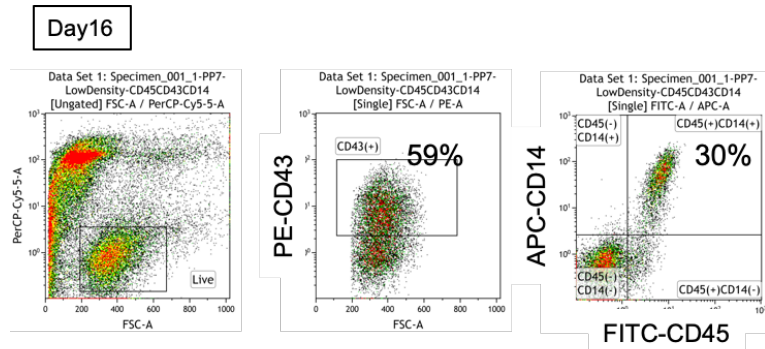


図2. iPS細胞由来CD45+CD14+細胞の作製

### (2) iPS細胞由来マクロファージの機能、分化能解析

CD14+細胞は自動磁気細胞分離装置で分離でき、凍結保存可能であることを確認した。iPS細胞由来マクロファージの機能と分化能を解析するため、CD14+細胞を回収し、血清でコートしたディッシュに播種後、M-CSF添加培地で4日間培養し、M0期に誘導した。M0期まで誘導後、LPSとIFN $\gamma$ によるM1期誘導あるいはIL4によるM2期誘導を試みた。その結果、M0期およびM2期の細胞は、M1期の細胞と比較してAcLDL取り込み能が高いことが示された(図3)。また、M1期に誘導した際に、CD80の高い発現を確認できた(図4)。遺伝子発現解析では、M1期の細胞でIL1b, TNFaの発現誘導、M2期の細胞でPDGFbの発現誘導が認められた(図5)。以上のことから、誘導シグナルによってM1期あるいはM2期に分化するM0期のマクロファージを得ることができた。

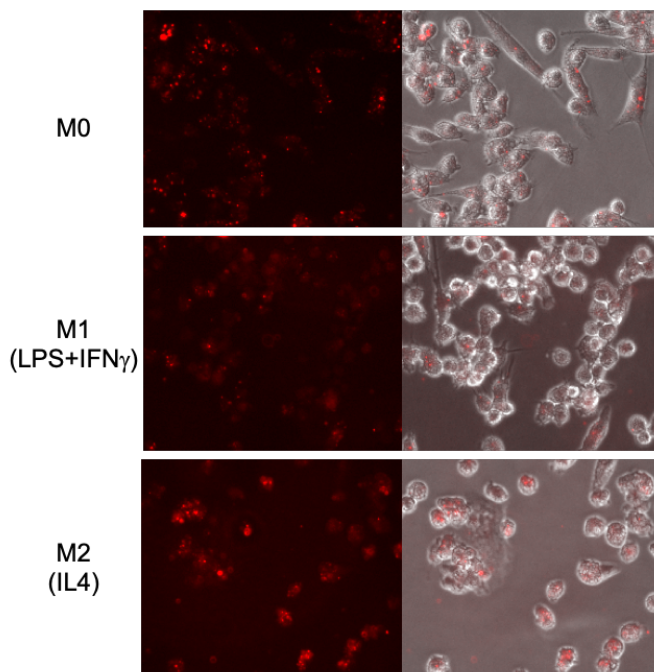
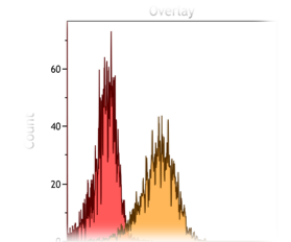


図3. AcLDLの取り込み



CD80 (M1 marker)

図4. CD80の発現

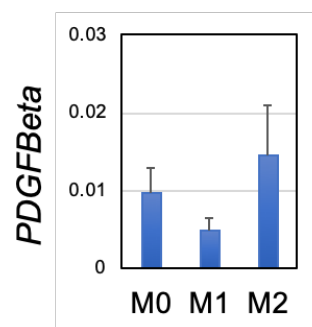


図5. PDGFbの発現

### (3) ACTA2-Fluc/AAVS1-Rluc レポーターiPS細胞の樹立

星細胞の活性化を定量的に評価するため、ACTA2-Fluc/AAVS1-Rluc レポーターiPS細胞を樹立した。我々がこれまでに開発に成功しているACTA2-RFP レポーターiPS細胞由来の静止期星細胞を用いた評価系は、RFPの蛍光を指標とした共焦点顕微鏡による解析であるため、ウェルごとに焦点深度を正しく補正する必要や、生細胞数での標準化の必要があり、オルガノイドに应用するには測定時間や精度に課題があった。そこで本研究では、星細胞の活性化を簡便かつ正確に評価するため、FireflyとRenilla二種のLuciferaseレポーターを用いて、星細胞活性化遺伝子であるACTA2の発現量と生細胞数を同時に定量できる系を開発した。まず、Crispr-Cas9システムを用いて、ヒトiPS細胞のACTA2遺伝子ストップコドン直前に2AペプチドとFirefly luciferaseを導

入した。Firefly luciferase の強度は ACTA2 の発現量と細胞数に依存するので、細胞数を補正する内部コントロールとしては Renilla luciferase を用いた。具体的には、ヒトゲノム上の安全領域として知られる AAVS1 座位に hEF1a プロモーター下で Renilla luciferase を発現するコンストラクトを Crispr-Cas9 を用いて導入した。この iPS 細胞から静止期星細胞を分化誘導し、肝構成細胞を用いた共培養系に使用することで、2 つの Luciferase 遺伝子の発現強度の比により星細胞の活性化を定量的に評価することを可能にした。

#### (4) 肝細胞障害による星細胞活性化評価

マウス肝前駆細胞、胆管上皮細胞、ACTA2-Fluc/AAVS1-Rluc レポーターiPS 細胞由来の星細胞を用いて肝オルガノイドを作製した。この培養系において、iPS 細胞由来マクロファージの有無による線維化促進作用を Luciferase によって評価した。共培養開始後、2 週間経過したところで LPS を添加した。2 日後に Luciferase assay を行ったところ、マクロファージの有無に関わらず Luciferase 活性が上昇していたが、マクロファージ存在下において、LPS 刺激による有意な Luciferase 活性の上昇が確認できた。

#### 〈引用文献〉

- ① 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-Potential Liver Progenitor Cells Derived from Human iPS Cells. *Stem Cell Reports* 5(4), 508-515 (2015)
- ② 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* 9(2), 490-498 (2017)
- ③ Kido T, Kouji Y. Induction of Functional Hepatocytes from Human iPSCs. *Methods Mol Biol* Vol. 1905 (Edited by Naoki Tanimizu), p. 131-142 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Chen Shin-Wei, Himeno Misao, Kouji Yuta, Sugiyama Masaya, Nishitsuji Hironori, Mizokami Masashi, Shimotohno Kunitada, Miyajima Atsushi, Kido Taketomo	4. 巻 10
2. 論文標題 Modulation of hepatitis B virus infection by epidermal growth factor secreted from liver sinusoidal endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71453-5	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 -

1. 著者名 Danoy Mathieu, Poulain Stephane, Kouji Yuta, Tauran Yannick, Scheidecker Benedikt, Kido Taketomo, Miyajima Atsushi, Sakai Yasuyuki, Plessy Charles, Leclerc Eric	4. 巻 16
2. 論文標題 Transcriptome profiling of hiPSC-derived LSECs with nanoCAGE	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Omics	6. 最初と最後の頁 138 ~ 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9mo00135b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 金子 信人、姫野 美沙緒、高橋 紀人、Bonepally Karunakar Reddy、堀 優太郎、宮島 篤、大栗 博毅、木戸 丈友
2. 発表標題 アザ-アルテミシニンによる肝星細胞の活性化抑制評価
3. 学会等名 第34回 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin-Wei Chen, Misao Himeno, Yuta Kouji, Masaya Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Masashi Mizokami, Kunitada Shimotohno, Atsushi Miyajima and Taketomo Kido.
2. 発表標題 Modulation of Hepatitis B virus Infection by Epidermal gGrowth Factor.
3. 学会等名 第27回 肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸 丈友、厚井 悠太、森 勇介、山田 忠範、宮島 篤
2. 発表標題 1. ヒトiPS細胞由来肝構成細胞の樹立と応用
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸 丈友、厚井 悠太、前田 夏希、王 路遥、酒井 康行、宮島 篤
2. 発表標題 2. iPS細胞を用いた肝線維症治療薬の同定
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taketomo Kido, Yuta Kouji, Atsushi Miyajima
2. 発表標題 Generation of quiescent hepatic stellate cells from human iPSCs for drug discovery
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木戸 丈友、厚井 悠太、森 勇介、山田 忠範、宮島 篤
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝星細胞の創薬研究への応用
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姫野 美沙緒、厚井 悠太、陳 欣蔚、西辻 裕紀、杉山 真也、溝上 雅史、木戸 丈友、宮島 篤
2. 発表標題 星細胞と肝細胞の三次元共培養モデルによるB型肝炎ウイルス感染系の確立
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Kouji, Atsushi Miyajima, Taketomo Kido
2. 発表標題 GENERATION OF HUMAN IPSC-DERIVED QUIESCENT HEPATIC STELLATE CELLS FOR DRUG DISCOVERY AND LIVER DISEASE MODELING
3. 学会等名 ISSCR annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 勇介、樋口 珠美、森村 馨、厚井 悠太、木戸 丈友、宮島 篤、我妻 昭彦、山田 忠範、山本 武
2. 発表標題 iPS細胞由来肝星細胞を用いた肝細胞共培養モデルの開発
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 厚井 悠太、宮島 篤、木戸 丈友
2. 発表標題 iPS細胞由来星細胞を用いた肝線維症治療薬スクリーニング系の開発
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木戸丈友、宮島篤	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------