

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650254

研究課題名(和文)代謝に着目した臓器・組織回路の構築

研究課題名(英文)Construction of in vitro system of metabolism-associated organs and tissues

研究代表者

田川 陽一 (TAGAWA, Yoh-ichi)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：70262079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マウスES/iPS細胞から、心筋、内皮細胞ネットワークおよび肝細胞の共存した肝組織、および細胞の共存した膵島様組織という心・内皮・肝・膵が一体化したシステム(vHELP: in vitro Heart, Endothelium, Liver, Pancreas)への分化誘導に成功した。これらの各々の組織特異的な機能について生化学的解析をおこない、それらの機能を有していることを確認した。PDMSによるマイクロ培養装置(培地の流路付)を作製し、vHELPを培養することができた。以上のことから、マウスES/iPS細胞由来vHELPは、本研究が目指すin vitro代謝回路に近づいたと言える。

研究成果の概要(英文)：The vHELP, having heart, endothelium, liver, and pancreatic islet, in vitro living system was succeeded to be constructed from mouse embryonic stem cells. Some biochemical analyses could indicate that these tissue-specific functions in the vHELP. The vHELP was cultured with medium flow in the original fluidic device made from polydimethylsiloxane. Higher hepatic functions were gained by this culture in the fluidic device. Consequently, we have succeeded to construct mouse ES cell-derived vHELP as a minimal mammal in vitro system.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料科学

キーワード：人工臓器工学 再生医工学 マイクロ流体デバイス 肝臓 すい臓 心臓 最小哺乳類 in vitro生命システム

1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞から単に肝細胞を誘導するのではなく、個体における肝器官形成を模したプロセスを経由した、つまり、ES 細胞の集団の一部を拍動心筋細胞へ分化した後、その心筋周囲に内皮細胞ネットワークを有する肝様組織を構築したオリジナルな *in vitro* 肝器官形成モデル **IVL^{mES}** の作製に成功した。これまでの単なる初代培養肝細胞とは異なり、**IVL^{mES}** はマウス個体の肝臓に近い薬物代謝を示す。現在、この **IVL^{mES}** を用いて、肝組織マイクロ培養装置(チップ)を開発し、高肝機能を有し、長期間(1か月以上)にわたってそれらの機能を維持することができた。

2. 研究の目的

エネルギー代謝・ホメオスタシスなどの研究は個体を用いた実験のみでしか解明されないと考えられている。しかし、我々はマウス ES 細胞から内皮細胞と肝細胞が機能的に共存した肝組織を構築しマイクロ培養(チップ化)することで、個体の肝に限りなく近づけることに成功した。この技術を発展させて、他の組織チップと関連させることで個体そのものにも近づけられると考えた。エネルギー代謝の循環を再現した「肝・膵・心筋・神経の組織回路チップ」を構築し、期待通りに機能すれば、薬物動態試験のみにとどまらず様々な動物実験の代替法となる。このシステムは一つの哺乳類生物の代謝系を再現したものであり、知能は持たないが、一つの生命システムの簡略版とも言え、Minimal Mammal として提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス ES 細胞から三胚葉を有する胚様体を作製し、ディッシュに接着させることにより、心筋、肝組織(独自に確立済み)や膵、細胞を分化誘導する。これらの分化誘導組織をポリジメチルシロキサン(PDMS)による流体デバイス上で培養する。

4. 研究成果

マウス ES/iPS 細胞から、心筋、内皮細胞ネットワークおよび肝細胞の共存した肝組織、および細胞の共存した膵島様組織という心・内皮・肝・膵が一体化したシステム(vHELP:in vitro Heart, Endothelium, Liver, Pancreas)への分化誘導に成功した。vHELP にアンモニアを添加すると尿素が合成されるが、そこにオルニチンを加えることによりさらに尿素合成が促進されることが確認できた。アンモニアやアルコール添加により培地中の GOT や GPT 活性レベルを指

標に肝細胞の細胞死レベルを計測できるようになった。この iHLP の系にオルニチンを添加したところ、肝細胞死が抑制されることもわかった。インスリンやグルカゴン投与による培地中のグルコースレベルの変化が確認できた。さらに、高グルコース培地では、培地中のグルコースレベルの低下と共に肝組織細胞中のグリコーゲン顆粒の貯蔵も観察でき、vHELP 中の膵島様組織によるものの可能性が示唆できた。

PDMS によるマイクロ培養装置(培地の流路付)を作製し、vHELP を培養することができた。培地は閉じた循環系ではなく開いた系であり、常に新しい培地が供給されるようになっているため、良好な培養環境が維持され、通常のバッチ培養に比べて特に肝機能が高いことが示された。

以上のことから、マウス ES/iPS 細胞由来 vHELP は、本研究が目指す *in vitro* 代謝回路に近づいたと言える。

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12件)

1. Ahn, S., M. Tamai, K. Nakashima, M. Ito, T. Suzuki, and *Y. Tagawa: An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J. Biosci. Bioeng. in press.* 【査読あり】
2. Aratsu, F., I. Harada, S. Yoshimura, C.-S. Cho, T. Akaike, and Y. Tagawa: Dynamic chemotactic response of fibroblasts to local stimulation using EGF-immobilized microbeads. *Biomaterials* 35:2471-2476, 2014 【査読あり】
3. Aikawa, H., M. Tamai, K. Mitamura, F. Itmainati, G. N. Barber, and *Y. Tagawa: Innate immunity in an in vitro murine blastocyst model using embryonic and trophoblast stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*117:358-365, 2014 【査読あり】
4. Shang, Y., M. Tamai, R. Ishii, N. Nagaoka, Y. Yoshida, M. Ogasawara, J. Yang, and *Y. Tagawa: Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells. *J. Biosci. Bioeng.* 117:99-106, 2014 【査読あり】
5. Miyanokoshi, M., T. Tanaka, M. Tamai, Y. Tagawa, and K. Wakasugi: Expression of the rodent-specific alternative splice variant of tryptophanyl-tRNA synthetase in murine tissues and cells. *Sci.Rep.* 3:3477. doi:1038/srep03477, 2013 【査読あり】

6. Tamai, M., M. Aoki, A. Nishimura, K. Morishita, and *Y. Tagawa: In vitro recapitulation of the urea cycle using murine embryonic stem cell-derived in vitro liver model. *Amino Acids* 45:1343-51, 2013 【査読あり】
 7. Tamai, M., E. Adachi, and *Y. Tagawa: Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblast in dense collagen fibrils. *Tissue Engineering part A* 19:2527-2535, 2013 【査読あり】
 8. Ryu, J.-Y., A. Siswanto, K. Harimoto, and *Y. Tagawa: Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreatic acini. *Transgenic Res.* 22:549-556, 2013 【査読あり】
 9. Harimoto, K., Y. Yoshida, K. Yoshihara, N. Nagaoka, T. Matsumoto, and * Y. Tagawa: Osteoblast compatibility of materials depends on serum protein absorbability in osteogenesis. *Dental Materials Journal* 31:674-680, 2012 【査読あり】
 10. Haque, A., X.-S. Yue, A. Motazedian, Y. Tagawa, T. Akaike: Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-base substrata. *Biomaterials* 33:5094-5106, 2012 【査読あり】
 11. 田川陽一編 創立90周年記念特別企画特集「こんな研究にもES細胞やiPS細胞が役に立つ - ノックアウトマウス、再生医療、毒性試験だけではない - 」 生物工学会誌. 90:546-561, 2012 【査読なし】
 - ・田川陽一：特集によせて. 546
 - ・玉井美保、田川陽一：マウスES/iPS細胞を用いたin vitro肝器官形成システムとそのミトコンドリア機能変化の解析. 560-561 【査読なし】
 12. 三田村圭祐、田川陽一：RNaseの豊富な組織からのRNA抽出のコツ 実験医学 30:2641-2647, 2012 【査読なし】
- 〔学会発表〕(計49件)
1. Tamai, M. and Y. Tagawa: マウス ES/iPS 細胞由来 in vitro 肝器官形成モデルにおける肝細胞極性. 第13回日本再生医療学会総会 2014年03月15日, 京都
 2. 藤原賢, 松原英理, 石部恵, 辻野一茂, 南出善幸, 工藤忍, 玉井美保, 田川陽一: マウス ES 細胞培養過程におけるメタボロミクス. 第13回日本再生医療学会総会 2014年03月15日, 京都
 3. 田川陽一、玉井美保：最小in vitro哺乳類人工生命システム構築の試み 「細胞を創る」研究会6.0 (招待講演) 2013年11月14日、山形
 4. Tamai, M. and Y. Tagawa: Recapitulation of the hepatic function using in vitro liver model from murine ES/iPS cells. 情報計算化学生物学会2013年大会 2013年10月29日～2013年10月31日, 東京
 5. Imamatsu, S., S. Ahn, K. Bamba, H. Okazaki, Y. Tagawa: A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells. TERMIS-AP 2013 Annual conference 2013年10月26日, 中国 烏鎮
 6. Shang, Y., M. Tamai, R. Ishii, N. Nagaoka, Y. Yoshida, J. Yang, Y. Tagawa: Liver tissue in vitro model using galactosylated chitosan/hyaluronic acid hybrid sponges. TERMIS-AP 2013 Annual conference 2013年10月26日, 中国 烏鎮
 7. T. Murakami, M. Tamai, Y. Tagawa: In vitro sinusoid-like networks consisting of hepatocytes, endothelial cells and hepatic stellate cells. 第20回肝細胞研究会 2013年09月27日, 大阪
 8. Tamai, M., H. Sakai, S. Miyagawa, E. Adachi, Y. Tagawa: Reconstruction of Liver Tissues Model Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils. 第20回肝細胞研究会 2013年09月27日, 大阪
 9. Chonnipa N., M. Tamai, H. Uchisawa, Y. Tagawa: Suppression of ethanol-induced liver injury in mouse by a novel tripeptide consisted of nonproteinogenic amino acids. 第20回肝細胞研究会 2013年09月27日, 大阪
 10. Shang, Y., M. Tamai, R. Ishii, N. Nagaoka, Y., Yoshida, M. Ogasawara, J. Yang, Y. Tagawa: Construction of hepatocyte and endothelial cell co-culture system in hybrid sponge integrated with a microfluidic device. 第20回肝細胞研究会 2013年09月27日, 大阪
 11. Taniguchi, Y., J. Ryu, Y. Tagawa: Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreas and liver. 第20回肝細胞研究会 2013年09月27日, 大阪
 12. Ahn, S. and Y. Tagawa: Reconstitution of human in vitro liver model consisting of ES/iPS cell-derived hepatic cells and endothelial networks. 第20回肝細胞研究会 2013年09月27日, 大阪
 13. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長 ES/iPS 細胞の単一細胞での緩慢法凍結保存. 第65回日本生物工学会大会 2013年09月20日, 広島
 14. Shang, Y., M. Tamai, R. Ishii, N. Nagaoka, Y., Yoshida, M. Ogasawara, J. Yang, Y. Tagawa: Construction of hepatocyte and endothelial cell co-culture system in hybrid sponge integrated with a microfluidic device.

- 日本生化学会大86回大会 2013年09月12日, 横浜
15. 玉井美保, 田川陽一: マウスES細胞由来 *in vitro* 肝組織における糖レベル調節能. 日本生化学会大86回大会 2013年09月11日~2013年09月12日, 横浜
 16. 安成皓, 中島謙治, 玉井美保, 村上努夢, 伊藤昌彦, 鈴木哲朗, 田川陽一: ヒトiPS細胞由来 *in vitro* 肝組織を用いたHBV感染・増殖モデルの開発. 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10日, 神戸
 17. 田川陽一: 最小哺乳類システム構築の試み. 2013年度生物工学フォーラム(招待講演) 2013年07月19日, 東京
 18. 田川陽一: 代謝に着目した最小哺乳類 *in vitro* システム構築の試み (招待講演) 転写代謝セミナー, 2013年6月21日, つくば
 19. Tagawa, Y., M. Tamai, Y. Fujiyama: Mouse ES cell-derived *in vitro* heart, liver, and pancreas model on microfluidic device. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013) 2013年06月12日, 米国 ポストン
 20. Tamai, M., H. Sakai, S. Miyagawa, E. Adachi, Y. Tagawa: Characterization of Liver Organoid Tissues Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013) 2013年06月12日, 米国 ポストン
 21. Ahn, S. and Y. Tagawa: High functional *in vitro* liver model consisting of human ES / iPS cell-derived hepatic lineage cells and endothelial networks. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013年06月09日, シンガポール
 22. Tagawa, Y. and M. Tamai: Super-functional and high responsive *in vitro* liver model derived from mouse ES cells and its application to a liver chip. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013年06月09日, シンガポール
 23. Imamatsu, S., S. Ahn, K. Bamba, H. Okazaki, Y. Tagawa: A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells. 日本組織培養学会第86回大会 2013年05月31日, つくば
 24. H. Aikawa, M. Tamai, F. Itmainati, G. N Barber, Y. Tagawa: Innate immune response of *in vitro* mouse blastocyst model. The Joint international Meeting of The 78th Meeting of the Japanese Society of Interferon and Cytokine Research 2013年05月20日~2013年05月21日, 東京
 25. Tagawa, Y.: Super-functional and high responsive *in vitro* liver model from mouse ES/iPS cells. Nankai University Bioengineering Seminar (招待講演) 2013年03月26日, 南開大学 (Tianjin, P.R. China)
 26. 安成皓, 藤山陽一, 田川陽一: 内皮細胞ネットワークを伴ったヒトES/iPS細胞由来肝組織マイクロデバイスの開発. 第12回日本再生医療学会総会 2013年03月23日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 27. 田川陽一: ES/iPS細胞の凍結保存液の開発と肝組織分化誘導. ゲノム未来会議 2.0(招待講演) 2013年02月08日, 慶応大学生命科学研究所 (山形県)
 28. Tagawa, Y.: Developmental Engineering, Regenerative Medicine Technology, and Synthetic Biology. Cathey General Hospital Seminar(招待講演) 2013年01月25日, Cathey General Hospital (Taipei, Taiwan)
 29. 田川陽一: ES/iPS細胞の凍結保存液の開発と肝組織分化誘導. 国立生育医療研究センターセミナー (招待講演) 2012年12月18日, 国立生育医療研究センター (東京都)
 30. 玉井美保, 田川陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞の *in vitro* 肝組織構築とその過程におけるミトコンドリア能力の獲得. 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日, マリンメッセ福岡 (福岡県)
 31. 守矢恒司, 豊田優, 田川陽一: アセトアミノフェン誘導肝障害の *in vivo* および *in vitro* モデルによる解析. 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日, マリンメッセ福岡 (福岡県)
 32. 内沢秀光, 白川和浩, 齋藤ゆかり, NILUBOL Chonnipa, 玉井美保, 田川陽一: シジミ由来オルニチン含有トリペプチド β -Ala-Orn-Orn の肝保護効果. 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日, マリンメッセ福岡 (福岡県)
 33. 玉井美保, 田川陽一: マウスES/iPS細胞を用いた *in vitro* 肝モデルにおける細胞極性の構築. 細胞を創る」研究会 5.0 2012年11月21日~2012年11月22日, 東京工業大学 (神奈川県)
 34. 相川博明, 田川陽一: 栄養外胚葉幹細胞株の樹立と胚盤胞の *in vitro* モデル構築の試み. 細胞を創る」研究会 5.0 2012年11月21日~2012年11月22日, 東京工業大学 (神奈川県)
 35. 田川陽一: 肝細胞・組織培養工学の新しいプラットフォーム-Body-On-Chipsの試みとその応用. スフェロイド分科会セミナー (招待講演) 2012年11月18日, 名

- 古屋都市センター（愛知県）
36. 田川 陽一: マウスES/iPS細胞を用いた *in vitro* 肝臓モデル. 慶應義塾大学先端研究セミナー（招待講演）2012年11月06日, 慶応大学生命科学研究所（山形県）
 37. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類ES/iPS細胞用緩慢法凍結保存液の開発. 日本生物工学会第64回大会 2012年10月26日, 神戸国際会議場（兵庫県）
 38. 内沢 秀光, 白川 和浩, 齋藤 ゆかり, Nilubol Chonnipa, 玉井 美保, 田川 陽一: シジミ由来トリペプチド β -Ala-Orn-Ornの肝保護効果及びGABA-Orn-Ornの存在. 日本食品科学工学会東北支部大会 2012年10月13日, 岩手大学（岩手県）
 39. Tamai, M. and Y. Tagawa: *In vitro* recapitulation of the hepatic metabolism using *in vitro* liver model from murine ES/iPS cells. 3rd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2012年09月06日, Hofburg Congress Center (Vienna, Austria)
 40. Harimoto, K., Y. Yoshida, K. Yoshihara, N. Nagaoka, B.V. Meerbeek, Y. Tagawa: Osteoblasts defeat fibroblasts on titanium surface during osteointegration steps. 3rd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2012年09月05日, Hofburg Congress Center (Vienna, Austria)
 41. 玉井 美保, 田川 陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞由来*in vitro* 肝組織構築における細胞極性とミトコンドリア能力の獲得. 第19回肝細胞研究会 2012年06月29日, 札幌医科大学（北海道）
 42. Yu Yue, 玉井 美保, 田川 陽一: 肝障害と肝再生における一酸化窒素の役割. 第19回肝細胞研究会 2012年06月29日, 札幌医科大学（北海道）
 43. 相川 博明, 田川 陽一: マウス胚盤胞における自然免疫応答研究のための*in vitro* 評価系の確立. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012年06月21日, 神戸商工会議所（兵庫県）
 44. 玉井 美保, 田川 陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞の*in vitro* 肝組織構築とその過程におけるミトコンドリア能力の獲得. 第11回日本再生医療学会総会 2012年06月12-13日, パシフィコ横浜（神奈川県）
 45. 商 怡, 玉井 美保, 楊 軍, 田川 陽一: 天然多糖類の三次元の細胞足場を用いた肝前駆細胞分化誘導. 第11回日本再生医療学会総会 2012年06月13日, パシフィコ横浜（神奈川県）
 46. 安 成皓, 田川 陽一: ヒトES/iPS細胞由来*in vitro* 肝臓モデルを用いた肝機能解析. 第11回日本再生医療学会総会 2012年06月13日, パシフィコ横浜（神奈川県）
 47. Yu Yue, 玉井 美保, 田川 陽一: マウス部分肝切除モデルにおけるアミノ酸の再生促進効果. 第11回日本再生医療学会総会 2012年06月13日, パシフィコ横浜（神奈川県）
 48. Nilubol Chonnipa, 玉井 美保, 齋藤 ゆかり, 内沢 秀光, 田川 陽一: シジミ由来非タンパク質構成アミノ酸からなるトリペプチドの*in vitro* 肝組織やマウス個体における肝保護効果. 第11回日本再生医療学会総会 2012年06月13日, パシフィコ横浜（神奈川県）
 49. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 操作を簡便化したマウスES細胞、霊長類ES細胞凍結保存液の開発. 日本組織培養学会 2012年05月18日, 京都大学（京都府）
- 〔図書〕(計 3件)
1. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存・輸送・解凍 「再生医療における臨床研究と製品開発」 技術情報協会 (2013) 577(129-132)
 2. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存・輸送・解凍 「再生医療・細胞培養の開発状況」シーエムシー出版 (2013) 258(89-96)
 3. 田川陽一、他12名: 生命理工系のための大学院基礎講座 生物化学 工学図書株式会社(2013) 187(149-161)
- 〔産業財産権〕
○出願状況(計 3件)
- 名称: 肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワンクチンの製造方法、スクリーニング方法、およびキット
発明者: 田川 陽一、玉井 美保、アン ソンホ、鈴木 哲朗、伊藤 昌彦、中島 謙治
権利者: 東工大、浜松医科大
種類: 特許
番号: 特願 2014-52754
出願年月日: 2014年03月14日
国内外の別: 国内

名称：霊長類多能性幹細胞の凍結融解方法
発明者：今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡
崎 宏悟, 田川 陽一
権利者：東工大、リンフォテック、日本ジェ
ネティクス
種類：特許
番号：特願 2013-246666
出願年月日：2013 年 11 月 28 日
国内外の別：国内

名称：肝組織培養用デバイス、肝組織培養用
システム、肝組織の培養方法及び肝機能の評
価方法
発明者：藤山 陽一、田川 陽一
権利者：島津製作所、東工大
種類：特許
番号：2013-0003
出願年月日：2013 年 11 月 08 日
国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 陽一 (TAGAWA, Yoh-ichi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号： 70262079

(3) 連携研究者

藤山 陽一 (FUJIYAMA, Yoichi)

株式会社島津製作所・デバイス部・
グループ長
研究者番号： 80396093