

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670589

研究課題名(和文) 肝臓全細胞置換によるヒト化動物モデルの開発

研究課題名(英文) Reconstitution of human hepatic cells in decellularized rodent liver

## 研究代表者

池田 一雄 (IKEDA, Kazuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80275247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットおよびマウス肝臓を界面活性剤を含む溶液で穏やかに還流し、細胞成分を完全に除去し、肝臓の微細形態を保持した[肝臓基質]を作製した。この肝臓基質にiPS細胞由来ヒト肝細胞と肝星細胞株細胞を還流によって移植し、生着させ肝臓基質の再細胞化を行った。その結果、dish上の共培養と比較し有意差を持って「肝臓基質」での培養がALB、CYP3の発現に好影響をもたらすには現時点では至っていない。今後、実質細胞、非実質細胞のバランスの検討あるいはスフェロイド作製後の「肝臓基質」での培養を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Hepatocytes induced from human iPS cells are expected to have medical applications such as biomedical research, drug study and regenerative medicine. In the present study, we first tried to induce hepatic-like cells from human iPS cells by using human hepatic stellate cells. Next, decellularized liver (DCL) was generated. Each mouse or rat liver was perfused sequentially with phosphate buffer saline, sodium dodecyl sulfate and TritonX100 through portal vein. Hepatic-like cells from human iPS cells and human hepatic stellate cells were infused through a portal vein after the completion of the decellularized procedure and cultured. When expression level of albumin and cyp3A4 was measured, the expression in the cells cultured in DCL was not significantly increased, compared with that in the cells cultured in normal dish. We need further devices to enhance the expression.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞 肝星細胞 iPS細胞 肝臓基質

## 1. 研究開始当初の背景

共同研究者の吉里らは、肝障害マウス(uPA)トランスジェニックマウスと免疫不全マウス(SCID)マウスを交配して得られたuPA/SCIDマウスにヒト肝細胞を移植して、ヒト肝細胞で構築された肝臓を有するキメラマウスを作成した (Am J Pathol, 2004;165(3):901-912. Hepatology, 2008;47(2):435-446)。これにより、生体内でヒト肝細胞がアルブミン合成能や薬物代謝能を保有しながら増殖するというユニークなモデルができあがった。これまでの齧歯類の病態モデルを利用したヒト肝臓病に関する研究は、齧歯類肝細胞の代謝動態や炎症・免疫反応がヒトと異なるため、得られたデータがヒト肝病態を反映するとは限らないものであった。また、培養によって増殖性ヒト肝細胞を得ることが可能になったが、高度に分化した肝細胞機能は培養により消失してしまうという難点があった。上記キメラマウスは、これらの難点を克服し、ヒト肝炎ウイルスの感染実験モデルとして、さらに、ヒトの薬物動態予測モデル動物としての利用価値が定まりつつある。しかしながら、肝臓の肝細胞以外はマウスの細胞で構築されているため細胞間相互作用が正常でないことで様々な問題が生じる。

我々はこれまで肝非実質細胞(肝星細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞)分離法を確立し、この分離培養細胞を用いて特に肝星細胞に関連しての肝臓の再生、組織修復に関連する各種分子動態の解析をおこなってきた。(Am J pathol, 1998, 153:1695-1700, J Clin Invest, 2001, 108:1369-1378, J Biol Chem, 2002, 277:19206-19212) また、星細胞の活性化の制御による肝線維化、肝硬変の治療を開発することを目標に、実験的に、血管内皮細胞増殖抑制剤、TNP-470が肝星細胞の活性化を抑制すること(Hepatology. 2000, 32:980-989)や膵炎の治療薬として使用されているセリンプロテアーゼインヒビターがTGF- $\beta$ の発現および活性を抑制することで、肝線維化を抑制すること(Gastroenterology. 2001, 120:1784-1800)。さらに、組み換えアデノウイルスベクターを用いてコラーゲンプロモ

ーターによる細胞特異的遺伝子制御により肝線維化を抑制すること(Gastroenterology 2005,129:259-268, GUT 2007,56:396-404)を明らかにしてきた。

これら肝非実質細胞研究を背景として、本研究では、肝臓の非実質細胞との細胞間相互作用により肝実質細胞の分化誘導が促進され、肝臓機能が保持されるという仮説のもとに、肝実質細胞と肝非実質細胞をともにヒト化した動物モデルの開発を目指し、肝臓基質の作製と肝臓基質内でのヒト肝実質細胞、肝非実質細胞の共培養実験をおこなった。

## 2. 研究の目的

現有のヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では実質細胞である肝細胞はヒト化されているが、他の非実質細胞(類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞など)は、ヒト化されていない。肝臓の炎症反応や線維化にはこれら非実質細胞が深く関わっていることが知られており、炎症や線維化を再現出来るモデル動物では肝細胞のみならず、これら非実質細胞もヒト化することが求められる。そのため、本研究では、「ヒト肝臓細胞で構築された人工肝臓」を有する実験系や全肝臓細胞ヒト化動物モデルを将来開発するための重要な最初のステップを築くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1)「肝臓基質」作製
- (2)iPS細胞から肝細胞への分化誘導の効率化
- (3)「肝臓基質」再細胞化

## 4. 研究成果

本研究において、ラット肝臓、マウス肝臓を界面活性剤(0.5%~1.0%SDS)を含む溶液で穏やかに還流し、細胞成分を完全に除去し、肝臓の微細形態を保持した[肝臓基質]を作製し、この肝臓基質にiPS細胞由来ヒト肝細胞還流によって移植し、生着させ肝臓基質の再細胞化を目標に、実験を行った。

- (1)「肝臓基質」作製;ラット肝臓、マウス肝臓を用い、ex-vivo閉鎖系(体外循環系)で培養可能となるように動物の門脈と胸部

下大静脈にカニューレーションを行い、0.5%～1.0%SDS を含む溶液で穏やかに還流し、細胞成分を完全に除去し、肝臓裏面の腹部下大静脈を閉鎖した。これによって ex-vivo 閉鎖系の肝臓基質を作製することができた。(2) iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の効率化；ヒト iPS 細胞を、ActivinA 100 ng/ml 添加した RPMI Medium1690+B27 supplement 中で、37℃、5%CO<sub>2</sub>、4%O<sub>2</sub> 条件下で 5 日間培養し、増殖因子を 20ng/ml HGF に変更し、引き続き低酸素条件下で 5 日間培養した。その後、20ng/ml OSM と HCM Single Quots を添加した Hepatocyte Basal Medium で 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 5 日間培養することにより、肝細胞へと分化誘導させた。さらに、ウイルスベクターによる遺伝子導入、フィーダー細胞としての肝星細胞の利用や GH をもちいることで ALB の発現増加がみられた。(3) 「肝臓基質」再細胞化；この「肝臓基質」の一葉に、iPS 細胞からの誘導肝細胞と肝星細胞株を注入し、Hepatocyte Basal Medium で還流し、混合培養を行った。混合培養 1 日後、2 日後、ALB と CYP3 の発現等を評価した。その結果、dish 上の共培養と比較し有意差を持って「肝臓基質」での培養が ALB、CYP3 の発現に好影響をもたらすには至っていない。今後、実質細胞、非実質細胞のバランスの検討あるいはスフェロイド作製後の「肝臓基質」での培養を検討していく予定である。

#### 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 4 件)

①Teranishi Y, Matsubara T, Krausz KW, Le TT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Involvement of hepatic stellate cell cytoglobin in acute hepatocyte damage through the regulation of CYP2E1-mediated xenobiotic metabolism. *Lab Invest.* 2015 May;95(5):515-24. doi: 10.1038/labinvest.2015.29. Epub 2015 Feb 16. PubMed PMID: 25686096. 査読有

②Kawasaki K, Ushioda R, Ito S, Ikeda K, Masago Y, Nagata K. Deletion of the collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2015 Feb 6;290(6):3639-46. doi: 10.1074/jbc.M114.592139. Epub 2014 Dec 18. PubMed PMID: 25525267; PubMed Central PMCID: PMC4319029. 査読有

③Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Efficient Engraftment of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells in uPA/SCID Mice by Overexpression of FNK, a Bcl-xL Mutant Gene. *Cell Transplant.* 2015;24(6):1127-38. doi: 10.3727/096368914X681702. Epub 2014 May 6. PubMed PMID: 24806294. 査読有

④Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepato Res.* 2014 Apr;44(4):460-73. doi: 10.1111/hepr.12140. Epub 2013 Jun 30. PubMed PMID: 23607402. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

①北村賢治、松原勤、寺西優雅、仲谷和記、河田則文、池田一雄 アセトアミノフェン誘導性肝障害における小胞体ストレス応答因子 CHOP の役割  
第 28 回肝臓洞壁細胞研究会 平成 26 年 12 月 14 日 アークホテル岡山 (岡山県岡山市)

②Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xl mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cells-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice

The 20th Annual Meeting of the Japanese Society  
for the Research of Hepatic Cells

Sep 27, 2013 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

③Sato M, Matsubara T, Daikoku A, Rombouts K,  
Ikeda K, Pinzani M, Kawada N. Identification of  
FGF2 as a cytoglobin regulatory factor leading to  
the deactivation of human hepatic stellate cells.  
The AASLD Liver Meeting  
Nov. 14, 2015 San Francisco (USA)

④Matsubara T, Teranishi Y, Nakatani K, Kawada  
N, Ikeda K. A protective role of C/EBP  
homologous protein in acetaminophen-induced  
acute hepatocyte damage in mice.  
The AASLD Liver Meeting  
Nov. 14, 2015 San Francisco (USA)

⑤ Matsubara T, Kitamura K, Teranishi Y,  
Kawada N, Ikeda K. Stress influences on bile  
acid homeostasis in development of diet-induced  
steatohepatitis  
The AASLD Liver Meeting  
Nov. 2, 2013 Boston (USA)

⑥Teranishi Y, Matsubara T, Iwaisako K, Nakatani  
K, Thuy LT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K,  
Kawada N. Unexpected influence of  
oxygen-binding cytoglobin expressed in stellate  
cells on acetaminophen-induced acute hepatocyte  
damage; in vivo and in culture studies  
The AASLD Liver Meeting  
Nov. 2, 2013 Boston (USA)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departmen  
ts/bunshi-anatomyregenerative.shtml](http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departments/bunshi-anatomyregenerative.shtml)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 一雄 (IKEDA, Kazuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80275247

### (2) 連携研究者

吉里 勝利 (YOSHIKATO, Katsutoshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・客員教  
授

研究者番号：20095516