

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750145

研究課題名(和文) ES/iPS細胞由来肝組織にリンパ球を導入したin vitro 炎症モデルの構築

研究課題名(英文) Hepatitis in vitro model of ES/iPS cell-derived hepatic tissue by co-culture with lymphocytes.

研究代表者

玉井 美保 (TAMAI, Miho)

東京工業大学・生命理工学研究科・東工大特別研究員

研究者番号：20619704

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)：マウスES細胞由来in vitro 肝組織モデルにおいて、アセトアミノフェン(APAP)を添加することで、細胞障害の誘導が観察できた。このことは肝細胞特異的なAPAP代謝によるマウスの薬物性肝障害と類似していた。そこで、このin vitro肝障害モデルにおいて免疫細胞の関与を検討するため、in vitro肝組織モデルと脾臓由来のリンパ球細胞の共培養を試みた。APAP添加後、共培養群においてより障害が促進されることが観察された。以上より、リンパ球を導入したin vitro 肝組織モデルでは、薬物による直接的な細胞死だけでなく、リンパ球から産生された炎症性サイトカインによる炎症が再現可能であった。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte injury could be observed in the mouse ES cell-derived hepatic tissue in vitro model after the addition of acetaminophen, APAP. This result was similar to the APAP-induced liver injury in a dependent manner on the hepatocyte-specific metabolism in mice. So, in order to investigate contribution of immune cells in the APAP-induced liver injury, lymphocytes which were prepared from syngeneic mouse spleen were co-cultured in the hepatic tissue in vitro model. The injury level was enhanced in the in vitro model co-cultured with the lymphocytes compared to that without ones. As mentioned above, besides direct drug-induced cell death, it could be indicated that the hepatic tissue in vitro model can become the injury by associating with inflammatory cytokines.

研究分野：人間医工学・生体医工学・生体材料科学

キーワード：in vitro モデル 肝組織 肝炎 リンパ球 ES/iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症は免疫反応によって引き起こされた後に、標的細胞の細胞死や再生、さらには活性化した線維芽細胞が入り込んだ線維化状態などきわめて複雑ある。これまで *in vitro* 系ではリンパ球と標的細胞のみでの免疫反応といった部分的な研究にとどまり、全体的な炎症反応の理解のためには動物実験に頼らざるを得なかった。本研究では、炎症を理解し、克服するための '*in vitro* 炎症モデル' の確立を目指し研究をおこなった。これまでに、肝細胞、内皮細胞や星細胞等からなる実際の肝組織に匹敵する *in vitro* 肝組織モデルについて研究を進め報告をしてきた。生体に近い構造を有するこの肝組織モデルであれば、*in vivo* の肝炎に匹敵するこれまでに報告の無い包括的な、*in vitro* 肝炎モデルの開発につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

炎症を理解・克服するために動物実験の代替となりうる '*in vitro* 炎症モデル' の確立が、より詳細な作用機序解明のために期待されている。これまでの免疫反応の *in vitro* 系はリンパ球と標的細胞のみの免疫反応にとどまっている。しかし、実際の炎症反応を考慮するためには、単一の細胞ではなく、組織全体としてリンパ球との相互作用を検証する必要があると考えた。それは単一の細胞では、生体内の組織における機能を十分に発揮できないためである。これまで *in vitro* での肝機能評価系には、ES 細胞や iPS 細胞を用いた肝細胞のみへの分化誘導報告が殆どであり、完全に *in vitro* での機能的な肝組織を用いた *in vitro* 肝炎モデル構築については未だに報告がない。

そこで本研究では、*in vitro* 肝組織モデルにリンパ球を導入し、'*in vitro* 肝炎モデル' の構築を目指した。これにより免疫反応を惹起し、肝組織全体での炎症反応を誘導する系の開発につながると考えた。本研究が達成されれば、動物実験の代替や様々なステップにおける阻害剤などの開発へ応用が期待できると考えた。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 肝組織モデルの作製と、肝細胞極性評価

より生体に近い肝機能を実現するには本来の肝臓における細胞同士の相互作用つまり、細胞の構成が重要であると考えている。そこで先ず、肝細胞、内皮細胞や星細胞等からなる実際の肝臓に匹敵する *in vitro* 肝組織モデルの作製をおこなった。特に、作製した肝組織の肝細胞が、肝細胞 - 肝細胞、肝細胞 - 内皮細胞、肝細胞 - 微小胆管という相互作用を再構築できている、つまり本来の肝細胞の

有する肝細胞極性構造が再構築できていることを重要ポイントと考えて *in vitro* 肝組織モデルを作製した。具体的には、BALB/c マウス由来 ES 細胞株 ST1 (独自に樹立) またはマウス iPS 細胞: iPS-MEF-Ng-20D-17 理研細胞バンク) を用いて、浮遊培養により胚様体を形成し、選別した胚様体をゼラチンコート上へ播種、その日を 0 日 (A0) とし、分化誘導培地で A18 まで培養し、*in vitro* 肝組織モデルを作製した。作製した、*in vitro* 肝組織モデルの肝細胞極性の機能評価は、Carboxydichlorofluorescein diacetate (CDFDA) を用い、*in vitro* 肝組織モデルに添加することで行った。

(2) *in vitro* 肝組織モデルを用いた '*in vitro* 肝炎モデル' の確立

次に、肝細胞極性が再構築できている *in vitro* 肝組織モデルを用いて、*in vitro* 肝炎モデルへの応用を試みた。上記 ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルは、BALB/c マウス由来であることから、BALB/c マウスの脾臓から採取したリンパ球を用いて共培養し、炎症反応が惹起可能なモデルの構築をおこなった。薬物性肝障害誘導物質として代表的なアセトアミノフェン (APAP) は、その肝障害誘導機構において、いくつかの炎症性サイトカインが起炎的に関与する可能性が報告されている。そこで本研究では、APAP を、作製した *in vitro* 肝組織モデルとリンパ球との共培養系に添加し、炎症反応が誘導できるかを検証した。細胞障害性の評価は、培養液中の乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase: LDH) の濃度を測定することで評価した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 肝組織モデルの作製と、肝細胞極性評価

マウス ES 細胞、またはマウス iPS 細胞を用いて *in vitro* 肝組織モデルを作製し、肝細胞極性評価のために、CDFDA を添加した。その結果、緑色蛍光を呈する物質が細胞間局所に蓄積する様子が観察された。添加した CDFDA は *in vitro* 肝組織モデルにおける肝細胞表面にある有機アニオントランスポーター (OATP) により細胞内へ取り込まれ、細胞内のエステラーゼにより脱アセチル化を受け緑色蛍光物質となり、胆管側の多剤耐性関連タンパク質 (MRP2) により排出されたと考えられ、作製した *in vitro* 肝組織モデルは細胞極性を再構築できていることが確認された。

(2) *in vitro* 肝組織モデルを用いた '*in vitro* 肝炎モデル' の確立

先ず、細胞極性の再構築できたマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルを用いて、APAP を添加することで細胞障害が誘導できることを確認した。マウス ES 細胞由来 *in vitro*

肝組織モデルに、APAP を添加し、24 時間後における細胞障害を培養中の LDH 濃度を測定することで評価した。その結果、マウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルでは、単純培養した初代培養肝細胞と比較して、24 時間後における LDH 濃度が高く、APAP により迅速に应答した結果であると考えられる。このことから、薬物性肝障害の評価モデルにおいて、単純な単一細胞ではなく、組織構築の必要性が示唆される結果が得られた。

次に、この *in vitro* 肝障害モデルにおいて免疫細胞の関与を検討するため、作製したマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルと脾臓由来のリンパ球細胞との共培養を試みた。この共培養系に、APAP を添加し 24 時間後の培養液中の LDH 濃度を測定した。その結果、マウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルと比較して、リンパ球との共培養系において、より障害が促進されることが観察された。肝炎患者の血中には炎症性サイトカインが高レベルに検出され、直接的な細胞障害よりも、免疫システムの活性化による肝障害の影響が大きいとされている。本研究結果においても、免疫担当細胞であるリンパ球を系内に導入したことでより障害が誘導されており、薬物による直接的な組織障害だけでなく、同時に誘導されたサイトカインによる炎症の再現が可能であったと考えられる。本研究の *in vitro* 肝組織モデルは、免疫反応を可能とするモデルであり、新しい評価系としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 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 and hepatic cell lines improves human hepatitis B virus replication. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118:107-11 (2014) doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.016
【査読有】
2. 玉井美保、田川陽一：哺乳類の合成生物学、そして人工生命体へ。特集「細胞を創る」研究とその展開：生物工学会誌. 93: 620-622, 2015
【査読無】

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 田川陽一、玉井美保、藤山陽一：細胞間等コミュニケーションを考慮した合成生物学 - デザイン生命工学 - . 日本農芸化学会 2016 2016 年 3 月 30 日、北海道
2. 玉井美保、藤山陽一、田川陽一：哺乳類 *in vitro* モデル構築の試み Mammal

in vitro model using fluidic culture device. 日本農芸化学会 2016 2016 年 3 月 30 日、北海道

3. 石部恵子、松原英理子、工藤忍、玉井美保、田川陽一：マウス ES 細胞の胚様体形成および初期胚発生改善のためのミネラルオイルの影響と精製法. 第 15 回 日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 19 日、横浜
4. 田川陽一、玉井美保、藤山陽一：デザイン生命工学による最小哺乳類 *in vitro* システム. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
5. 玉井美保、田川陽一：免疫細胞応答を考慮した *in vitro* 肝炎モデル構築の試み. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
6. 苅谷智行、玉井美保、Jonathan Hollmann、相川博明、田川陽一：ES 細胞および TS 細胞の共培養系による胚盤胞 *in vitro* モデルにおけるサイトカイン応答の解析. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
7. 古賀匠、玉井美保、守矢恒司、田川陽一：マウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルへの概日リズム導入の試み. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
8. 阿部一成、玉井美保、村上努夢、田川陽一：肝細胞・内皮細胞・星細胞による *in vitro* 肝組織モデル. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
9. 高橋和雅、玉井美保、田川陽一：化学処理フィーダー上におけるマウス ES 細胞の神経系への分化誘導. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
10. 鴨志田美里、玉井美保、弘瀬雅教、田川陽一：胚性幹細胞由来心筋組織への概日リズム導入の試み. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
11. 石部恵子、松原英理子、工藤忍、玉井美保、田川陽一：ES ならびに iPS 細胞から作製する肝組織の薬の代謝及び毒性評価への応用におけるミネラルオイルの影響とその精製. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 2016 年 3 月 8 日、横浜
12. 玉井美保、藤山陽一、田川陽一：流体デバイスを用いた肝組織チップによる肝機能の向上 Recapitulation of the hepatic functions in liver tissue chips using fluidic cell culture device. 第 38 回分子生物学会年会・第

- 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015
2015年12月2日、神戸
13. Yue YU, 玉井 美保, 田川 陽一: 肝再生における一酸化窒素の機能解析. 第 80 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015年7月17日、東京
 14. 守矢 恒司, 玉井 美保, 小松 銀河、上平 正道、田川 陽一: 概日リズムによるアセトアミノフェン代謝の制御及び IL-6 の関与. 第 80 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015年7月17日、東京
 15. 苅谷 智行, 玉井 美保, 相川 博明、田川 陽一: 動物実験代替法としての胚盤胞 *in vitro* モデルを用いた自然免疫システム. 第 80 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015年7月18日、東京
 16. 田川陽一, 玉井美保, 藤山陽一: 動物実験代替法を目指した最小哺乳類 *in vitro* システム. 第80回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015年7月18日、東京
 17. Tamai, M., Y. Fujiyama, Y. Tagawa: Murine ES/iPS cell-derived *in vitro* liver model on a micro-fluidic device. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (ISSCR), 25 June 2015, Stockholm Sweden
 18. 玉井 美保, 酒井 宏司、宮川 眞一、田川 陽一: 門脈枝結紮誘導肝前駆細胞株樹立における IL-6 依存性について. 第 22 回肝細胞研究会 2015年6月4日、米子
 19. 田川 陽一, 玉井 美保, 藤山 陽一: 最小哺乳類 *in vitro* モデルの構築と応用 -ES/iPS 細胞を用いた試み-. 第 14 回分子予防環境医学研究会 2015年2月13日、大阪
 20. Tagawa, Y., M. Tamai, S. Ahn, K. Nakashima, M. Ito, and T. Suzuki: Human iPS cell-derived *in vitro* model for Hepatitis B virus infection and proliferation. 2014 World Stem Cell Summit 4 December 2014, San Antonio
 21. Tamai, M., Y. Fujiyama, Y. Tagawa: High- and multi-functional *in vitro* liver model derived from mouse ES/iPS cells on micro-fluidic device. 2014 World Stem Cell Summit 4 December 2014, San Antonio
 22. 田川 陽一, 玉井 美保, 藤山 陽一: 再生医学研究オーバービュー:ES 細胞から分化細胞、組織、そして、生命システム。「細胞を創る」研究会 7.0 2014年11月14日、北海道
 23. 田川 陽一, 玉井 美保, 藤山 陽一: 最小哺乳類 *in vitro* システムの戦略と応用. 第 66 回日本生物工学会大会 2014年9月10日、北海道
 24. 玉井 美保, 藤山 陽一、田川 陽一: 流体デバイスを用いたマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデル. 第 66 回日本生物工学会大会 2014年9月10日、北海道
 25. 竹下 裕治, 張本 乾一, 玉井 美保, 南 隆之、荻 博次、長岡 紀幸、松川 昭博、吉田 靖弘、田川 陽一: QCM-D による様々な細胞種の接着と伸展の観察. 第 66 回日本生物工学会大会 2014年9月10日、北海道
 26. 玉井 美保 田川陽一: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルにおける肝代謝能. 第 21 回肝細胞研究会 2014年6月27日、東京
 27. 守矢 恒司, 玉井 美保, 豊田 優、田川 陽一: 概日リズムを考慮したアセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける急性期タンパク質による保護作用. 第 21 回肝細胞研究会 2014年6月27日、東京
 28. 玉井 美保, 酒井 宏司、宮川 眞一、田川 陽一: マウス門脈結紮による肝再生モデルにおける IL-6 依存性. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2014年6月19日、北海道
 29. 守矢 恒司, 玉井 美保, 豊田 優、田川 陽一: マウス門脈結紮による肝再生モデルにおける IL-6 依存性. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2014年6月19日、北海道
 30. 苅谷 智行、相川 博明、玉井 美保, 田川 陽一: ES 細胞および TS 細胞を用いたマウス胚盤胞 *in vitro* モデルにおける TLR 応答. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2014年6月19日、北海道
 31. 玉井 美保, 藤山 陽一、田川 陽一: *In vitro* liver model derived from murine ES/iPS cells for animal use alternative, 動物実験代替を目指した *in vitro* 肝組織モデル. 日本組織培養学会第 87 回大会 2014年5月29日、東京

〔図書〕(計 1 件)

1. 玉井美保, 小池 亨、田川 陽一: 肝組織構築における培養条件の設定とシステム開発.
動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術: 動物細胞の培養を成功させる条件設定集: 技術情報協会. 第 9 章, 第 14 節, 2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉井 美保 (TAMAI Miho)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
東工大特別研究員
研究者番号：20619704