

平成21年 6月 2日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18300161
 研究課題名 (和文)
 発生的知見に基づいたES細胞由来肝組織による新しい概念の高性能肝臓モデルの開発
 研究課題名 (英文)
 Development of super-functional liver model based on developmental information
 研究代表者
 田川 陽一 (TAGAWA YOH-ICHI)
 東京工業大学・フロンティア研究センター・准教授
 研究者番号： 70262079

研究成果の概要：

個体発生時の肝臓形成を模倣したマウスES細胞から肝組織へ分化誘導する我々独自の手法を応用して、肝細胞チップではなく、肝組織チップを開発することが本研究の目的であった。胚様体またはES細胞由来肝組織を培養できる蓋開閉型マイクロ培養装置の開発を行い、肝機能を測定することに成功した。また、ES細胞由来肝組織のほか、内皮細胞ネットワーク管状構造の周囲に初代培養肝実質細胞が接着する類洞肝組織構造のマイクロ培養装置の開発にも成功した。以上のことから、肝組織チップが薬物代謝や毒性試験へ応用できる可能性を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学・肝臓

1. 研究開始当初の背景

肝組織における肝細胞の3つの極性（肝細胞-肝細胞、肝細胞-胆管、肝細胞-ディッセ腔）を *in vitro* で再現することが難しいことなどから、肝臓から調製された肝細胞の培養は困難を極めていた。バイオマテリアルの開発や肝細胞だけでなく肝非実質細胞との共培養なども多数報告があるが、肝組織構築を再現することは難しかった。

その一方で、分化に対して万能であるES細胞を利用して、肝細胞のみへ分化誘導する

試みが多数報告されるようになった。ES細胞由来肝細胞を移植医療へという方向性では正しいことであるが、ES細胞由来肝細胞が本来の肝細胞と同一であるならば、*in vitro* 培養に関しては同様な問題を克服できないことは自明であると我々は考えた。

我々は、肝細胞培養には肝組織構築が必要不可欠であることに重点をおき、個体発生時の肝臓形成を模倣するため、マウスES細胞を用いて一から肝組織（肝細胞だけでなく内皮細胞等もES細胞から分化）を形成させる

ことに成功していた(S. Ogawa, Y. Tagawa, et al., Stem Cells, 2005)。

2. 研究の目的

肝臓は、薬物の解毒、多くの栄養物の代謝、血液凝固因子やアルブミン等のタンパク質産生など非常に多くの機能を有する生命に必須の臓器である。それらのほとんどの機能を肝実質細胞(肝細胞)が担っており、しかも、一般的な成熟細胞は一つの機能をもつようになるが、一つの肝細胞でこれらの機能すべてを同時に有していることが特徴である。この肝細胞を *in vitro* で培養すると、これらのほとんどの肝機能は劇的に失われてしまうことから、肝細胞そのものを用いた薬物代謝試験や肝細胞移植医療は困難であった。

我々独自の発生学的知見を用いた肝組織誘導法を応用し、これまでの肝細胞チップとは異なり、肝組織チップを開発することを本研究の目的とした。肝組織チップは、薬物代謝試験への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 肝組織を培養可能なマイクロ培養装置を開発する。従来の細胞チップではマイクロ培養装置内へ培地と共に細胞をチューブを用いて導入し培養室内へ肯定する手法であった。しかし、再構築した肝組織やまたは分化誘導前の胚様体を流入路から導入することは不可能であるため、マイクロ培養装置を開閉可能な設計にすることにした。設計したマイクロ培養装置はポリジメチルシロキサン(PDMS)により加工した。

(2) ヒトES細胞の使用に関する学内整備を行い、申請を行った。

(3) さまざまなバイオマテリアル上で血管内皮細胞の管腔化を試み、管腔化内皮細胞に初代培養肝細胞等を播種して肝組織の再構築を行い、マイクロ培養装置にて培養を行った。

(4) 肝機能に関しては、特異的な遺伝子群の発現の他、アンモニア代謝を比色法により、テストステロンのCYPによる水酸化をHPLCにより測定し、それぞれの能力を検討した。

4. 研究成果

胚様体またはES細胞由来肝組織を培養できる蓋開閉型マイクロ培養装置の開発を行い、肝機能を測定することに成功した。

肝組織チップ(バッチ型)の構造と全体図

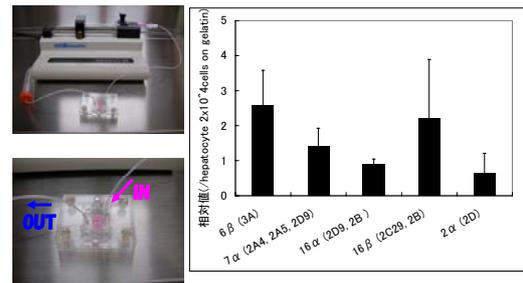


図1 肝組織チップとその代謝能力の例

さらに、膜介在型のチップの開発も行い、バイオマテリアルを導入した膜で培養室を区切り、その膜の上の流路と下の流路を独立させ、膜の上に肝実質細胞、下に内皮細胞を接着させたチップを作製した。それぞれの細胞種が密に接着できるように、流路を短くした。CYPの活性を測定し、一定の活性レベルを確認できた。

また、ES細胞由来肝組織のほか、内皮細胞ネットワーク管状構造の周囲に初代培養肝実質細胞が接着する類洞肝組織構造のマイクロ培養装置の開発に成功した。この培養はEHSゲル等のバイオマテリアルを用いる必要があるため、培地の流入圧に耐えられる必要があるため、培地流入口を工夫した。類洞様構造について、組織学的検討を行い、切片および共焦点顕微鏡による観察から管状構造を確認した。

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10件)

- ① Motoyama, H., S. Ogawa, A. Kubo, S. Miwa, J. Nakayama, Y. Tagawa, and S. Miyagawa: In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 [査読あり]
- ② Maruyama, H., M. Takahashi, M. Takamoto, Y. Shiba, H. Ise, J. Koyama, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and U. Ikeda: Deficiency of Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular

- injury. *Cardiovasc Res.*, 80:175-180, 2008 [査読あり]
- ③ Isoda, K., N. Kagaya, S. Akamatsu, S. Hayashi, M. Tamesada, A. Watanabee, M. Kobayashi, Y. Tagawa, M. Kondoh, M. Kawase, and K. Yagi: Hepatoprotective effect of vitamin b(12) on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 31:309-311, 2008 [査読あり]
- ④ Hoshihara, T., H. Nagahara, C. S. Cho, Y. Tagawa, and T. Akaike: Primary hepatocyte survival on non-integrin-recognizable matrices without the activation of Akt signaling. *Biomaterials* 28:1093-1104, 2007 [査読あり]
- ⑤ 田川陽一 : トランスジェニック動物作製のための遺伝子導入方法 再生医療 6:134-139, 2007 [査読なし]
- ⑥ Tsutsui, M., S. Ogawa, Y. Inada, E. Tomioka, A. Kamiyoshi, S. Tanaka, T. Kishida, M. Nishiyama, M. Murakami, J. Kuroda, Y. Hashikura, S. Mivagawa, F. Satoh, N. Shibata, and Y. Tagawa*: Characterization of cytochrome P450 expression in murine embryonic stem cell-derived hepatic tissue system. *Drug Metab. Dispos.* 34:696-701, 2006 [査読あり]
- ⑦ Sato, H., M. Takahashi, H. Ise, A. Yamada, S. Hirose, Y. Tagawa, H. Morimoto, A. Izawa, U. Ikeda: Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342:107-112, 2006 [査読あり]
- ⑧ Qian, X., K. Agematsu, G. J. Freeman, Y. Tagawa, K. Sugane, T. Hayashi: ICOS-ligand B7-H2, expressed on Human type II alveolar epithelial cells, plays a role in pulmonary host defense system. *Eur. J. Immunol.* 36:906-918, 2006 [査読あり]
- ⑨ Kamiyoshi, A., T. Sakurai, Y. Ichikawa-Shindo, J. Fukuchi, H. Kawate, S. Muto, Y. Tagawa, and T. Shindo : Endogenous aCGRP protects against concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342:152-158, 2006 [査読あり]
- ⑩ Sasaki, S, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and A. Nakane: The role of gamma interferon in acquired host resistance against *Staphylococcus aureus* infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46:367-374, 2006 [査読あり]
- [学会発表] (計 25 件)
- ① M. Tamai, S. Hosoya, T. Akaike, E. Adachi, Y. Tagawa : Construction of Artificial Liver System Containing Multiple Cell Sorts and Biomaterials. SNU - TIT - TU - UT Joint Bioengineering Symposium, Seoul, Korea, 2009/03/28 (Poster)
- ② Y. Tagawa : Developmental Engineering and Regenerative Medicine. SNU-TIT-TU-UT Joint Bioengineering Symposium, Seoul, Korea, 2009/03/27 (Oral、シンポジウム)
- ③ Y. TAGAWA : Developmental Engineering and Regenerative Medicine, SNU-TIT-TU-UT Joint Bioengineering Symposium, 2009/03/27, Seoul (Oral)
- ④ Y. Tagawa. Super-functional Liver Model based on Developmental

- Engineering and Biomaterials. 2009 China-Japan Regenerative Medical Techniques Forum Shanghai, China 2009/03/18 (招待講演)
- ⑤ 柳 濟榮、Siswanto Antony、三田村 圭祐、赤池敏宏、神吉昭子、田川陽一 : Green-Red 蛍光システムを用いた幹細胞移植実験, 日本再生医療学会総会, 2009年3月6日, 東京 (口頭)
- ⑥ 細谷智、岩城啓修、菊池史郎、上野正樹、玉井美保、田川陽一、渡辺昌彦、安達栄次郎 : 高密度培養法を用いた複合型人工肝臓の再構成, 日本再生医療学会総会, 2009年3月6日, 東京 (口頭)
- ⑦ 酒井浩司、田川陽一、本山博章、宮川眞一 : マウス門脈結紮モデルより分離した肝前駆細胞の解析と分化誘導, 日本再生医療学会総会, 2009年3月5日, 東京 (ポスター)
- ⑧ Y. Tagawa. EMBRYONIC STEM CELLS IN DRUG METABOLISM AND TOXICOLOGY. 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), Taipei, Taiwan 2008/11/08 (招待講演)
- ⑨ H. Motoyama, S. Ogawa, S. Miyagawa, Y. TAGAWA : Ectopic Expression of Pdx1 and Ngn3 Are Highly Up-Regulated in Regenerative Liver, and Which Contributed to Transdifferentiation of Liver To Pancreas 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), Taipei, Taiwan 2008/11/06 (Oral)
- ⑩ M. Tamai, S. Kobayashi, and Y. Tagawa : Development of the highly functional hepatic tissue through mimicking of liver construction. TOIN International Symposium on Biomedical Engineering 2008, Yokoyama, 2008/10/31 (Oral)
- ⑪ J. Ryu, K. Mitamura, A. Siswanto, T. Akaike, Y. Tagawa : Production of green mouse for somatic stem cell transplantation experiments. TOIN International Symposium on Biomedical Engineering 2008, Yokoyama 2008/10/31 (Oral)
- ⑫ 相川博明、川瀬雅也、斉藤直、赤池敏宏、田川陽一 : E S細胞における金属イオンの動態 第60回日本生物工学会 仙台的動態 2008年8月28日 (口頭)
- ⑬ Y. Tagawa, S. Kobayashi, H. Okuyama, T. Shindo, T. Akaike. : In vitro reconstruction of hepatic tissue structure. The 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, Netherland, 2008/05/29 (Poster)
- ⑭ K. Mitamura, A. Siswanto, J. Ryu, A. Kamiyoshi, E. Adachi, T. Akaike, Y. Tagawa : Roles of donor, recipient cells and environmental factors in the formation of embryonic stem cell-derived teratoma in mice. The 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, Netherland, 2008/05/29 (Poster)
- ⑮ 三田村圭祐、柳 濟榮、Siswanto Antony、神吉昭子、安達栄治郎、赤池敏宏、田川陽一 : Grreen-Red 蛍光システムを用いたE S細胞由来テラトーマにおける組織形成の解析 : 第7回日本再生医療学会

- 総会 名古屋 2008年3月14日(口頭)
- ⑬ 岳曉珊、田川陽一、赤池敏宏、竹内純、長岡正人：固定化N-カドヘリンモデルによるP19細胞の分化制御：第7回日本再生医療学会総会 名古屋 2008年3月14日(口頭)
- ⑭ 小林俊介、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、田川陽一：肝実質細胞—管化内皮細胞共培養法の確立とその肝機能解析：第7回日本再生医療学会総会 名古屋 2008年3月13日(ポスター)
- ⑮ 小林俊介、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、田川陽一：管化内皮細胞共培養システムを用いた肝実質細胞との共培養における肝機能の解析：第30回日本分子生物学会および第80回日本生化学学会合同大会 横浜 2007年12月13日(ポスター)
- ⑯ 田川陽一：ES細胞を用いた in vitro 肝組織構築におけるバイオマテリアルへの期待：第29回日本バイオマテリアル学会 大阪 2007年11月27日(口頭)
- ⑰ 小林俊介、藤山陽一、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、小関英一、田川陽一：管化内皮細胞培養システムを用いた肝実質細胞との共培養における肝機能の解析：第29回日本バイオマテリアル学会 大阪 2007年11月27日(口頭)
- ⑱ K. Mitamura, A. Siswanto, J. Ryu, A. Kamiyoshi, E. Adachi, T. Akaike, and Y. Tagawa：Donor and recipient cells in mice can be visualized and clearly discriminated by using Breen-Red fluorescent system, TOIN International Symposium on Biomedical Engineering 2007, Yokohama 2007/11/02 (Oral)
- ㉒ Y. Tagawa：Liver Model Derived from

Embryonic Stem Cells, 1st International symposium on cancer therapy and regenerative medicine 2007 Sizuoka 2007/10/06 (Oral)

- ㉓ 荒津史裕、原田伊知郎、田川陽一、赤池敏宏：サイトカイン固定化型マイクロビーズによる細胞への局所刺激誘導と細胞の動的挙動解析：第72回インターフェロン・サイトカイン学会 京都 2007年7月5日(ポスター)
- ㉔ 小川真一郎、田川陽一：ES細胞を用いた肝再生医療への可能性—ES細胞由来肝組織の肝機能解析—第6回日本再生医療学会総会 横浜 2007年3月13日(シンポジウム)
- ㉕ 田川陽一：ES細胞から肝臓を造る第6回日本再生医療学会総会 市民公開講座 再生医療最前線—臓器傷害と機能の再生— 横浜 2007年3月12日(講演)

[図書] (計 3件)

- ① 田川陽一、小川真一郎、玉井美保、小林俊介：高性能・多機能肝臓モデルの作製を目指して「幹細胞の分化誘導とその応用」ブッカーズ pp.318-326. 2009
- ② 後藤光昭、田川陽一、赤池敏弘：新規バイオマテリアルを中心とした幹細胞の培養・文化誘導技術と誘導された肝細胞による薬物毒性評価用チップの可能性「幹細胞の分化誘導とその応用」ブッカーズ pp. 367-378. 2009
- ③ 田川陽一、他30名：バイオ系のための基礎化学問題集 講談社 pp.14-29 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

- ① 藤山陽一、田川陽一、小林俊介：「バイオデバイス」特願 2008-023638 (国内)
出願年月日：2008.2.4

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 陽一 (TAGAWA YOH-ICHI)
東京工業大学・フロンティア研究センター・
准教授
研究者番号：70262079

(2) 研究分担者

小関 英一 (OZEKI EIICHI)
株式会社島津製作所・主幹研究員
研究者番号：30192529

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHINICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80229806

長岡 正人 (NAGAOKA MASATO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助
教
研究者番号：90397050

(3) 連携研究者

上記研究分担者3名は、2008年度より
連携研究者