

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15099

研究課題名(和文) マイクロ流路による時計組織工学の創成

研究課題名(英文) Creation of Clock Tissue Engineering using Microfluidics

研究代表者

今村 聡 (Imamura, Satoshi)

京都大学・高等研究院・特定研究員

研究者番号：30846689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓や創薬の研究においてヒト多能性幹細胞由来肝細胞(hPSC-hep)の機能化は重要であるが、それは未だに達成されていない。本研究では機能化の方法として体内時計に着目し、マイクロ流体デバイス(μ FD)を用いてhPSC-Hepの時計振動機構を解明し、hPSC-Hepをより機能化・成熟化することを目指した。本研究では、1) 正確な時間因子投与が可能なマイクロ流体デバイスの開発に成功、2) 肝細胞の分化過程において時計遺伝子の振動は肝芽細胞への分化後に始まることを見出し、3) 温度変化が肝細胞の機能を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hPSC-Hepの機能化はこれまでに多くの研究者が取り組んできたが、機能を成熟化させることは困難であった。hPSCからの肝臓分化誘導においては、多くの研究が成長因子や細胞の混合、オルガノイド形成などからアプローチであるが、時計遺伝子の関連性に関しては正しく「No man's land」状態である。本研究は、この時計遺伝子と分化誘導・機能発現の重要性にいち早く気づいた研究であり、正しく時間を制御することが可能なマイクロ流体デバイスと融合させることで機能的なhPSC-Hepの作製が可能となり、hPSC-Hepの実用化に大きく貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Functionalization of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes (hPSC-hep) is important in the study of liver and drug discovery, but this has not yet been achieved. In this study, I focused on the biological clock as a functionalization method and aimed to elucidate the clock oscillation mechanism of hPSC-Hep using microfluidic devices (μ FD) to make hPSC-Hep more functional and mature. In this study, 1) I succeeded in developing a microfluidic device capable of precise time factor administration, 2) I found that the oscillation of clock genes in the differentiation process of hepatocytes starts after differentiation into hepatoblasts, and 3) I found that temperature change promotes the function of hepatocytes.

研究分野：組織工学

キーワード：幹細胞 時計遺伝子 熱刺激 マイクロ流体デバイス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、ヒトの体内において最大の臓器であり、生命維持に必要な様々な機能を持つ。創薬において、薬物代謝評価や安全性評価には初代肝細胞が必要不可欠である。しかし、初代肝細胞はドナー確保が困難であり、代替となる細胞の開発が急務となっている。

ヒト多能性幹細胞（hPSC）は、無限回の自己複製能と多分化能を持つことから、肝細胞の代替として期待されている。しかし、このhPSC由来肝細胞（hPSC-Hep）は未熟であるため薬物代謝能が十分ではなく、実用化には至っていない。

申請者はこの問題を解決するために、体内時計に着目した。体内時計は細胞内の時計遺伝子により振動し、細胞周期、脂肪細胞や膵臓における脂質や糖代謝、生殖活動などを制御している。肝臓においても、時計遺伝子の発現抑制は肝細胞の細胞分裂阻害や多倍体化などの障害を誘発するだけでなく¹、薬物代謝酵素 CYP3A4 などが概日リズムを示しており²、体内時計が薬物代謝調節機構と密接な関係があることは明らかである。その一方で、hPSC-Hep における体内時計の肝機能発現については、不明な点が多い。特に、hPSC の肝臓分化過程における体内時計獲得時期や、時計遺伝子と肝機能の関連性については殆ど知見がないままである。hPSC-Hep をより成熟化・機能化し、創薬や安全性評価への実用化には、この機構解明が必須である。

しかし、この機構解明には時間という解決すべき課題がある。まず、時計遺伝子は1周期約24時間で発現が変動するが、従来の分化誘導・細胞処置では誘導因子の投与が約1～数日ごとであり、一致していない。また、時間遺伝子による細胞挙動変化の観察や測定も24時間での変動を長期間行う必要があるが、自動化顕微鏡観察以外の実験では非常に困難になる。

申請者はこの問題を解決するために、微細加工技術を基に新しい細胞実験の形となるマイクロ流体デバイス（ μ FD）を駆使する。これは、1）送液制御用のバルブやポンプの搭載、2）複数の成長因子を数ミリ秒単位での投与制御、などの従来の細胞培養実験では困難だった細胞刺激印加やサンプル回収の自動プログラム化が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、 μ FD を用いて hPSC-Hep の時計振動機構を解明し、hPSC-Hep をより機能化・成熟化することである。この目的を達成するために本研究では以下の点に基づいて研究を行う。

- （1）添加因子・培地の自動投与・回収用 μ FD の開発
- （2）hPSC-Hep の分化過程における時計振動解析
- （3）時計同調因子による hPSC-Hep の時計制御と機能解析

3. 研究の方法

- （1）添加因子・培地の自動投与・回収用 μ FD の開発

肝細胞分化過程における時計遺伝子の作動機構の解明には、分化誘導因子を厳密に時間制御し、細胞の表現系を解析する必要がある。そこで、厳密な時間制御が可能なバルブ・ポンプ搭載 μ FD を開発する。バルブやポンプは因子や培地の時間的投与・回収のプログラム化を可能にする。 μ FD 材料には生物適合性・ガス透過性の高いポリジメチルシロキサン（PDMS）を使用する。

- （2）hPSC-Hep の分化過程における時計振動解析

hPSC-Hep の時計振動開始時期を同定するために、平面培養で分化させた hPSC-Hep を分化フェーズごとに経時的に細胞を回収した。時計遺伝子の振動を全ての細胞で同調させるために、定期的にデキサメタゾンを用いる。得られた細胞から ReliaPrep[™] RNA Miniprep Systems（Promega）を用いて RNA 抽出し、PrimeScript RT Master Mix（Takara）を用いて cDNA 合成を行う。合成した cDNA をテンプレートに TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II（Takara）を用いて qPCR を実施し、時計振動の開始時期を同定する。

- （3）時計同調因子による hPSC-Hep の時計制御と機能解析

最終項目では、生体内の肝細胞に関与する時計同調因子を時間的に投与・制御し、hPSC-Hep の時計や肝機能に与える影響を明らかにする。

- 1) 睡眠のリズム：メラトニンは昼夜情報の伝達や肝細胞のアポトーシス防止効果を持つ³
- 2) 食事のリズム：インスリンやグルカゴンは肝臓での糖代謝に関与する。
- 3) 体温のリズム：日内変動を示し、肝細胞では高温刺激が CYP3A4 活性を上げる効果がある。これらのリズムが hPSC-Hep に与える影響を評価することを明らかにする。

4. 研究成果

- （1）添加因子・培地の自動投与・回収用 μ FD の開発

開発した μ FD は当初の予定では複数の分化因子を導入できる構造を考慮に入れていたが、複数の因子を必要とする発生段階に従って時計同調因子を入れる必要がなくなったため（後述）、シリッジポンプを用いた培地交換システムを搭載した。

- （2）hPSC-Hep の分化過程における時計振動解析

まず、デキサメタゾンが細胞の時計遺伝子の同調に働くこと、成熟した肝細胞で時計遺伝子の振動が確認されることを確かめるために、初代培養肝細胞 (CryostaX Pooled; SEKISUI XenoTech) の発現変動を調べた (図1)。その結果、デキサメタゾン処理したものでは *PER2* と *BMAL* の発現変動が確認できたのに対し、デキサメタゾン処理していないものでは変動が確認できなかった。以上のことからデキサメタゾン処理は時計遺伝子の同調に有効であることに加えて、初代培養肝細胞には時計機構が備わっていることが明らかになった。

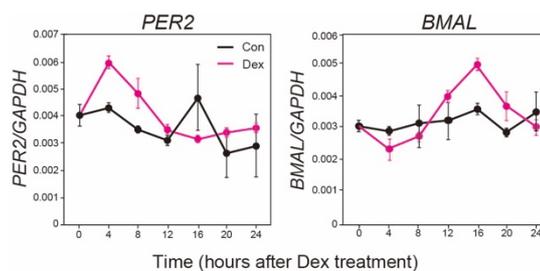


図1. 初代培養肝細胞における時計遺伝子の日周変動

次に細胞の hPSC から肝細胞への分化過程 (図2) における時計遺伝子の発振を確認するために、各分化過程において 24 時間の発現変動を調べた (図3)。その結果、分化していない hPSC 及び D4 では *PER2* や *BMAL* の振動が確認できなかった。一方で、肝芽細胞から成熟肝細胞分化過程においては *PER2* 及び *BMAL* の発現変動が確認された。また、培養皿上で分化させた肝細胞の時計遺伝子の発現変動を調べたところ、デキサメタゾン処理したものでは時計遺伝子の変動が確認された (図4)。この分化させた肝細胞は RNA-seq による網羅的な解析の結果、未熟な状態であることが確認されたが、時計振動が確認された。以上のことから、肝細胞の分化過程において時計遺伝子の振動は肝芽細胞から肝細胞への成熟過程で獲得されることが明らかとなった。肝芽細胞以前の時計同調因子の導入によって時計を強制発現させ肝細胞の機能化を想定していたが、近年の研究で、分化初期の正常な発生に必要な分節時計の振動には体内時計の抑制が重要であることが明らかとなった⁴。このことから意図的な時計振動の誘導は分化を阻害する可能性があるため、振動しない時計を意図的に制御する必要はないと考えた。それゆえ、時計同調因子の導入は肝芽細胞まで分化させた後に行うこととした。μFD で細胞分化実験を行った結果、細胞の接着が弱く、培地交換時に肝芽細胞まで分化させることが困難であった。流速の制御により接着を制御することが可能であるが、デバイス内への導入を肝芽細胞まで分化させた後に行うことで接着することを確認済みである先行研究を利用することとした。

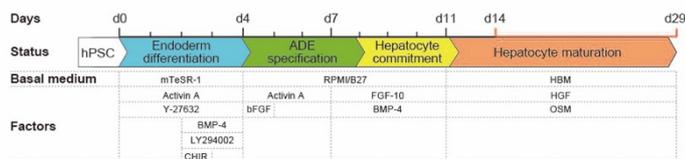


図2. hPSC 由来肝細胞分化プロトコル

分化していない hPSC 及び D4 では *PER2* や *BMAL* の振動が確認できなかった。一方で、肝芽細胞から成熟肝細胞分化過程においては *PER2* 及び *BMAL* の発現変動が確認された。また、培養皿上で分化させた肝細胞の時計遺伝子の発現変動を調べたところ、デキサメタゾン処理したものでは時計遺伝子の変動が確認された (図4)。この分化させた肝細胞は RNA-seq による網羅的な解析の結果、未熟な状態であることが確認されたが、時計振動が確認された。以上のことから、肝細胞の分化過程において時計遺伝子の振動は肝芽細胞から肝細胞への成熟過程で獲得されることが明らかとなった。肝芽細胞以前の時計同調因子の導入によって時計を強制発現させ肝細胞の機能化を想定していたが、近年の研究で、分化初期の正常な発生に必要な分節時計の振動には体内時計の抑制が重要であることが明らかとなった⁴。このことから意図的な時計振動の誘導は分化を阻害する可能性があるため、振動しない時計を意図的に制御する必要はないと考えた。それゆえ、時計同調因子の導入は肝芽細胞まで分化させた後に行うこととした。μFD で細胞分化実験を行った結果、細胞の接着が弱く、培地交換時に肝芽細胞まで分化させることが困難であった。流速の制御により接着を制御することが可能であるが、デバイス内への導入を肝芽細胞まで分化させた後に行うことで接着することを確認済みである先行研究を利用することとした。

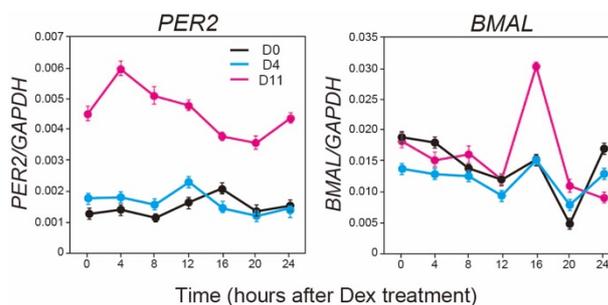


図3. hPSC 由来肝細胞分化段階における時計遺伝子の日内変動

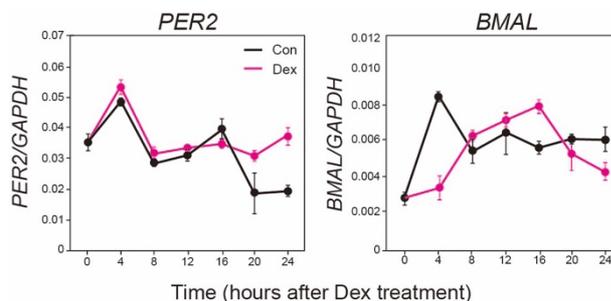


図4. hPSC 由来肝細胞における時計遺伝子の日内変動

(3) 温度刺激による hPSC-Hep の機能促進化

生体内において、肝臓はおおよそ 39°C という生理的温度環境下にあり、それは体内の平均温度と比較して高い温度である。そこで、本研究では hPSC-Hep を 39°C という温度環境下で培養し、肝機能への影響を評価し、以下の結果を得た⁵。

- ① 42°C の環境下は hPSC-Hep の分化後の細胞生存率を劇的に低下させる一方で、39°C の環境下では分化後の生存率に差は見られなかった (図5)。
- ② 39°C の環境下は hPSC-Hep の肝機能 (アルブミン分泌能、CYP3A 活性能及び解毒機能など) を増加させる (図6)
- ③ 39°C の刺激は hPSC-Hep の分化過程にのみ効果があり、初代肝細胞 (PHH) や肝細胞のセルライン (HepG2 や HepaRG) の肝機能改善には効果がない、もしくは肝機能を低下させる (図7)。

熱刺激の変化によって肝細胞の機能化が促進することが明らかとなった。体温は時計遺伝子

の振動によって制御されていることから、肝機能の向上には時計遺伝子による制御が関わっていることを示している。実際に日内の温度変化を再現することで肝機能の変化と時計遺伝子の挙動を明らかにすることが可能となると考えられる。

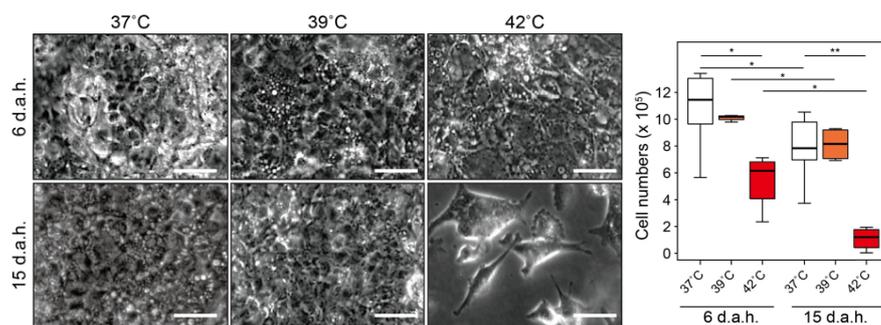


図 5. 37°C、39°C および 42°C の熱処理による hPSC 由来肝細胞の細胞写真と生存率

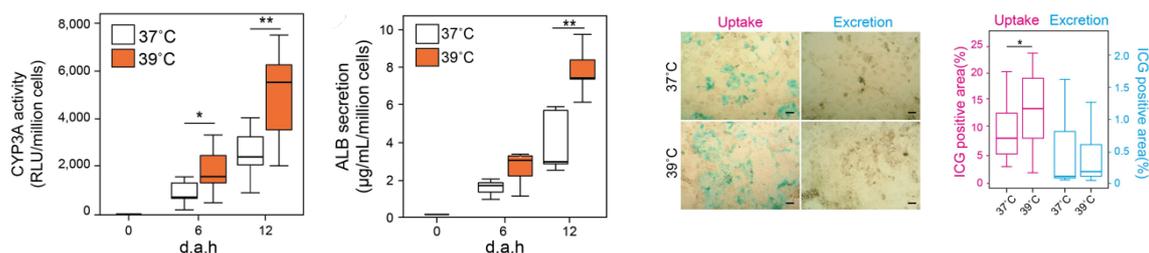


図 6. 37°C と 39°C の熱処理時の CYP3A 活性、アルブミン分泌能および ICG 処理

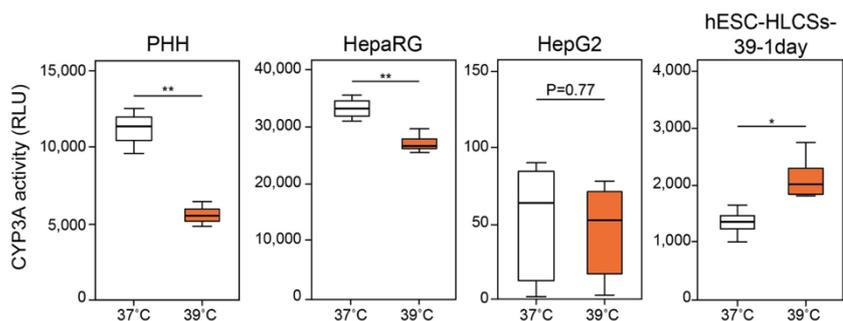


図 7. 37°C と 39°C の熱処理時の初代肝細胞、HepaRG、HepG2 および分化課程における hPSC-Hep の 1 日処理後の CYP3A 活性の評価

引用文献

- 1 Chao H-W, Doi M, Fustin J-M, Chen H, Murase K, Maeda Y *et al.* Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-Erk1/2 signaling pathway. *Nat Commun* 2017; **8**: 2238.
- 2 Takiguchi T, Tomita M, Matsunaga N, Nakagawa H, Koyanagi S, Ohdo S. Molecular basis for rhythmic expression of CYP3A4 in serum-shocked HepG2 cells. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 1047-1056.
- 3 Sheen J-M, Chen Y-C, Hsu M-H, Tain Y-L, Huang Y-H, Tiao M-M *et al.* Melatonin Alleviates Liver Apoptosis in Bile Duct Ligation Young Rats. *Int J Mol Sci* 2016; **17**: 1365.
- 4 Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Watanabe H, Kondoh G, Kageyama R *et al.* Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids. *Proc Natl Acad Sci* 2022; **119**. doi:10.1073/pnas.2114083119.
- 5 Inamura S, Yoshimoto K, Terada S, Takamuro K, Kamei K. In vitro culture at 39 ° C during hepatic maturation of human ES cells facilitates hepatocyte-like cell functions. *Sci Rep* 2022; **12**: 5155.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Imamura Satoshi, Yoshimoto Koki, Terada Shiho, Takamuro Kaho, Kamei Ken-ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 In vitro culture at 39? °C during hepatic maturation of human ES cells facilitates hepatocyte-like cell functions	5. 発行年 2022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/s41598-022-09119-7	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Imamura
2. 発表標題 Heat treatment facilitates hepatic differentiation of hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells
3. 学会等名 ISSCR Annual meeting 2021 Virtual（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------