

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300178

研究課題名（和文）

ES 細胞や iPS 細胞、組織幹細胞を用いた肝臓モデル構築と薬物試験への実用化

研究課題名（英文）

Construction of *in vitro* liver model using ES, iPS, or somatic stem cells, and its application for drug metabolism assay

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

研究成果の概要（和文）：

EHSゲル上に培養した内皮細胞ネットワークに、初代培養肝細胞、門脈結紮誘導肝幹細胞、またはヒトES/iPS細胞由来肝細胞を播種して*in vitro*肝組織を構築した。この*in vitro*肝組織によるアセトアミノフェン誘導肝障害モデルを作製し、メタボローム解析をおこなった。この*in vitro*肝組織をマイクロ培養装置で培養し、高肝機能な肝組織チップを開発した。我々の開発した肝組織チップは今後の薬物動態試験への応用に期待できる。

研究成果の概要（英文）：

We have succeeded to establish to construct *in vitro* liver model culturing primary hepatocytes, portal vein-ligation-induced hepatic stem cells, or human ES/iPS cell-derived hepatocytes with the networks of endothelial cells on EHS gels. The culture of these *in vitro* liver models in our original microfluidic system had significantly larger advantages for liver specific potentials compared to the non-fluidic. Our results lead strong expectation of our *in vitro* liver chips for application of drug metabolism and disposition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：バイオチップ、肝、薬物代謝、毒性試験、ES細胞

## 1. 研究開始当初の背景

マウスES細胞を分化誘導した集団の中に肝細胞特異的な遺伝子発現を確認した報告(Hamazaki et al, 2001; Chinzei et al, 2002; Jones et al, 2002など)があるが、これらの研究ではES細胞集団全体を単一の

細胞種へ均一に分化誘導する方法の確立に全力が注がれてきた。しかし、我々は、肝器官（肝組織）の発生に必要な環境（心筋細胞や血管内皮細胞）を全て同じES細胞から作り出し、ES細胞集団の一部を肝組織へ分化誘導する*in vitro*システム（IVL<sup>mES</sup>：*in vitro*

liver derived from mouse ES cells) の確立に成功した (Stem Cells, 2005)。我々の手法は、ES 細胞が万能であることを利用し、肝細胞のみならず肝臓が発生するためのニッチ形成に必要な心筋細胞や肝非実質細胞も同時に分化誘導する独創的なシステムである。

## 2. 研究の目的

肝臓は薬物の代謝・解毒やアルブミンや血液凝固因子といった生命維持に必要な不可欠なタンパク質産生等、我々が生存するために必要な役割を担っている臓器である。また、創薬研究における薬物代謝評価のためにヒト肝臓のミクロゾームや実験動物による解析が行われているが、肝臓の実質細胞（肝細胞）を培養し解析に用いることができれば動物実験を代替しうると思われる。しかしながら、肝細胞を培養すると、長期間の生存は難しく、肝機能も速やかに失うことが問題となっている。研究代表者の田川は、肝細胞が長期間培養でき、高機能を維持できるためには肝組織の再構築が必要なのではないかと考えた。

そこで、本課題では、再構築「肝組織」をマイクロ培養装置で培養した「肝組織チップ」を開発し、薬物代謝試験への実用化を目指すものである。従来までの肝細胞のみの肝細胞チップの開発研究と異なり、「肝組織チップ」が本提案の特色である。

## 3. 研究の方法

肝細胞の種類によって2つの型のIVLを作製した。初代肝細胞、門脈結紮誘導肝幹細胞、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞はEHSゲル上に構築した内皮細胞ネットワークとの共培養による、マウスES細胞の場合は胚様体経路によるIVLである。

門脈結紮肝幹細胞は、麻酔下のマウスを開腹し、70%肝側の門脈を結紮した後閉腹し、1週間後に肝臓をコラゲナーゼ処理して非

実質画分から増殖性の細胞を株化した。

マイクロ培養装置は、蓋の開閉式チップを設計し、ポリジメチルシロキサン (PDMS) により作製した。培地はシリンジポンプにより培養槽内へ供給した。この再構築型肝組織チップを培地フロー条件下で培養し、アンモニア代謝を比色定量法、テストステロンといったさまざまな物質に対するCYP活性をHPLCとLC-MSや肝特異的遺伝子発現をRT-PCRで検討した。

## 4. 研究成果

第一に、マウス初代肝細胞、内皮細胞株とバイオマテリアル (EHSゲル) の3者の組み合わせにより再構築した肝組織 (IVL<sub>PH&EC/EHS</sub>) を用いて、解熱剤であるが大量摂取すると肝毒性を示すアセトアミノフェンによる反応を観察した。マウス個体同様に我々の初代培養肝細胞の肝組織を用いた系では肝毒性が通常の初代培養法に比べて顕著に高いことを確認した。メタボローム解析をおこない、アセトアミノフェンの代謝を確認し、さらにその際の様々な代謝物の変化を解析した。さらに、IVL<sub>PH&EC/EHS</sub>を我々が独自に開発した蓋開閉式培地フローチップ内で培養した。この肝組織チップによるフロー培養は、通常の培地のフローなしバッチ培養に比較して有意に肝機能 (尿素合成能、チトクロームP450アイソザイム活性) が有意に高かった。

第二に、マウス肝門脈を結紮することにより、結紮、非結紮葉ともから肝前駆細胞 (肝幹細胞) 株を樹立することに成功し、この細胞は肝細胞と胆管上皮細胞の両方向に分化できる能力を有することを確認した。

第三に、内皮細胞ネットワークと共培養によりヒトiPS細胞およびヒトES細胞から肝様組織 (IVL<sub>hES/iPS&EC/EHS</sub>) を誘導することに成功した。この分化誘導における分子生物学的な解析をおこない、成熟肝細胞への分

化を確認した。

第四に、これまでのシングル流路マイクロ培養装置を4流路に設計し、肝細胞培養として利用できることを確認した。

第五に、肝臓灌流モデルにおけるアンモニアからの尿素合成をモニターし、オルニチン投与によりその尿素合成が促進されることを確認した。そこで、マウスES細胞由来肝組織において、同様に、アンモニアやオルニチンの添加による反応を解析したところ、肝臓灌流モデルの場合と同様な反応性を確認できた。このことは、尿素サイクルの一部がミトコンドリア内で反応が起きていることから、ミトコンドリアの活性やミトコンドリアへの流入・排出のトランスポーターが働いていることを示している。また、色素などの肝細胞への取り込み・反応・局所的排出も確認できたことから、マウスES細胞由来肝組織の肝細胞には細胞極性が構築されており、特に微小胆管への代謝物の排出が確認できたことは、今後の薬物動態試験への応用に期待できる。

以上のことから、本研究では、肝細胞としての細胞ソースを絞り込むことなく、目的に応じ、長期培養可能から短期培養高機能なものまでのIVLを構築し、その肝組織チップ化することによりin vivoにちかい肝臓モデルの構築に成功し、目標であった実用化に限りなく近づいたと思われる。

## 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14件)

Toyoda, Y., M. Tamai, K. Kashikura, S. Kobayashi, Y. Fujiyama, T. Soga, and Y. Tagawa\*: “Acetoaminophen-induced hepatotoxicity in a liver tissue model consisting of primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network” *Drug Metab. Dispos.* 40. 169-177 (2011)

Hayashi, T, A. Horiuchi, K. Sano, N. Hiraoka, M. Kasai, T. Ichimura, T. Sudo, Y. Tagawa, R. Nishimura, O. Ishiko, Y. Kanai, N. Yaegashi, H. Aburatani, T. Shiozawa, I. Konishi: “Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy” *Sci. Rep.* 1. 180 (2011)

Tamai, M., A. Yamashita, and Y. Tagawa\*: “Mitochondrial development of the *in vitro* hepatic organogenesis model with simultaneous cardiac mesoderm differentiation from murine induced pluripotent stem cells” *J. Biosci. Bioeng.* 122. 495-500 (2011)

Denda, K., K. Nkano-Wakabayashi, N. Okamoto, N. Kitamura, J. Ryu, Y. Tagawa, T. Ichisaka, S. Yamanaka, and M. Komada: “NrK, an X-linked protein kinase in the germinal center kinase family, is required for placental development and fetoplacental induction of labor” *J. Biol. Chem.* 286. 28802-28810 (2011)

Hikosaka, K., H. Noritake, W. Kimura, N. Sultana, M. T. K. Sharkar, Y. Tagawa, T. Uezato, Y. Kobayashi, T. Wakita, and N. Miura: “Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occluding in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry” *Biomedical Research.* 32. 143-150 (2011)

明地将一、藤山陽一、玉井美保、田川陽一: “肝機能デバイスの開発” 島津評論. 67. 53-59 (2010)

A. Higuchi, S.-T. Yang, P.-T. Li, M. Tamai, Y. Tagawa, Y. Chang, Y. Chang, Q.-D. Ling, S.-T. Hsu: “Direct ex vivo expansion of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood on membranes” *J. Membrane Science* 351. 104-111 (2010)

A. Higuchi, M. Tamai, Y.-A. Ko, Y. Tagawa Y-H Wu, B. D. Freeman, J.-T. Bing, Y. Chang, Q.-D. Ling: “Polymeric Membranes for Chiral Separation of Pharmaceuticals and Chemicals-Short title; Membranes for Chiral Separation” *Polymer Reviews* 50. 113-143 (2010)

Kyuwa, S., S. Takagaki, S. Matsuyama, F. Taguchi, J. Saegusa, Y. Iwakura, Y. Tagawa, and Y. Yoshikawa: “Characterization of a variant virus from ascites of subacute granulomatous serositis in interferon- $\gamma$ -deficient C57BL/6 mice persistently infected with murine coronavirus, strain JHM.” *Viral Immunology* 23. 437-442

(2010)

Hossain, S., A. Stanislaus, MJ, Chua, S. Tada, Y. Tagawa, EH. Chowdhury, T. Akaike: "Carbonate apatite-facilitated intracellularly delivered siRNA for efficient knockdown of functional genes" *J. Control. Release.* 147. 101-108 (2010)

Sakai, H., Y. Tagawa\*, M. Tamai, H. Motoyama, S. Ogawa, J. Soeda, T. Nakata, S. Miyagawa: "Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403. 298-304 (2010)

Inuma, N., T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, T. Arai, T. Yoshizawa, T. Koyama, R. Uetake, H. Kawate, S. Muto, Y. Tagawa, S. Miyagawa, T. Shindo: "Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver" *Peptides* 31. 865-871 (2010)

Motoyama, H., Ogawa, S., Kubo, A., Miwa, S., Nakayama, J., Tagawa, Y., and Miyagawa, S.: "In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385. 123-128 (2009)

Hu, T., Takamoto, M., Hida S., Tagawa, Y., and Sugane, K.: "IFN- $\gamma$  deficiency worsen Pneumocystis pneumonia with Th17 development in nude mice" *Immunol Lett.* 127. 55-59 (2009)

[学会発表] (計 35 件)

守矢 恒司、豊田 優、田川 陽一: "マウス個体を用いたアセトアミノフェン誘導肝障害モデル構築の試み: 概日リズムと肝毒性との相関性" 日本分子生物学会 (第 3 4 回日本分子生物学会年会) . (20111213). 横浜

Je-young Ryu and Yoh-ichi Tagawa: "Clonality of pancreatic acini and ducts in chimeric mice" 日本分子生物学会 (第 3 4 回日本分子生物学会年会) . (20111213). 横浜

安 成皓, 三田村 圭祐, 安達 栄治郎, 田川 陽一: "ヒト ES/iPS 細胞を用いた in vitro ヒト肝組織モデルの構築" 日本分子生物学会 (第 3 4 回日本分子生物学会年会) . (20111213). 横浜

張本乾一, 長岡紀幸, 鈴木一臣, 吉田靖弘, 田川陽一: "オッセオインテグレーションにおける線維芽細胞の影響" 第 33 回日本バイ

オマテリアル学会大会. (20111121). 京都

Yu Toyoda, Miho Tamai, Koji Moriya, Shunsuke Kobayashi and Yoh-ichi Tagawa: "Development and validation of in vitro liver tissue model consisting of primary hepatocytes assembling around an endothelial network" 6th Toin international symposium on Biomedical engineering 2011. (20111105). 横浜

Koji Moriya, Yu Toyoda, Yoh-ichi Tagawa: "Mouse model for acetaminophen-induced liver injury for screening of hepatoprotective compounds" 6th Toin international symposium on Biomedical engineering 2011. (20111105). 横浜

Kenichi Harimoto, Noriyuki Nagaoka, Kazuomi Suzuki, Yasuhiro Yoshida, & Yoh-ichi Tagawa: "Advantage of Osteoblasts in Cell Competition on Biomaterials" 6th Toin international symposium on Biomedical engineering 2011. (20111105). 横浜

Je-young Ryu and Yoh-ichi Tagawa: "Development of pancreatic acinar cells in chimera of eGFP and DsRed2" 6th Toin international symposium on Biomedical engineering 2011. (20111105). 横浜

Yoh-ichi Tagawa: "*In vitro* model of liver organogenesis using embryonic stem cells" *Taiwanese Society of Molecular Medicine* (招待講演) . (20111002). Taipei, Taiwan

田川 陽一, 安 成皓, 玉井 美保: "合成生物学による肝組織モデルの構築を目指して" 日本生物工学会 (第 6 3 回大会) (招待講演). (20110927). 東京

Yu Toyoda, Koji Moriya, Shunsuke Kobayashi, Miho Tamai, Eijiro Adachi, and Yoh-ichi Tagawa: "Acetaminophen-induced hepatotoxicity in liver tissue-like structure consisting of primary hepatocytes assembling around endothelial cell network" 第 84 回日本生化学会大会 . (20110921). 京都

Yu Toyoda, Koji Moriya and Yoh-ichi Tagawa: "Acetaminophen-induced hepatotoxicity in a liver tissue model consisting of primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network" 2011 International Graduate Forum on Biotechnology, Bioengineering and Biomedical Science (IGF3B-2011). (20110827). Beijing, China

Kenichi Harimoto, Noriyuki Nagaoka, Kazuomi Suzuki, Yasuhiro Yoshida, & Yoh-ichi Tagawa: “Advantage of Osteoblasts in Cell Competition on Biomaterials” 2011 International Graduate Forum on Biotechnology, Bioengineering and Biomedical Science (IGF3B-2011). (20110827). Beijing, China

Hiroaki Aikawa, Yoh-ichi Tagawa, Tadashi Saito, Yuko Fujiwara, Yuki Mizobuchi, and Masaya Kawase: “Dynamics of Metal Ions in Murine Embryonic Stem Cells” 2011 International Graduate Forum on Biotechnology, Bioengineering and Biomedical Science (IGF3B-2011). (20110827). Beijing, China

Miho Tamai, Toshihiro Akaike, Eiji Adachi, Yoh-ichi Tagawa: “In vivo organization of vascularized hepatic tissues model with fibroblast-embedded collagen fibrils formation at intraperitoneal sites in partially hepatectomized mice” Gordon Research Conference on collagen. (20110722). New London, USA

豊田 優, 守矢 恒司, 山下 晃平, 小林 俊介, 田川 陽一: “細胞組織工学を応用した肝毒性評価系の開発” 第 18 回肝細胞研究会. (20110624). 東京

Yoh-ichi Tagawa: “*In vitro* systems of liver organogenesis derived from murine or human iPS cell have high multiple hepatic potentials in long culture” International Conference on Systems Biology of Stem Cells. (20101017). Taipei, Taiwan

K. Harimoto, N. Nagaoka, T. Akaike, K. Suzuki, Y. Yoshida, Y. Tagawa: “Cell-adhesive advantage of osteoblasts on titanium in the model of in vitro osseointegration” 2010 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Symposium – Asia & Pacific. (20100915). Sydney, Australia

Yoh-ichi Tagawa: “High hepatic potentials in liver tissue micro-sized flow-culture system using murine or human ES/iPS cell” 2010 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Symposium – Asia & Pacific. (20100915). Sydney, Australia

S. Ahn, A. Yamashita, M. Tamai, T. Akaike, and Y. Tagawa: “*In vitro* systems of liver organogenesis derived from murine or human iPS cell have high multiple hepatic potentials in long culture” International Society for Stem Cell Research, 8th Annual Meeting. (20100616).

San Francisco, USA

安 成皓, 田川 陽一: “ヒト iPS 細胞を用いたヒト型肝組織の in vitro 構築” 第 10 回日本再生医療学会学術集会. (20110301). 東京

豊田 優, 守矢 恒司, 玉井 美保, 山下 晃平, 赤池 敏宏, 安達 栄次郎, 田川 陽一: “細胞組織工学を応用した ex vivo 肝毒性評価系の開発” 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. (20101207). 神戸

張本 乾一, 長岡 紀幸, 赤池 敏宏, 鈴木 一臣, 吉田 靖弘, 田川 陽一: “バイオマテリアルに対する細胞の接着性がオッセオインテグレーションに及ぼす影響” 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会. (20101129). 広島

玉井 美保, 酒井 宏司, 宮川 眞一, 赤池 敏宏, 安達 栄次郎, 田川 陽一: “増殖性肝前駆細胞を用いた高密度コラーゲンゲルによる 3 次元肝組織化” 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会. (20101129). 広島

玉井 美保, 細谷 智, 赤池 敏宏, 安達 栄次郎, 田川 陽一: “初代培養肝細胞を用いた再構成コラーゲンゲル内培養の検討” 第 16 回肝細胞研究会. (20090626). 山形

安 成皓, 玉井 美保, 豊田 優, 奥山 久嗣, 赤池 敏宏, 新藤 隆行, 藤山 陽一, 小関 英一, 田川 陽一: “ES 細胞等を用いた肝組織チップの開発” 第 22 回日本動物実験代替法学会. (20091114). 大阪

豊田 優, 玉井 美保, 奥山 久嗣, 小林 俊介, 新藤 隆行, 安達 栄治郎, 藤山 陽一, 小関 英二, 田川 陽一: “肝様組織チップを用いた ex vivo 肝毒性評価系の構築” 第 32 回日本分子生物学会年会. (20091209). 横浜

張本 乾一, 長岡 紀幸, 赤池 敏宏, 鈴木 一臣, 吉田 靖弘, 田川 陽一: “バイオマテリアルに対する細胞の接着性が骨形成に及ぼす影響” 第 9 回日本再生医療学会総会. (20100318). 広島

酒井 宏司, 玉井 美保, 奥山 久嗣, 本山 博章, 小川 眞一郎, 田川 陽一, 宮川 眞一: “門脈結紮による肝前駆細胞の増殖誘導” 第 9 回日本再生医療学会総会. (20100318). 広島

Hiroshi Sakai, Yoh-ichi Tagawa, Hiroaki Motoyama, Shinichiro Ogawa, Shinichi Miyagawa: “Hepatic Portal Branch Ligation-Stimulated Appearance of Bipotent

Hepatic Progenitor Cells in Mice” 2009 Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR). (20091108). Barcelona, Spain

Hiroaki Aikawa, Tadashi Saito, Yuko Fujiwara, Yuki Mizobuchi, Toshihiro Akaike, Yoh-ichi Tagawa, Masaya Kawase: “New Role of Feeder Cells to Embryonic Stem Cells --Metal Analysis of Embryonic Stem Cells by ICP-MS” 2nd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) *in conjunction with* 2009 Seoul Stem Cell Symposium. (20090831). Seoul, Korea

Miho TAMAI, Satoshi HOSOYA, Toshihiro AKAIKE, Eijiro ADACHI, Yoh-ichi TAGAWA: “Establishment of the High Density Culturing System Using Primary Culture of Hepatocyte” 2nd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) *in conjunction with* 2009 Seoul Stem Cell Symposium. (20090831). Seoul, Korea

Y. Tagawa: “Developmental Analysis using Multi-Color Fluorescent Embryonic Stem Cell Lines” 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem Cell Techniques. (20090910). Taipei, Taiwan

Y. Tagawa: “Developmental Engineering and Development of Novel Artificial Liver System” 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem cell Techniques in Dong Hwa University. (20090922). Hualien, Taiwan

Y. Tagawa: “Developmental Engineering and Development of Novel Artificial Liver System” Seminar at National Cheng Kung University. (20091204). Tainan, Taiwan

〔図書〕(計3件)

三田村圭祐、田川陽一: “実験医学 別冊 核酸実験の原理とプロトコール (平尾一郎、胡桃坂仁志編集)” 羊土社. 167-180 (2011)

瀧伸介、田川陽一: “I F N 「series モデル動物利用マニユアル 疾患モデルの作製と利用 免疫疾患」(岩倉洋一郎監修)” エル・アイ・シー. 361-367 (2011)

田川陽一、他28: “バイオ研究のフロンティア 医療・診断をめざす先端バイオロジー” 工学図書株式会社. 186 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計4件)

名称: 細胞培養デバイス

発明者: 藤山陽一、田川陽一

権利者: 島津製作所・東京工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-030204

出願年月日: 2012. 2. 15

国内外の別: 国内

名称: 肝保護剤、医薬組成物、食品、細胞等の保護方法、および細胞等保護用組成物

発明者: 内沢秀光、田川陽一、芥藤ゆかり、玉井美保、白川和浩

権利者: 青森産業技術センター・東京工業大学・白川商店

種類: 特許

番号: 特願 2011-159586

出願年月日: 2011. 7. 21

国内外の別: 国内

名称: CELL CULTURE DEVICE AND CELL CULTURE METHOD (細胞培養デバイス及び細胞培養方法)

発明者: 藤山陽一、田川陽一

権利者: 島津製作所・東京工業大学

種類: 特許

番号: PCT-JP2010/065585

出願年月日: 2010. 9. 10

国内外の別: 外国 (日本含む)

名称: 細胞培養デバイス、細胞培養システム、及び細胞培養方法

発明者: 藤山陽一、田川陽一

権利者: 島津製作所・東京工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-118960

出願年月日: 2010. 5. 25

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田川 陽一 (TAGAWA, Yoh-ichi)

研究者番号: 70262079

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・準教授

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

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