

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870145

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞からの機能的肝細胞の大量調製法とヒト肝細胞キメラマウスの樹立

研究課題名(英文) Generation of hepatocyte from iPS cells and establishment of human liver chimeric mice

研究代表者

木戸 丈友(Kido, Taketomo)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：00401034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導系から、肝前駆細胞に特異的なマーカーの発現を指標に細胞を分取した。分取した細胞は高い増殖能を有し、アルファフェトプロテインやHNF4aを発現しており、肝前駆細胞の特徴を有した。さらに、これらの細胞は増殖後、特定の培養条件下で培養することで、肝細胞様細胞と胆管上皮細胞様細胞への二分化能を示した。以上より、本研究で樹立したヒトiPS細胞由来肝前駆細胞は、大量調製可能であり、肝細胞と胆管上皮細胞のソースとして有用である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：After induction of hiPS cells to the hepatic lineage according to the published procedures, we enriched the cells expressing cell surface antigens expressed on liver progenitors by cell sorting using specific antibodies. Sorted cells exhibited a high proliferative potential. Those cells expressed immature hepatic genes, such as AFP and HNF4a. After expansion of those cells by serial passages, they were able to differentiate into either hepatocyte-like cells or cholangiocyte-like cells depending on the culture condition. These results suggest that self-renewable liver progenitors can be isolated from hiPS cells. They may be a useful source for producing a large amount of functional hepatocytes and cholangiocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：iPS細胞 肝臓 肝細胞 胆管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓は、代謝や血清タンパク質の産生など多種多様な機能を持ち生体の恒常性を担う臓器である。肝細胞は、薬物代謝の中心的な細胞であり、それに関わる多数の酵素群 (Cytochrome P450: CYP) を発現する。生体において、肝細胞は極性を有し、細胞膜上に多数の膜輸送タンパク質が適切に配置されており、薬物の取り込み、代謝、排泄を行っている。したがって、*in vitro* で薬物の薬効や毒性を評価する上では、生体肝細胞と遜色のない薬物代謝酵素群の発現および薬物の肝細胞への取り込みと排泄機構を持った細胞が必要である。

(2) これまで、新規薬剤の薬効、毒性を評価するため、初代肝細胞培養系が広く利用されてきたが、生体から分離した肝細胞は培養することで、その機能を急速に失うため、十分な機能と再現性のある *in vitro* の薬物評価系はないのが現状である。そもそも成熟したヒト肝細胞を大量に得ることは不可能である。

(3) 近年、iPS 細胞から肝細胞を誘導する試みが活発に行われている。しかし、既報の iPS 細胞由来肝細胞は、薬物代謝酵素発現に関しては、成体の成熟肝細胞とは比較にならない程の低レベルでしかなく、薬物の取り込み、排泄に関与する各種膜輸送タンパク質の局在、機能に関しても十分に再現出来ていない。さらに、iPS 細胞からの肝細胞分化の問題として、様々なサイトカインによる多段階かつ長期間の分化誘導を必要とすること、また、全ての iPS 細胞を均一に肝細胞に分化させることは困難であるといった問題がある。

2. 研究の目的

本研究では、創薬研究に利用可能な高機能性肝細胞を、ヒト iPS 細胞から大量に調製するシステムの樹立を目指す。肝前駆細胞は継代培養可能であるので、これをヒト iPS 細胞から分化誘導して増幅し、それを機能的な肝細胞へと分化誘導するシステムの開発を行う。さらに、このヒト肝細胞をマウスに移植し *in vivo* での機能を評価する。

3. 研究の方法

(1) 従来法に従い、ヒト iPS 細胞から多段階的に分化誘導した培養系から肝前駆細胞を純化する。ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の純化には、これまでに肝前駆細胞を濃縮することが示されている細胞表面マーカーの発現を指標に行う。次に、純化した肝前駆細胞を維持・増幅する培養系を確立し、増幅した肝前駆細胞から肝細胞への分化誘導系を 2 次元および 3 次元培養法を用いて

最適化する。

(2) 肝前駆細胞の特徴解析のひとつとして、胆管上皮細胞への分化能について解析する。ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞をマトリゲル/コラーゲンゲル内で包埋培養し、分化が終了した時点で、タンパク質、遺伝子レベルで胆管上皮細胞への分化能について評価する。

(3) マウス胎児肝臓から、肝類洞内皮細胞や肝星細胞といった肝非実質細胞に特異的な表面抗原の発現を指標にこれらの細胞を分離する。分離後の濃縮率についてフローサイトメトリーによる解析を行い算出する。

(4) 分化誘導したヒト肝細胞とマウス肝臓から分離した肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞との三次元培養法の樹立による肝細胞の高機能化を試みる。誘導した肝細胞について、各種の肝成熟マーカーやトランスポーターの発現について、タンパク質あるいは遺伝子レベルで解析する。さらに、こうして作製した肝細胞を、肝障害を与えた免疫不全マウスに、経脾的に移植してヒト肝細胞キメラマウスの樹立を試みる。移植後、ヒト肝細胞の置換率について、ヒトアルファフェトプロテイン、ヒトアルブミン、ヒトサイトケラチンを特異的に認識する抗体を用いて、免疫組織化学的に解析する。

4. 研究成果

(1) EpCAM, DLK1 等の肝前駆細胞マーカーについて、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の濃縮に利用可能か検討を行った。ヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導系から、肝前駆細胞に特異的なマーカーの発現を指標に細胞を分取した。分取した細胞は、コロニーを形成し、培養 7 日で約 7 倍に増殖した。また、継代培養、凍結保存が可能であった。さらに、遺伝子、タンパク質レベルの解析において、アルファフェトプロテイン、HNF4a、PROX1、CD13、EpCAM 等を発現することが明らかとなり、肝前駆細胞の特徴を示した。これらのマーカー分子の発現は、増殖後あるいは凍結保存後においても維持された。

(2) 分取した細胞について、肝細胞および胆管上皮細胞への二分化能を解析したところ、平面培養系において、オンコスタチン M 存在下では、二核を有する肝細胞様細胞に分化した。本研究で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞は、従来法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞と比較し、高いアルブミン産生能と薬物代謝酵素活性を示した。特に、代表的な薬物代謝酵素の一つである CYP3A4 活性を測定したところ、肝細胞へ分化誘導してから二週間以上にわたり、高い

活性を維持することが明らかとなった。また、マトリゲル/コラーゲンゲル培養では数 100 ミクロン程度のシストを形成し、胆管上皮細胞様細胞に分化した。分化誘導後、肝前駆細胞のマーカーであるアルブミンとアルファフェトプロテインの発現減少が認められた一方、胆管上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン7の発現誘導が認められた。

以上より、本研究で樹立したヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞は大量調製可能であり、肝細胞と胆管上皮細胞のソースとして有用である可能性が示唆された。

(3) 妊娠 14 日目のマウス胎児肝臓から自動磁気細胞分離装置を用いて、Stab2 と p75NTR の発現を指標に、それぞれ肝類洞内皮細胞と肝星細胞を同時に分取可能な条件を決定した。フローサイトメトリー解析の結果、分離後の肝非実質細胞の濃縮率は、95%以上であり、肝類洞内皮細胞と肝星細胞の細胞比は、約 7:3 であった。

次に、本研究で樹立したヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞と二次元および三次元的に共培養系を作製した。三次元共培養系は、低接着性マイクロウェルプレートを用いて作製した。三次元培養系において、肝前駆細胞の単独培養と比較し、肝非実質細胞を加えた共培養系では効率的な組織化が認められた。また、遺伝子発現解析の結果、アルブミン、G6PC、TAT、CYP3A4 をはじめとする各種薬物代謝酵素群等の肝機能マーカーおよび ABCC2、ABCC3、ABCB4 等のトランスポーターは二次元培養系に比べ、三次元培養系で高く発現し、肝非実質細胞を加えた培養系で最も高い発現を示した。以上のことから、マウス胎児由来肝非実質細胞は、肝組織の構築に効果的であるだけでなく、肝細胞の成熟化を促進することが明らかとなった。

このように、本研究ではヒト iPS 細胞から高機能性の肝細胞を誘導することに成功した。

(4) 最後に、誘導したヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞を免疫不全マウスに移植し、ヒト肝細胞キメラマウスの樹立を試みた。マウスは NOD/Scid 免疫不全マウスを用い、四塩化炭素 (20% CCl₄/corn oil:1ml/kg) を腹腔内に投与し肝障害を誘発した。肝障害の程度は、四塩化炭素投与後、経時的に血清中の ALT 値を測定し判断した。ALT 値の上昇が認められた時点で、経脾的にヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞 (1x10⁶ cells/mouse) を移植した。移植後二日後において、免疫染色の結果、レシピエントマウス肝臓内にヒトアルファフェトプロテインを発現する細胞が認められた。しかしながら、移植 1 週間後においては、マウス肝細胞がヒト肝細胞で置換されている様子は

観察されなかった。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

Taketomo Kido, Minoru Tanaka, Yasuyuki Sakai, Atsushi Miyajima. (2013/9/26-27) Generation of liver progenitors from human iPS cells. (Osaka, Japan)

木戸 文友 「創薬研究に向けた iPS 細胞から機能的肝組織の構築へ」2014 年 2 月 27 日 東京

木戸 文友、伊藤 利将、厚井 悠太、宮島 篤 「ヒト iPS 細胞から肝類洞内皮細胞の分化誘導」2014 年 3 月 4-6 日 京都

木戸 文友、田中 稔、篠原 満利恵、Wenjin Xiao、酒井 康行、宮島 篤 「ヒト iPS 細胞からの機能的肝細胞の大量調製法の確立」2014 年 3 月 4-6 日 京都

厚井 悠太、木戸 文友、伊藤 利将、小林 彩香、宮島 篤 「ヒト iPS 細胞からの肝類洞内皮細胞の分化誘導と肝組織構築への応用」2014 年 6 月 27-28 日 東京

木戸 文友、厚井 悠太、田中 稔、小林 彩香、宮島 篤 「ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の二分化能の解析」2015 年 3 月 19-21 日 横浜

厚井 悠太、木戸 文友、小林 彩香、宮島 篤 「ヒト iPS 細胞からの肝類洞内皮細胞への分化誘導と成熟肝細胞の作製への応用」2015 年 3 月 19-21 日 横浜

小林 彩香、木戸 文友、厚井 悠太、宮島 篤 「ヒト iPS 細胞由来成熟肝細胞の誘導における肝非実質細胞の役割」2015 年 3 月 19-21 日 横浜

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: ヒト iPS 細胞からの肝組織構築
発明者: 宮島 篤、木戸 文友、厚井 悠太、小林 彩香
権利者: 国立大学法人東京大学
種類:
番号: 62/134889
出願年月日: 2015 年 3 月

国内外の別：アメリカ合衆国

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 丈友 (Kido Taketomo)
東京大学分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：00401034

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：