

宮島 篤

東京大学 分子細胞生物学研究所 教授

肝分化指向性 iPS 細胞からの高機能性肝組織の構築

§1. 研究実施の概要

肝細胞の分化誘導系および機能維持において培養系の酸素濃度をコントロールすることが重要である。そこで本年度は、二次元微細加工技術を用いて大きさの異なるハニカム状のマイクロウェル構造を持つ酸素透過性ポリジメチルシロキサン(PDMS)プレートを作製し、成熟ラット肝細胞およびマウス胎児肝臓細胞を培養し、肝細胞の機能を評価した。基板背面からの直接酸素供給は成熟ラット肝細胞の三次元組織化を著しく容易にすると共に、機能発現とその維持を大幅に改善した。また、マウス胎児肝臓細胞の培養においても、通常の2次元平面培養に比べ、スフェロイド形成により分化がより強く誘導された。一方、ヒトの内胚葉組織から iPS 細胞を複数株樹立し、in vitro での肝細胞分化誘導を様々な方法で実施し、特定の microRNA が未分化肝細胞の成熟を促進しうることを明らかにした。さらに、類洞内皮細胞への分化誘導系も検討した。今後は、培養基の最適化を図りつつ、肝細胞の分化培養系および機能維持の条件を検討する。さらに、ヒト iPS 細胞からの分化誘導系の改良を行うとともに酸素透過性プレートへの適用を検討する。

§ 2. 研究実施体制

(1)「宮島」グループ(東京大学)

- ① 研究分担グループ長:宮島 篤(東京大学 分子細胞生物学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・マウス肝臓から肝構成細胞の分離と肝組織の再構成
 - ・ヒト iPS 細胞などからの肝非実質細胞への分化

(2)「酒井」グループ(東京大学)

- ① 研究分担グループ長:酒井 康行(東京大学 生産技術研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・酸素透過材料からなるハニカム型マイクロウェル構造を持つ基板の作成とラット初代培養肝

細胞の組織化

(3)「落谷」グループ(国立がん研究センター)

① 研究分担グループ長:落谷 孝広(国立がん研究センター がん転移研究室 独立室長)

② 研究項目

・ヒト iPS 細胞の樹立と in vitro での肝細胞分化誘導系の開発

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

「マウス肝臓から肝構成細胞の分離と肝組織の再構成」

マウス胎児由来の肝芽細胞および肝芽細胞株 HPPL 細胞の自発的な三次元組織化が肝細胞分化に与える影響について検討を行った。胎生14.5日の肝臓細胞を直径の異なる多孔性マイクロウェルプレート上に播種し、スフェロイド形成を誘導し、albumin および Cyp の発現を指標に分化の評価を行った。2次元の平面培養に比べてスフェロイドを形成した場合の方が albumin および Cyp の発現は数倍程度高かった。また、オンコスタチン M 存在下において、スフェロイドの形成が抑制されることが明らかとなった。これまで、オンコスタチン M は、肝細胞の分化もしくはその機能維持に必須のサイトカインとして知られていることから、スフェロイド形成後のオンコスタチン M の役割について検討し、最適な三次元組織化培養法の樹立を行う。将来的には、この技術をヒト iPS 細胞由来肝芽細胞に当てはめることにより、機能的肝組織の構築を試みる。

当研究室で樹立された肝芽細胞株 HPPL は、肝臓の上皮系細胞である肝細胞および胆管上皮細胞への分化が可能な細胞である。多孔性マイクロウェルプレート上にて HPPL 細胞を培養し、オンコスタチン M、デキサメタゾンによる肝細胞分化誘導法を確立した。今後、HPPL 細胞由来肝細胞の機能の向上をめざす。

「ヒト iPS 細胞などからの肝非実質細胞への分化」

以前に開発したマウス ES 細胞からの肝類洞内皮細胞への分野誘導系を基に、ヒト iPS 細胞からの類洞内皮細胞の分化誘導を試みた。まず embryoid body を形成し、BMP4, Activin, FGF2 で中胚葉系へ分化誘導し、VEGF の存在下で培養した後、最後に TGFβ 阻害剤を加えて培養することで、肝類洞内皮細胞に特有の Stabilin2 や第8凝固因子などの発現が認められた。しかしながら、分化誘導系の効率や再現性に課題があり、培養系の最適化/安定化が今後の課題である。

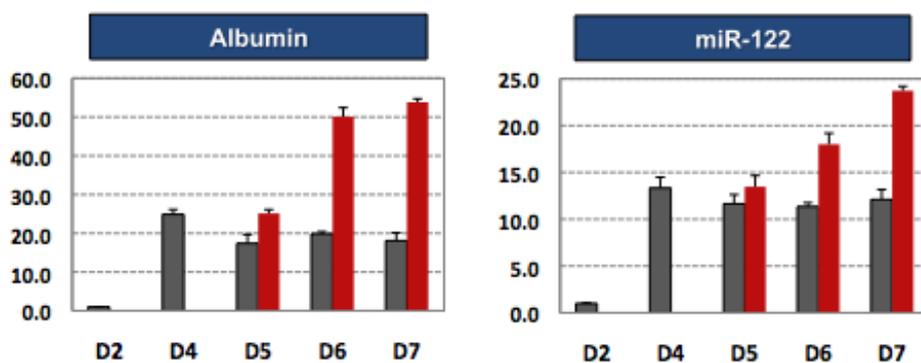
「成熟肝細胞を用いた構築方法確立」

- 目的: 本PJの基盤となる培養デバイスの開発を行う。
- 方法: 酸素透過性材料であるポリジメチルシロキサン(PDMS)の二次元微細加工技術を用いて、大きさの異なるハニカム状のマイクロウェル構造を持つ培養基板を作成し、まずは成熟ラット肝細胞を用いて、適切な表面処理・背面からの酸素供給の有無・播種細胞密度等が三次元組織化と機能に及ぼす影響を網羅的に検討した。
- 結果: 直径 46-326 mm, 深さ 65-225 mm のウェルを持つ培養基板を精度よく製作できた。酸素プラズマ処理 PDMS を MPC ポリマーで被覆すると、どの直径でも約2日で三次元浮遊凝集体となったが、コラーゲン吸着を行うと内部に付着した半球状の凝集体を得ることができたことから、酸素プラズマ処理・コラーゲン吸着が処理として十分であることが明らかとなった。通常のディッシュ上の飽和播種密度である 1.0×10^5 cells/cm² では、背面からの酸素供給の有無は顕著な違いを与えなかったが、 2.0×10^5 cells/cm² 以上では酸素供給無では、細胞は急速に死亡した。一方、酸素供給条件では、最大で 6.0×10^5 cells/cm² の播種で三次元化を起こし得た。アルブミン分泌・チトクローム P450 活性とも酸素供給条件でレベル・維持共に向上したが、特に前者では細胞当たりで 10-20 倍に高まった。
- 結論: 以後の基本となる培養基板を作成し、その表面処理条件を設定した。基板背面からの直接酸素供給は成熟ラット肝細胞の三次元組織化を著しく容易にすると共に、機能発現とその維持を大幅に改善した。次年度は、開発した基板を用いて、ラットの成熟肝細胞を用いて、集団のサイズ・三次元化の程度・非実質細胞の共存等を最終的に最適化すると共に、暴露酸素濃度を変えて、成熟組織の機能学的 zonation の再現を試みる。

「iPS 細胞からの肝細胞分化誘導系」

iPS 細胞の肝細胞への分化誘導の効率を高めるための方法として、肝細胞の成熟化を促進する因子の探求を実施した。すでに正常の肝臓の発生と成熟過程に関与する小分子 RNA である microRNA の候補を網羅的に解析したデータを保有している。この中から、未分化の肝細胞を成熟化させる microRNA を検討した。その結果、特定の microRNA が未分化肝細胞の成熟を促進する事を明らかにした(図1)。ここに示すように、アルブミンの発現および成熟型肝臓に豊富に存在する microRNA122 の発現を誘導する事が出来た。したがって、肝臓に指向性の高い iPS 細胞にこのような肝細胞の成熟に関与する小分子 RNA を導入する事で、肝細胞としての機能を増強する可能性が示唆された。

▶ microRNA over-expression in fetal hepatocytes



§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)