

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. 研究実施体制

### (1)「宮島」グループ

① 研究代表者: 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

① 主たる共同研究者: 酒井 康行(東京大学 生産技術研究所、教授)

#### ② 研究項目

- ・成熟肝細胞における酸素透過マイクロウェルを用いた擬似三次元組織培養系の確立
- ・構築された組織における機能マーカーの発現解析と主要肝機能評価

### (3)「落谷」グループ

③ 主たる共同研究者: 落谷 孝広(国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野、分野長)

#### ④ 研究項目

- ・ヘテロ三次元組織構築に必要な肝細胞を誘導するための技術確立

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(宮島篤)

本研究の目標は、無限増殖能を備えたiPS細胞から疾患メカニズムの解明や創薬研究などに利用可能な成熟肝臓レベルで多様な機能を発現する肝組織をin vitroで再構築することである。成

熟肝レベルの機能の指標として、代謝や解毒などの機能や肝特異的な転写因子群の発現などに加えて、創薬研究への応用を考慮して細胞の増殖性も重点目標としている。本研究では、ヒトiPS細胞から分化誘導した細胞を各種肝構成細胞との三次元共培養系に適用し、高機能肝組織の構築を行う予定である。しかしながら、iPS細胞からの肝細胞分化における問題として、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う点がある。我々も、既報の方法によりヒトiPS細胞を段階的に肝芽細胞に分化誘導すると、肝芽細胞特異的なタンパク質であるHNF4aやAFPの発現は一部の細胞にのみ限局することを観察している。我々はこれまでにマウス胎児肝臓中には増殖性の肝芽細胞が存在し、継代培養可能であることを示してきた。そこで、平成23年度においては、ヒトiPS細胞からの肝細胞分化誘導系の改善として、iPS細胞を肝芽細胞へといったん分化誘導し、それを純化・増幅後に機能的肝細胞へと分化成熟させるという2段階の分化誘導法の確立を試みた。具体的には、まず、iPS細胞を肝細胞へと分化誘導し、肝芽細胞の表面抗原の発現を指標に純化して、肝細胞への分化能を維持したまま細胞を増幅する培養系を樹立した。樹立した肝芽細胞から分化誘導した肝細胞は、ヒト肝ガン由来細胞株HepG2と比較し、高い薬物代謝酵素分子の発現を有していた。また、肝臓細胞の分離に利用可能な細胞膜タンパク質の解析を行った<sup>1,2,3</sup>。

平成24年度においては、他グループと連携し、樹立したヒトiPS細胞由来肝芽細胞と各種肝非実質細胞との三次元共培養系等に適用することで、高機能肝組織の構築を試みる。

(酒井康行)

酸素透過性材料を用いる静置培養系にて、ラット肝細胞を用いて疑似三次元的共培養の確立と評価を行い、iPS誘導肝細胞に適用することで、創薬スクリーニングに使用可能な高機能培養系の開発を目指す。昨年度までの研究で、ハニカム型マイクロウェル構造を持つ酸素透過培養用のプレートおよび表面処理等に関する確立が終了したので、これを踏まえて平成23年度においては、(1)成熟肝細胞における酸素透過マイクロウェルを用いた疑似三次元組織培養系の確立、(2)構築された組織における機能マーカーの発現解析と主要肝機能評価についての検討を進めた。

(1)および(2)について、高い肝機能発現が安定して得られた直径200 μmのマイクロウェル構造を持つポリジメチルシロキサン(PDMS)表面および平滑なPDMS表面を用いて、線維芽細胞やマウス不死化類洞内皮細胞株と成熟ラット肝細胞の共培養を行った。重層化肝細胞を線維芽細胞層でサンドイッチするタイプの共培養については、通常の飽和密度の6倍の面密度( $6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)での播種が可能で、平均3層からなる重層化組織を形成し、タンパク・尿素合成能等の機能レベルは通常の数倍に向上した<sup>4</sup>)。次に、同じ構造を持つPDMS培養表面を酸素非透過の組織培養用プレートに置き、飽和細胞密度で培養したところ、細胞の死亡や肝細胞の顕著な凝集剥離が見られた。一方、PDMS表面を底面がPDMSで作られ下面の気相からの酸素直接供給が可能な状況に置き、同様の培養を行うと、平滑なPDMS表面では、播種した順序でほぼ完全な二相重層化共培養が可能であった。またマイクロウェル構造でも、下部の肝細胞が凝集して半球状

となりその表面を類洞内皮細胞が連続的に覆うという状況が実現した(論文作成中)。創薬スクリーニングで多用される簡便なサンドイッチコラーゲン培養に習い、上部の類洞内皮の代わりにマトリゲルを培養液に添加したところ、極めて良好な微細胆管の形成が見られた。またタンパク合成能も添加直後から速やかに上昇した。一方、類洞内皮を添加したところ、タンパク合成能の上昇はやや遅いが最終的にはマトリゲル重層化と同程度となった。これはマトリックス物質の蓄積に時間がかかるためと思われた。以上、平面またはマイクロ3D構造を付与した PDMS 表面を用い、下面から細胞へと半ば直接的に酸素供給を行うことで、個々の細胞レベルでの完全共培養が実現できることを明らかとした。また類洞内皮の代わりにマトリゲルを用いると同様の機能的効果が迅速に得られることも明らかとした。

(2)については、さらに、生体肝小葉構造内で見られる機能学的 zonation—酸素が豊富な門脈域(小葉外周部)で合成能が亢進し、酸素濃度が低くなる中心静脈部(小葉中心部)で解毒酵素群の活性が亢進する—の再現の可能性を検証した。具体的には、平面型の PDMS 表面を用いてマトリゲル重層化培養を行い、酸素濃度 5%及び 21%での機能的差異を検討した。その結果、通常の組織培養用ディッシュでは解毒酵素群の活性は 21%で亢進したが、PDMS 培養では逆に 5%濃度でより高い活性を得た。タンパク合成能に関しては、組織培養用ディッシュではやはり 21%濃度が良好であったが、PDMS 培養では、解毒酵素活性とは逆に 21%で亢進を見た。このことは、PDMS 培養を用いて細胞の酸素要求性を満たしつつ暴露濃度を生理学的レンジに正確に設定する(ほぼ完全に気相とのヘンリー平衡に持ち込める)ことで、培養系においても小葉内の機能学的 zonation の再現が可能であることを断片的ではあるが初めて示すことができた。

平成 24 年度においては、これらの成果の上に、ラット肝細胞においては、三次元化・共培養・暴露酸素濃度を最終的に最適化し、定量的 PCR アレイを用いて生理学的酸素濃度での好氣的呼吸実現の肝代謝における意義を実証すると共に、これらの利点を活かし、他グループの研究で得られる iPS 由来肝前駆細胞について、最終的な成熟化に関する検討を開始する。

(落谷孝広)

昨年度までの研究で、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を複数同定した。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 の候補や正常の肝臓を網羅的に解析したデータをもとに<sup>5)</sup>、未分化の肝細胞を成熟化させる microRNA を検討した結果、microRNA-148a が未分化肝細胞の成熟を促進する事を明らかにした。miR-148a は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。平成23年度は、この miR-148a の肝細胞成熟化のメカニズム解明と薬物代謝関連の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した結果、miR-148a は肝細胞分化を制御する遺伝子群の DNA メチル化を制御する Dnmt1 遺伝子を標的とすることで一連の肝細胞成熟化を促進する事を明らかにするとともに、CYP2C9 や CYP3A などのチトクローム遺伝子の発現も40%ほど増加させた(論文作成中)。したがって、本研究成果は肝臓に指向性の高い iPS 細胞<sup>6)</sup> に対して、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強く示唆された。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Miyaoka Y, Kato H, Ebato K, Saito S, Miyata N, Imamura T and Miyajima A, "Retention in the Golgi apparatus and expression on the cell surface of Cfr/Esl-1/Glg-1/MG-160 are regulated by two distinct mechanisms" *Biochemical Journal*, 44, 33-41, 2011 (DOI: 10.1042/BJ20110318)
2. Tsukahara Y, Tanaka M and Miyajima A, "TROP2 expressed in the trunk of the ureteric duct regulates branching morphogenesis during kidney development" *PLoS One*, 6, e28607, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0028607)
3. Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen Y-R, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T and Miyajima A, "Inhibition of Stabilin-2 elevates the circulating hyaluronic acid level and prevents tumor metastasis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109, 4263-4268, 2012 (DOI: 10.1073/pnas.1117560109)
4. Evenou F, Hamon M, Fujii T, Takeuchi S and Sakai Y, "Gas-permeable membranes and co-culture with fibroblasts enable high-density hepatocyte culture as multilayered liver tissues", *Biotechnol. Prog.*, 27(4), 1146-1153, 2011 (DOI: 10.1002/btpr.626)
5. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*. 6(1):e16081, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0016081)
6. Ishikawa T, Hagiwara K and Ochiya T, "Generation and Hepatic Differentiation of Human iPS Cells" *Methods Mol. Biol.*, 826,103-114, 2012 (DOI: 10.1007/978-1-61779-468-1\_9)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)