

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

- ・成熟肝細胞を用いた構築方法確立
- ・構築組織の応答挙動の詳細評価
- ・iPS 誘導肝細胞を用いた組織構築と評価

### (3) 「落谷」グループ

① 主たる共同研究者: 落谷 孝広 (国立がん研究センター 分子細胞治療研究分野 分野長)

#### ② 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」グループ

・マウス肝臓から肝構成細胞の分離と肝組織の再構成

増殖性の肝前駆細胞が得られれば、それを増幅し保存することで短期間で再現よく肝細胞

へ分化成熟を誘導することが期待される。そこでヒト iPS 細胞から肝前駆細胞を分化誘導し、増幅後にそれを肝細胞へと分化誘導するシステムの開発を行った。ヒト iPS 細胞を肝臓系細胞へ分化誘導後に、肝前駆細胞特異的な表面抗原の発現を指標にして肝前駆細胞を分離し、その維持培養系を樹立した。さらに、マウス成体の肝臓から肝非実質細胞をコラゲナーゼ灌流法によって分離して、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞との三次元共培養により、肝細胞の分化／成熟に対する作用を検討した。代表的な薬物代謝酵素である CYP3A4 mRNA 発現は、通常の培養系と比較し、1.5 倍程度増強した。今後は、マウスの胎児および成体肝臓から各種非実質細胞（肝星細胞、肝中皮細胞、類洞内皮細胞）を分取し、様々な密度、組み合わせで三次元共培養を行うことで、各種肝非実質細胞の肝細胞の機能分化／維持に対する作用を解析する。

#### ・ヒト iPS 細胞からの肝非実質細胞への分化

in vitro での肝細胞の機能発現／維持には、生体肝における肝細胞を取り巻く微小環境を再現することが重要である可能性が考えられる<sup>4)</sup>。そこでまず、ヒト iPS 細胞から間葉系細胞を分化誘導した。分化誘導した間葉系細胞と、既に樹立したヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞との三次元共培養により、肝細胞のマーカーであるアルファフェトプロテイン、アルブミンの発現が増強した。また、ヒト iPS 細胞から肝類洞内皮細胞の分化誘導を行い、分化誘導後、肝類洞内皮細胞のマーカーである Stab2, CD31 の発現を確認した。今後は引き続き肝類洞内皮細胞の分化誘導系の改良を行う。さらに、このようにヒト iPS 細胞から誘導した各種肝非実質細胞をヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞に加えたヒト生体肝臓様の三次元的構造の再構成を行うことで成熟細胞に近い肝細胞の誘導系と開発する。

### 「酒井」グループ

#### ・成熟肝細胞を用いた構築方法確立

#### ・構築組織の応答挙動の詳細評価

酸素透過性プレートを用いた成熟ラット肝細胞のサンドイッチ培養とマイクロウェル構造を利用した三次元培養については、PCR アレイを用いて新鮮遊離肝細胞と比較をしたところ、酸素直接供給条件下で、サンドイッチ培養が最も近い発現プロファイルを与え、次いで三次元培養の順となった。続いて気相中の酸素濃度を変えて一連の実験を行ったところ、タンパク合成能・解毒酵素活性の両方で酸素透過プレートを用いた 10% 気相酸素の培養が最も高い機能の長期安定発現を与えた。胎児ラット酸素透過材料にマイクロウェル構造を付与し、ラット実質肝細胞、ラット由来胆管上皮細胞、ヒト由来類洞内皮細胞からなる共培養凝集体を高い播種密度でも迅速に形成しえた。これらの共培養で、CYP1A1/2 酵素活性は、2~4 倍程度に向上し、類洞内皮との共培養では代謝物は凝集体外へ排泄され、胆管上皮との共培養では内部に蓄積される傾向にあったことから、共培養による組織極性の制御の可能性が示された。さらに、酸素透過膜上のコラーゲンゲルに形成させたマイクロウェル構造にて、ウェルの大きさを変えて毛細胆管の形成を観察したところ、直径 60-80 マイクロメートルのウェルでは、中央部に大きな胆汁溜りを形成させることに成功した。以上

の成果は、酸素透過性材料と微細構造技術を融合利用することで、肝細胞の自己組織化を促し、機能と極性発現をも再現可能な肝組織モデルを形成しえることを示している<sup>7)</sup>。

#### ・iPS 誘導肝細胞を用いた組織構築と評価

一方、肝前駆細胞からの組織構築のモデルとして、ラット胎児肝細胞を異なる酸素濃度で培養した結果、通常の培養プレートではどの条件でも単層が形成されるにすぎなかったが、酸素透過プレートではマトリックス物質に富む間質下層と肝実質細胞の上層とからなる厚いヘテロ肝組織が自発的に形成された。特にはじめは低い酸素濃度で、中期から高い酸素濃度で培養した場合、組織厚みが 100 マイクロメータへと最も厚くなりまた最も高い機能を発現した。また間質層の中では、やや未熟な肝細胞が発達する過程が観察された。このことは未熟な肝細胞の成熟を達成するうえで、マトリックス層と酸素濃度コントロールの重要性を指摘するものである<sup>8)</sup>。さらに、マウス ES からサイトカインカクテル逐次添加法(落谷らの分化誘導プロトコール)にて、酸素濃度の影響を検討した。その結果、分化誘導初期に 5%酸素濃度で培養した群で、20%で培養したものに比べて内胚葉系への分化が亢進し、最終的に出現する肝細胞の割合が増加することを見出した<sup>10)</sup>。今後、以上の候補の培養系と条件について、iPS 誘導肝細胞の培養を行い成熟化への寄与を評価(中間報告)、創薬応用・ウイルス感染性試験応用での有効性を検証する(最終評価まで)。

#### 「落谷」グループ

すでに開発した HIFC 分化誘導方法を改良してヒト iPS 細胞からの肝細胞分化及び成熟化促進を計るための microRNA148a の機能解析に焦点を当てた。成熟型の肝細胞分化誘導に深く関与する microRNA148a はメチル化の維持等に重要な分子として有名な DNMT を制御する事が明らかとなった。この microRNA を幼若肝細胞へ導入する事により、DNMT1 の発現が抑制され、同時に肝細胞特異的な成熟肝細胞マーカーである microRNA122、アルブミン、トランスサイレチン、チトクロームなどの遺伝子が発現上昇したことから、肝細胞の分化あるいは成熟化に microRNA148b は、DNMT を介して作用する事が示唆された<sup>6)</sup>。また、この microRNA148a は、ヒト肝細胞がんでは、他の肝細胞がんを特徴づける microRNAs と並んで<sup>9)</sup>、その発現が抑制されている事も臨床検体の解析から明らかとなった。つまり、microRNA148a は、肝細胞の分化と肝細胞発がんの双方の過程に関与するマイクロ RNA である事がわかった。さらに、平成 24 年度は、iPS 細胞の肝細胞への orientation を促す microRNA の探索を行ない、内胚葉分化誘導に係ると思われる複数の microRNAs の候補を選定した。今後は、こうした肝細胞分化促進型 microRNAs を肝細胞分化指向性 iPS 細胞に導入し、その肝機能の向上を図るとともに、平成 25 年度の前半には、これらの肝細胞を宮島らの非実質細胞と共培養する系や、酒井の三次元培養システムに搭載する検討を開始する。

### §3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. *Curr. Biol.***22**, 1166-1175, 2012 (DOI:10.1016/j.cub.2012.05.016).
2. Zhu N-L, Asahina K., Wang J., Ueno R., Lazaro R., Miyaoka Y., Miyajima A., and Tsukamoto H. Hepatic stellate cell-derived delta-like homolog 1 (DLK1) in liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **287**, 10355-10367, 2012 (DOI:10.1074/jbc.M111.312751).
3. Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* **23**, 2845-2855, 2012 (DOI:10.1091/mbc.E12-02-0097).
4. Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A.  $\alpha 1$ - and  $\alpha 5$ -Containing laminins regulate the development of bile ducts via  $\beta 1$ -integrin signals. *J. Biol. Chem.* **287**(34), 28586-97, 2012 (DOI:10.1074/jbc.M112.350488)
5. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**(2), 751-756, 2013 (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.11.076).
6. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawaharada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A. and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology* (in press) (DOI:10.1002/hep.26422)
7. Matsui H, Takeuchi S, Osada T, Fujii T and Sakai Y. Enhanced bile canaliculi formation enabling direct recovery of biliary metabolites of hepatocytes in 3D collagen gel microcavities, *Lab on-a-Chip*, **12**, 1857-1864, 2012 (DOI:10.1039/c2lc40046d).
8. Hamon M, Hanada S, Fujii T and Sakai Y. Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells in vitro. *Cell Transplant.*, **21**(2-3), 401-410, 2012 (DOI:10.3727/096368911X605303).
9. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T., Taguchi YH. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS One*, **7**:e48366, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0048366)
10. Katsuda T, Teratani T, Chowdhury MM, Ochiya T., Sakai Y. Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic

progenitor cells, *Biochem. Eng. J.*, **74**, 95-101, 2013 (DOI:10.1016/j.bej.2013.02.012)

11. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev.*, **27**, 169-181, 2013. (DOI:10.1101/gad.204776.112)

**(3-2) 知財出願**

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)