

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. 研究実施の概要

(宮島篤)

従来のヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導は、種々の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、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。そこで、従来法による肝細胞分化誘導系の改善として、まずヒト iPS 細胞から増殖性の肝前駆細胞を分化誘導した後に、それを分離して増幅してから、成熟肝細胞へと誘導するシステムの開発に取り組んだ。これまでの成果として、ヒト iPS 細胞から増殖性肝前駆細胞および肝非実質細胞のうち、最大の割合を占める肝類洞内皮細胞の特徴を示す細胞を分化誘導することに成功した。現在、肝前駆細胞と肝非実質細胞を三次元的に共培養することで、成熟肝細胞へと分化誘導する系の構築を行っている。また、同時に免疫不全マウスへの移植系の確立も目指し、生体内での機能的な肝細胞および肝類洞内皮細胞への分化成熟化を試みている。

(酒井康行)

酸素透過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について、昨年度、細胞近傍の酸素濃度として 10%が最良であることを報告したが、今年度、同じ細胞近傍での酸素濃度であっても、酸素透過条件と非透過条件とでは、細胞の酸素消費速度に 10 倍以上の差が認められ、細胞の酸素消費を確実に充足することの重要性が確認できた。このことは肝代謝能を対象とした qPCR アレイでも裏付けられた。一方、三次元培養を含めた最良の培養系条件でも、採取直後の肝細胞と比較すると時間に伴う発現低下が著しく、培養条件の更なる改善が必須であることも示された。三次元培養については、前年度確立した酸素透過マイクロウェルを用いた効率的球状凝集体形成法で、大きさの異なる球状凝集体について、各種解毒代謝活性とその毒性発現に対する影響を系統的に調べた結果、酸素の拡散消費で予想される直径よりもはるかに小さな径の凝集体が望ましいことを確かめた。一方、胎児ラット肝細胞と成熟胆管上皮細胞の共培養球状凝集体を作製し、一定程度以上の胆管上皮細胞の存在が機能的胆管様ネットワークの構築に必須であり、その条件では、肝細胞の産生する胆汁が、凝集体内に形成される胆汁溜りに回収・蓄積されることを観測した。

(落谷孝広)

すでに開発したヒト 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 の機能解析および内胚葉分化誘導に寄与する microRNA 解析に焦点を当てた。昨年度の成果から、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 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ことから、DNMT1 を制御する因子を検討する事で、肝細胞分化促進の可能性があるかどうかを検討した結果、同様の肝機能亢進に有用であった。さらに、平成 25 年度は、iPS 細胞の、内胚葉分化誘導に係ると思われる複数の microRNAs の候補の機能解析を実施した。その結果、内胚葉関連遺伝子群の発現解析から、microRNA19, 122, および 193a-3p, の 3 種のマイクロ RNA が内胚葉分化を制御している事を突き止めた。今後は、こうした内胚葉および肝細胞分化促進型 microRNAs を肝細胞分化指向性 iPS 細胞に組み合わせたかたちで導入し、CYP 活性等を指標に、より成熟型幹細胞に近い性質を持った細胞作成に力点を置き、研究を継続中である。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. Komori T., Tanaka M., Senba E., Miyajima A. and Morikawa Y. Lack of Oncostatin M receptor b leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J. Biol. Chem.* **288**, 21861-21875, 2013
(doi:10.1074/jbc.M113.461905)
2. Katsuda T., Kojima N., Ochiya T., and Sakai Y. Biliary epithelial cells play an essential role in the reconstruction of hepatic tissue with a functional bile ductular network. *Tissue Eng. A*, **19**:2402-11., 2013 (doi:10.1089/ten.TEA.2013.0021)
3. Gailhouste L., and Ochiya T. MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression. *Cancer Diagnostics*, pp 12-14, 2013
4. Seki A., Sakai Y., Komura T., Nasti A., Yoshida K., Higashimoto M., Honda M., Usui S., Takamura M., Takamura T., Ochiya T., Furuichi K., Wada T., and Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a murine steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology*, **58**, 1133-42., 2013.
(doi:10.1002/hep.26470)
5. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Hagiwara K, Hatada I, Kitagawa N, Kawaharada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi RU, Shibata T, Miyajima A, Ochiya T. miR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology*, **58**, 1153-1165, 2013.
(doi:10.1002/hep.26422)
6. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol. Cell. Biol.* **34**:900-913, 2014. (doi:10.1128/MCB.01384-13)
7. Tabata Y, Horiguchi I, Lutolf MP. and Sakai Y. Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors, *Biomat. Sci.*, **2**, 176-183, 2014. (doi:10.1039/C3BM60183H)
8. Katsuda T, Teratani T, Chowdhury MM, Ochiya T and Sakai Y. Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic progenitor cells, *Biochemical Engineering Journal*, **74**, 95-101, 2013.
(doi: 10.1016/j.bej.2013.02.012)

(3-2) 知財出願

- ①CREST 研究期間累積件数 (国内2件)