

「人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製・制御等の医療基盤技術」
平成 22 年度採択研究代表者

H26 年度
実績報告書

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

ヒト iPS 細胞から肝細胞を分化誘導する試みが数多く報告されているが、誘導された iPS 細胞由来肝細胞は、成体の成熟肝細胞と比較して機能的に著しく未熟である。そこで、本研究グループでは、様々な角度からヒト iPS 細胞から機能的な肝細胞を分化誘導する方法の開発を行って来た。H26年度の各グループの成果は以下のものである。

(宮島グループ)

生体肝臓から分離した肝細胞は培養により急速に機能を失うことから、肝細胞の高機能発現には肝非実質細胞が必要であると考えられる。そこで、前年度までに分化誘導に成功している iPS 細胞由来の増殖性肝前駆細胞に、マウス胎仔から分離した肝類洞内皮細胞と間葉系細胞を組み合わせた二次元および三次元の共培養を行った。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細胞の組織化が認められた。また、アルブミン産生等の肝機能は、二次元培養系に比べて三次元培養系で高く発現し、さらに肝非実質細胞を加えた培養系で格段に高い発現を示した。このように、マウス胎児由来肝非実質細胞は、肝組織の構築と肝細胞の成熟化を促進することが明らかとなった。そこで、昨年度に開発した iPS 細胞から肝類洞内皮細胞の分化誘導系を改良するとともに、肝間葉系細胞の分化誘導も進めた。今後は iPS 細胞から誘導した肝細胞と肝非実質細胞による肝の機能的組織構築を、酒井グループおよび落谷グループの成果も取り入れて進める予定である。

(酒井グループ)

微小酸素電極を用いて細胞層近傍の実酸素濃度を計測することで、酸素透過 PDMS 膜を用いた細胞層への酸素直接供給培養では、たとえ細胞層の実酸素濃度が同じであっても、細胞の呼吸回路が全く異なることを明瞭に示した。つまり、通常のプレート培養(TCPS 培養)では嫌氣的呼吸であるのに対し、PDMS 培養では酸素消費量が 10 倍以上となり、生体と同じく明らかに好氣的呼吸を利用していることが確認できた。この PDMS 培養で血管内皮細胞との共培養を行うと、TCPS 上では両者が同一平面を取り合うのに対し、両者を完全に重層化することができた。ヒト iPS 細胞の肝分化誘導においても、PDMS 培養を用いて特に分化誘導後期で酸素供給量を上げることで呼吸回路の嫌気から好気へのスイッチを促し、分化を促進することが示された。

(落谷グループ)

ヘテロ三次元組織構築に必要な肝細胞の作成に継続して専念するとともに、HCV の感染スクリーニング系に適合するかどうかを検証した。Hepa-iPS 細胞を *in vitro* で分化誘導した細胞に肝細胞成熟化を制御する microRNA148(Hepatology, 2013)を導入した細胞の CYP 活性の最適化を完了した。この肝細胞成熟化を促進する microRNA を用いる事で、宮島らの構築する分化誘導系によるヒト iPS 細胞の *in vitro* での肝細胞分化の完成度を高める工夫を継続検討した。さらに、内胚葉を誘導する2種のマイクロ RNA を同定し、内胚葉の遺伝子発現の誘導を確認した。分化誘導した肝細胞での HCV の複製を二次元培養で検討した結果、HCV ウイルス RNA の検出による複製が確

認された。また、HCV の複製を抑制する anti-miR-122 (LNA)の導入によって、その複製が抑制される予備的知見を得た。

Inagaki N, Inagaki F, Kokudo N and Miyajima A. “Use of mouse liver mesothelial cells to prevent postoperative adhesion and promote liver regeneration after hepatectomy” *J. Hepatology*, in press. (doi: 10.1016/j.jhep.201)

W. Xiao, H. Matsui, M. Shinohara, K. Komori, T. Osada, Y. Sakai, “The importance of physiological oxygen concentrations in the sandwich cultures of rat hepatocytes on gas-permeable membranes”, *Biotechnol. Prog.*, vol. 30, No. 6, pp.1401-10, 2014 (doi: 10.1002/btpr.1954).

Ishikawa T, Kobayashi M, Yanagi S, Kato C, Takashima R, Kobayashi E, Hagiwara K, Ochiya T. Human Induced Hepatic Lineage-Oriented Stem Cells: Autonomous Specification of Human iPS Cells toward Hepatocyte-Like Cells without Any Exogenous Differentiation Factors. *PLOS ONE*, in press