

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)  
(英語) Research Center for Realization of Regenerative Medicine  
(Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation)
- 研究開発課題名： (日本語) ヒト iPS 細胞由来肝構成細胞による肝線維化モデルの樹立と応用  
(英語) Establishment and application of liver fibrosis model using human induced pluripotent stem cell-derived liver cells
- 研究開発担当者 (日本語) 東京大学 分子細胞生物学研究所 助教 木戸丈友  
所属 役職 氏名： (英語) Laboratory of Cell Growth and Differentiation, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Research Associate, Taketomo Kido
- 実施期間： 平成 28 年 11 月 15 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 酸素暴露濃度の制御による高機能肝組織/肝線維化モデルの構築  
開発課題名： (英語) Establishment of a functional liver tissue model/ liver fibrosis model by controlling oxygen tension
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学 生産技術研究所 特任助教 篠原満利恵  
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Project research associate/ Project assistant professor, Marie Shinohara

## II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

肝組織／肝線維化モデルの開発に向けて、ヒト iPS 細胞から高効率かつ簡便な肝前駆細胞の分化誘導系の樹立を試みた。フィーダーフリー培養系においてヒト iPS 細胞を増幅し、iPS 細胞からの肝分化は3段階誘導法により行った。このフィーダーフリー培養系における肝前駆細胞の分化誘導効率について解析するため、特異的なマーカーである Carboxypeptidase M (CPM) の発現をフローサイトメトリーによって解析した。我々は、これまでにフィーダー細胞を用いた分化誘導系においては、20-40%の細胞が CPM 陽性であることを示してきたが、フローサイトメトリー解析の結果、80%程度の細胞が CPM 陽性肝前駆細胞であることが明らかとなった。以上より、フィーダーフリー培養系において、効率的かつ安定的に CPM 陽性肝前駆細胞を誘導する培養系の樹立に成功した。

次に、我々は、CPM 陽性肝前駆細胞の分化能を、ラミニンやコラーゲンコート、コラーゲンゲル上で評価した。CPM 陽性肝前駆細胞を増幅後、iPS 細胞由来の類洞内皮細胞、星細胞と高密度で播種し、肝細胞へ分化誘導した。その結果、ラミニンやコラーゲンコートしたディッシュ上で分化誘導した肝細胞と比較し、コラーゲンゲル上で分化誘導した肝細胞において、CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, G6PC, CPS1, TAT, PCK1 の発現が高く認められた。さらに、RNA-seq 解析の結果、コラーゲンゲル上の高密度培養系において、肝前駆細胞と比較し、60 種類の肝代謝マーカーが顕著に増加した。

また、多様な肝機能を備えたヒト iPS 細胞由来肝組織の構築に向けて、WNT シグナルのアクチベーターである CHIR99021 の肝機能に与える影響について解析した。初代培養肝細胞を、CHIR99021 の存在、非存在下で培養した。3日間培養後、肝臓のゾーン1、ゾーン3領域で特異的に発現する遺伝子群について解析した。その結果、CHIR99021 の存在下においてゾーン3領域の肝細胞マーカーである CYP1A2 や CYP3A4 の発現は促進することが明らかとなった。我々は、ヒト iPS 細胞由来の類洞内皮細胞や星細胞が多くの WNT ファミリー分子を発現することを明らかにしており、成熟した肝組織の構築は、iPS 細胞由来の肝前駆細胞、類洞内皮細胞、星細胞を使用した肝構築系の樹立が有効であることが示唆された。

（英文）

In order to develop an iPSC-derived liver model/liver fibrosis model, we tried to establish an efficient and convenient method for inducing the liver progenitor cells (LPCs). iPSCs were expanded in feeder-free culture condition, and hepatic differentiation of iPSCs was induced using the three-step protocol. Then, to evaluate the efficiency of the LPCs induction in this feeder-free culture condition, we analyzed the expression of LPC specific marker, Carboxypeptidase M (CPM), by flow cytometry analysis. Although we had previously shown that 20-40% of specified hepatic cells were CPM<sup>+</sup> in the feeder-dependent culture condition, flow cytometry analysis revealed that 80% of specified hepatic cells were CPM<sup>+</sup> LPCs. Therefore, we developed a highly efficient and reliable induction system for iPSC-derived CPM<sup>+</sup> LPCs in feeder-free culture condition.

Then, we evaluated the differentiation potential of CPM<sup>+</sup> LPCs on laminin or collagen-I coated dishes or collagen-I gel. After expansion of CPM<sup>+</sup> LPCs, they were then differentiated into hepatocytes by co-culturing with iPSC-derived liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and hepatic stellate cells (HSCs) at high cell density. The levels of hepatic gene expression such as CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, G6PC, CPS1, TAT and PCK1 in hepatocytes cultured on collagen-I gel were much higher than those cultured on laminin or collagen-I coated dishes. In addition, RNA-seq analysis revealed that expression of 60 hepatic metabolic enzyme genes was dramatically increased in this co-culture model.

We tested the effect of WNT activator, CHIR99021, on hepatic functions to develop a iPSC-derived liver model with various hepatic functions. Primary human hepatocytes were cultured in the presence or absence of CHIR99021. We analyzed the zone-1 and zone-3 specific marker genes after three days of culture. The results showed that zone-3 specific marker genes such as CYP1A2 and CYP3A4 were increased in the presence of CHIR99021. Because we have previously shown that iPSC-derived LSECs and HSCs expressed numerous WNT family genes, co-culture of CPM<sup>+</sup> LPCs with iPSC-derived HSCs and LSECs may be an effective way to generate more mature liver model.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Mathieu Danoy, Marie Shinohara, Astia Rizki-Safitri, Dominique Collard, Vincent Senez, Yasuyuki Sakai, Alteration of pancreatic carcinoma and promyeloblastic cell adhesion in liver microvasculature by coculture of hepatocytes, hepatic stellate cells and endothelial cells in a physiologically-relevant model, 2017, Integrative Biology, 9, 4, 350-361.
2. Eric Leclerc, Keiichi Kimura, Marie Shinohara, Mathieu Danoy, Morgane Le Galld, Taketomo Kido, Atsushi Miyajima, Teruo Fujii, Yasuyuki Sakai, Comparison of the transcriptomic profile of hepatic human induced pluripotent stem like cells cultured in Petri and in a 3D microscale dynamic environment, 2017, Genomics, 109, 1, 16-26.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HBV 感染, 口頭, 木戸文友, 杉山真也, 厚井悠太, 小林彩香, 大山裕棋, Chen Shin-Wei, 溝上雅史, 宮島篤, 第 23 回肝細胞研究会, 2016/7/7-8, 国内
2. A novel hierarchical in- vitro coculture model of the liver microvasculature for pancreatic cancer cells adhesion monitoring, ポスター, Mathieu Danoy, Marie Shinohara, Astia Rizki-Safitri, Dominique Collard, Vincent Senez, Yasuyuki Sakai, TERMIS-AP 2016, 2016/9/3-6, 国外.

3. A new physiologically- relevant liver tissue model based on hierarchical coculture using oxygen permeable multiwell plates, 口頭, Wenjin Xiao, Keiichi Kimura, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai, TERMIS-AP 2016, 2016/9/3-6, 国外.
4. ヒト iPS 細胞由来肝類洞壁細胞の樹立, 口頭, 木戸丈友, 厚井悠太, 大山裕棋, Chen Shin-Wei, 宮島篤, 第 30 回肝類洞壁細胞研究会学術集会, 2016/11/25-26, 国内
5. ヒト iPS 細胞由来肝非実質細胞の樹立, 口頭, 厚井悠太, 木戸丈友, 大山裕棋, Chen Shin-Wei, 宮島篤, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内
6. 肝組織構築に向けた効率的なヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞分化誘導系の樹立, 大山裕棋, 木戸丈友, 厚井悠太, Chen Shin-Wei, 宮島篤, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内
7. Development of HBV infection model using iPS-derived hepatic cells, Chen Shin-Wei, 木戸丈友, 厚井悠太, 大山裕棋, 杉山真也, 溝上雅史, 宮島篤, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
無し

(4) 特許出願  
無し