

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) 肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) ヒト iPS 細胞由来肝細胞/肝組織による肝炎ウイルスの感染・増殖系の樹立と応用

(英語) Development and application of an HBV infection/replication model using human iPSC-derived hepatocytes

研究開発担当者 (日本語) 宮島 篤

所属 役職 氏名：(英語) Laboratory of Cell Growth and Differentiation, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Professor, Atsushi Miyajima

実施期間：平成28年4月1日～平成31年3月31日

分担研究 (日本語) iPS 細胞由来の肝組織構築と肝炎ウイルス感染・増殖の評価

開発課題名：(英語) Development of iPSC-derived liver tissue

研究開発分担者 (日本語) 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

分担研究 (日本語) iPS 細胞由来肝細胞系での肝炎ウイルス遺伝子系の違いについての検討

開発課題名：(英語) Difference among HBV genotypes using iPSC-derived hepatocytes

研究開発分担者 (日本語) 溝上 雅史

所属 役職 氏名：(英語) Genome Medical Sciences Project, Project Leader, Masashi Mizokami

分担研究 (日本語) iPS 細胞由来肝細胞系での肝炎ウイルス感染と病態に関連する宿主因子の解析

開発課題名：(英語) Analysis of host factors associated with hepatitis virus infection and pathogenicity using iPSC-derived hepatocytes

研究開発分担者 (日本語) 杉山 真也

所属 役職 氏名：(英語) Genome Medical Sciences Project, Vice Project Leader, Masaya Sugiyama

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

現在、初代培養肝細胞、HBV 受容体を導入した HepG2 細胞株、ヒト化キメラマウス由来肝細胞が HBV 感染実験系として使用されている。しかしながら、HBV ゲノタイプと宿主細胞の遺伝背景との関連解析には、様々な異なる遺伝背景の肝細胞を使用した廉価で汎用性の高い HBV の感染・複製系の開発が必要である。我々は、肝前駆細胞マーカーとしてカルボキシペプチダーゼ M (CPM) を同定し、ヒト iPS 細胞から分化した肝前駆細胞ステージから、増殖能及び肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を有する CPM 陽性の肝前駆細胞の樹立に成功している。この技術開発により、ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率的に作製することが可能となった (Kido et al. Stem Cell Reports. 2015)。しかし、より成熟した肝細胞の作製には肝非実質細胞が必要である可能性がある。

平成 28 年度は、iPS 細胞から効率的に類洞内皮細胞、星細胞を作製するため、各種の前駆細胞の純化と増幅の新たな手法を確立することに成功した (Koui et al. 論文投稿中)。また、溝上・杉山・脇田らと共同で、ヒト iPS 細胞由来肝細胞／肝臓モデル (CPM 陽性細胞と類洞内皮細胞や星細胞との共培養系) における HBV の長期感染・複製モデルを開発した。ヒト iPS 細胞から分化した肝前駆細胞ステージから CPM 陽性肝前駆細胞を調製し、マウス線維芽細胞上で増幅した。iPS 細胞由来の肝細胞単独での HBV 感染成立には、肝細胞に発現する HBV 受容体 NTCP タンパク質の発現量や HBV の感染期間が cccDNA の検出に重要であることが示唆された。

次に、iPS 細胞由来の肝臓モデルを樹立するため、増幅した CPM 陽性肝前駆細胞をコラーゲン I ゲル上に iPS 細胞由来の類洞内皮細胞、星細胞と共に高密度で播種した。本培養系において、肝細胞の機能的なマーカーである薬物代謝酵素の一つ CYP3A4 の活性を測定し、肝成熟化について評価した。その結果、肝細胞のみの単独培養系と比較し、iPS 細胞由来肝臓モデル (類洞内皮細胞および星細胞との共培養系) において CYP3A4 の高い活性が認められた。また、この培養系において HBV 感染実験を行なったところ、iPS 細胞由来肝臓モデルにおいて高かった。以上の結果から、iPS 細胞由来の CPM 陽性肝前駆細胞は、類洞内皮細胞や星細胞と共培養することで、より機能的な肝細胞へと分化し、HBV 感染能も向上することが示唆された。一方、脇田らは共培養した細胞に JFH-1 由来 HCV 粒子の感染を試みたが、感染は確認できなかった。受容体の発現が十分でない可能性が考えられる。また、異なるドナーに由来する iPS 細胞から誘導した肝細胞において、HBV の感染レセプターである NTCP の発現量に違いが認められた。HBV ゲノタイプと宿主細胞の遺伝背景との関連解析には、ドナーによらず安定的に肝細胞を得る必要があることから、今後は、遺伝背景の異なる iPS 細胞由来の類洞内皮細胞や星細胞との共培養系を樹立し、HBV 感染系へ応用する。

（英文）

To date, primary cultured human hepatocytes, Hep2 cells expressing HBV-receptor and hepatocytes derived from humanized mice have been used as a model of HBV infection. However, to understand the correlation between HBV genotype and host genetic background, it is necessary to develop a reliable and versatile model of HBV infection/replication using hepatocytes with diverse genetic background. We have identified Carboxypeptidase M (CPM) as a novel cell surface marker of liver progenitor cells (LPCs), and generated iPSC-derived CPM⁺ LPCs with the potential to proliferate and differentiate into both hepatocytes and cholangiocytes. This method has enabled us to produce human hepatocytes from iPSCs efficiently (Kido et al. Stem Cell Reports. 2015). However, to make more mature hepatocytes, liver non-parenchymal cells may be necessary.

In this year, in order to generate liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and hepatic stellate cells (HSCs) from iPSCs efficiently, we have successfully established methods for purification and expansion of each progenitors (Koui et al. submitted). We have also established a long-term HBV infection/replication model using iPSC-derived hepatocytes in collaboration with Drs. Mizokami, Sugiyama and Wakita. After isolation of CPM⁺ cells from differentiated iPSCs at the immature hepatocyte stage, they were expanded on mouse embryonic fibroblasts. Then, expanded CPM⁺ cells were co-cultured with iPSC-derived LSECs and HSCs on collagen-I gel at a high cell density. In this culture system, we evaluated the hepatic maturation of iPSC-derived CPM⁺ LPCs by CYP3A4 activity as a marker for functional hepatocytes. CYP3A4 activity was higher in the iPSC-liver model (iPSC-derived hepatocytes co-cultured with LSECs and HSCs) compared with hepatocytes. Then, we used this model for HBV infection, and found that the iPSC-liver model supported HBV infection. Thus, these data indicated iPSC-derived CPM⁺ LPCs were differentiated into more functional hepatocytes by co-culture with LSECs and HSCs, and they were susceptible to HBV infection. We also attempted to infect HCV using HCV particles derived from JFH-1. However, so far infection was not confirmed. Expression of HCV receptor may not be sufficient.

Furthermore, hepatocytes derived from various iPSC lines expressed HBV entry receptor, NTCP, at a variable level. To analyze the correlation between HBV genotypes and host genetic background, we will improve the culture system and develop iPSC-liver models from different iPSCs to use for HBV infection assay.

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 件、国際誌 件）
- (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、第 23 回肝細胞研究会、口頭、木戸丈友、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、大阪大学中之島センター、2016/7/7、国内。
 2. 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、富山国際会議場、2016/11/25、国内
 3. ヒト iPS 細胞由来肝非実質細胞の樹立、厚井悠太、木戸丈友、大山裕棋、Chen Shin-Wei、宮島篤、口頭、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台国際センター、2017/3/7、国内
 4. 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、口頭、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、仙台国際センター、2017/3/7
 5. Development of HBV infection model using iPS-derived hepatic cells、口頭、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、仙台国際センター、2017/3/7、国内
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
 1. 幹細胞生物学、宮島篤、川崎市民講座、2016.5.30. 川崎市、国内

2. 幹細胞の基礎と応用、宮島篤、染色体学会市民講座、2016.11.3, 東京大学、国内
3. iPS 細胞由来の膵島および肝細胞の創出と医療応用、宮島篤、平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム, 2/2/2017. 品川、国内

(4) 特許出願

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 肝炎等克服緊急対策研究事業
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

補助事業課題名：(日本語) ヒト iPS 細胞由来肝細胞における肝炎ウイルス感染系の解析
(英語) Studies on hepatitis virus infection using human iPSC-derived hepatocytes

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 副所長 脇田 隆字
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases, Deputy Director-General, Dr. Takaji Wakita

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) ヒト iPS 細胞由来肝細胞における肝炎ウイルス感染系の解析
(英語) Analysis of hepatitis virus infection system using human iPSC-derived hepatocytes

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者：国立大学法人東京大学・分子細胞生物学研究所・宮島 篤 総括研究報告を参照。

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 4件)

1. Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Mizuguchi H. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. Sci Rep. 2017 Apr 4;7:45698.
2. Yao WL, Ikeda S, Tsukamoto Y, Shindo K, Otakaki Y, Qin M, Iwasawa Y, Takeuchi F, Kaname Y, Chou YC, Chang C, Watashi K, Wakita T, Noda T, Kato H, Fujita T.

Establishment of a human hepatocellular cell line capable of maintaining long-term replication of hepatitis B virus. *Int Immunol*. 2017 Mar 11. doi:10.1093/intimm/dxx012. [Epub ahead of print]

3. Kinoshita W, Ogura N, Watashi K, Wakita T. Host factor PRPF31 is involved in cccDNA production in HBV-replicating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 22;482(4):638-644.
4. Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Asano Y, Nagata H, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Iwamoto M, Watashi K, Wakita T, Watanabe M. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci Rep*. 2016 Jul 8;6:29358

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Yuichi Akahori, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kohji Moriishi, Koichi Watashi, Takaji Wakita, Makoto Hijikata. **Development of novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes**. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌コンベンションセンター、(2016. 10.23-25) 口頭発表 国内
2. 赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、森石恆司、渡士幸一、脇田隆宇、土方 誠、立体培養した HBV 受容体 hNTCP 発現不死化ヒト肝細胞による新たな HBV 培養系を用いた抗 HBV 薬評価系の構築、第 26 回抗ウイルス療法学会、名古屋市立大学 (2016. 5.13-15) 口頭発表 国内
3. Yuichi Akahori, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kohji Moriishi, Koichi Watashi, Takaji Wakita, Makoto Hijikata. The cell line derived from immortalized human hepatocytes was highly susceptible to blood-borne hepatitis B virus in the three-dimensional culture condition. 2016 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (Seoul, Korea), Sep21-24, 2016 ポスター 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願