

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

ES細胞由来肝組織装置による薬物動態計測システム

### 2. 氏名

田川 陽一

### 3. 研究のねらい

肝臓は薬物の代謝・解毒やアルブミンや血液凝固因子といった生命維持に必要なタンパク質の産生等、我々が生存するために極めて重要な役割を担っている臓器である。よって、創薬研究における薬物代謝評価では、ヒト肝臓のミクロゾームや実験動物が利用されている。本来ヒト肝臓から調製された実質細胞（肝細胞）を培養して薬物動態の解析や人工肝臓への応用をしたいが、肝細胞は長期間の培養も困難で、その肝機能を維持することもできない。本来からだの中の細胞は極性があるにも関わらず、*in vitro* 培養ではその極性にこだわらない強引な培養を行っている。肝臓は肝細胞の他にも、内皮細胞、クッパー細胞等の非実質細胞や細胞外マトリックスと共に肝組織を構築しており、肝細胞－肝細胞、肝細胞－胆管、肝細胞－ディッセ腔（類洞側）の3つの極性がある。この3つの極性を無視した培養方法では肝機能は維持できないし、薬物トランスポーターも構成が難しくなることが予想される。高機能を維持して肝細胞を培養するためには、肝組織の再構築が必要ではないかと考えた。我々はすでに分化に対して万能性であるマウス胚性幹（embryonic stem:ES）細胞を用いて、肝細胞だけでなく、肝細胞とネットワーク構造を有する内皮細胞からなる肝様組織の構築に成功し、その機能を高度に長期的に維持できることを確認している。そこで、新しい概念の人工肝臓への応用や薬物代謝計測肝臓チップを目指して、組織からの初代培養細胞やヒトES細胞を用いて、肝組織を再構築することが、第一の本課題のねらいである。近年、胚から樹立されたES細胞とは異なり、体細胞からES細胞と同様な分化能力を有するiPS（induced pluripotent stem）細胞の樹立方法が確立された。そこで、本研究では、ヒトES細胞だけでなく、ヒトiPS細胞を利用した肝様組織の構築も目指すことにした。

第二のねらいとして、このように再構築された「肝組織」をマイクロ培養装置で培養した「肝組織チップ」を開発し、薬物代謝試験への実用化を目指す。従来までは肝細胞のみの「肝細胞チップ」の開発研究がなされてきた。しかし、肝細胞のみでは、肝細胞極性がないために、薬物動態を計測することはできない。本研究の特色は、「肝組織チップ」の開発である。

さらに、ヒトES細胞やヒトiPS細胞からの肝組織が *in vitro* で再構築可能であれば、*in vivo* の肝臓組織に対応できる。*In vitro* 肝組織の応用として、従来の肝細胞株培養では難しかったヒト肝炎ウイルスの感染・増殖における抗ウイルス薬のスクリーニング等に役立つことが期待できる。

#### 4. 研究成果

##### 1) In vitro肝組織の構築

###### a) 初代培養細胞を用いた肝組織再構築

我々が独自に作出した赤色蛍光トランスジェニックマウスの肝臓から初代培養肝細胞を調製した。内皮細胞としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と肺癌上皮細胞株の融合株に緑色蛍光タンパク質発現ベクターを導入した安定発現株GH7を用いた。動物由来のバイオマテリアルゲル上に緑色蛍光GH7と赤色蛍光肝細胞を播種したところ、図1に示すように肝類洞様構造を構築できた。緑色の内皮細胞株が管腔構造を形成し、その周囲に赤色の肝細胞が存在している肝組織様構造が確認できた。この初代肝細胞により再構築された肝様組織は、通常の2次元培養に比べて優位に高い肝機能を有していることを確認した。

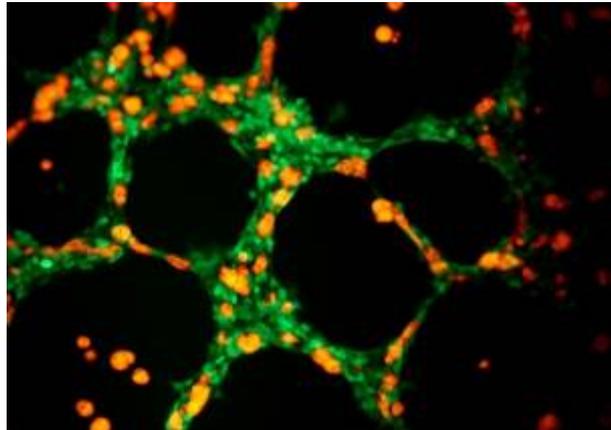


図1 初代培養肝細胞と内皮細胞による肝類洞様構造

赤色蛍光：肝細胞、  
緑色蛍光：内皮細胞株

###### b) ヒトES細胞を用いた肝組織への試み

ヒトES細胞は文部科学省の指針を遵守し、東京工業大学に学内指針、学内倫理委員会、ヒトES細胞専用実験室を整備した(図2)。本研究計画は東工大で審査・承認された後、文部科学大臣によって承認を受けた。ヒトES細胞国内樹立機関である京都大学よりヒトES細胞株を入手し、培養を開始し、現在、肝細胞への分化誘導をおこなっている。



図2 ヒトES細胞専用培養室

###### c) ヒトiPS細胞を用いた肝組織への試み

ヒトES細胞実験計画の承認に時間がかかったため、ヒトiPS細胞を国立成育医療センターより入手し、定法に従って肝細胞への分化誘導に成功した(図3)。さらに、類洞様構造の再構築に成功し、肝機能の測定をおこなっている、マウスES細胞やマウスiPS細胞由来肝組織同様に十分な肝機能を有していることを確認した。

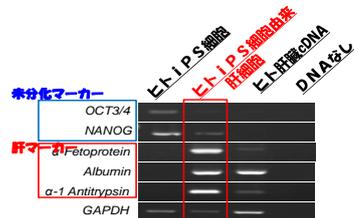


図3 ヒトiPS細胞由来肝細胞の遺伝子発現解析

##### 2) 肝組織チップ装置の開発

株式会社島津製作所との共同開発により、マイクロ培養装置(チップ)を作製した。培養装置はポリメチルシロキサン(PDMS)により加工を行い、流路を付与した。将来的には多流路にすることが可能である。さらに、肝臓は代謝が盛んに行われるために、溶存酸素やpHが非常に重要であることが分かっている。そこで、このような微量の流れのある状況でpHと溶存酸素濃度が計測できるようにしたシステムを作製した(図4)。

本研究は、「肝細胞チップ」ではなく、「肝組織チップ」の開発を目指した。本研究で開発した装置を用いて、肝組織を培養したところ、非常に高い尿素合成能力とテストステロン投与によるシクロオキシゲナーゼ活性を確認できた。本肝組織チップシステムは薬物代謝を計測することが期待できる。現在、ヒトiPS細胞由来肝様組織を培養したマイクロ培養装置システムによる薬物代謝を計測している。

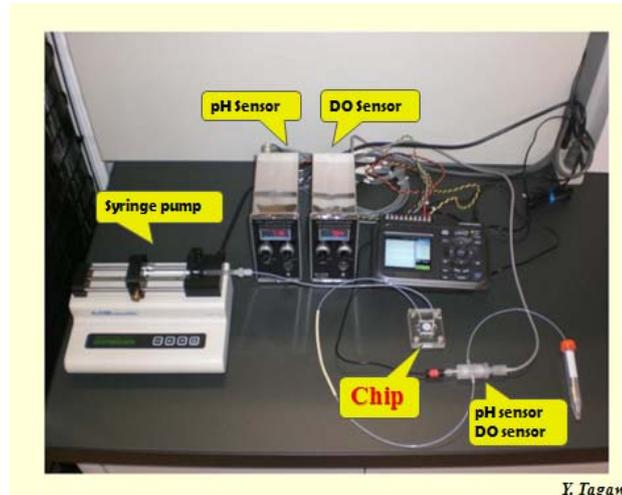


図4 マイクロ培養装置システム  
DO:溶存酸素

以上のように、初代培養細胞やヒトiPS細胞から肝様組織を構築することに成功した。これらの肝様組織は、通常の初代培養肝細胞の2次元培養に比べて肝機能が高く、薬物代謝活性の計測が可能であり、薬物スクリーニング等に十分期待できると思われる。また、その応用として、肝組織チップシステムを開発し、この流路を有することが薬物代謝測定にバリエーションを加えることが可能となり、さらに実際の肝臓に近い環境の再現が期待できる。

## 5. 自己評価

本研究は、ヒトES細胞を用いて肝組織を構築する。その一方でマイクロ培養装置を開発し、ヒトES細胞由来肝組織をそのマイクロ培養装置で培養し、薬物動態を計測することであった。ヒトES細胞使用許可を得るのに時間がかかり、ヒトES細胞を用いた肝組織チップまでは到達できなかった。しかしながら、ヒトES細胞とほぼ同等の分化能力を有するとされるヒトiPS細胞を用いて肝組織チップの作製に成功した。また、作製した肝組織チップにおいて通常のディッシュ上の培養に比して高肝機能を達成した。

多くの薬物における取り込み→代謝→排出の動態を計測できる検証が必要であるが、当初の目的にある程度達成したと考えている。

課題としては、上記の多くの薬物における動態と個体レベルとの検証が必要である。さらに、現時点の肝組織チップよりも小さく、ハイスループット化を目指す必要があると思っている。また、課題にあるようにヒトiPS細胞ではなく、ヒトES細胞で確立することが重要であると考えている。

## 6. 研究総括の見解

ヒトES細胞実験の許可の取得に時間がかかったにもかかわらず精力的な努力の結果、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞由来の肝組織構築に成功し、肝機能を発現することも実証したことは極めて高く評価出来る。チップとして利用出来る可能性も示した。実用段階までに発展すれば創薬研究などへの貢献は極めて大きいものがある。今後の発展を大いに期待したい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Motoyama, H., S. Ogawa, A. Kubo, S. Miwa, J. Nakayama, Y. Tagawa, and S. Miyagawa: In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者:藤山陽一、田川陽一

発明の名称:バイオデバイス

出願人:島津製作所、東京工業大学

出願日:2008年2月4日

#### (3)受賞

・日本動物実験代替法学会 優秀演題賞受賞 (2009年11月)

#### (4)著書

・田川陽一、小川真一郎、玉井美保、小林俊介: 高性能・多機能肝臓モデルの作製を目指して「幹細胞の分化誘導とその応用」ブッカーズ pp.318-326. 2009

・後藤光昭、田川陽一、赤池敏弘: 新規バイオマテリアルを中心とした幹細胞の培養・文化誘導技術と誘導された肝細胞による薬物毒性評価用チップの可能性「幹細胞の分化誘導とその応用」ブッカーズ pp. 367-378. 2009

・田川陽一: 胚性幹(ES)細胞のバイオロジーとその応用と期待 「医療・診断をめざす先端バイオテクノロジー」(29名:関根光雄編)pp.68-78 2009

#### (5)学会発表

##### 学会発表(国際)

・H. Motoyama, S. Ogawa, S. Miyagawa, Y. TAGAWA : Ectopic Expression of Pdx1 and Ngn3 Are Highly Up-Regulated in Regenerative Liver, and Which Contributed to Transdifferentiation of Liver To Pancreas 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), Taipei, Taiwan 2008/11/06

・Y. Tagawa, S. Kobayashi, H. Okuyama, T. Shindo, T. Akaike. : In vitro reconstruction of hepatic tissue structure. The 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, Netherland, 2008/05/29

・Y. Tagawa : Developmental Engineering and Regenerative Medicine. SNU-TIT-TU-UT Joint Bioengineering Symposium, Seoul, Korea, 2009/03/27

##### 学会発表(国内)

・田川陽一 : ES細胞を用いたin vitro肝組織構築におけるバイオマテリアルへの期待:第29回日本バイオマテリアル学会 大阪 2007年11月27日

・小林俊介、藤山陽一、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、小関英一、田川陽一：管化内皮細胞培養システムを用いた肝実質細胞との共培養における肝機能の解析：第29回日本バイオマテリアル学会 大阪 2007年11月27日

・小川真一郎、田川陽一：ES細胞を用いた肝再生医療への可能性－ES細胞由来肝組織の肝機能解析－ 第6回日本再生医療学会総会 横浜 2007年3月13日

・小林俊介、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、田川陽一：管化内皮細胞共培養システムを用いた肝実質細胞との共培養における肝機能の解析：第30回日本分子生物学会および第80回日本生化学学会 合同大会 横浜 2007年12月13日

・安 成皓, 玉井 美保, 豊田 優, 奥山 久嗣, 赤池 敏宏, 新藤 隆行, 藤山 陽一, 小関 英一, 田川 陽一:ES細胞等を用いた肝組織チップの開発、第22回日本動物実験代替法学会 2009年11月14日、大阪

#### (6)招待講演

##### 招待講演(国際)

・Y. Tagawa. Embryonic stem cells in drug metabolism and toxicology 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), Taipei, Taiwan 2008/11/08

・Y. Tagawa. Super-functional Liver Model based on Developmental Engineering and Biomaterials. 2009 China-Japan Regenerative Medical Techniques Forum Shanghai, China 2009/03/18

・Y. Tagawa. Developmental Analysis using Multi-Color Fluorescent Embryonic Stem Cell Lines. 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem Cell Techniques Taipei, Taiwan 2009/09/20

・Y. Tagawa. Developmental Engineering and Development of Novel Artificial Liver System. 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem cell Techniques in Dong Hwa University Hualien, Taiwan 2009/09/22

・Y. Tagawa. Developmental Engineering and Development of Novel Artificial Liver System. Seminar at National Cheng Kung University Tainan, Taiwan 2009/12/04

##### 招待講演(国内)

・田川陽一:ES細胞から肝臓を造る 第6回日本再生医療学会総会 市民公開講座 再生医療最前線－臓器障害と機能の再生－ 2007年3月12日、横浜

#### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

##### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Maruyama, H., M. Takahashi, M. Takamoto, Y. Shiba, H. Ise, J. Koyama, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and U. Ikeda: Deficiency of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. Cardiovasc Res., 80:175-180, 2008

・Isoda, K., N. Kagaya, S. Akamatsu, S. Hayashi, M. Tamesada, A. Watanabe, M. Kobayashi, Y.

Tagawa, M. Kondoh, M. Kawase, and K. Yagi: Hepatoprotective effect of vitamin b(12) on dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biol. Pharm. Bull. 31:309-311, 2008

•Hu, T., M. Takamoto, S. Hida, Y. Tagawa, K. Sugane: IFN- $\gamma$  deficiency worsen Pneumocystis pneumonia with Th17 development in nude mice. Immunol Lett., 127:55-59, 2009

•Iinuma, N., T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, T. Arai, T. Yoshizawa, T. Koyama, R. Uetake, H. Kawate, S. Muto, Y. Tagawa, S. Miyagawa, T. Shindo: Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. Peptides 2010 in press