

論文の内容の要旨

Development of an *in vitro* human liver model by using iPS cells

(ヒト iPS 細胞を用いた肝臓モデルの構築)

厚井 悠太

【背景】

肝臓は代謝や解毒などの機能を有する臓器であり、これらの多彩な肝機能を実質的に担う肝実質細胞（肝細胞）と肝非実質細胞（類洞内皮細胞、星細胞など）から構成される（図1）。特に、肝細胞は多様な代謝酵素を発現し、肝機能の中心を担うことから、近年、創薬研究や再生医療への応用を目的としてヒト iPS 細胞から誘導する試みが活発に行われている。しかしながら、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、生体の肝細胞と比較して代謝酵素活性等の重要な機能が著しく低く、実用には至っていない。

肝臓の発生は、胎生中期に前腸内胚葉の一部が肝前駆細胞となることで開始する。

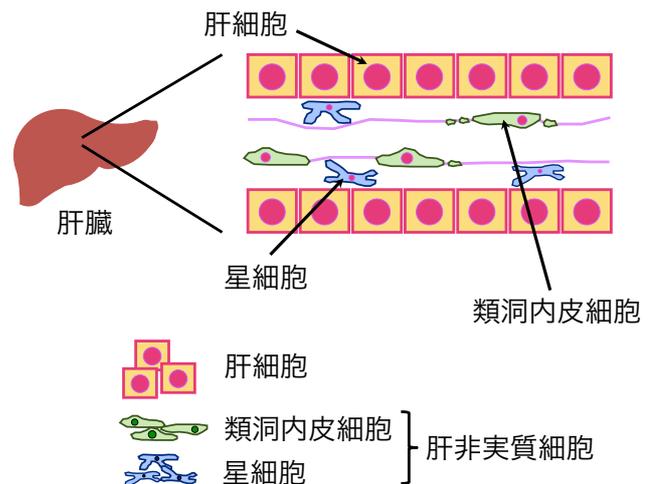


図1. 肝臓の構造

肝細胞の周囲には類洞内皮細胞や星細胞といった肝非実質細胞が存在している。

その後、肝前駆細胞は、類洞内皮細胞や星細胞といった中胚葉由来の細胞からの種々の液性因子や細胞外マトリクスからのシグナル、あるいは細胞同士の接着などによって肝細胞へと分化する。したがって、培養系において高機能なヒト iPS 細胞由来肝細胞を誘導するためには、類洞内皮細胞や星細胞との共培養系を樹立し、肝発生を生体外で模倣することが重要であると考えられる。

また、類洞内皮細胞や星細胞は肝細胞の分化を促進するのみならず、様々な肝疾患の発症や進行に重要な役割をしている。したがって、多様な肝機能を備えたヒト肝臓モデルや肝疾患モデルを構築するためにも、肝非実質細胞は重要な細胞である。

【目的】

本研究は、ヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞や星細胞への分化誘導系を確立し、得られた細胞を既法に従い誘導した iPS 細胞由来の肝前駆細胞と共に培養して、生体に近い機能を有したヒト肝臓モデルを構築することを目的とした。

【結果】

1. マウス肝発生過程における類洞内皮前駆細胞と星前駆細胞の同定と成熟化培養系の樹立

類洞内皮細胞、星細胞の分化過程には未だに不明な点が残されていたことから、マウス胎仔肝臓を用いた前駆細胞の同定と、それらの成熟化培養系の樹立を試みた。フローサイトメトリー解析の結果、胎齢 12.5 日のマウス肝臓には、FLK1⁺CD31⁺CD34⁺類洞内皮前駆細胞と ALCAM⁺星前駆細胞が存在した。そこで、セルソーターを用いてこれらの前駆細胞を分取して各前駆細胞を培養した。FLK1⁺CD31⁺CD34⁺類洞内皮前駆細胞を TGFβ阻害剤の存在下で培養すると、成熟類洞内皮細胞マーカーの発現が亢進し、類洞内皮細胞へと分化が進んだ。一方で、ALCAM⁺星前駆細胞を ROCK 阻害剤の存在下で培養すると、成熟星細胞マーカー遺伝子の発現が亢進し、星細胞へと分化が進んだ (図 2)。

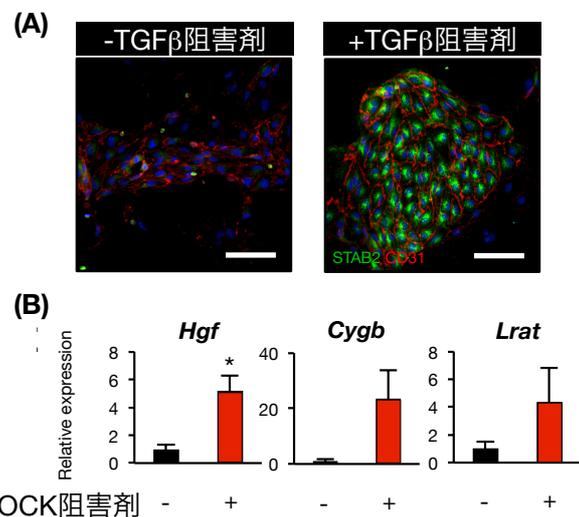


図2. 類洞内皮細胞および星細胞への分化誘導シグナル
(A) マウス由来類洞内皮前駆細胞をTGFβ阻害剤存在下で培養すると成熟類洞内皮細胞マーカー (Stab2) の発現が亢進する。
(B) マウス由来星前駆細胞をROCK阻害剤存在下で培養すると成熟星細胞マーカーの発現が亢進する。

2. ヒト iPS 細胞から類洞内皮細胞への分化誘導

マウス胎仔肝臓からの前駆細胞の分離方法と成熟化培養系を iPS 細胞からの分化誘導系に応用することで、類洞内皮細胞を誘導した。まず、ヒト iPS 細胞から中胚葉を經由して血管内皮前駆細胞を誘導し、セルソーターを用いて FLK1⁺CD31⁺CD34⁺類洞内皮前駆細胞を分取した。その類洞内皮前駆細胞を TGFβ阻害剤の存在下で培養し、類洞内皮細胞への分化を誘導した。こうして得られたヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞は、内皮細胞様の形態を呈し、血液凝固第 VIII 因子、FCGR2B, STAB2 等の類洞内皮細胞特異的マーカーを高発現した (図 3)。

3. ヒト iPS 細胞から星細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から中胚葉性の細胞を誘導し、セルソーターを用いて ALCAM⁺星前駆細胞を分取した。分離した星前駆細胞を ROCK 阻害剤の存在下で培養して星細胞への分化を誘導した。ヒト iPS 細胞由来星細胞は、NGFR, LRAT, NES, HGF 等の星細胞特異的マーカーを高発現し、特徴的な性質の一つであるビタミン A の貯蔵能を有した (図 4)。

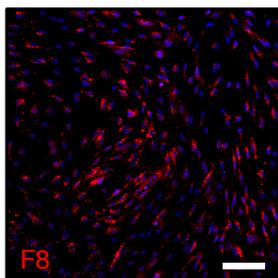


図3. ヒトiPS細胞由来類洞内皮細胞
ヒトiPS細胞由来類洞内皮細胞は特異的マーカーである血液凝固第VIII因子 (F8) を高発現する。

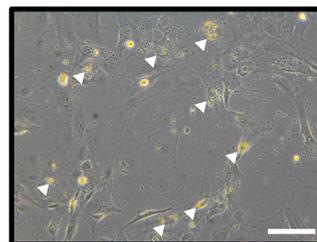


図4. ヒトiPS細胞由来星細胞
ヒトiPS細胞由来星細胞は細胞内にビタミンAを貯蔵する。(矢頭：ビタミンAの油滴)

4. ヒト iPS 細胞由来肝構成細胞を用いたヒト肝臓モデルの構築

既法に従って誘導したヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞と、新たに樹立したヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞、星細胞との共培養系を樹立した。RNA-seq 解析による網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、共培養によって、60 種類の肝代謝マーカーの発現が顕著に促進されることが明らかとなり、ヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞と星細胞は、肝前駆細胞の増殖や肝細胞への分化を促進することが明らかとなった。

【考察】

本研究ではマウス肝発生過程を解析から、類洞内皮前駆細胞、星前駆細胞を同定し、それらの分離法を確立した。さらに類洞内皮細胞、星細胞への分化・成熟化にはそれぞれ TGF β シグナル、Rho-ROCK シグナルが関与することが明らかとなった。これらの知見をヒト iPS 細胞からの分化誘導系に適用することで、ヒト iPS 細胞から類洞内皮細胞、星細胞への分化誘導系を樹立した。ヒト iPS 細胞由来類洞内皮細胞および星細胞は、生体肝臓におけるこれらの細胞に類似した性質を示した。また、ヒト iPS 細胞由来の類洞内皮細胞と星細胞は HGF や BMP、FGF などの肝細胞の成熟化を促進する分泌因子や、コラーゲンやラミンなどの細胞外基質を高発現していたことから、これらの因子による細胞間の相互作用によって、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の増殖や分化が促進されたと考えられる (図 5)。

本研究により、機能的な肝臓モデル作製のためには、肝臓を構成する細胞を組み合わせ、肝発生過程を模倣することが重要であることが示された。今後、本研究によって樹立されたヒト肝臓モデルは、肝病態モデルや細胞治療への応用、ドラッグスクリーニングなどの創薬研究へ利用されることが期待される。

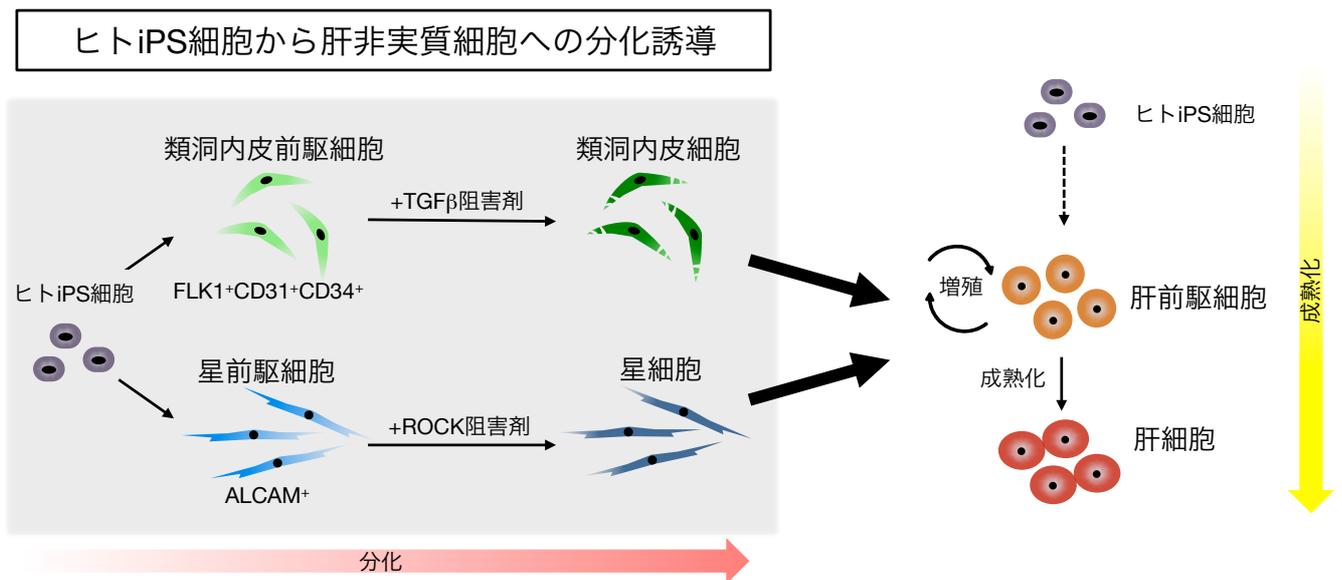


図5. ヒトiPS細胞由来類洞内皮細胞/星細胞の樹立
ヒトiPS細胞由来類洞内皮細胞/星細胞は前駆細胞を経由して誘導した。これらの細胞はヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の増殖や肝細胞への成熟化をサポートした。