

＝総説＝
薬物動態および毒性試験への応用を目指した
ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製とその培養技術
Generation and culture techniques of human iPS cell-derived
hepatocytes for application to pharmacokinetic/toxicokinetic studies

堺 陽子^{1,2}, 岩尾岳洋², 國正淳一¹, 松永民秀^{2*}
Yoko Sakai^{1,2}, Takahiro Iwao², Junichi Kunimasa¹, Tamihide Matsunaga^{2*}

¹ 愛知学院大学 薬学部 臨床薬物動態学講座

¹ *Laboratory of Clinical Pharmacokinetics, Aichi Gakuin University School of Pharmacy*

² 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野

² *Department of Clinical Pharmacy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*

Summary

The liver plays important roles in metabolism, detoxification, and bile formation and secretion in humans. Now, various models, such as animals, human hepatocytes, hepatic microsomes, and hepatocarcinoma cell lines, are used in drug pharmacokinetic studies. But there are some problems such as species differences, a difficulty in obtaining fresh human hepatocytes, lot-to-lot variations, and decrease of hepatic functions during *in vitro* culture. Recently, induced pluripotent stem cells (iPS cells) were generated and expected for not only regenerative medicine but also drug development studies. Thus, human iPS cell-derived hepatocytes would provide a valuable model for various applications involving hepatic pharmacokinetic and toxicokinetic studies. However, the cells are functionally immature. We have investigated a hepatic differentiation of human iPS cells with a focus on extracellular matrix (ECM) and culture techniques. Here, we review effects of ECM and the techniques on functions of hepatocytes cultured *in vitro*.

Keywords: iPS cells, hepatic differentiation, pharmacokinetic study, toxicokinetic study, extracellular matrix, culture techniques

1. 緒言

肝臓は、代謝や解毒、胆汁の生成・分泌など生体内において重要な役割を担っている。特に薬物代謝は、腎臓や小腸、肺でも行われるが、肝臓の主たる機能である¹⁾。医薬品開発において、薬物動態試験は必須項目であることから、肝臓において医薬品候補化合物がどの程度代謝を受けるかということをより正確に予測することが必要である。また、医薬品による肝毒性は開発中止となる原因のひとつとなることから、これを予測することも非常に重要である。現在、さまざまなモデル系を用いてこれらの評価が行われている。 *In*

vivo 試験系としては実験動物が用いられることが多いが、ヒトとの間には種差があるため、結果をヒトへ外挿することが困難である。 *In vitro* 試験系としては、ヒト肝ミクロソームやヒト初代肝細胞、ヒト肝ガン由来の HepG2 細胞などがよく用いられている^{2,3)}。しかし肝ミクロソームは、小胞体局在の酵素による代謝のみしか評価できないといった問題点がある。また、ヒト初代肝細胞は、高価であるのに加え、薬物代謝酵素活性は個人差が大きいことが知られていることから、調製された肝細胞の機能は、ドナーが違えば大きく異なることも問題である。 HepG2 細胞は薬物代謝活性や輸送活性が極めて低いなどさまざまな問題がある^{3,4)}。

*Corresponding author

Prof. Tamihide Matsunaga

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 (〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

Department of Clinical Pharmacy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan (3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya Aichi 467-8603, JAPAN)

TEL / FAX: 052-836-3751

*E-mail address: tmatsu@phar.nagoya-cu.ac.jp

	ヒトES細胞	ヒトiPS細胞
ソース	受精胚内部細胞塊	各種体細胞
分化能	Totipotency(全能性)	Totipotency(全能性)
利点	<ul style="list-style-type: none"> 品質管理が容易 大量培養が可能 遺伝子操作不要 蓄積データが豊富 	<ul style="list-style-type: none"> 受精卵が不要 自己細胞を利用
問題点	<ul style="list-style-type: none"> 倫理上の問題 他家移植 	<ul style="list-style-type: none"> 安全性が不透明

Table 1. Characteristics of human ES iPS cells^{7,8)}

近年、従来の株化細胞に比べて高い薬物動態学的機能を有する HepaRG 細胞が注目されるようになってきているが、単一のクローンであるということが問題である⁵⁾。そこで、これらの問題を解決することが可能となりうるヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) から肝細胞への分化誘導に関して多くの研究が行われており⁶⁾、ヒト多能性幹細胞由来肝細胞は、創薬研究における有用なモデル系として期待されている。

1998年に Thomson らによって樹立された ES 細胞は、様々な種類の細胞に分化する多能性と高い増殖能を有する (Table 1)^{7,8)}。したがって、再生医療や細胞治療、創薬研究などへの利用が期待され、特に海外では臨床応用を目指した研究が盛んに行われている。しかし、ヒト ES 細胞は生命の萌芽である受精卵を滅失して樹立するため、生命倫理上大きな問題がある。一方、この倫理的問題が大幅に解消され、ES 細胞と同様の性質を持った細胞がヒト iPS 細胞である。ヒト iPS 細胞は 2007年に Takahashi らによって、レトロウイルスベクターを用いて体細胞に 4 種類の遺伝子 (octamer transcription factor-3/4 (OCT3/4), sex determining region Y-box 2 (SOX2), Kruppel-like factor 4 (KLF4), v-myc myelocytomatosis

viral oncogene homolog (c-MYC)) を導入することによって樹立された (Fig. 1)⁸⁾。このヒト iPS 細胞はほぼ全ての組織細胞に分化し得る能力を有し、また、この作製方法は比較的容易であるにも関わらず、高い再現性が得られる画期的な手法である。また、ヒト iPS 細胞は、ほぼ無限に増殖可能であるため、確立されたプロトコールに沿って分化させることで、組織細胞を安定して供給することができる。さらに、様々なヒトの細胞から樹立することは、様々な遺伝的背景を有するヒト iPS 細胞を得ることが可能となることから、幹細胞研究が大きく進展することとなった。

現在、我々は薬物動態および毒性試験への応用に向けて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導研究を行っている。そこで本総説では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に関する現状と、肝細胞の機能に対する細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM) の影響および *in vitro* 培養技術について、我々の研究成果も含めて概説する。

2. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化法は、2009年に初めて報告されて以来いくつか報告されているが、その主な方法として分化誘導の際にはサイトカイン等の液性因子が用いられている⁹⁾。具体的には、activin A などを用いて内胚葉に分化誘導後、fibroblast growth factor (FGF) や bone morphogenic protein (BMP) などを用いて肝芽細胞に分化誘導する。その後、hepatocyte growth factor (HGF) や oncostatin M (OSM), dexamethasone (DEX) などを用いて肝細胞に成熟させる方法である。我々は、サイトカインと低分子化合物を組み合わせた肝細胞への分化誘導法を報告しており、内胚葉から肝芽細胞への分化誘導には、dimethyl sulfoxide (DMSO) を、肝芽細胞から

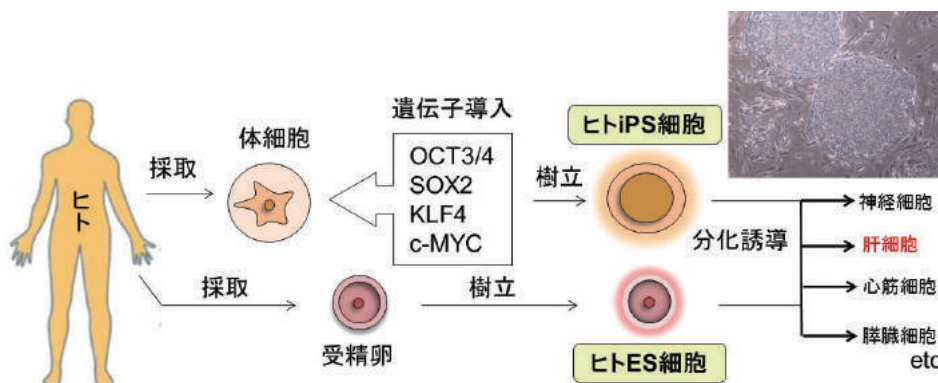


Fig. 1. Generation of human pluripotent stem cells and their potential

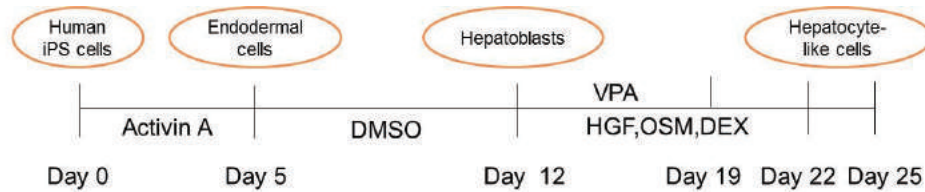


Fig. 2. Schematic of the protocol for the differentiation into hepatocytes from human iPS cells¹⁰⁾
 Activin A, 100 ng/mL; dimethyl sulfoxide, (DMSO), 1%; valproic acid, (VPA), 2mM; hepatocyte growth factor, (HGF),
 10 ng/mL; oncostatin M, (OSM), 20 ng/mL; dexamethasone, (DEX), 100 nM

肝細胞への分化誘導には、低分子化合物である valproic acid (VPA) を用いることで、効率よくヒト iPS 細胞を肝細胞に分化誘導する方法を確立している (Fig. 2)¹⁰⁾。VPA は臨床の現場では抗てんかん薬として用いられているが、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase : HDAC) 阻害作用を有することも知られている。我々の研究では、この HDAC 阻害作用が肝細胞への分化促進に重要な役割を果たしていることが示唆された。その他にも、Takayama らは発生の過程で肝細胞への分化・成熟に関与する転写因子類をアデノウイルスベクターによって導入し、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製する方法を報告している¹¹⁾。Takebe らは、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVECs) とヒト間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSCs) を共培養させることにより肝芽 (liver bud) を作製し、免疫不全マウスに移植することで、機能を有した肝組織を作製したと報告している¹²⁾。以前はヒト iPS 細胞由来肝細胞は胎児様の性質を有しており、機能的にも未熟であったが、近年さまざまな分化誘導法が報告されており、成熟化という課題は徐々に克服されつつある。今後さらに研究が進むことで、ヒト初代肝細胞に匹敵する機能を有したヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製が可能となることが期待される。

3. 細胞外マトリックス

近年、ECM の量的変化や質的变化によって細胞の分化・増殖の制御が行われている可能性が指摘されている¹³⁾。また、細胞が S 期に入るためには ECM との接着が必須であり、たとえ成長因子が存在していても細胞は ECM との接着が無い限り DNA 合成期への移行はできないことが知られている¹⁴⁾。さらに、細胞が ECM と接着することで発生したシグナルによりアポトーシスを回避するという接着依存性の細胞内シグナル伝達機構も明らかになっている¹⁵⁾。したがって、細胞-ECM 間相互作用は肝細胞の増殖や分化、機能発現においても極めて重要だと考えられる。この相互作用において、細胞側では細胞膜表面に存在する細胞接着分子であるインテグリン

が重要となる。インテグリンはさまざまな ECM をリガンドとし、これらと結合することで細胞の増殖や移動、分化などを制御するシグナルを伝達する。以下では、そのリガンドとなる代表的な ECM について、それらの肝細胞の機能に対する効果とともに紹介する。

3-1. コラーゲン

哺乳類においてコラーゲンは組織を構築する主要なタンパク質であり、全タンパク質の約 30% を占めている¹⁶⁾。コラーゲン構造をとっている分子種には少なくとも 6 種類 (I-V 型と I 型トリマー) ある。このうち最も多いのは I 型コラーゲンであり、全コラーゲン量の 80-90% を占める。I 型コラーゲンは特有の物理的・生物学的性質を有するため、様々な細胞培養の ECM として汎用されている。

1953 年に Grobstein によって、コラーゲンが細胞増殖と形態形成に関して重要な役割を果たしていることが報告された¹⁷⁾。1956 年には Ehrmann らによって、コラーゲンコーティング上とガラス上での各種細胞の成長の比較を検討し、コラーゲンコーティング上において細胞の成長が促進したと報告された¹⁸⁾。また、ラット肝実質細胞をコラーゲンコーティングした培養皿上で培養することで、プラスチックやガラス製培養皿よりも長期間の生存が確認されている¹⁹⁾。さらに、肝細胞をコラーゲンゲル上で培養することによって、分化や機能が 20 日間維持することを可能にしたとの報告もある²⁰⁾。このように、コラーゲンによって細胞分化や細胞増殖が促進される理由として 2 つのことが考えられている。まず一つは細胞が基底膜を作製する能力を促進させること、もう一つは細胞を tissue culture treated polystyrene (TCPS) プレートに移した時に起こる細胞の扁平化および伸展による体積の増大を阻止し、細胞の形状や体積を維持することである。つまり、コラーゲンの生体での役割は動物の体の構造を支えるのみと考えられていたが、細胞の再生、分化、形態形成などにも影響を及ぼしていることが明らかとなっている。

3-2. マトリゲル

マトリゲルはマウス Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肉腫由来のゲルで、ECM の主要な成分であるラミニン -111 や IV 型コラーゲン、エンタクチンなどに加え、transforming growth factor (TGF)- β や FGF など様々な増殖因子も含んでいる。近年、マトリゲル上で培養したラット初代肝細胞の hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α 及び HNF6 の遺伝子発現や DNA 結合活性はコラーゲン上で培養した時と比較して高いことが報告された²¹⁾。また、肝特異的マーカーである albumin (ALB) や cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2E1, CYP3A1, CYP3A2 の発現の増加もタンパク質レベルで確認された。さらに、肝前駆細胞である小型肝細胞は、マトリゲルの処理によって成熟化や基底膜様構造の形成、肝特異的転写因子の発現誘導をもたらす可能性があるとの報告もある²²⁾。これらは、マトリゲル上で培養を行なうことで肝細胞が球形を示し、立体的な形態をもたらすこと、またマトリゲルの主要成分であるラミニンが肝特異的タンパク質の発現を促進するなど、肝機能向上には、マトリゲルの性質が大きく関与していることを示唆している^{23,24)}。

我々は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化の過程において ECM としてマトリゲルを用いることで、肝特異的マーカーや薬物代謝酵素遺伝子の発現がコラーゲンを用いた場合よりも高いことを報告している²⁵⁾。この理由についても上述したマトリゲルの作用によるものであると考えられる。

3-3. ラミニン

基底膜を構成する主要成分のひとつであるラミニンは基底膜への細胞接着において中心的役割を果たしており、主に上皮組織の構築に関わっていると考えられている。ラミニンは α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の 3 つのポリペプチド鎖からなるヘテロ三量体である。 α 鎖の細胞接着ドメインには Arg-Gly-Asp (RGD) というアミノ酸配列があり、この配列が細胞との接着に深く関与していることが報告されている²⁶⁾。また、 β 鎖には Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) や Pro-Asp-Ser-Gly-Arg (PDSGR) などのアミノ酸配列も見いだされており、これらは上皮性細胞との接着に関与すると考えられている²⁷⁾。しかし、これらの合成ペプチドは、細胞接着活性が弱いという難点が存在する。また、ポリペプチド鎖の組み合わせ (α 鎖 5 種、 β 鎖 3 種、 γ 鎖 3 種) によって少なくとも 19 種類の異なるアイソフォームが存在する²⁸⁾。肝細胞の機能維持に積極的に関与しているアイソフォームであるラミニン -111 は、分子量 80 万の巨大なタンパク質である。Kikkawa らは肝細胞接着活性ペプチドを検出するためにラット初代肝細胞を用いて検討したところ、ラミニン -111 中

の A13 (RQVFQVAYIIKA) 部分が強い活性を有することを示した²⁹⁾。そこで、A13 をコーティングしたプラスチックプレート上に肝細胞を播種し、その肝特異的マーカー遺伝子の発現を調べると、マトリゲル上に播種した場合と同様に tyrosine aminotransferase, tryptophan-2,3-dioxygenase および CYPs の発現が維持されていた。また、ラミニン -111 上で培養することによって、ヒト iPS 細胞から分化させた肝幹前駆細胞の大量培養が可能であるとの報告もある³⁰⁾。この方法では 3 ヶ月以上にわたって培養が可能であり、このヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞は肝細胞様細胞および胆管細胞様細胞の両方への分化能力を有していることも認められている。

4. 肝細胞の機能向上を目指した培養技術

4-1. スフェロイド培養法

生体内で肝臓は三次元的に肝細胞同士、さらには非実質細胞や血管内皮細胞などが密に凝集して肝組織を構成することでその機能を発揮している。一般的な細胞培養は二次元的にプラスチック培養皿上に接着するように培養を行うため、実際の生体内とは環境が大きく異なる。一方、スフェロイド培養は細胞をプラスチック培養皿上に接着させることなく、細胞が多数集合した球状の細胞凝集塊 (スフェロイド) を形成させ三次元的に培養する方法である。したがって、二次元培養法に比べて、より生体内の環境に近い状態で培養が可能となる。

スフェロイドを形成するための三次元培養法に関しては多くの方法が知られている。最近では、微細加工技術を応用したマイクロウェルを利用して均一な大きさのスフェロイドを大量に作製できる培養基材が開発されている。代表的なものとしては、感光材ポリマーを用いて加工した直径 100 μm の細胞接着領域を 100 μm 間隔で配置した Cell-able[®] プレート (東洋合成工業社製) がある。接着基質としては、I 型コラーゲンを使用している。このプレート上で凍結ヒト肝細胞と 3T3-swiss albino (フィーダー細胞) を共培養することで肝細胞をスフェロイド状で培養することが可能となり、54 日間もの長期間にわたり CYP 活性や ALB 分泌などの肝特異的な機能を維持することができる。Elien らによると、スフェロイドの直径が $95 \pm 13 \mu\text{m}$ の場合に最も機能が高いと報告されており³¹⁾、Cell-able[®] プレートを用いることで、適切なサイズのスフェロイドを形成することが可能となる。フィーダー細胞として使用する 3T3-swiss albino は他の 3T3 細胞と比較してこのプレートに対しての接着性が強く、また肝細胞増殖促進因子であるプレイオトロフィンを放出することが知られている³²⁾。このことも肝細胞の機能を維持してスフェロイドを形成させるための

重要な要因であると考えられる。

Takayama らはスフェロイド培養が可能なナノピラープレート® (日立ハイテクノロジーズ社製) を使用し、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を行い、その有用性を報告している³³⁾。このプレートを用いて三次元的に分化誘導を行うと、二次元的に分化誘導した場合と比較して、薬物代謝酵素や薬物トランスポーター、核内転写因子の発現上昇が認められた。また、CYP2C9 および CYP3A4 活性の上昇や、rifampicin によるこれら薬物代謝酵素活性の誘導も認められた。さらに、HepG2 細胞と比較して、薬剤性の肝毒性の評価にも優れていることを報告している。

フラスコ内の培地を攪拌し、細胞を浮遊させることでスフェロイドを形成させる方法によってヒト ES/iPS 細胞から肝細胞の分化誘導を行ったとの報告もある³⁴⁾。この方法で作製した肝細胞は、肝細胞マーカー遺伝子の発現だけでなく、肝細胞の特徴的な機能 (ALB 分泌や尿素産生、LDL の取り込み、グリコーゲンの蓄積、CYP の誘導など) が認められている。また、このスフェロイドを肝障害モデルマウスに移植することで、生存期間の延長も認められた。

このようにスフェロイド培養法は肝細胞培養の研究において多くの検討がされており、機能向上に有用であることが示されている。しかし、多くの報告は肝細胞のみでスフェロイドを作製しており、実際の肝小葉内部の構造を十分には反映していないということや、類洞構造が存在していないため、薬物がスフェロイドの内部に十分に浸透しないなどの問題点も指摘されていることから、今後さらなる研究の発展が期待される。

4.2. 積層培養法

積層培養法とは、細胞層を 1 層ずつ重ねて多層構造を構築する方法であり、この方法は 2 つに大別することが出来る。まず 1 つ目として、平面で培養した細胞シート

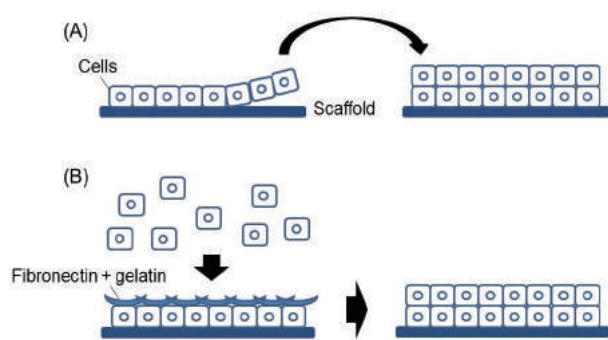


Fig. 3. Generation of 3-dimensional cell sheets by using a temperature-responsive hydrogel (A) and fibronectin-gelatin nanofilms (B)

を積み重ねて多層構造を形成する方法である (Fig. 3A)。これは細胞と細胞間もしくは細胞と ECM を接着させ、細胞シートを作製する。しかし、この方法は作製した細胞シートを剥離する際に用いる剥離液によって細胞間接着や細胞と ECM 間の接着も破壊させてしまうため、この点に注意が必要である。そこで、この問題を解決するために、Haraguchi らによって温度応答性培養皿が開発された³⁵⁾。これはゲル状態にした温度応答性のハイドロゲル上に細胞を播種し、37°C で単層培養により細胞シートを作製した後、温度を 20°C まで下げることでハイドロゲルをゾル化してシートを剥離する方法である。これにより、不可能であった細胞シートの作製と回収が可能となった。そしてこの細胞シートを複数積み重ねることで、立体的な組織を形成できる積層培養法を確立した。実際にこの方法を用いて肝細胞シートと内皮細胞シートを重層化させることにより、ALB 合成能を維持した肝細胞の長期培養が可能であると報告している³⁶⁾。また、Sakai らはヒト初代肝細胞とヒト皮膚由来線維芽細胞 (TIG-118 細胞) の共培養シートを作製し、これを TK-NOG マウス (肝臓のアルブミン遺伝子エンハンサー/プロモーター支配下に herpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-TK) を導入し、ガンシクロビル投与によって肝障害をきたすようにデザインされたマウス) の皮下に移植した後、移植組織の構造や血清中のヒト ALB (hALB)、ヒト alpha 1-antitrypsin (h α 1-AT) 濃度およびマウスの生存率を検討した³⁷⁾。その結果、血管が新生されたヒト肝組織が構築され、その構造は肝細胞と血管が交互に配列する肝小葉に類似していた。また、共培養シートを移植したマウスにおいて、hALB や h α 1-AT の血中濃度は肝細胞のみで作製したシートを移植したマウスよりも有意に高値であり、生存率も高かった。

2 つ目の方法としては、細胞層の上に新たな細胞層を培養していく方法である (Fig. 3B)。Matsusaki らは単層培養した細胞の表面をおよそ 6 nm の厚さとなるようにフィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) のナノ薄膜で覆うことで、その薄膜上に細胞を積層化できることを報告した³⁸⁾。2009 年には、これを応用して開発された CellFeuille (セルフィーユ) が製品化されている。また、単一細胞表面に FN-G ナノ薄膜を形成することで、短期間で三次元組織体を構築できる細胞積層法も考案した³⁹⁾。

このような培養法は複数種類の細胞を積層化できることや、一度に多層構造が構築できるため、より生体の環境に近い状態で培養可能であることが期待できる。しかし、スフェロイドと同様に積層数を多くすればするほど酸素や栄養を細胞層内部へ供給することが困難になることが課題であると考えられる。

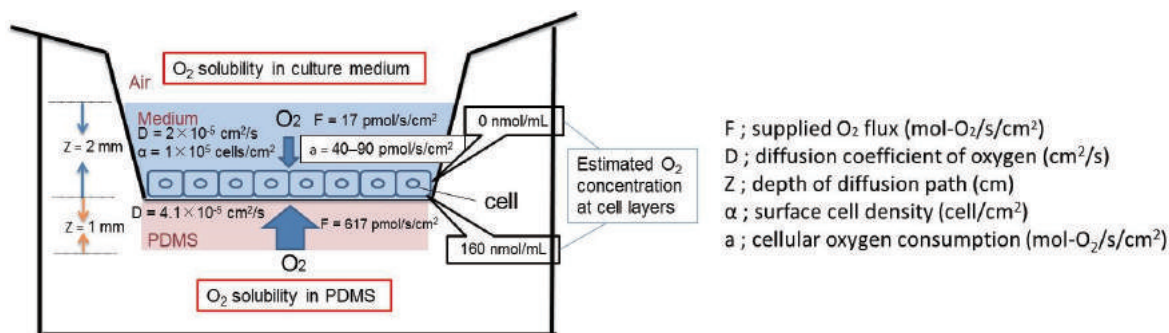


Fig. 4. Oxygen supply to the static cultured hepatocytes in the plate bottom⁴⁸⁾

4.3. サンドイッチ培養法

サンドイッチ培養法とは、細胞をコラーゲンゲルやマトリゲルなどのECMで挟んで培養する方法である。初代肝細胞をコラーゲンゲルにてサンドイッチ培養すると、単層培養を行ったときと比較してALB分泌能や薬物の取り込み活性、代謝活性などの肝特異的な機能が向上することが知られている⁴⁰⁾。また、この培養法では三次元構造が形成され、肝機能の比較的長期間の維持が可能になり、細胞の極性も認められる。さらに、胆管腔が形成するとともに胆管側膜上に排泄トランスポーターが局在化することも報告されている⁴¹⁾。したがって、サンドイッチ培養法は、薬物の胆汁排泄を評価するための方法として用いられる。

サンドイッチ培養法はコラーゲンゲルだけでなく、マトリゲルを上部から覆う方法も報告されている。Germanoらが行った研究では、上部から覆うマトリゲル層を2層、3層、4層と多くしていくに従って、マウス初代肝細胞間にできる細管や細胞数が増加していく傾向があると報告している⁴²⁾。また、Swiftらはマウス初代肝細胞を用いてECMの組み合わせと播種する細胞密度を変え、比較検討している⁴³⁾。この報告では、排出トランスポーターであるMrp4のタンパク質発現量以外で大きな差は認められなかった。そこで、Mrp4の発現量とタウロコール酸の胆汁排泄能の解析を行ったところ、1.0もしくは 1.25×10^6 cells/wellの細胞密度で播種し、コラーゲン/マトリゲルの組み合わせでサンドイッチ培養を行い、培養3日目に評価するという条件が胆汁排泄能の評価に適していることが示された。

ヒトiPS細胞からの分化誘導法にも、サンドイッチ培養を用いた報告はいくつかある。例えば、ヒトiPS細胞から心筋細胞に分化誘導する際に、マトリゲル/マトリゲルのサンドイッチ培養を行うことで、機能が向上したことが報告されている⁴⁴⁾。

Biらは、I型コラーゲンがコートされているBioCoatプレート上に 0.35×10^6 cells/wellの凍結ヒト肝細胞を播種し、上層からマトリゲルで覆ったサンドイッチ培養法

を検討した⁴⁵⁾。この培養法により、細胞間に微小胆管の形成促進が認められた。これは、ヒトiPS細胞由来肝細胞の機能向上や胆管系輸送評価には有用である可能性が考えられる。

4.4. 酸素濃度を考慮した培養法

肝実質は肝小葉という組織学的単位の集合として知られているが、機能的な面からは細葉という単位の集合体として捉えられている。細葉は門脈周辺域(zone 1)、小葉中間体(zone 2)、小葉中心域(zone 3)に区別される。Kurtらはラット初代肝細胞を用いて、それぞれのzoneの肝細胞が要求する栄養素や酸素濃度に違いがあること、それに伴い機能的役割にも違いが生じていることを報告している⁴⁶⁾。このことから、初代肝細胞やヒトiPS細胞由来肝細胞を培養する際に、異なる酸素濃度を考慮して培養することによって、それぞれのzoneに特徴的な機能を有する肝細胞を培養できる可能性が考えられる。

Matsuiらは、上層からマトリゲル含有培地を常に添加し、下層には酸素透過性の良いpoly-dimethylsiloxane (PDMS)膜とコラーゲンが共有結合を形成したプレート(PDMSプレート)を用い、ラット初代肝細胞のサンドイッチ培養を行った。対照として、コラーゲンコーティングしたTCPSプレートと比較すると、微小胆管形成が促進したと報告している⁴⁷⁾。このことから、胆管形成や胆汁排泄能は酸素濃度によって制御されている可能性が考えられる。

ラット肝細胞をTCPSプレート上でコンフルエントにして培養した場合、気液界面からの培養液相中への酸素供給速度は、酸素消費速度を満たすことができないが、一方で、PDMSプレートにおける単位面積当たりの酸素供給速度は、酸素消費速度を十分に上回ることが報告されている⁴⁸⁾。したがって、インキュベーター内の酸素濃度を肝細胞が必要とする濃度に適切に調整することで、肝細胞の酸素消費量を完全に充足することが可能になる(Fig. 4)。そこで、Xiaoらはインキュベーター内の酸素濃度を5%、10%もしくは20%としてサンドイッチ

培養を行い、ラット初代肝細胞が要求する酸素濃度の検討を行った⁴⁹⁾。その結果、10%酸素下で培養した肝細胞で、細胞の形態や機能の維持、生存率の改善が認められ、毛細管ネットワークも観察された。しかし、5%酸素濃度下で培養した細胞は、細胞に供給できる酸素量が生体内と比較し低いことから、ミトコンドリアで好氣的代謝を行うための十分な酸素を得ることができず、嫌氣的代謝を行っていることが考えられた。さらに、TCPSとPDMS膜では酸素透過速度(フラックス)に違いがあるため、TCPSプレートでの培養では嫌氣的代謝となっていることも示された。生体内の肝臓における酸素濃度は、動脈 zone では13%、静脈 zone では5%程度であることが知られている⁴⁶⁾。したがって、酸素濃度の工夫を凝らした培養法は、*in vivo*に近い環境下での肝細胞培養法を可能にしているものと思われる。

Choらは、ラット初代肝細胞に酸素を供給しながら、異種細胞である3T3-J2細胞と共培養を行い、60 mmディッシュ内でのそれぞれの細胞播種密度(肝細胞数と3T3-J2細胞数の割合を1:9(低)、1:3(中)、9:1(高))と共培養日数(2, 7, 10, 14日目)がもたらす肝機能の変化に関して検討している⁵⁰⁾。その結果、肝細胞密度が高密度より低密度において、肝細胞数の増殖が優れていた。また、ALB分泌量は、共培養日数に関係なく、低・中密度において単位肝細胞あたりの分泌量が高値を示した。尿素合成能は、10日目を過ぎると、それぞれの播種密度での違いは認められなかった。肝細胞は多くの酸素を消費し、高い代謝能を有する特徴を持つ。肝細胞数がフィーダー細胞数よりも少ないことは、単位肝細胞が取り込める酸素量が増加し、これに伴って、肝機能の向上に繋がると考えられる。

我々も、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化の過程において酸素を分化の初期から供給することで、肝特異的マーカーのmRNA発現量が上昇するという結果を得ている(未発表データ)。このように培養容器や酸素濃度を考慮することで、肝細胞の機能向上もしくは目的とする機能発現を制御できる可能性がある。

5. まとめ

本総説では、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化の現状と、肝細胞の機能を制御するような培養技術やECMについて述べてきた。組織工学によると、ECMはシグナル分子や足場として細胞を支持する役割があり、現在では組織再生の礎を担っている。ECMの量や質が細胞の形態や機能の相違を生じさせることを念頭に置き、肝細胞の培養に応用していく必要がある。また、今回紹介した肝細胞培養法は、既知から最新の報告を大まかに分類

したものである。しかし、*in vitro*で分化・培養された肝細胞は、生体内の肝細胞と同等の性質を示すに至っていないのが現状である。我々は、優れた肝細胞の分化・培養法の開発には、生体内の肝臓の構造上の特徴や肝細胞の周りの環境をより詳細な解明と理解が必要であると考えている。これからも、生体内の肝細胞に近い*in vitro*での分化・培養法を確立し、薬物動態および毒性試験をはじめとしたさまざまな試験系に応用して、医薬品候補化合物の動態/毒性スクリーニングや薬剤性肝障害のメカニズムの解明に貢献していくことを目指してさらに研究を進めていきたい。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたって御協力頂いております名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野(薬学部臨床薬学教育研究センター)各位に感謝致します。

7. 引用文献

- 1) Jochheim A., Hillemann T., Kania G., Scharf J., Attaran M., Manns M.P., Wobus A.M., Ott M., *Int. J. Dev. Biol.*, **48**, 23–29 (2004).
- 2) Puviani A.C., Ottolenghi C., Tassinari B., Pazzi P., Morsiani E., *Comp. Biochem. Physiol.*, **121**, 99–109 (1998).
- 3) Olsen A.K., Hansen K.T., Friis C., *Chem. Biol. Interact.*, **107**, 93–108 (1997).
- 4) Brandon E.F.A., Raap C.D., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H.M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 233–246 (2003).
- 5) Andersson T.B., Kanebratt K.P., Kenna J.G., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **8**, 909–920 (2012).
- 6) Katsuda T., Sakai Y., Ochiya T., *J. Stem Cells*, **7**, 1–17 (2012).
- 7) Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M., *Science*, **282**, 1145–1147 (1998).
- 8) Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S., *Nat. Protoc.*, **2**, 3081–3089 (2007).
- 9) Touboul T., Hannan N.R., Corbineau S., Martinez A., Martinet C., Branchereau S., Mainot S., Strick-Marchand H., Pedersen R., Di Santo J., Weber A., Vallier L., *Hepatology*, **51**, 1754–1765 (2010).
- 10) Kondo Y., Iwao T., Yoshihashi S., Mimori K., Ogihara R., Nagata K., Kurose K., Saito M., Niwa T., Suzuki T., Miyata N., Ohmori S., Nakamura K., Matsunaga T., *PLoS One*, **9**, e104010 (2014).
- 11) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara

- M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M.K., Mizuguchi H., *J. Hepatol.*, **57**, 628–636 (2012).
- 12) Takebe T., Sekine K., Enomura M., Koike H., Kimura M., Ogaeri T., Zhang R.R., Ueno Y., Zheng Y.W., Koike N., Aoyama S., Adachi Y., Taniguchi H., *Nature*, **499**, 481–484 (2013).
- 13) Chen W.C., Lin H.H., Tang M.J., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **307**, 695–707 (2014).
- 14) Zhu X., Assoian R.K., *Mol. Biol. Cell*, **6**, 273–282 (1995).
- 15) Giancotti F.G., Ruoslahti E., *Science*, **285**, 1028–1032 (1999).
- 16) Pachence J.M., *J. Biomed. Mater. Res.*, **33**, 35–40 (1996).
- 17) Grobstein C., *Exp. Zool.*, **124**, 383–388 (1953).
- 18) Ehrmann R.L., Gey G.O., *Journal of National Cancer Institute.*, **16**, 1375–1403 (1956).
- 19) Sattler C.A., Michalopoulos G., Sattler G.L., Pitot H.C., *Cancer Res.*, **38**, 1539–1549 (1978).
- 20) Michalopoulos G., Pitot H.E., *Exp. Cell Res.*, **94**, 70–78 (1975).
- 21) Borlak J., Singh P.K., Rittelmeyer I., *PLoS One*, **10**, e0124867 (2015).
- 22) Sugimoto S., Mitaka T., Ikeda S., Harada K., Ikai I., Yamaoka Y., Mochizuki Y., *J. Cell. Biochem.*, **87**, 16–28 (2002).
- 23) Oda H., *Tiss. Cult. Res. Commun.*, **18**, 203–219 (1999).
- 24) Caron J.M., *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1239–1243 (1990).
- 25) Kondo Y., Iwao T., Nakamura K., Sasaki T., Takahashi S., Kamada N., Matsubara T., Gonzalez F.J., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Toyoda M., Umezawa A., Nagata K., Matsunaga T., Ohmori S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 237–243 (2014).
- 26) Ruoslahti E., Pierschbacher M.D., *Science*, **238**, 491–497 (1987).
- 27) Aucoin L., Griffith C.M., Pleizier G., Deslandes Y., Sheardown H.J., *Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **13**, 447–462 (2002).
- 28) Durbeej M., *Cell Tissue Res.*, **339**, 259–268 (2009).
- 29) Kikkawa Y., Takahashi N., Matsuda Y., Miwa T., Akizuki T., Kataoka A., Nomizu M., *Biomaterials*, **30**, 6888–6895 (2009).
- 30) Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H., *Stem Cell Reports*, **1**, 322–335 (2013).
- 31) Gevaert E., Dolle L., Billiet T., Dubrue P., Grunsvan L.V., Apeldoorn A.V., Cornelissen R., *PLoS One*, **9**, e105171 (2014).
- 32) Sato H., Funahashi M., Kristensen D.B., Tateno C., Yoshizato K., *Exp. Cell Res.*, **6**, 152–164 (1999).
- 33) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue M.K., Mizuguchi H., *Biomaterials*, **34**, 1781–1789 (2013).
- 34) Vosough M., Omidinia E., Kadivar M., Shokrgozar M.A., Pournasr B., Aghdami N., Baharvand H., *Stem Cells Dev.*, **22**, 2693–2705 (2013).
- 35) Haraguchi Y., Shimizu T., Sasagawa T., Sekine H., Sakaguchi K., Kikuchi T., Sekine W., Sekiya S., Yamato M., Umezumi M., Okano T., *Nat. Protoc.*, **7**, 850–858 (2012).
- 36) Harimoto M., Yamato M., Hirose M., Takahashi C., Isoi Y., Kikuchi A., Okano T., *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 464–470 (2002).
- 37) Sakai Y., Yamanouchi K., Ohashi K., Koike M., Utoh R., Hasegawa H., Muraoka I., Suematsu T., Soyama A., Hidaka M., Takatsuki M., Kuroki T., Eguchi S., *Biomaterials*, **65**, 66–75 (2015).
- 38) Matsusaki M., Kadowaki K., Nakahara Y., Akashi M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 4689–4692, (2007).
- 39) Matsuzawa A., Matsusaki M., Akashi M., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103**, 1554–1564 (2015).
- 40) Dunn J.C.Y., Yarmush M. L., Koebe H.G., Tompkins R.G., *FASEB J.*, **3**, 174–177(1989).
- 41) Choi H.J., Choi D., *J. Korean Surg. Soc.*, **84**, 202–208 (2013).
- 42) Germano D., Uteng M., Pognan F., Chibout S.D., Wolf A., *Toxicol. In Vitro*, doi: 10.1016/j.tiv.2014.05.009.
- 43) Swift B., Brouwer K.L.R., *Mol. Pharm.*, **7**, 491–500 (2010).
- 44) Zhang J., Klos M., Wilson G.F., Herman A.M., Lian X., Raval K.K., Barron M.R., Hou L., Soerens A.G., Yu J., Palecek S.P., Lyons G.E., Thomson J.A., Herron T.J., Jalife J., Kamp T.J., *Circ. Res.*, **111**, 1125–1136 (2012).
- 45) Bi Y.A., Kazolias D., Duignan D.B., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1658–1665 (2006).
- 46) Jungermann K., Kietzmann T., *Kidney Int.*, **51**, 402–412 (1997).
- 47) Matsui H., Osada T., Moroshita Y., Sekijima M., Fujii T., Takeuchi S., Sakai Y., *Biochem. Eng. J.*, **52**, 255–262 (2010).
- 48) Sakai Y., Nishikawa M., Evenou F., Hamon M., Huang H., Montagne K.P., Kojima N., Fujii T., Niino T., *Methods Mol. Biol.*, **826**, 189–216 (2012).
- 49) Xiao W., Shinohara M., Komori K., Sakai Y., Matsui H., Osada T., *Biotechnol Prog.*, **30**, 1401–1410 (2014).
- 50) Cho C.H., Park J., Nagrath D., Tilles A.W., Berthiaume F., Toner M., Yarmush M.L., *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 188–199 (2007).