

マウス ES/iPS細胞を用いた *in vitro* 肝器官形成システムとそのミトコンドリア機能変化の解析

玉井 美保*・田川 陽一

細胞の有する分化に対して万能性 (pluripotency) とは、個体を形成しているあらゆる種類の細胞、つまり三胚葉 (内胚葉, 中胚葉, 外胚葉) 系列の細胞種すべてへ分化できる能力のことで、胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES細胞) はM. Evansらによりマウスの遅延胚盤胞の内部細胞塊から初めて樹立された pluripotency を有する細胞株である¹⁾。ES細胞は分化に万能性であることから、再生医学の研究において魅力的であり、各々の専門の臓器・組織に関する細胞への分化誘導の研究とその臨床的応用研究がおこなわれている^{2,3)}。さらに最近、ES細胞と同じ三胚葉への分化能や高い自己複製能を有する人工万能性細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS細胞) が樹立された^{4,6)}。

ES細胞やiPS細胞からの肝細胞への分化誘導研究も多くの報告がある⁷⁻¹⁰⁾。これらの研究は再生医療を目的とし、いかに目的細胞である肝細胞のみへ分化誘導し、高純度に精製できるかに関心の重点が置かれている。筆者らは、ES細胞の万能性を利用することにより、肝細胞のみならず、肝組織構築に必要な細胞を適宜分化誘導した時間軸のある *in vitro* 肝器官形成モデルの構築を試みている。これまで、肝細胞のみではなく肝非実質細胞種 (内皮細胞など) を同時に有した肝組織構造が、肝細胞の長期培養や肝特異的な機能を発揮するのに重要であることを示してきた^{11,12)}。肝機能を発揮するためには、肝特異的な遺伝子発現があればよいだけでなく、細胞内小器官の成熟化なども重要であり、そのためには、肝組織構造を構築して肝細胞特異的な細胞極性を再現しないといけないと思われる。このES細胞からの *in vitro* 肝器官形成モデルを用いれば、肝臓が形成していく過程での細胞内小器官、特に、ミトコンドリアの機能変化を観察できるのではないかと考えた。

ES/iPS細胞から肝組織への分化誘導

初期胚は着床後に、三胚葉に分化する。中胚葉由来の心臓原基から産生された線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) などにより内胚葉由来の腹側前腸に刺激が入り、肝器官形成が始まる¹³⁾。内皮前駆細胞と肝芽細胞が出現し、'肝芽'を形成し、最終的に類洞構造をもつ肝組織が形成される。

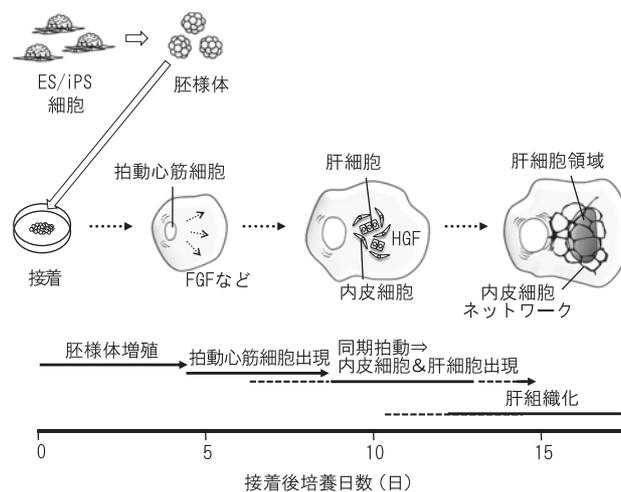


図1. ES細胞からの *in vitro* 肝器官形成モデル

そこで、筆者らの時間軸のある *in vitro* 肝器官形成モデルは、図1に示すように、マウスES細胞の一部を拍動心筋細胞へ分化誘導し、その周囲のES細胞を肝組織化する。ES細胞の一部を確実に心筋細胞へ分化させることで、その周囲にアルブミン産生細胞コロニーの中へ内皮細胞が入り込んでいるような肝芽様細胞集団の形成を誘導でき、さらに培養を続けることで内皮細胞のネットワークとアルブミン産生細胞からなる肝組織構築が可能である¹¹⁾。このマウスES細胞由来肝様組織はアルブミンタンパク質産生の他、アンモニア代謝能力も非常に高く、解毒などで非常に重要な働きを有するCYPアイソザイム群の活性も高活性であった¹²⁾。また、本来の肝臓の有する細胞極性が再構築されており、物質の取り込み・排出が効果的におこなわれる (未発表)。

同様にマウスiPS細胞を用いて肝組織への分化誘導を試み、遺伝子発現解析や免疫蛍光染色などにより肝組織形成を評価し、iPS細胞においても肝組織構築が可能であることを確認した¹⁴⁾。

in vitro 肝器官形成におけるミトコンドリア機能解析

実際に個体でみられる成熟動物におけるエネルギー代謝系は一挙に形成されたものではなく、個体の分化・発達の時系列の中で、秩序正しく獲得されてきたものであ

*著者紹介 東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻 (博士研究員) E-mail: tamai.m.aa@m.titech.ac.jp

る。そこで発生過程に基づき肝組織への分化誘導を行う *in vitro* 肝器官形成モデルを用い、組織構築過程でのエネルギー代謝変化を解析した。具体的には、酸素消費速度 (oxygen consumption rates, OCR) と細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate, ECAR) を測定することで、細胞内におけるミトコンドリア機能変化として評価をおこなった。

マウス ES/iPS 細胞の分化過程における OCR と ECAR を測定した結果、分化誘導初期において OCR と ECAR ともに高い値を示した。これはこの段階において細胞増殖が活発に起きているためであると考えられる。この後、OCR と ECAR の値が一時低下し、細胞が増殖から分化のステージに移行することが示唆された。続く拍動心筋細胞から初期肝組織分化段階では、OCR、ECAR が増加しており、肝組織形成後期段階ではさらに ECAR が増加することが分かった。これらの結果は、拍動心筋細胞の出現から肝組織形成初期段階に多くの酸素を消費し、肝組織形成後期において細胞が糖代謝系をより動かし ATP を産生することを示唆している。つまり、拍動心筋細胞から肝組織形成に向かい酸素をより多く消費し、肝組織形成後期になるにつれて、酸素消費だけではなく、肝臓での糖代謝系が機能し始めたことを示唆している。得られた OCR、ECAR の値を用いて、エネルギー代謝学的解析結果を図2に、*in vitro* 肝器官形成過程におけるエネルギー代謝プロファイルを図3に示す。ES/iPS 細胞は、自立拍動心筋細胞の出現から始まる肝組織形成過程つまり、*in vitro* 肝器官形成過程のエネルギー代謝プロファイルにおいて、分化ステージ特異的な特徴を示したことから細胞内小器官であるミトコンドリアレベルにおいても分化ステージ特異的に機能が変化していることが確認された¹⁴⁾。

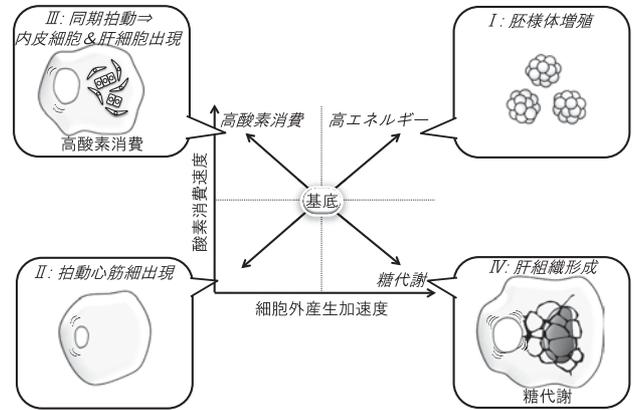


図3. *In vitro* 肝器官形成過程におけるエネルギー代謝プロファイル

おわりに

肝臓は肝細胞と内皮細胞などの細胞により、極性のある肝組織を構築し肝機能を発揮している。このようなモデルである ES/iPS 細胞からの内皮細胞と肝細胞からなる肝組織分化誘導過程を追跡することで、ES/iPS 細胞から分化過程に出現する各組織・細胞種特異的なミトコンドリア機能変化が顕著に示されることが分かった。肝細胞は解糖系のみならず脂肪酸からエネルギーを獲得する能力を有していることから、この肝組織においてβ酸化経路についても詳細な検討をしたいと考えている。肝組織分化誘導過程は、薬物代謝試験やミトコンドリアの成熟過程を *in vitro* で追跡する系としての利用が考えられ、さらに作製した肝組織は極性を有しており、高機能 *in vitro* 肝組織モデルとして期待される。今後より一層の解析を進め、モデルとしての可能性を見いだしたい。

文 献

- 1) Evans, M. J. *et al.*: *Nature*, **292**, 154 (1981).
- 2) Nakano, T. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **10**, 771 (2012).
- 3) Kattman, S. J. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **4**, 228 (2011).
- 4) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, **126**, 663 (2006).
- 5) Takahashi, K. *et al.*: *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 6) Nakagawa, M. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 101 (2008).
- 7) Hamazaki, T. *et al.*: *FEBS Lett.*, **497**, 15 (2001).
- 8) Yamada, T. *et al.*: *Stem Cells*, **20**, 146 (2002).
- 9) 小川真一郎, 田川陽一: *生物工学*, **81**, 358 (2002).
- 10) Gai, H. *et al.*: *Differentiation*, **79**, 171 (2010).
- 11) Ogawa, S. *et al.*: *Stem Cells*, **23**, 903 (2005).
- 12) Tsutsui, M. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 696 (2006).
- 13) Zaret, K. S.: *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 329 (2008).
- 14) Tamai, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 495 (2011).

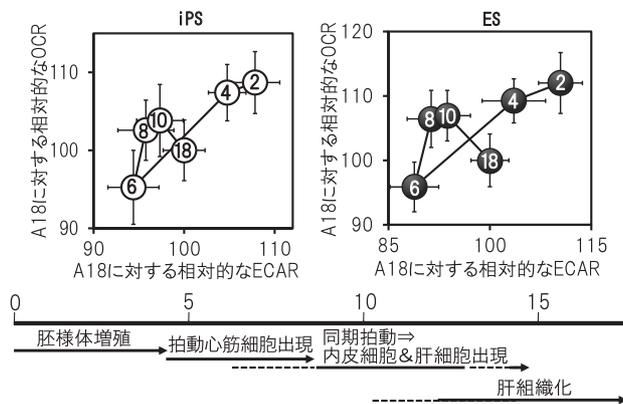


図2. ES/iPS細胞の *in vitro* 肝器官形成過程におけるエネルギー代謝学的解析