

形成などの更なる成熟化は支持しなかった。OSM を単独で添加すると、細胞間の結合が発達し細胞自身も大型化した (図 3 (D))。ただし、マウスで見られたような積層化や胆管形成は観察できなかった。HGF は増殖を促進したが、形態学的な成熟化は支持しなかった (図 3 (C))。

さらに、HGF と OSM について、三次元培養と単層培養におけるアルブミン分泌能への影響を 5 週間の培養にて検討した (図 6)。上述の形態的成熟化と同様に、OSM 添加による機能亢進が見られた。特に三次元培養と OSM の組合せでは、著しい機能亢進が見られた (図 6 (B))。3 週間後及び 5 週間後 (培養終了時) に EROD 活性を測定したところ、図 6 のアルブミン分泌と同様の結果が見られた。5 週間後の培養終了時に細胞数を DNA 量で測定し、同じく三次元培養したヒト肝ガン細胞株 Hep G2 細胞と、細胞当たりの機能を比較したところ、図 6 で見られた著しい促進の後でも、アルブミン分泌や EROD 活性は、Hep G2 細胞の 1/20~1/10 に留まっており、依然として成熟化には程遠い状況にあることが示された。興味深いことに、未分化肝細胞のマーカーである α -フェトプロテインのアルブミン分泌能に対する比を測定すると、三次元培養においては単層培養と異なり、培養日数の増加と共に α -フェトプロテインの分泌能が低下し、成熟化の方向に向かっていることが示された。この結果には、添加因子の影響は見られ

ず、三次元培養自体の効果であると推察された。

E. まとめと今後の展望

第一の目的である肝組織用の三次元担体成型プロセスについては、当初想定していた光成型ではなく、シート積層・機械加工法を検討した。その結果、マクロ流路の枝分かれ・合流構造を持ち、かつ高空隙率の細胞担持用ランダム多孔質部、とを併せ持つ三次元担体の成型に成功した。今回のデザイン・製作においては、予め塩を含ませた厚さ 1.6 mm のポリ乳酸シートを材料として用いその内部はランダム多孔質部としたが、機械加工に換えて例えばエキシマレーザーなどの非接触微細加工法を用い、樹脂のみからなる 100 μ m 程度の厚さのシートを積層しつつ微細加工を行うことで、組織化された多孔質構造を内部に再現することも原理的には可能である。またレーザー加工を用いることで、流路分岐部に見られたような機械加工による多孔質構造の乱れ (図 3 (B)) も完全に防ぐことが可能である。また、本プロセスでは、機械加工に耐える強度の保持のため樹脂から塩を取り除く前に切削加工を行ったが、レーザーを用いることで塩を発泡溶出させてから加工することも可能と思われ、より汎用かつ単純なプロセスとして発展させることも期待できる。

第二の目的であるマウス肝前駆細胞の三次元担体を用いる *in vitro* 選択的増幅・成熟化の *in vivo* における効果につ

いては、この2週間の *in vitro* 増幅・成熟化が移植後4週間の肝組織再構築に決定的とも言える促進効果を持つことを明らかとした。しかしながら、HE染色像からみると、この前培養を行った系においても、4週間では完全な成熟化には至っていないように見える。すなわち、多くの細胞が単核であり、また比較的小型の細胞質を保ったままである。今後、今回の知見を元に、*in vitro/in vivo* を通してより完全な成熟肝組織を再構築する手法へと発展させていく必要がある。このためには、*in vitro/in vivo* のアルブミン分泌能で部分的に見られた成熟化がどの発達段階を示しているのかについて、他の肝分化・肝機能マーカーの mRNA レベルでの発現状況を捉えることで解析する必要があると考えている。

第三の目的であるヒト胎児肝細胞の成熟化については、PLLA担体三次元培養と OSM の組合せが優れた効果を持つことを見出した。マウスで優れた効果を示した NA や DMSO は小型肝細胞用の形態維持には非常に有効であったが、さらなる機能的・形態的成熟化を促進することはなかった。一方で、このような充進にも関わらず最終到達機能レベルは、成熟肝の 1/20~1/10 程度と推定された。採取直後のヒト胎児肝細胞の機能レベルは極めて良好であることが報告されているので、我々が入手可能となるまでの増幅 (3PDL 以下とされている) に急激な機能低下が起こっていると推察される。しかし、冒頭で述べたように、臨床学的意

義のある大きさの肝組織を再構築するためには 10^{11} レベルの細胞数が必要で、たとえヒト ES 細胞からの効率的な肝細胞分化誘導が可能となったとしても、機能を落とさずに継代したり継代後に機能を回復させたりする技術が不可欠である。一方でこのような大幅な増幅過程において細胞が正常性を失う可能性は否定できず、今回用いた細胞についても、そのような観点からの批判も多い。遺伝子発現レベルでの正常性のチェックと、場合によっては適当な表面マーカーに基づいた正常細胞のみの高度な精製などを行うなどの必要性もあろう。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Enhanced *in vitro* maturation of fetal mouse liver cells with oncostatin M, nicotinamide and dimethylsulfoxide; Y. Sakai, J. Jiang, N. Kojima, T. Kinoshita and A. Miyajima: *Cell Transplant.*, **11**(5), 435-441 (2002).
- Cultivation of fetal liver cells in a three-dimensional poly-L-lactic acid scaffold in the presence of oncostatin M: J. Jiang, N. Kojima, T. Kinoshita and A. Miyajima, Weiqun Yan and Y. Sakai: *Cell Transplant.*, **11**(5), 403-406 (2002).
- Development of a xenogeneic direct hemoperfusion method in a bioartificial

liver system: K. Naruse, Y. Sakai, Lei Guo, J. Shindoh, Ji Chang Son, Masatoshi Makuuchi.: *J. Artif. Organs.*, **5**, 257-264 (2002).

- セル&ティッシュエンジニアリング, 特集によせて, 再生医療に工学者は何を寄与できるか? : 酒井康行 : *生物工学会誌*, 80(5), 1-2 (2002).
- Cultivation and induction of fetal liver cells in poly-L-lactic acid scaffolds: J. Jinlan, N. Kojima, A. Miyajima, W Yan, Y. Sakai: *Mat. Sci. Eng. C*, in press.

2. 学会発表

- Enhanced in vitro maturation of fetal mouse liver cells in a poly-l-lactic acid scaffold: Jinlan Jiang, Chunguang Hu, Nobuhiko Kojima, Atsushi Miyajima, Weiqun Yan and Yasuyuki Sakai: The 1st International Tissue Engineering Meeting of China and The 3rd National Conference of Tissue Engineering of China, 2002.5
- Induction of in vitro maturation of fetal hepatocytes using 3D PLLA scaffold s for liver tissue engineering: J. Jiang, S. Hanada, N. Kojima, A. Miyajima and Y. Sakai: International Symposium on Cell Biomechanics & Tissue Engineering, 2002.9.
- 継代ヒト胎児肝細胞の各種因子や三次

元・混合培養による分化機能誘導 : 酒井康行, 萱野寛美, 花田三四郎, 小島伸彦, 宮島篤 : 第 40 回日本人工臓器学会, 2002.10.

- In vivo efficacy of engineered liver tissue using fetal mouse liver cells matured in 3D PLLA scaffold: J. Jiang, L. Guo, N. Kojima, K. Naruse, M. Makuuchi, A. Miyajima and Y. Sakai: 5th International Meeting of the Tissue Engineering Society International, 2002.11.
- Culture conditions suitable for maturation of fetal human hepatocytes after repeated subcultivation : Y. Sakai, H. Kayano, S. Hanada, J. Jiang, N. Kojima, A. Miyajima : 5th International Meeting of the Tissue Engineering Society International, 2002.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

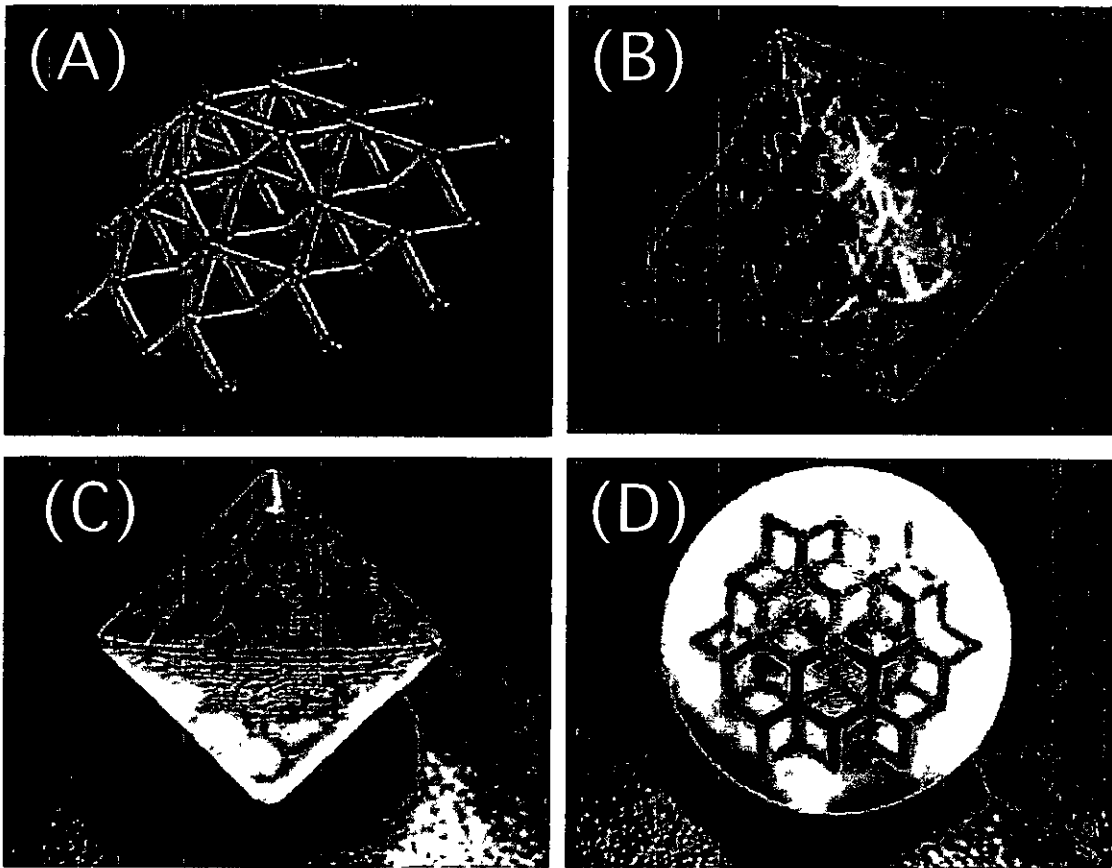


図 1. CADによるモデル肝組織デザイン (A, B) とその光造型モデル (C, D).

CAD 3次元CADデータのCAMデータへの変換



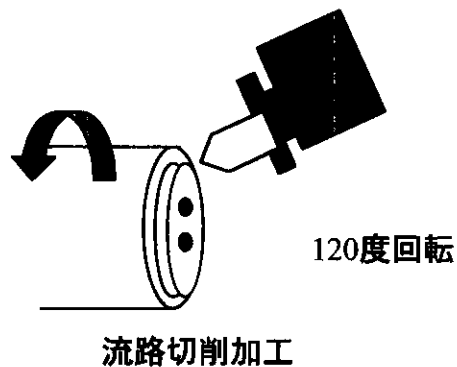
複合加工機にデータを取り込み、積層造形+切削加工



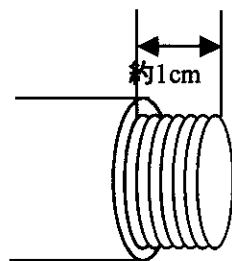
PLLA /NH₄HCO₃複合体をシート状に成形したものを準備



一段ずつ流路を切削加工



6段目まで積層と流路切削加工を繰り返す



積層したものを円錐に加工し、2つを張り合わせて完成.

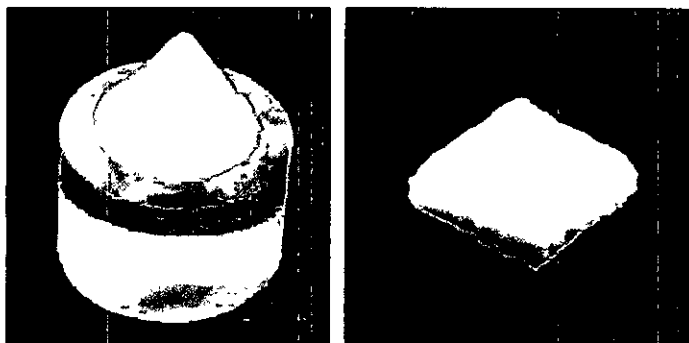


図2. シート積層・機械加工によるポリ乳酸スポンジ三次元担体の作成プロセス.

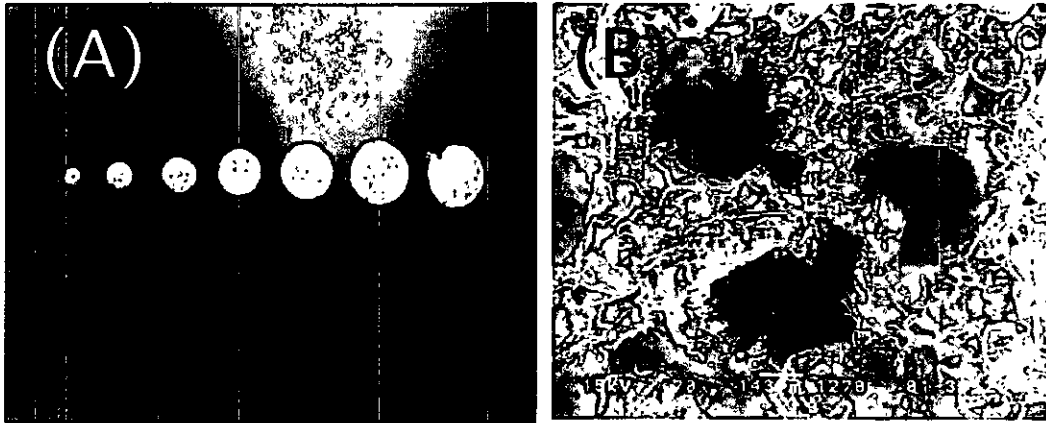


図 3. 各層の加工状況 (A) と流路分岐部のSEM写真 (B).

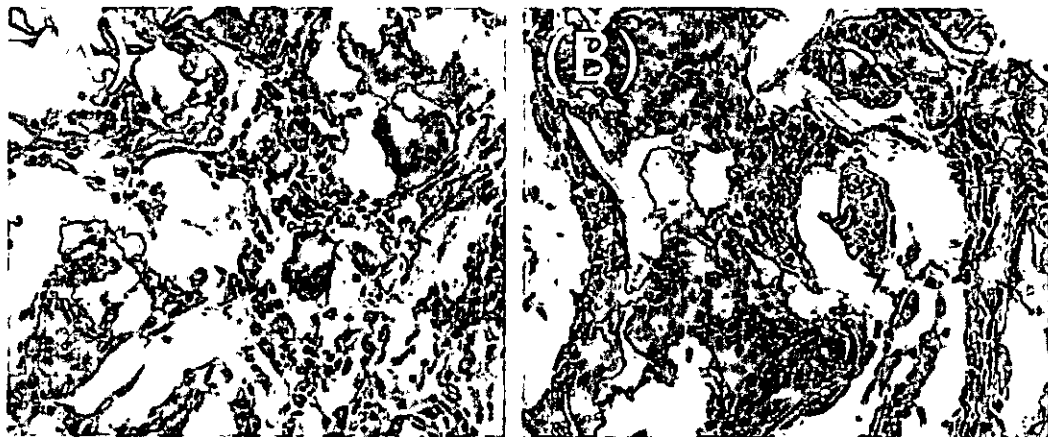


図 4. 移植後 4 週間のHE染色. 2週間の前培養無し (A) と培養有り (B).

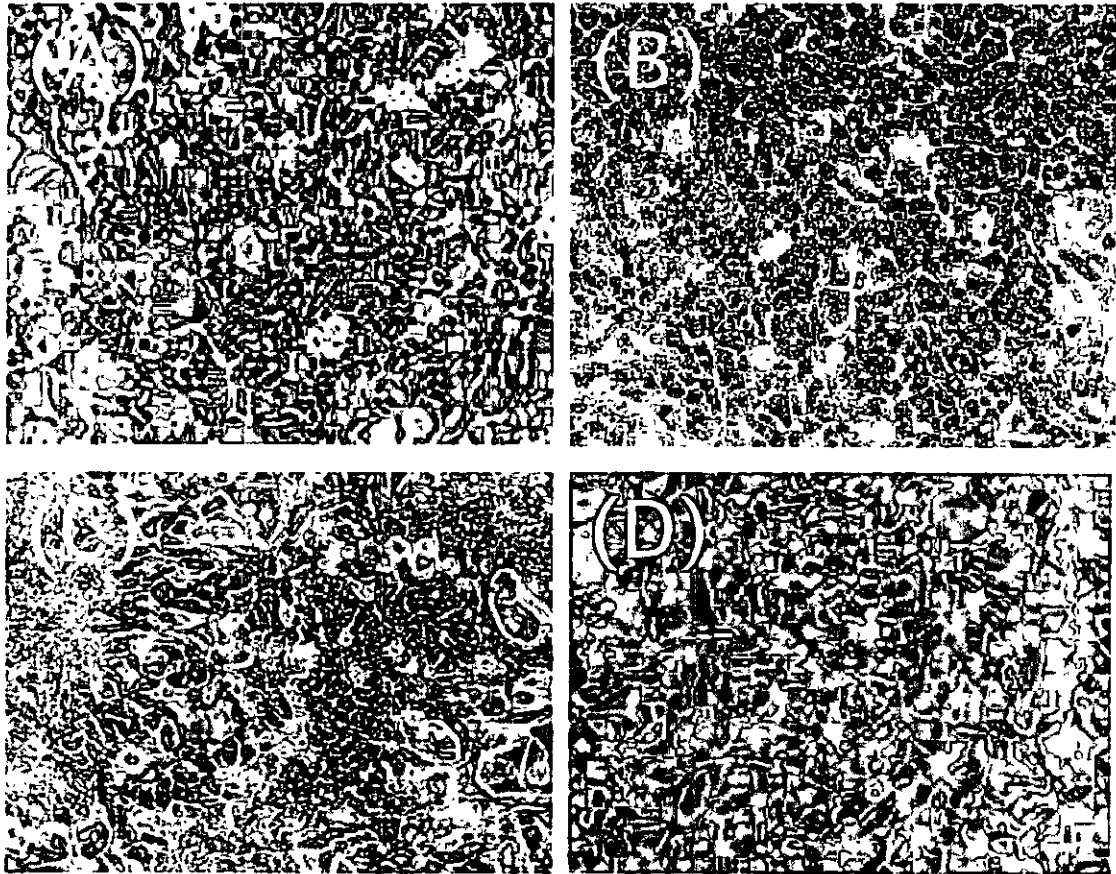


図5. 播種後2週間の継代ヒト胎児肝細胞の形態. 基礎培地中 (A), NA/DMSO添加 (B), HGF添加 (C) およびOSM添加 (D).

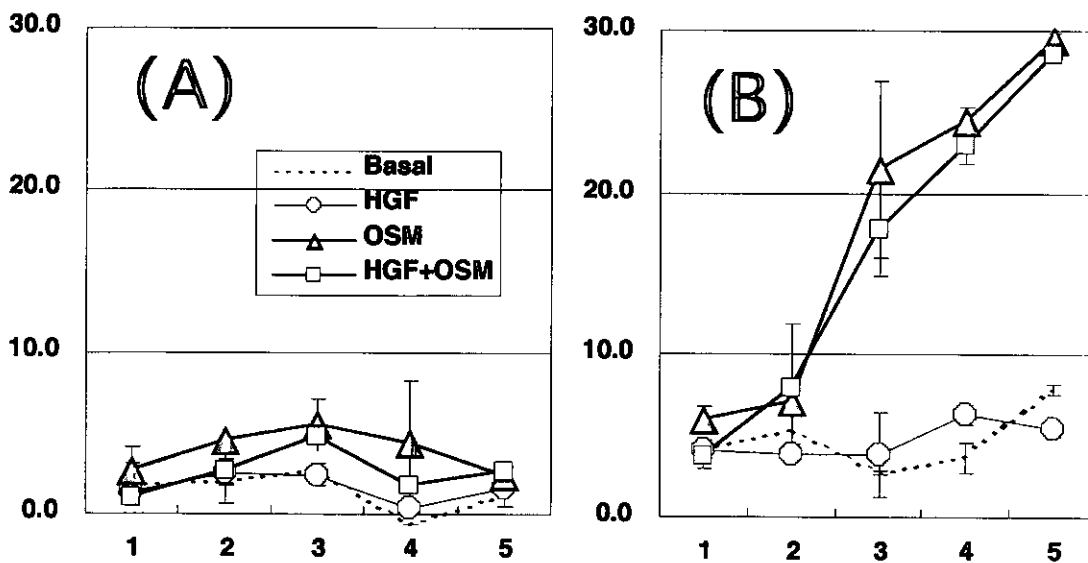


図6. 継代ヒト胎児肝細胞の各種因子存在下におけるアルブミン分泌の変化. 単層培養 (A) およびPLLA三次元培養 (B).

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ES 細胞からの肝細胞分化系に関する研究

分担研究者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・助手

研究要旨 臓器移植がドナー不足により困難な我が国においては、外傷や疾病によって損なわれた臓器を補うために、ほぼ全ての臓器に分化する能力を持つ胚性幹細胞（ES 細胞）を用いた再生医療への期待が高まっている。殊に患者数の多い肝疾患の治療を目的とした肝臓などの内胚葉由来の組織細胞への分化系の樹立は急務である。しかし哺乳類の内胚葉形成機構には未解明な部分が多く、ES 細胞から肝臓細胞への分化系はいまだ確立されていない。発生生物学的知見より内胚葉形成におけるアクチビン・Nodal シグナルの重要性が示唆されているが、アクチビンのリガンド刺激では ES 細胞から内胚葉が形成されない。本研究ではアクチビン・Nodal シグナルを ES 細胞において伝達したところ、初期内胚葉のマーカーである SOX17 の発現が上昇することを見出した。また肝臓前駆細胞のマーカーである Dlk の発現も RNA/タンパク質のレベルで上昇していることを見出した。これらの結果により ES 細胞から肝臓細胞への分化においてもアクチビン・Nodal シグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。

A. 研究目的

多分化能を持つ初期胚細胞が機能を持った組織細胞へと分化していく過程においてはさまざまなシグナルによる分化誘導が起こっている。ES 細胞が *in vitro* で効率良く分化する際にも同様なシグナルを与えることで初期胚と同様な環境をつくり出すことが必要であることが予想される。本研究ではアクチビン・Nodal シグナルを ES 細胞において伝達し、初期内胚葉のマーカーである SOX17 や肝臓前駆細胞のマーカーである Dlk の発現を解

析することにより、ES 細胞から肝臓細胞への分化におけるアクチビン・Nodal シグナルの役割を検討した。

B. 研究方法

LIF 存在下で培養している未分化の ES 細胞に 2 種類の発現ベクター (pPGK-IP と pCAG-IP) を用いて活性型アクチビン受容体 (ALK4CA) を発現させた。pCAG-IP は pPGK-IP よりも ALK4CA を多く発現させることによってアクチビンシグナルをより多く細胞内に伝達することができる。こ

うした3種類のES細胞をLIF存在下またはLIF非存在下で培養し、RNAを調製、または免疫染色用に調製した。得られたRNAを用いて定量的RT-PCR法によってSOX17そしてDlkのmRNAの発現を定量した。また抗Dlk抗体を用いて分化したES細胞を染色した。

以上の実験はすべてin vitroのマウス培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

アクチビン・NodalシグナルをES細胞において伝達したところ、初期内胚葉のマーカーであるSOX17の発現がアクチビンシグナルの量依存的に上昇することが示された(図1A)。また肝臓前駆細胞のマーカーであるDlkの発現もRNA/タンパク質のレベルでアクチビンシグナルの量依存的に上昇していることを見出した(図1B、図2)。

D. 考察

アフリカツメガエルなどの系においてはアクチビン・Nodalシグナルが内胚葉を誘導することは示されていたが、哺乳類のES細胞においてはそのような報告はない。本研究者は昨年度の報告で、未分

化のES細胞においてleftyが発現していることから、ES細胞にアクチビンのリガンドを添加することにより内胚葉への分化を検討することは困難であることを示した。本報告で用いた活性型アクチビン受容体を発現させることによりアクチビン、Nodalのシグナルをリガンド非依存的に伝達する方法は上記の問題点を克服する方法である。この方法でアクチビン・NodalシグナルをES細胞において伝達したところ、初期内胚葉のマーカーであるSOX17の発現のみならず肝臓前駆細胞のマーカーであるDlkの発現もアクチビンシグナルの量依存的に上昇していることが示されたことにより、ES細胞から効率良く肝臓細胞を分化する可能性が開かれたと考えられる。

E. 結論

アクチビン・NodalシグナルをES細胞において伝達したところ、初期内胚葉のマーカーであるSOX17の発現が上昇することを見出した。また肝臓前駆細胞のマーカーであるDlkの発現もRNA/タンパク質のレベルで上昇していることを見出した。これらの結果によりES細胞から肝臓細胞への分化においてもアクチビン・Nodalシグナルが重要な役割を果たすこ

とが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

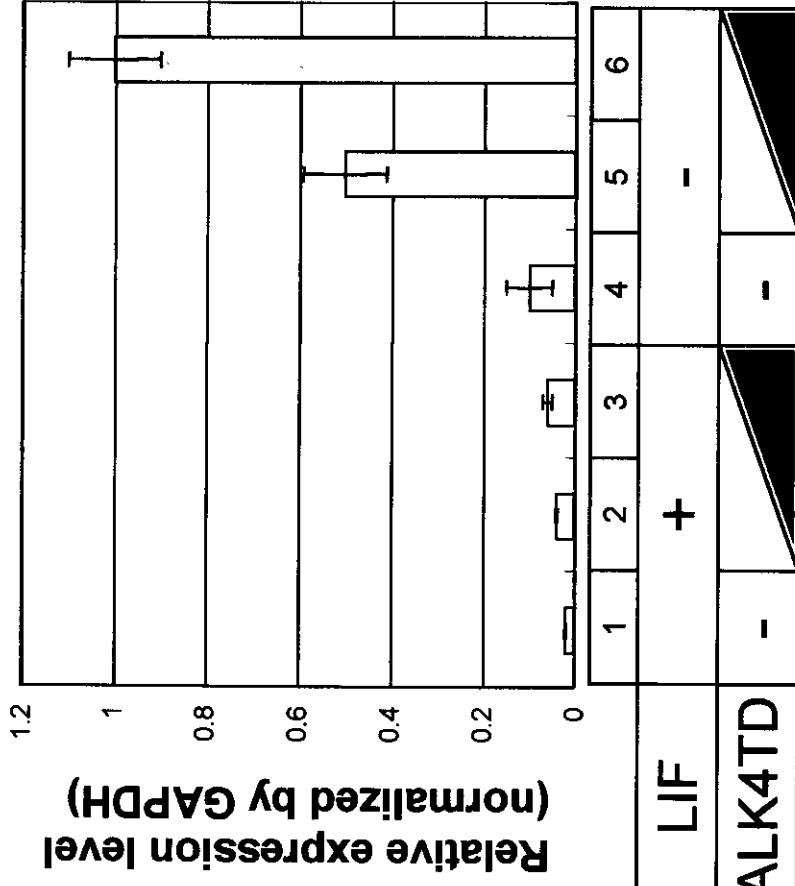
G. 結論

アクチビン・Nodal シグナルを ES 細胞において伝達したところ、初期内胚葉のマーカーである SOX17 の発現が上昇することを見出した。また肝臓前駆細胞のマーカーである Dlk の発現も RNA/タンパク質のレベルで上昇していることを見出した。これらの結果により ES 細胞から肝臓細胞への分化においてもアクチビン・Nodal シグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

A. SOX17



B. Dlk

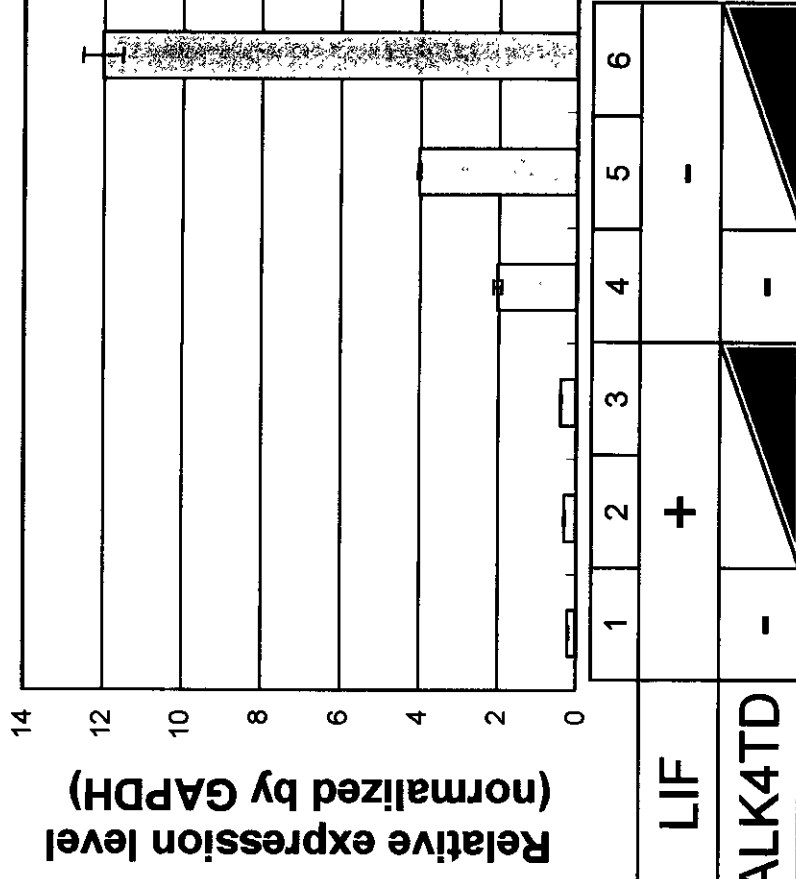


図1. 未分化または分化した ES 細胞におけるSOX17, Dlkの発現に対するアクチビンシグナルの影響 LIF存在下(+)で培養している未分化のES細胞(lane1-3)とLIF非存在下(-)で培養している分化したES細胞(lane1-3)に活性型アクチビン受容体を低レベル(lane2,5)または高レベル(lane3,6)で発現させる。それぞれの細胞からRNAを調製し、SOX17 (初期内胚葉マーカー) (A)とDlk (肝臓前駆細胞マーカー) (B)の発現を定量的RT-PCR法によって検討した。GAPDHの発現量をもとに発現量を補正した。

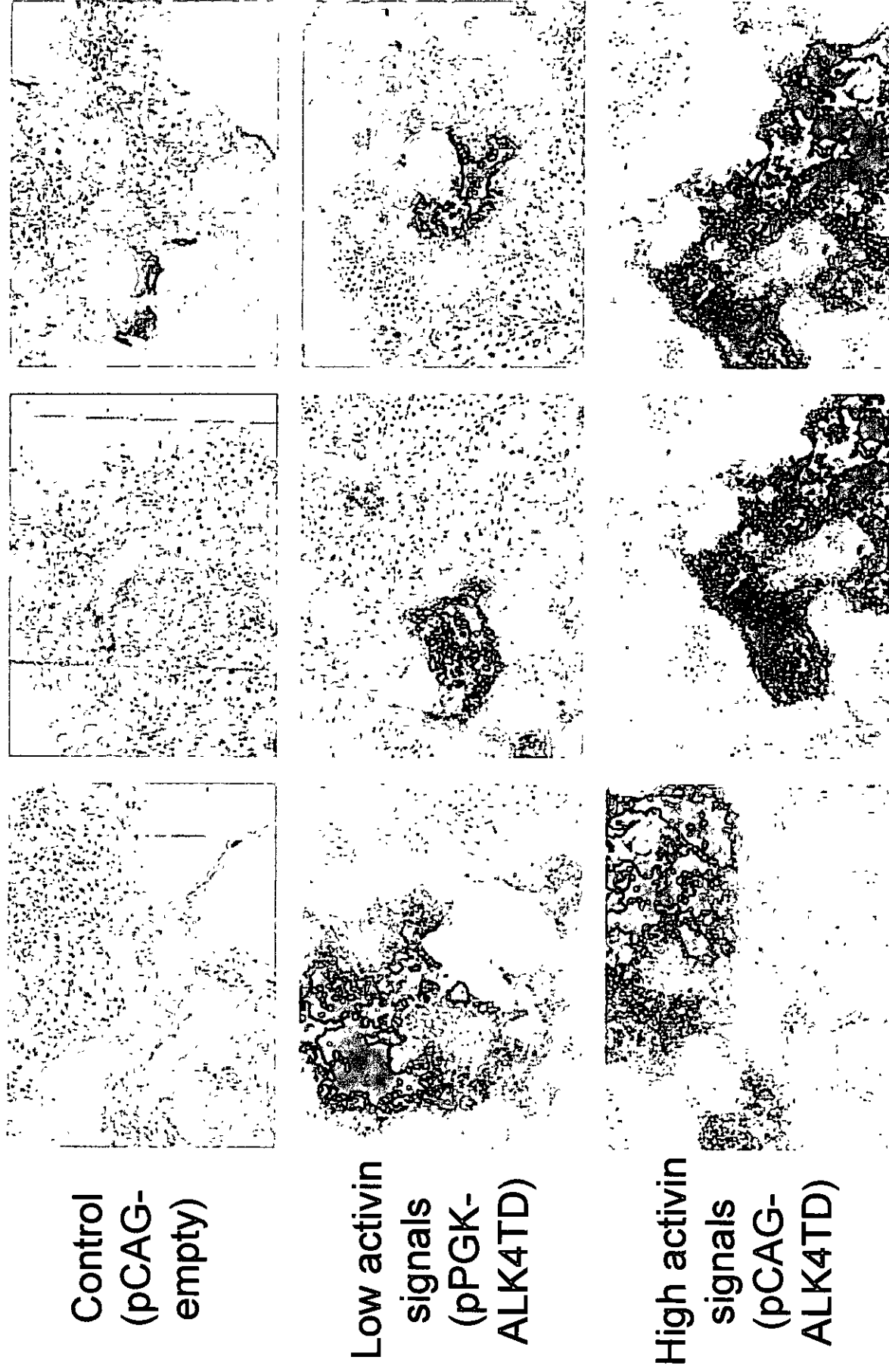


図2. 分化した ES 細胞におけるDlkの発現に対するアクチビンシグナルの影響
 LIF非存在下(-)で培養している分化したES細胞に活性型アクチビン受容体を低レベル(中段)または高レベル(下段)で発現させる。それぞれの細胞を抗Dlk抗体で染色した (茶色)。

III.研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi M., Sekiguchi T., Hara T., Kinoshita T., and <u>Miyajima A.</u>	Cultivation of AGM-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances homing to the bone marrow.	<i>Blood</i>	99	1190-1196	2002
Minehata K., Mukouyama Y., Sekiguchi T., Hara T., and <u>Miyajima A.</u>	Macrophage-colony stimulating factor modulates the development of hematopoiesis by stimulating the differentiation of endothelial cells in the AGM region.	<i>Blood</i>	99	2360-2368	2002
Matsui T., Kinoshita T., Morikawa Y., Tohya K., Katsuki M., Ito Y., Kamiya A., and <u>Miyajima A.</u>	K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development.	<i>EMBO J</i>	21	1021-1030	2002
Tamura H, S. Okamoto, K. Iwatsuki, Y. Futamata, K. Tanaka, Y. Nakayama, A. Miyajima and T. Hara.	In vitro differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow.	<i>Exp. Hematol.</i>	30	957-966	2002
Kamiya A., N. Kojima, T. Kinoshita, Y. Sakai and A. Miyajima	Maturation of fetal hepatocytes <i>in vitro</i> by extracellular matrices and Oncostatin M; Induction of tryptophan oxygenase.	<i>Hepatology</i>	35	1351-1359	2002
Kinoshita T and A. Miyajima	Cytokine regulation of liver development.	<i>Biochimica et Biophysica Acta</i>	1592	303-312	2002
Matsui T., T. Kinoshita, T. Hirano, T. Yokota And A. Miyajima	STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development.	<i>Biol. Chem.</i>	277	36167-36173	2002
Nakayama K, K-W. Kim, and A. Miyajima	A novel nuclear zinc finger protein EZI enhances nuclear retention and transactivation of STAT3.	<i>EMBO J.</i>	21	6174-6184	2002
Tanimizu N, M. Nishikawa, and A. Miyajima	Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1, an EGF-like homeotic protein.	<i>J. Cell Sci.</i> in press.			2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tamura S., Y. Morikawa, M. Tanaka, A. Miyajima and E. Senba	Developmental expression pattern of oncostatin M receptor β in mice	<i>Mech Dev.</i>	115	127-131	2002
Enomoto H., K. Yoshida, Y. Kishima, T. Kinoshita, M. Yamamoto, A.D. Everett, <u>A. Miyajima</u> and H. Nakamura.	Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation.	<i>Hepatology</i>	36	1519-1527	2002
Y. Sakai, J. Jiang, N. Kojima, T. Kinoshita and A. Miyajima	Enhanced in vitro maturation of fetal mouse liver cells with oncostatin M, nicotinamide and dimethylsulfoxide	Cell Transplant .	11(5)	435-441	2002
J. Jiang, N. Kojima, T. Kinoshita and A. Miyajima, Weiqun Yan and Y. Sakai	Cultivation of fetal liver cells in a three-dimensional poly-L- lactic acid scaffold in the presence of oncostatin M	Cell Transplant .	11(5)	403-406	2002
K. Naruse, Y. Sakai, Lei Guo, J. Shindoh, Ji Chang Son, Masatoshi Makuuchi.	Development of a xenogeneic direct hemoperfusion method in a bioartificial liver system	J. Artif. Organs.	5	257-264	2002
酒井康行	セル&ティッシュエンジニアリン グ, 特集によせて, 再生医療に工学 者は何を寄与できるか?	生物工学会 誌	80(5)	1-2	2002
J. Jinlan, N. Kojima, A. Miyajima, W Yan, Y. Sakai	Cultivation and induction of fetal liver cells in poly-L-lactic acid scaffolds	Mat. Sci. Eng. C			in press

20020460

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.31-P.32の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。