

20112504/A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスによる
慢性肝炎モデル作出

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 紙谷 聡英

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスによる慢性肝炎モデル作出 -----1

東海大学 創造科学技術研究機構・准教授 紙谷聡英

II. 研究に関するの刊行物の一覧表 ----- 13

III. 研究に関するの刊行物の別刷 ----- 15

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

総括研究報告書

免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスによる慢性肝炎モデル作出

研究代表者 紙谷 聡英 (東海大学・創造科学技術研究機構・准教授)

研究要旨

B型、C型肝炎ウイルス(HBV,HCV)の感染は免疫・炎症反応を介して慢性肝炎を発症し、肝硬変・肝癌の原因となる。HBV,HCVは種特異性から、マウス等の実験動物を用いた感染実験が困難である。近年開発された免疫不全ヒト肝キメラマウスでは、HBV,HCVの*in vivo*での感染・増殖が可能だが、免疫細胞が欠損しており感染後に生じる慢性肝炎が再現されない。そこで本研究では、免疫系の完成していない胎生期や新生児期のマウス肝臓にヒト肝幹・前駆細胞を移植し、ヒト細胞をレシピエントの免疫系に自己と認識させることで免疫寛容を促す。これにより、免疫不全動物を使用せず異種移植に対する免疫拒絶反応を抑制することで、免疫系を保持した状態でのヒト細胞の生着を可能としたキメラマウスを作成し、*in vivo*における肝炎ウイルスの感染・増殖に伴う炎症反応の再現系を構築する。

最終分化した体細胞に様々な遺伝子群を発現させ、神経細胞や心筋細胞、血液細胞にDirect Reprogrammingできることが報告されている。そこで、患者由来のヒト繊維芽細胞を用いて、肝細胞誘導因子の遺伝子導入によりヒト肝前駆細胞を誘導しキメラマウス作成に使用する。患者個々の遺伝背景を反映した肝細胞を持つ動物モデルによるウイルスの増殖や肝炎の進行の研究が可能になり、薬物感受性の差異等を考慮した新薬開発など幅広い応用が考えられる。

平成23年度は、マウス体細胞をモデルとして、肝細胞へのDirect Reprogrammingを可能とする因子の探索をおこなった。その結果、既に報告のあるHNF4 α やFoxA3に加えて新規の候補遺伝子を同定した。また、マウス胎仔および新生仔への肝幹・前駆細胞の移植系の構築を行っている。

A. 研究目的

ウイルス性肝疾患の治療法研究が困難な理由として、ウイルスの種特異性によりマウス・ラットといった簡便な実験動物による研究が困難な点がある。近年、免疫不全マウスに肝障害を誘導する遺伝子を組み込むことで、ヒト肝細胞を高効率に移植可能な系が構築され(Tateno et al., 2004)、作成したヒト肝細胞キメラマウスにHBV、HCVが感染可能なことが示されている(Tsuge et al., 2005 等)。しかし、このマウスモデルでは免疫細胞が存在しないために、慢性肝炎の原因となる肝臓へのウイルス肝炎に伴う免疫・炎症反応が再現できない。免疫機能を保持したまま肝細胞をヒト化できる系の確立が、肝炎ウイルスによる慢性肝炎の動物モデル作成を通じた新規治療法開発のために必須である。ヒト細胞をマウスに生着させるには異種移植に対する免疫拒絶を抑制する必要がある。本研究では、これまでの免疫不全動物モデルではなく、免疫系の完成していない胎生期や新生児期のマウス肝臓にヒト肝幹・前駆細胞を移植して自己免疫寛容を誘導する。生体内では自己抗原を認識する免疫細胞を排除する選択システムが存在する。胎生・新生仔期にヒト細胞を移植し、ヒト細胞をレシピエントの免疫系に自己と認識させ免疫寛容を促すことで生着を可能にする系を構築する。我々は、マウス繊維芽細胞に肝発生・肝機能を制御する転写因子群を強制発現させ

クリーニングを行った結果、複数の転写因子を導入することで繊維芽細胞を肝細胞様細胞へと Direct reprogramming できる Preliminary な結果を得ている。また、Grompe らが報告している Fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) 欠損マウスを用いて、レシピエント肝細胞のみに肝障害を誘導し移植細胞の増殖が誘導できることを確認している。そこで平成 23 年度は、移植するヒト肝前駆細胞のソースとして、ヒト繊維芽細胞に上記の肝分化誘導因子を発現させ肝幹・前駆細胞を誘導する系を構築する。平成 24、25 年度は、誘導ヒト肝幹・前駆細胞を FAH 欠損マウス胎仔・新生仔肝臓へと移植した後にレシピエントの肝障害を誘導することで、免疫系を保持したヒト肝キメラマウスの作成を行い、肝炎ウイルス感染による炎症反応・慢性肝炎の誘導が可能か検討する。

B. 研究方法

HBV, HCV 由来の慢性肝炎モデル作成に必要な免疫系を保持したヒト肝細胞キメラマウスの作出技術の確立を目的として、次の研究を遂行する。

1. ヒト繊維芽細胞からの肝前駆細胞の分化誘導・純化系の構築

最終分化した体細胞に遺伝子導入して、神経細胞や心筋細胞、血液細胞に Direct

Reprogramming できることが近年報告されている。本研究では、マウス・ヒト繊維芽細胞に候補遺伝子群を導入し、肝前駆細胞を誘導できるか検討する。分化誘導後に細胞表面抗原の網羅的なスクリーニングを行い作成したヒト肝前駆細胞の特異的細胞表面マーカーを同定し純化する。この目的のために、胎仔肝臓から肝幹・前駆細胞をフローサイトメーター (FACS) を用いて純化し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。HNF4 α 、FoxA2、FoxA3 などの既知の肝細胞機能遺伝子に加えて、胎仔肝幹・前駆細胞に高く発現する核内因子群を候補遺伝子として同定した。候補遺伝子をレトロウイルスベクター (pGCDNSam) にクローニングし、強制発現用ウイルスを作成した。マウス胎仔繊維芽細胞を、胎生 13 日マウス胎仔を酵素処理することで分離・培養し、候補遺伝子をレトロウイルスを用いて強制発現させた後に、サイトカイン (Hepatocyte Growth Factor [HGF] および Epidermal Growth Factor) 存在下で培養した。肝細胞系への分化誘導を、肝細胞マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR を用いて同定した。

また我々は、マウス胎仔繊維芽細胞との共培養でマウス胎生肝前駆細胞の *in vitro* 増殖が誘導可能なことを見出しており、ヒト肝前駆細胞をこの系を用いて増幅することを目的とした。そこで、ヒト iPS 細胞由来の肝幹・前駆細胞がこの系を用いて増殖が可能

かをまず検討した。既報に従って、ヒト皮膚細胞由来 iPS 細胞を、アクチビン、Fibroblast growth factor, Bone morphogenetic protein, HGF とサイトカインを連続的に添加することで肝臓系細胞へと分化誘導した。得られた細胞から肝幹・前駆細胞を FACS を用いて分化し、マウス胎仔繊維芽細胞をフィーダー細胞としてコロニー形成培養を行い、細胞の増殖性と分化能を解析した。

2. 肝障害誘導マウス胎仔を用いた、生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築

FAH 欠損マウスは、チロシン分解の最終段階を制御する酵素である FAH の欠損により、毒性代謝産物蓄積による肝障害を発症する。

FAH 欠損マウスは

2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC) の添加によりほぼ正常の状態を保つが、NTBC 添加を止めると速やかな肝障害を誘導できる。そこで FAH 欠損マウス胎仔肝臓に、同じ発生時期の正常肝幹・前駆細胞を移植した後に肝障害を誘導して、移植細胞の生着が可能か検討を行う。発生過程において肝臓形成が進行する各段階 (マウス胎生 11 日から出生前後まで) の FAH 欠損胎仔肝臓に、GFP マウス胎児より分離した肝前駆細胞を実体顕微鏡下で経子宮的に移植する。手術後、親マウスへの NTBC 投与を停止し胎仔マウス肝臓における肝障害を誘導する。肝幹・前駆細胞

の移植時期や NTBC 投与停止による肝障害誘導の時期を条件検討することで、最も適切な移植条件を設定することを目的とした。

平成 23 年度は、胎仔・新生仔マウスへの肝幹・前駆細胞への移植条件の検討を行った。マウス胎生 13 日肝臓より肝幹・前駆細胞を分離し、新生仔マウスの肝臓に直接的に細胞移植を行った。また、新生仔マウスの眼底静脈を経由して静脈血流を通じた細胞移植を検討した。

3. ヒト繊維芽細胞由来肝前駆細胞を用いた、免疫機能を持つヒト肝細胞キメラマウスの作成

上記1,2 の研究成果を元に、ヒト繊維芽細胞から肝前駆細胞を誘導し、FAH 欠損マウス胎仔肝臓へと移植を行う。NTBC の投与停止により肝障害を誘導し、FAH 欠損マウス胎児の肝臓内で移植したヒト細胞が肝細胞の障害を補完することで、マウス個体が成体まで成長できるか観察する。ヒト細胞由来肝前駆細胞を移植した場合、マウス体内ではサイトカインの種差等の問題から十分な増殖効率が得られない可能性がある。その場合には、一過的な遺伝子導入・発現による移植・生着効率の改善を試行する。

4. 作成したキメラマウスにおける免疫系の評価および肝炎ウイルスの感染実験

これまでの研究で作成したヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝機能・免疫機能の解析を行なう。キメラマウス体内のヒト血清アルブミンや薬物代謝酵素の発現レベルの解析、末梢血中の免疫細胞 (B 細胞や T 細胞) の細胞数や機能が正常か解析する。肝臓切片の染色によりドナー細胞の生着率を測定する。HBV または HCV をマウスに接種し、キメラ肝臓内でウイルスの感染・増殖を観察する。さらに、肝炎ウイルスの持続的な感染を起こすマウスが得られた場合には長期の飼育を行い、免疫細胞の活性化や炎症反応が生じるか観察する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。

動物実験に関しては、当大学の定める指針に従って実験を遂行する。

ヒト細胞の使用に関しては倫理審査委員会の規定に従い、説明・同意を得られたサンプルを使用する。またヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に従って研究を遂行する。

C. 研究結果

1. ヒト繊維芽細胞からの肝前駆細胞の分化誘導・純化系の構築

(1) マウス線維芽細胞から肝細胞への Direct Reprogramming 系

肝細胞の機能は、HNF4 α や FoxA2, 3 といった Liver-enriched transcription factor のネットワークにより制御されている。これらの転写因子群、またはマイクロアレイによる網羅的解析で肝芽細胞等に特徴的に発現していた核内因子を肝細胞系へのリプログラミング候補遺伝子として選別した。マイクロアレイには、マウス胎仔 13 日肝臓をコラゲナーゼによって分散し、肝幹・前駆細胞マーカーである CD133 および Dlk の両陽性画分を FACS を用いて純化し RNA を回収して用いた。得られた候補遺伝子をマウス線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、約 2 週間培養した後に肝細胞マーカーであるアルブミンの発現をリアルタイム PCR にて解析した。HNF4 α および FoxA2 の強制発現によりアルブミンの誘導が見られたもののその発現レベルはコントロールとして用いたマウス胎仔肝臓由来細胞と比べて低いものだった。そこで、この二つの遺伝子と協同的にアルブミン発現を誘導できる因子のスクリーニングを行った結果、HLH 型核内因子の一つを同時に強制発現した際にアルブミンが強く誘導された (PCR および免疫染

色)。さらに、チトクローム P450 (CYP)3A11 等の成熟肝細胞のマーカー遺伝子の発現誘導も観察されたことから、HNF4 α および FoxA2 に加えて今回同定した HLH 因子を含む 3 因子が肝分化誘導因子として示唆された (図 1, 2)。

得られた線維芽細胞由来肝臓系細胞中に高増殖性の肝幹・前駆細胞が含まれるか検討を行った。様々な細胞表面抗原のスクリーニングの結果、3 因子によって誘導した細胞中に E-cadherin 陽性細胞が多数含まれていた。現在、この細胞が高増殖性や肝機能を保持しているか検討している。

(2) ヒト iPS 細胞を用いた肝幹・前駆細胞の純化・長期培養系の構築の試み

ヒト肝幹・前駆細胞の *in vitro* での増幅系を構築する目的で、ヒト iPS 細胞由来細胞をモデルとして研究を行った。

ヒト iPS 細胞を既報に従って肝臓系細胞へと分化誘導を行った。サイトカイン等の刺激により、 α フェトプロテイン (AFP)、HNF4 α 陽性の幼弱肝細胞へ分化させた。この培養系中に、高増殖性の肝前駆細胞が含まれるか検討するために、我々がマウスをモデルとして同定した肝幹・前駆細胞マーカー CD133 および CD133 の表面抗原抗体を用いて細胞分画を行った。FACS を用いて分画した各細胞をマウス線維芽細胞をフィーダーとして低密度培養を行い、AFP、HNF4 α 陽性のコ

コロニー形成能を同定した(図 3)。その結果、 $CD13^+CD133^+$ 分画に高いコロニー形成能が見られ、この分画に高増殖性の肝幹・前駆細胞様の細胞が濃縮されていることが分かった。形成されたコロニーをトリプシンにより酵素的に分散し新たなフィーダー細胞上に播種することで継代培養を繰り返した結果、1カ月にわたり増殖しつづけることが分かった(図 4)。数代の継代培養後に形成されたコロニーでも、初代のコロニーと同様に AFP、FoxA2、HNF4 α 陽性を示すことから、継代培養後も肝幹・前駆細胞様細胞としての形質を維持していると考えられる。以上の結果から、ヒト肝幹・前駆細胞を長期培養できる培養条件の確立ができたと考えている。

2. 肝障害誘導マウス胎仔を用いた、生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築

マウス胎仔・新生仔への移植系構築の目的で、まず胎仔肝臓由来の肝幹・前駆細胞のマウス新生仔への移植を行った(図 5)。マウス胎生 13 日肝臓より分離した Dlk^+ 肝幹・前駆細胞を新生仔マウスの肝臓に直接移植を行った場合には、移植したマウス個体の一部で肝臓に移植細胞が検出されるものの、個体間のばらつきが観察された。そこで、眼底静脈を通じた経静脈的な移植を試みた。 Dlk^+ 肝幹・前駆細胞を新生仔マウスの眼底静脈より移植し、各臓器における生着を観察した。その結果、移植直後ある程度の期

間で肝臓への生着を検出する一方で肺等への異所性の細胞の沈着や増殖が見られることが分かった。今後、移植後の時間経過に従って肝臓やその他の異所性の移植細胞の生着・増殖の過程を解析する予定である。

3. ヒト繊維芽細胞由来肝前駆細胞を用いた、免疫機能を持つヒト肝細胞キメラマウスの作成

4. 作成したキメラマウスにおける免疫系の評価および肝炎ウイルスの感染実験

両研究課題に関しては、平成 24、25 年度での遂行を計画している。

D. 考察

マウス線維芽細胞から Direct に肝細胞を作り出す系として、我々は HNF4 α および FoxA2, 3 に加えて、HLH 型転写因子を発現させることで誘導効率が上昇することを見出した。しかし、その分子基盤については未だ不明である。この新規肝分化因子は、肝細胞の肝機能・成熟化の促進に関与すると考えられる。我々はマウス胎生肝細胞にオンコスタチン M および細胞外マトリクスを添加することで、幼弱な肝細胞を成熟肝細胞へと分化誘導できることを既に報告している(Kamiya et al., 1999, 2002)。今回同定した HLH 型転写因子をこの培養系に強制発現することで、胎生肝細胞の成熟をより促進で

きることを見出した。この HLH 型転写因子と他の肝細胞機能に関係する転写因子群 (HNF ファミリー、C/EBP など)との直接的な相互作用など、今後検討したいと考えている。

ヒト線維芽細胞への遺伝子導入、肝細胞 (肝幹・前駆細胞) への分化誘導を進める上で細胞周期関連遺伝子の影響が考えられる。我々は、マウス胎仔肝臓から分離した肝幹・前駆細胞の長期培養を行う中で、培養が進むにつれて cdk インヒビターである *cdkn2a* の発現が上昇し細胞増殖が停止することを見出している。従って、ヒト線維芽細胞からの肝幹・前駆細胞の分化系でも、分化誘導に必要な長期培養の中で cdk インヒビターによる増殖停止が誘導される可能性が考えられる。我々は、human *cdkn2a* のノックダウンによりこの問題を解決することを考えている。

マウス胎仔および新生仔への移植系の構築では、どのような移植系が有用かの検討を行っている。マウス新生仔の眼底静脈を経由した移植では、細胞の一部が肝臓へ効率的に移行する一方で、肺への細胞の侵入・吸着も多く見られた。今後、このような条件下でマウス肝幹・前駆細胞がどのような挙動を示すのか解析するとともに、胎仔マウスへの移植も含めた移植系の検討を引き続き行う予定である。

E. 結論

(1) 線維芽細胞から肝前駆細胞を分化誘導するために必要な遺伝子群の探索を行い、既知の分化誘導因子である HNF4 α および FoxA2、3 に加えて、新規の肝分化誘導因子を同定した。

(2) ヒト肝幹・前駆細胞の *in vitro* での培養条件の探索を行い、ヒト iPS 細胞由来細胞を用いて、肝幹・前駆細胞の増殖を促進する条件を見出した。

(3) マウス胎仔および新生仔への移植系の構築を行い、マウス胎仔肝臓由来の肝幹・前駆細胞の移植により肝臓および異所性の生着・増殖が見られることが分かった。

今後の研究課題として、

(1) 同定した肝分化誘導遺伝子を用いた、ヒト線維芽細胞からの肝前駆細胞の分化誘導および *in vitro* での純化・培養系を構築する。

(2) マウス胎仔・新生仔への肝前駆細胞の移植系を構築する

(3) ヒト線維芽細胞から誘導した肝前駆細胞の *in vitro* および *in vivo* でのウイルス感染実験を行う。

を予定しており、平成 24、25 年度の研究課

題として実施する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

刊行物等は II 章に記載した。

・国内学会発表

紙谷聡英、柳田絢加、岡田 健、伊藤 慶一、
中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの長期増殖可能な肝
前駆細胞の分化誘導」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

柳田 絢加、紙谷 聡英、岡田 健、伊藤 慶
一、伊東 秀典、中内 啓光

「発生過程における cdk 抑制因子 p57 による
肝増殖制御機構」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

伊藤 慶一、紙谷 聡英、岡田 健、柳田 絢
加、伊東 秀典、中内 啓光

「胎仔肝幹細胞の自己複製を制御する新規
分子の探索とその機能解明」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

紙谷聡英、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの肝幹・前駆細胞分
化誘導系の構築」

第 15 回肝臓学会大会 (JDDW2011)

福岡国際会議場 2011 年 10 月 20-23 日

紙谷聡英

「肝幹・前駆細胞の長期増殖を制御する細
胞内シグナル伝達機構」

第 46 回 幹細胞治療研究フォーラム

東大医科学研究所 2012 年 3 月 22 日

・国際学会発表

Okada Ken, Kamiya Akihide, Ito Keiichi,
Yanagida Ayaka, Ito Hidenori, Kondou
Hiroki, Nishina Hiroshi and Nakauchi
Hiromitsu

「Prospective isolation and expansion of
hepatoblast during early-fetal liver
development in mice」

Annual Meeting of International Society for
Stem Cell Research

Toronto, June 15-18, 2011

Yanagida Ayaka, Kamiya Akihide, Ito
keiichi, Okada Ken and Nakauchi Hiromitsu,

「Induction of constitutive proliferation of
hepatic stem/progenitor-like cells derived
from human iPS cells

EXCITING BIOLOGIES Cellular

development : Biology at the interface

Kobe, Japan, Sep 29-Oct 1, 2011

Ito keiichi, Kamiya Akihide, Yanagida
Ayaka, Okada Ken and Nakauchi Hiromitsu
「Proliferation of hepatic stem/progenitor
cells by spatio-temporally expressed genes
during development」
EXCITING BIOLOGIES Cellular

development : Biology at the interface
Kobe, Japan, Sep 29-Oct 1, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

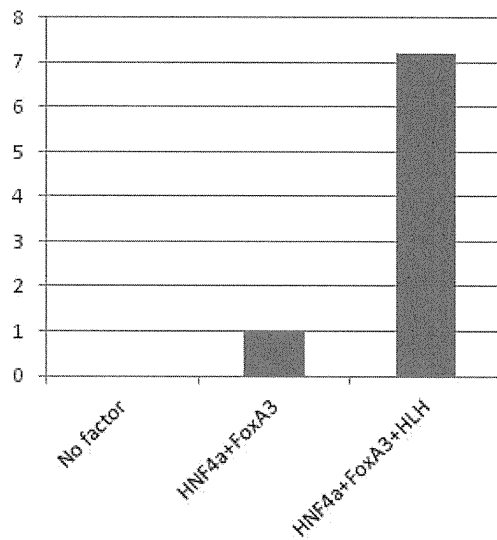
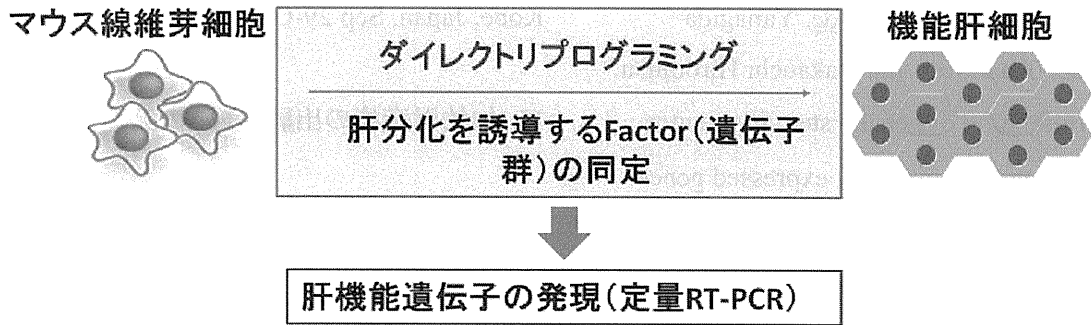


図1 遺伝子導入によるマウス線維芽細胞での肝細胞マーカーアルブミンの発現誘導

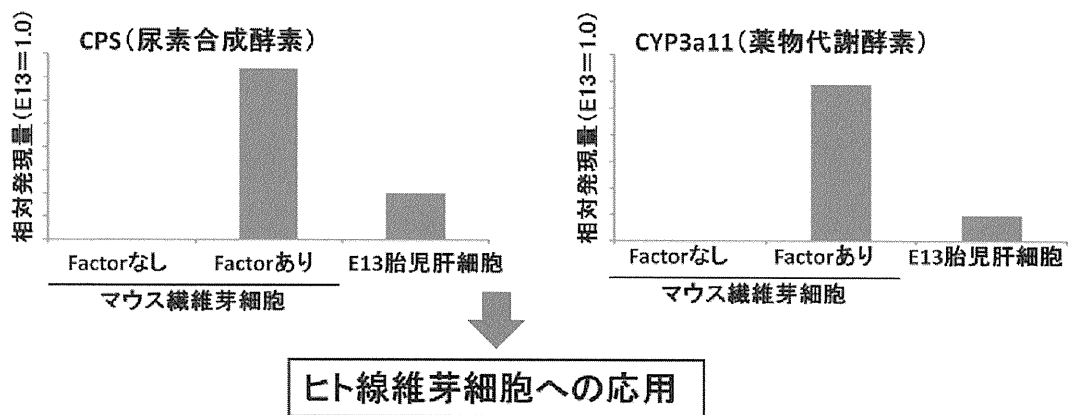


図2 Direct Reprogramming によるマウス線維芽細胞の機能肝細胞への分化誘導

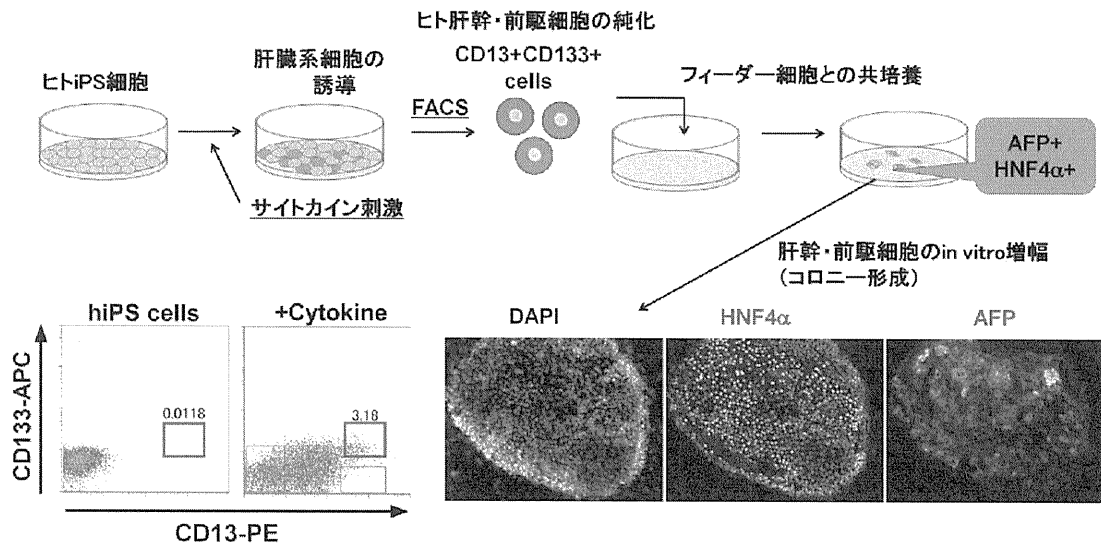


図3 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の分離・培養系の構築

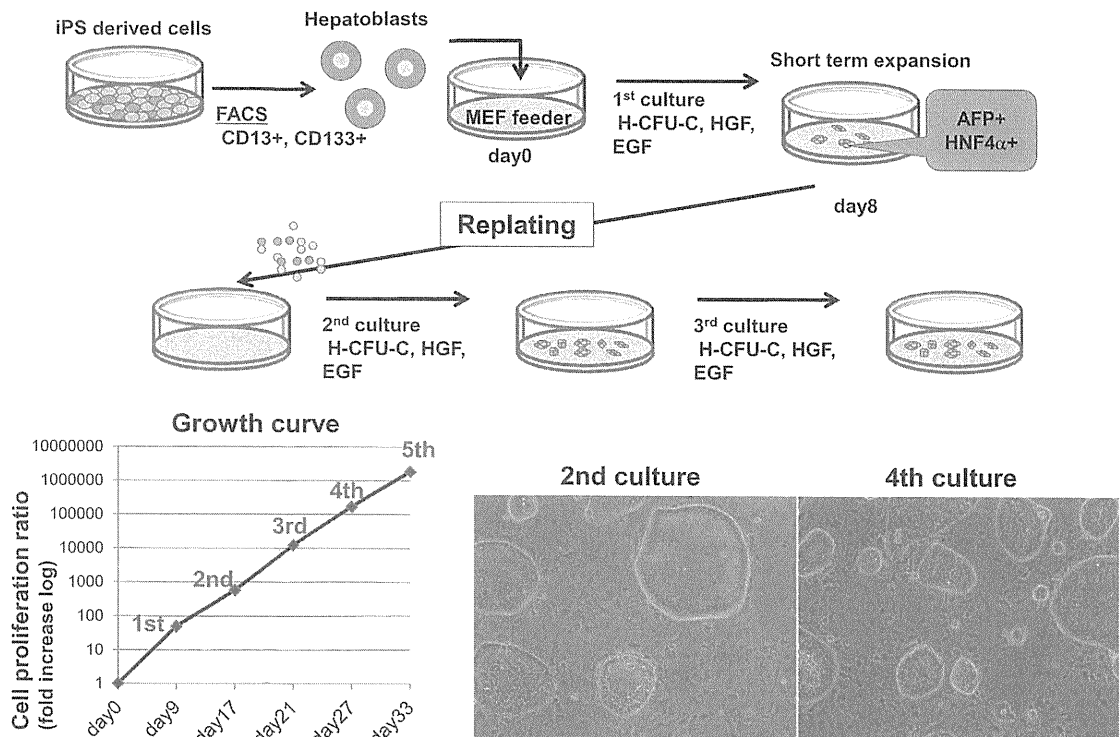


図4 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の長期増殖能

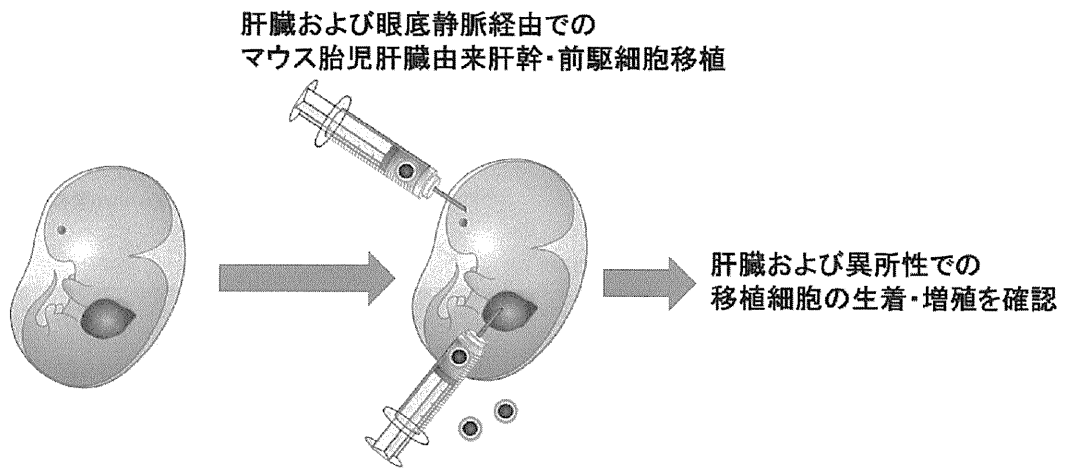


図 5 肝幹・前駆細胞のマウス胎仔・新生仔への移植系

II. 研究に関するの刊行物の一覧表

研究に関するの刊行物の一覧表

雑誌

原著論文

(1) Ito H, Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Okada K, Nakauchi H*. In vitro expansion and functional recovery of mature hepatocytes from mouse adult livers. *Liver Int.* 32(4):592-601. **2012** (*Corresponding Authors)

(2) Okada K, Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Ito H, Kondou H, Nishina H, Nakauchi H*. Prospective Isolation and Characterization of Bipotent Progenitor Cells in Early Mouse Liver Development. *Stem Cells Dev.* 21(7):1124-33. 2012 (*Corresponding Authors)

総説

(1) Kamiya A, Miyajima A. Mice with artificial human liver. *Hepatology.* 55(3):974-976. **2012**

III. 研究に関するの刊行物の別刷

BASIC STUDIES

***In vitro* expansion and functional recovery of mature hepatocytes from mouse adult liver**

Hidenori Ito¹, Akihide Kamiya¹, Keiichi Ito¹, Ayaka Yanagida¹, Ken Okada¹ and Hiromitsu Nakauchi^{1,2}

1 Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

2 Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi-shi, Saitama, Japan

Keywords

drug metabolism – *in vitro* expansion – mature hepatocyte

Abbreviations

2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; CK, cytokeratin; CPS, carbamoyl phosphate synthetase; CYP, cytochromes P450; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; GSK, glycogen synthase kinase; HGF, hepatocyte growth factor; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; MEF, mouse embryonic fibroblasts; MEK, MAPK/ERK kinase; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TAT, tyrosine aminotransferase; TGF, tumour growth factor.

Correspondence

Akihide Kamiya, PhD, and Hiromitsu Nakauchi, MD, PhD
Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokane-dai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan
Tel: +81 3 5449 5330
Fax: +81 3 5449 5451
e-mails: kamiyaa@ims.u-tokyo.ac.jp; nakauchi@ims.u-tokyo.ac.jp

Received 23 August 2011

Accepted 8 December 2011

DOI:10.1111/j.1478-3231.2011.02741.x

The liver is an organ central to the maintenance of homeostasis *in vivo*. Hepatocytes, the main cellular component of the adult liver, express many enzymes and proteins required for mature liver functions, such as amino acid and lipid metabolism, gluconeogenesis, synthesis of serum proteins and xenobiotic detoxifica-

Abstract

Background: Mature hepatocytes retain the ability to regenerate the liver lobe fully *in vivo* following injury. Several cytokines and soluble factors (hepatocyte growth factors, epidermal growth factors, insulin and nicotinamide) are known to be important for proliferation of mature hepatocytes *in vitro*. However, hepatocytes monolayer-cultured on extracellular matrices have gradually lost their specific functions, particularly those in drug metabolism. **Aim:** We have explored and established a new culture system for expansion of functional hepatocytes. **Methods:** We evaluated two approaches for efficient expansion of mature hepatocytes: (i) Co-culture with mouse embryonic fibroblasts (MEF); (ii) Addition to culture of inhibitors of cell signals involved in liver regeneration. After expansion steps, 3-dimensional spheroid-forming culture was used to re-induce mature hepatocellular function. **Results:** The addition of inhibitors for tumour growth factor (TGF) β and glycogen synthase kinase (GSK) 3 β efficiently induced *in vitro* expansion of mature hepatocytes. Although expression of hepatocellular functional genes decreased after expansion in monolayer culture, their expression and the activity of cytochrome P450 enzymes significantly increased with spheroid formation. Furthermore, when hepatocytes were co-cultured with MEF, addition of a MAPK/ERK kinase (MEK) inhibitor at the spheroid formation step enhanced drug-metabolism-related gene expression. **Conclusion:** Combination of the MEF co-culture system with the addition of inhibitors of TGF β and GSK3 β induced *in vitro* expansion of hepatocytes. Moreover, expression of mature hepatocellular genes and the activity of drug-metabolism enzymes in expanded hepatocytes were re-induced after spheroid culture.

tion. Cytochromes P450 (CYP, a superfamily of hemo-proteins), catalyses the conversion of hydrophobic chemicals to more polar derivatives and is highly expressed in mature hepatocytes (1). The substrates of CYP include a wide variety of exogenous carcinogens and drugs as well as endogenous substrates, such as

steroid hormones or fatty acids. Primary hepatocytes and microsomes derived from hepatocytes are frequently used for the analysis of drug metabolism and hepatotoxicity. During liver regeneration *in vivo*, mature hepatocytes are temporally induced to divide with recovery of liver functions (2). Mature hepatocytes can also proliferate for a long time *in vivo*, as shown by serial transplantation of hepatocytes into mice with liver injury (3). Despite their high proliferation capacity *in vivo*, isolated hepatocytes lose viability and markers of hepatocellular differentiation within 3–4 days under normal culture condition (4, 5). Therefore, effective culture systems that maintain both proliferative activity and mature functions must be developed to permit expanded use of hepatocytes in pharmacologic analysis.

Several groups have studied culture systems that induce constitutive expansion of mature hepatocytes. Hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF) and tumor growth factor (TGF) α , which are important factors for *in vivo* liver regeneration, stimulate DNA synthesis in mature hepatocytes *in vitro* (6, 7). Addition of nicotinamide prolongs proliferation of mature hepatocytes (8, 9). In addition, a specific fraction of adult hepatocytes, known as small hepatocytes, were found to exhibit high proliferative activity and bi-potency for differentiation into hepatocytic and cholangiocytic cells (10, 11). However, after two-dimensional (2D) monolayer culture on several extracellular matrices, the functional characteristics of adult hepatocytes were down-regulated. When freshly isolated from livers, adult hepatocytes strongly expressed liver-enriched transcription factors (HNF1 α , 1 β , HNF3 α , β , γ and HNF4 α) for hepatocellular functional genes. Nevertheless, when these cells were cultured on collagen-coated dishes, expression of hepatocellular functional genes was significantly down-regulated because expression of these transcription factors fell during *in vitro* culture. Of interest is that addition of nicotinamide and matrigel to the culture partially induced expression of these genes (5, 7). In addition, primary hepatocytes cultured on moderately adhesive surfaces or cultured using hanging-drop technique spontaneously self-assemble into spherical aggregates ('spheroid formation'). Hepatocytes in the spheroids maintain expression of liver-enriched transcription factors and mature liver functions (12–14). In addition, several growth factors and dexamethasone induce expression of mature functional genes in 3D hepatic organoid culture (15). These results suggest that hepatocellular tertiary structure is important in maintenance of mature liver functions. However, we know of no study of de-differentiated hepatocytes that have recovered mature hepatocellular functions (i.e. CYP activity) on expansion using several growth factors.

In this study, we found that co-culture with mouse embryonic fibroblasts (MEF) or the addition to culture of inhibitors of cell signals modestly induced proliferation of mature hepatocytes from adult mouse livers. Activation of β -catenin signalling using inhibitor for

glycogen synthase kinase (GSK) 3 β and inhibition of TGF β signalling significantly induced expansion of mature hepatocytes. Although these hepatocytes lost their mature hepatocellular functions during *in vitro* expansion, hepatocellular aggregation induced by hanging-drop culture permitted recovery of expression of several mature enzymes. In particular, spheroid formation in the presence of inhibitor of MAPK/ERK kinase (MEK) efficiently induced drug metabolic activity *in vitro*.

Materials and methods

Materials

C57BL/6NCrSlc mice and green fluorescent protein (GFP) transgenic mice (Nihon SLC, Shizuoka, Japan) were used in this study. All animals were treated under guidelines of the Institute of Medical Science, The University of Tokyo. Purchased reagents included Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), DMEM/Ham's F12 half medium, penicillin/streptomycin/L-glutamine (100 \times), dexamethasone, nicotinamide, trypsin/EDTA, donkey serum and gelatin from porcine skin (Sigma, St Louis, MO, USA); insulin-transferrin-selenium X, non-essential amino acid solution, Hepes buffer solution and TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); fetal bovine serum (FBS: Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan); HGF and EGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA); collagen type I (Nitta Gelatin, Osaka, Japan); the selective MEK1/2 inhibitor N-[[2-(2,3-dihydroxypropoxy)-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide (PD0325901) and the selective GSK3 β inhibitor 6-[[2-[[4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile (CHIR99021: both Axon Biochemicals, Groningen, The Netherlands); the Rho-associated protein kinase inhibitor 4-[[1R)-1-aminoethyl]-N-4-pyridinyl-trans-cyclohexanecarboxamide, dihydrochloride (Y-27632; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan); the activin receptor like kinase (activated by TGF β family) inhibitor A-83-01 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) (16); Percoll solution (GE Healthcare UK, Amersham, UK).

Conditioned medium for *in vitro* expansion

To collect conditioned medium derived from mid-fetal mouse livers, we cultured E14 fetal liver cells dissociated using collagenase (17). Both parenchymal and non-parenchymal cells from fetal livers were cultured on gelatin-coated dishes. After 1 day of culture, non-attached hematopoietic cells were washed out with phosphate-buffered saline (PBS). Attached cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1 \times penicillin/streptomycin/L-glutamine, 1 \times non-essential amino acid solution, and 10⁻⁷ M dexamethasone. Conditioned media (3–5 day culture; 5–7 day culture) were collected and passed through 0.45 μ m sterile filters.