

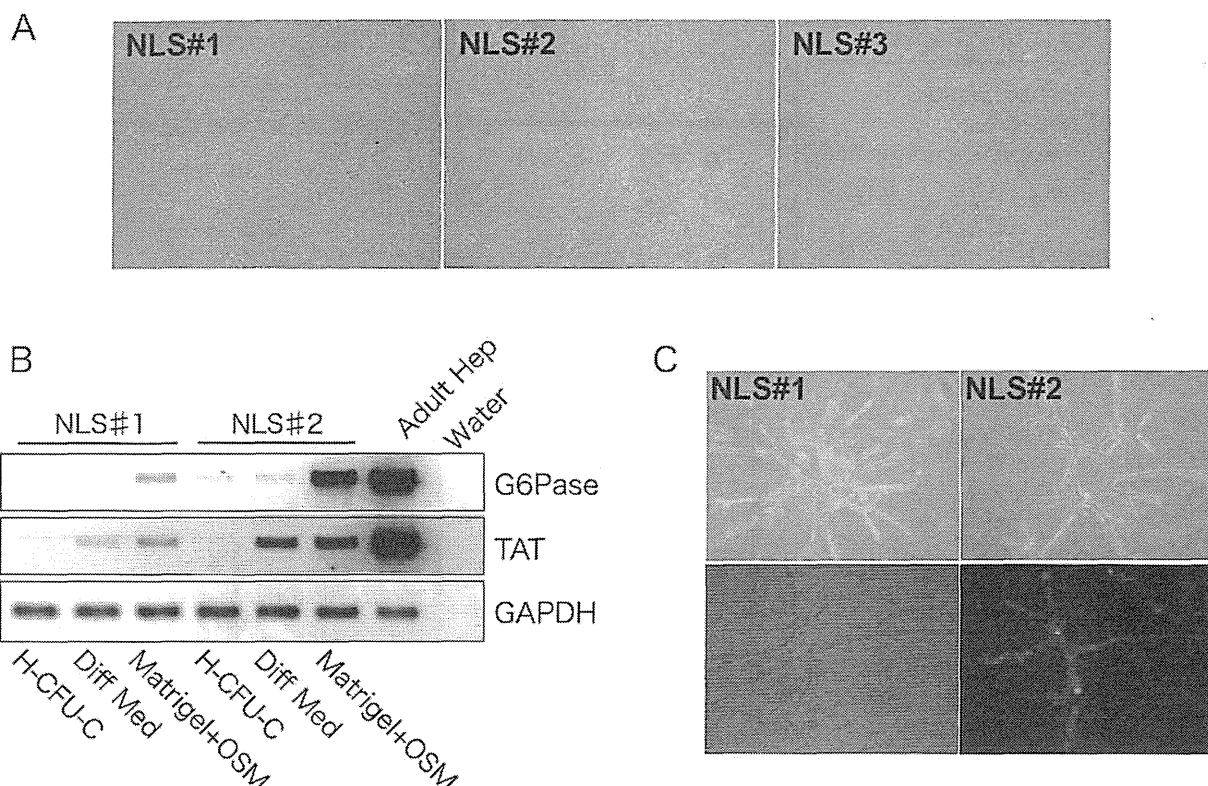


図5 正常成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞様細胞の性状解析

(A)マウス正常肝臓のCD13⁺CD49f⁺CD133⁺画分を培養し形成された大型コロニーを継代培養することで、長期増殖能を持つNLS (Normal Liver-derived Stem-like) cellを樹立できる。(B, C) NLS細胞は、肝成熟誘導因子(OSM+細胞外マトリクス)添加(B)やコラーゲンゲル培養(C)により、それぞれ成熟肝細胞機能遺伝子の誘導やbranching構造の形成誘導がみられる(文献2より引用)。

化管系)に発現する転写因子である。Sox9発現細胞のLineage Tracingを用いた最近の研究成果から、成体肝臓において胆管系のSox9陽性細胞が成熟肝細胞のTurn Overを制御する幹細胞であることが示された¹³⁾。われわれは成体における肝幹・前駆細胞を分離・同定する目的で、FACSと蛍光標識抗体を用いた成体マウス肝臓の非実質細胞画分の網羅的表面抗原発現解析を行った。その結果、CD13, CD49f, CD133といった表面抗原陽性細胞の中に、single cellで培養した際に大型のコロニーを形成できる肝幹・前駆細胞様細胞が含まれることを明らかとした²⁾。CD13⁺CD49f⁺CD133⁺細胞は、生体肝臓から分離直後はCK19陽性でalbuminを発現

しない胆管系細胞に近い性質を持つ。その一方で培養を続けることで、一部の細胞がalbumin⁺CK19⁺のoval細胞(障害肝臓にみられる高増殖性の肝細胞系細胞。肝前駆細胞の一種と考えられる)に類似した細胞へ分化することを見いだした。成体肝臓ではCD133は胆管系細胞に発現することから、胎仔期における肝芽細胞の一部が胆管系細胞へと分化する過程で、その一部(Canals of Hering構造周辺と考えられる)に多分化能と高増殖性を持つ成体肝幹・前駆細胞が含まれるという形に、発生過程における肝臓の幹細胞システムが変化すると考えられた(図4)。成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞が成熟肝細胞・胆管細胞への分化能を持つのかという問いに

答えるために、われわれはsingle cell由来のCD13⁺CD49f⁺CD133⁺細胞から形成されたコロニーを継代培養した後に、*in vitro*での肝細胞および胆管細胞への分化誘導を行った。OSMおよび細胞外マトリクス添加により成熟肝細胞マーカー（グルコース6リン酸ホスファターゼやチロシンアミノトランスフェラーゼ）の発現誘導がみられる一方で、コラーゲンゲル包埋培養を行うことでCK19陽性のBranching構造が効率的に形成されることを見いだした(図5)。この結果から、成体肝臓由来のCD13⁺CD49f⁺CD133⁺細胞が1細胞から成熟肝細胞および胆管細胞系の両方に分化できる多分化能を持つことを示した。

4 まとめ

本稿では、胎生期および成体肝臓における肝幹細胞システムおよびその分子メカニズムについて解説した。肝臓は外来薬物・アルコール代謝、糖・脂質代謝、血清蛋白質の合成などさまざまな機能を持つ。新規薬物の開発では、肝毒性の評価が重要なステップとみなされており、*in vitro*でのヒト肝細胞を用いた効率的な評価系の構築が求められている。最近では、皮膚細胞から直接的に肝細胞へと分化誘導する系の開発などもすすめられ、肝幹細胞から成熟肝細胞への分化の分子メカニズムを明らかにすることで応用面への研究の広がりも期待できる。

文 献

- 1) Suzuki A, Sekiya S, Onishi M et al : Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48 : 1964–1978, 2008
- 2) Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y et al :

- Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology* 137 : 1114–1126, 2009
- 3) Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H : Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci* 11 : 1302–1310, 2006
 - 4) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S et al : SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 250 : 332–347, 2002
 - 5) Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H et al : Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116 : 1775–1786, 2003
 - 6) Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A et al : Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol* 51 : 127–138, 2009
 - 7) Okada K, Kamiya A, Ito K et al : Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells Dev* 21 : 1124–1133, 2012
 - 8) Schmidt C, Bladt F, Goedecke S et al : Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373 : 699–702, 1995
 - 9) Parviz F, Matullo C, Garrison WD et al : Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 34 : 292–296, 2003
 - 10) Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y et al : Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18 : 2127–2136, 1999
 - 11) Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A et al : Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 43 : 245–256, 2011
 - 12) Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S et al : Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 136 : 1000–1011, 2009
 - 13) Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H et al : Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43 : 34–41, 2011

特集Ⅱ

肝疾患と幹細胞をめぐる進歩

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*

紙谷 聡英**

Key Words : hepatic stem/progenitor cell, iPS cells,
liver development

はじめに

幹細胞は自己複製能力と多分化能を持つ特徴的な細胞であり、生体の発生や器官再生などに重要な役割を果たしている。幹細胞には大きく2つの種類があり、生体のさまざまな組織に存在し、その組織の機能細胞へと分化できる体性幹細胞と、三胚葉すべての細胞への分化能を持つ多能性幹細胞に分けられる。2012年度のノーベル医学生理学賞に京都大・山中教授の人工多能性幹細胞(iPS細胞)が選出されるなど、幹細胞を用いた再生医療の実用化・創薬への応用が期待されている。本稿では、肝臓における幹細胞の性状、特に多能性幹細胞からの肝幹・前駆細胞の分化誘導系を中心に解説する。

生体組織における肝幹細胞システム

体性幹細胞は、血液幹細胞、毛根の色素幹細胞、小・大腸幹細胞などがあり、組織の再生・新陳代謝に関与している。肝臓は、固形臓器としては稀な高い再生能力を特徴として持つ。しかし、通常の組織再生では最終分化した成熟肝細胞が一時的に増殖能力を回復し再生を行うことから、肝再生過程における幹細胞の研究は遅れていた。近年、フローサイトメーターと細胞

表面抗原特異的抗体を組み合わせた細胞分画法を用いて胎児期および成体における肝幹・前駆細胞の同定・培養が可能となり、その性状が徐々に明らかとなってきた(図1)。発生初期過程では、肝臓は腸管の一部が心臓・横中隔からの液性因子の刺激により肝芽(肝臓の初期原基)に分化する¹⁾²⁾。肝芽では、肝芽細胞(胎児期の肝幹・前駆細胞)が活発に増殖するとともに、肝発生の進行に伴い肝臓内の周囲の細胞(血液細胞や線維芽細胞など)からのシグナルを受け、成熟肝細胞・胆管細胞へと分化し、成体肝臓組織を形成していく³⁾。この肝芽細胞のマーカーとしてCD49f, Dlk, Liv2などの表面抗原が報告されており、われわれも表面抗原抗体を用いた網羅的解析からCD13, CD133を肝芽細胞特異的マーカーとして同定している^{4)~7)}。

一方、成体肝臓では慢性的な炎症状態など強い肝障害の際にoval細胞と呼ばれる前駆細胞が出現することが知られていたが、正常肝臓に肝幹・前駆細胞が存在するかは不明な点が多かった。Reidらは、ヒト肝組織の解析からEpCAM陽性の肝幹・前駆細胞を分離している⁸⁾。さらに、EpCAMがマウス正常肝および障害肝での肝前駆細胞のマーカーであることが報告されている⁹⁾。われわれはマウス正常肝臓を酵素的に分散し、表面抗原の発現を網羅的に解析することで、最終的にCD13⁺CD47⁺CD133⁺陽性の高増殖性細胞の分離に成功した¹⁰⁾。この細胞は長期増殖が可能であり、

* Differentiation of human ES and iPS cells into hepatic stem/progenitor-like cells.

** Akihide KAMIYA, Ph.D.: 東海大学創造科学技術研究機構医学部門[〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143]; Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, Isehara, Kanagawa 259-1193, JAPAN

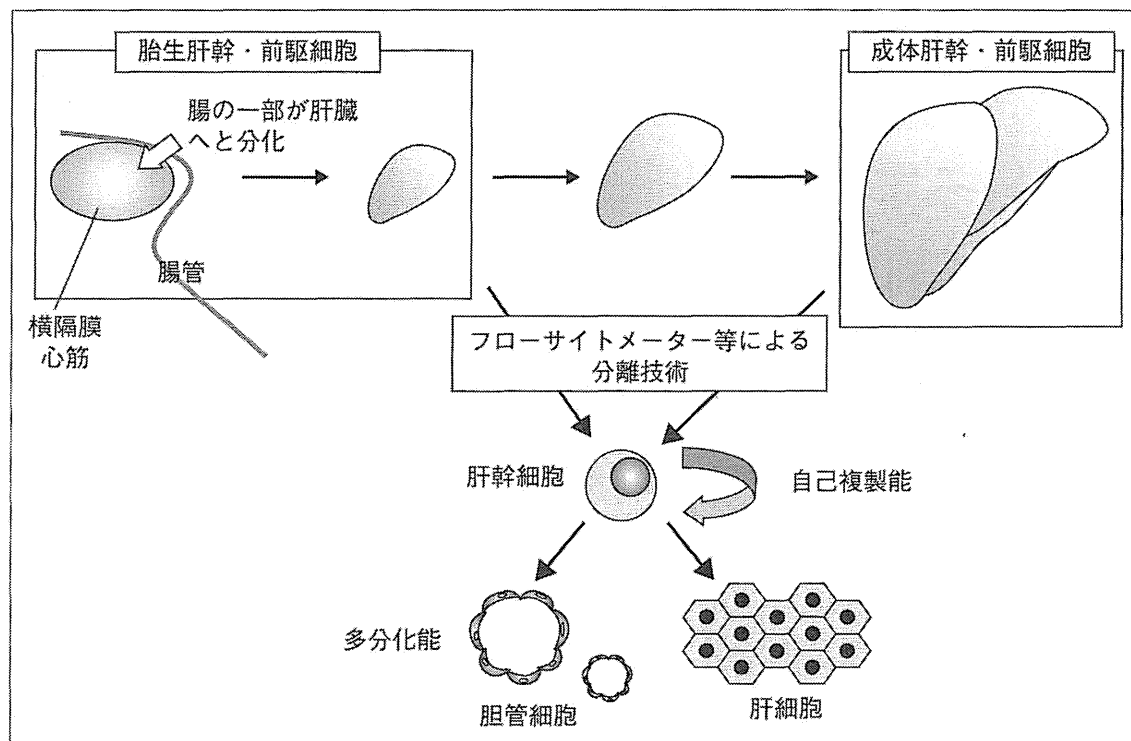


図1 胎児および成体肝臓における幹・前駆細胞

肝臓は発生初期に腸管の一部が肝芽へと分化することで生じる。この肝芽に含まれる肝幹・前駆細胞(肝芽細胞)は活発な増殖力を持つとともに、成熟肝細胞および胆管細胞への分化能を保持する。一方、成体肝臓にも肝幹・前駆細胞が存在し、重篤な肝障害の際などに機能すると考えられる。

成熟肝細胞と胆管細胞への分化能を持つ幹・前駆細胞であることを示した。成体肝臓ではCD133は胆管系細胞に発現することから、胎仔期における肝芽細胞の一部が胆管系細胞へと分化する過程で、その一部(canals of Hering構造周辺と考えられる)に多分化能と高増殖性を持つ成体肝幹・前駆細胞が含まれるという形に、発生過程における肝臓の幹細胞システムが変化すると考えられた(図2)。実際に、胆管などのマーカーであるSox9陽性細胞から分化する細胞系譜をlineage tracingの手法を用いて解析した研究では、正常肝臓においても成熟肝細胞の新陳代謝にSox9陽性の胆管様細胞が関与していることが報告されている¹¹⁾。

多能性幹細胞と肝細胞系への分化誘導

多能性幹細胞は、ほぼ無限といえる高い増殖・自己複製能力とさまざまな臓器の機能細胞へと分化可能な多能性を持つ細胞であり、その特性から再生医療に最適なソースとして考えられている(図3)。多能性幹細胞には、受精卵(胚盤胞)

の一部の細胞を培養して作製するembryonic stem細胞(ES細胞)と体細胞(皮膚・血液細胞など)に山中因子(Oct3/4, Sox2, Klf4など)を遺伝子導入して作成するinduced pluripotent stem細胞(iPS細胞)がある。ヒトES細胞は1998年にジェームズ・トムソン博士らによって樹立されたが、生命の萌芽である受精卵を破壊するという倫理的問題や、受精卵の遺伝的バックグラウンドや免疫学的性質を引き継ぐためにES細胞から作製した機能細胞や組織を他人に移植しても免疫的に拒絶されるという問題点があった¹²⁾。この問題を解決したのが、2007年に山中教授によって作製されたヒトiPS細胞である¹³⁾。ヒト個体から容易に採取できる皮膚や血液細胞に複数の遺伝子を導入し培養することで、ほぼES細胞と同等の増殖能・多分化能を持つiPS細胞が得られることがわかった。受精卵を破壊して作製する必要がないために倫理的問題を解決するとともに、患者本人からiPS細胞を樹立し目的の細胞へと分化・移植を行うことで、ほぼ免疫的に拒絶を受けない移植が可能になると期待されている。初期のiPS細胞

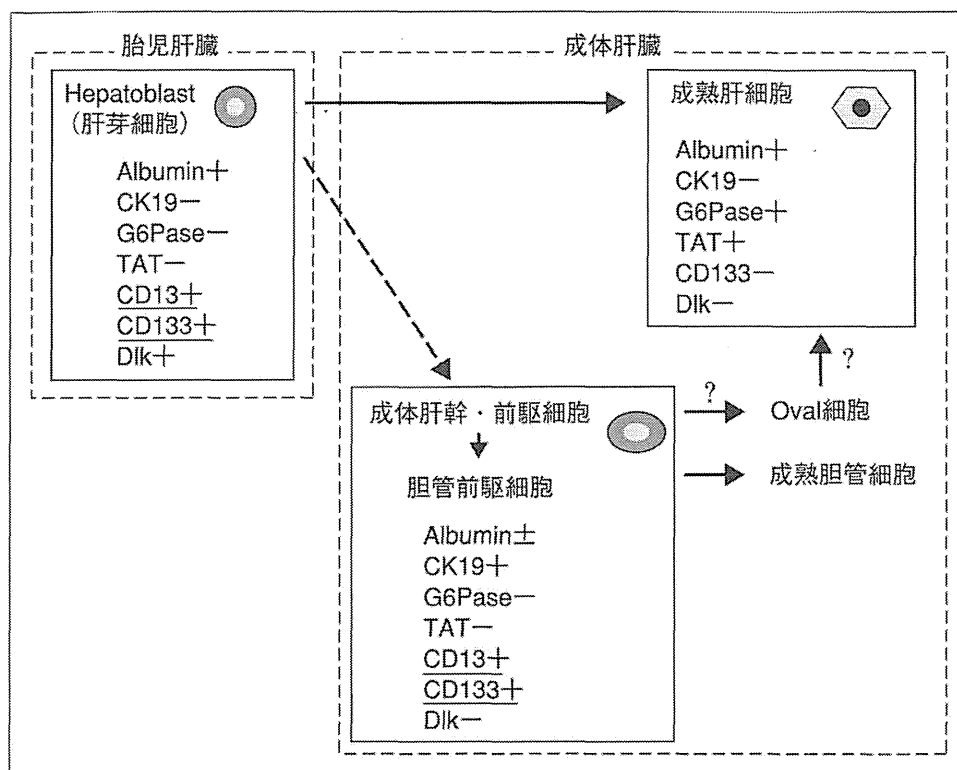


図2 肝発生過程における肝幹・前駆細胞の変化

胎児期の肝幹・前駆細胞はCD13, CD133の他Dlk1などを細胞表面マーカーとして発現している。またalbuminの発現量が高い一方でcytokeratin19 (CK19)などの発現は非常に弱い。一方、成体肝臓における幹・前駆細胞はCD13, CD133など胎児期と共通する細胞表面マーカーを発現する一方で、Dlk1などは発現しない。また、albuminの発現量が非常に低い一方でCK19の発現上昇がみられ、より胆管細胞に近い細胞であると考えられる。

の作製にはレトロウイルスを用いるために、山中因子が染色体に導入され将来の癌化などの危険を伴うことが指摘されていたが、近年エプゾーマルベクターなど染色体を変異させないiPS細胞誘導法が確立され、日本においても網膜色素上皮変性症への移植治療など実際にヒトiPS細胞を用いた再生医療の開始が計画されている¹⁴⁾。

ヒトES, iPS細胞を再生医療や創薬へと応用するには、目的の細胞系譜への効率的な分化誘導系が不可欠である。肝臓系細胞への分化誘導系は、生体の肝発生を模倣する形で行われる。初期肝臓原基は、内胚葉系細胞共通の前駆細胞であるendodermal progenitor cellより発生する。多能性幹細胞からendodermal progenitor cellの分化誘導に必要なのがTGFβファミリーに属するActivin Aである。Activin Aは多能性幹細胞に高濃度で作用するとendodermal progenitor cellへの分化誘導を促進する濃度依存性が知られている。また、ケモカイン受容体のCXCR4が特異的

マーカーとして報告されており、分化誘導系内のE-cadherin⁺CXCR4⁺細胞がendodermal progenitor cellとして純化できる¹⁵⁾。発生過程では、腸管のendodermal progenitor cellが心臓細胞からのfibroblast growth factor (FGF)や横隔膜細胞からのbone morphogenetic protein 4 (BMP4)の作用により初期肝細胞へとspecificationを受ける¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、胎生期の肝細胞の増殖には肝細胞増殖因子(HGF)が必須である¹⁸⁾。そこで、Activin Aに続いてFGF, BMP4, HGFと連続的にこれらのサイトカインを添加することで、ヒト多能性幹細胞からの効率的な肝細胞誘導系が構築され、ヒトiPS細胞からSox9, CXCR4陽性のendodermal progenitor cell, FoxA2陽性の初期肝芽細胞, HNF4α, αフェトプロテイン陽性の幼弱肝細胞と発生段階と同様に段階的に分化することが報告された¹⁹⁾。

このように胎仔肝発生の分子メカニズムを理解することは、多能性幹細胞からの効率的な肝

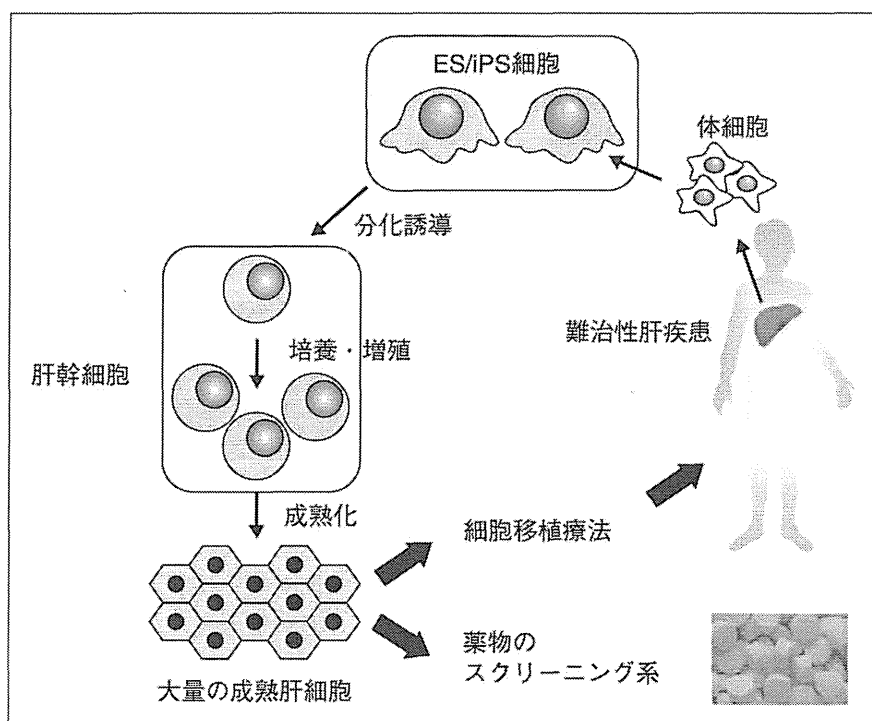


図3 多能性幹細胞を用いた肝疾患治療・創薬への応用

iPS細胞誘導技術の進化により、血液などの侵襲性の低い細胞を用いて多能性幹細胞の樹立が可能になった。そこで、健康人または肝疾患患者からiPS細胞を樹立し、肝幹・前駆細胞を分化誘導する。試験管内で必要な細胞数にまで増殖させた後に成熟肝細胞へ分化誘導することで、創薬や肝細胞移植療法に使用可能な大量の成熟肝細胞を得ることができる。

分化誘導系の確立には必須である。われわれは、胎生期肝細胞の培養系を構築し、さまざまなサイトカイン・液性因子を添加することで、肝細胞の成熟過程に重要な因子の探索を行った。胎生期の肝臓は造血幹細胞が活発に増殖する造血器官として機能することが知られている。われわれは胎生肝臓に多数存在する血液細胞から供給されるオンコスタチンM(OSM)が、胎生肝細胞からの成熟肝細胞への分化を誘導することを見出した²⁰⁾。OSMは多能性幹細胞から誘導した幼弱肝細胞を成熟化させる際にも用いられている。しかし、多能性幹細胞由来成熟肝細胞は、薬物代謝酵素などの肝臓の代謝に必須な遺伝子群の発現が生体内の肝細胞と比較して非常に低いことが知られており、発生過程での肝成熟化過程に重要な分子群が同定されることで、多能性肝細胞からのより高機能な肝細胞の誘導が可能になると予想される。

多能性幹細胞からの 肝幹・前駆細胞様細胞の誘導系

難治性肝疾患に対する肝細胞移植療法や創薬における肝毒性評価など成熟ヒト肝細胞の需要が高まっている。現在、脳死ドナー肝臓から分離された肝細胞が用いられるが、遺伝的な均一性などからヒト多能性幹細胞(ES,iPS細胞)から誘導された成熟肝細胞がそのソースとして期待されている。しかし、成熟肝細胞を機能を維持したまま試験管内で増幅することは困難で、大量のヒト肝細胞を得る手段の開発が必要とされる。そこでわれわれは、多分化能と高増殖能を持つ肝前駆細胞をヒト多能性幹細胞から誘導し、試験管内での長期培養により多数の細胞を得た後に、成熟肝細胞等へ分化誘導できる系の構築を目的として研究を行っている。ヒトiPS細胞を既報に従ってサイトカインの連続添加(Activin A 4日間, FGF+BMP4 3~4日間, HGF 3~4日間)によって刺激することで、AFP⁺HNF4α⁺の幼

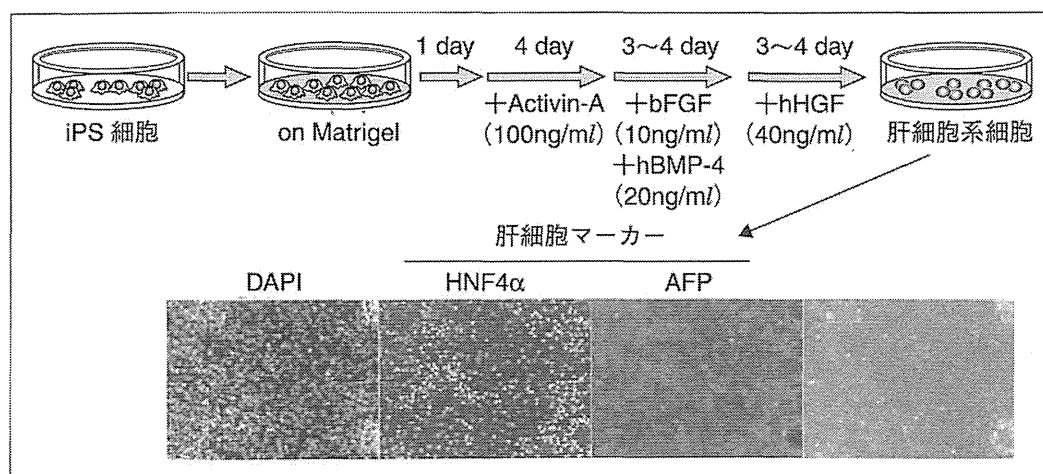


図4 多能性幹細胞からの肝臓系細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞は、Activin A, basic fibroblast growth factor (bFGF), bone morphogenetic protein (BMP) 4, hepatocyte growth factor (HGF)の連続的添加により、HNF4αおよびαフェトプロテイン(AFP)陽性の幼弱肝細胞へと分化する。

弱肝細胞へと分化誘導できる(図4)。得られた細胞画分内に高増殖性の肝前駆細胞様の細胞が存在するか、低密度培養によるコロニーアッセイによって検討した。しかし、分化誘導したiPS細胞由来肝臓系細胞を酵素的に分散し単独でculture dish上で培養した結果、高い増殖性を示すものはみられなかった。われわれは培養系に問題がある可能性を考慮し、まずマウス胎児肝臓由来細胞をモデルとして肝幹・前駆細胞の新規培養系を構築した。初期肝臓原基では、腸管から分化した初期肝幹・前駆細胞が横隔膜に侵入しつつ増殖することで肝発生過程が進行する。肝幹細胞マーカーCD13, CD133, Dlk等を用いて肝発生初期の肝幹・前駆細胞を純化しその性質を詳細に解析した結果、高い細胞増殖のためには間葉系細胞との相互作用が必要なことを見出した²¹⁾。ヒトiPS細胞からの肝分化誘導系においても、肝前駆細胞の増殖に間葉系細胞との相互作用が必要な可能性を考え、mouse embryonic fibroblast (MEF)との共培養系を構築した(図5)。ヒトiPS細胞をサイトカイン刺激によって誘導した後に、肝幹・前駆細胞マーカーであるCD13およびCD133の発現を解析した。その結果、サイトカイン刺激に伴ってCD13, CD133両陽性細胞が出現することを見出した。この細胞画分をFACSを用いて純化し、MEFをフィーダー細胞として低密度で培養した結果、1細胞から増殖し100細

胞以上からなる大型のコロニーを形成できる高増殖性の細胞が多数含まれることを見出した。このコロニーは、AFP⁺HNF4α⁺の肝臓系細胞であり、他の画分(CD13およびCD133の発現が低い細胞集団)では高いコロニー形成能はみられなかった。以上の結果から、CD13およびCD133を用いることで、ヒトiPS細胞分化系から肝前駆細胞様細胞(hepatic progenitor-like cell; HPC)を純化できることを見出した。次にわれわれは、ヒトiPS細胞由来HPCの試験管内での長期増殖能について検討した。ヒトiPS細胞を肝細胞系へと分化誘導した後に、CD13⁺CD133⁺細胞を純化・培養しコロニーを形成させた(1st culture)。得られたコロニーを酵素的に分散し、新規フィーダー細胞上に低密度で播種した(2nd culture)。同様に得られたコロニーを継代培養し、各段階での細胞数を計測した結果、サイトカイン・シグナル伝達阻害剤などの添加により1か月以上にわたり増殖可能なことを見出した。数継代後のコロニーを肝細胞マーカーなどで染色したところ、HNF4αやAFPといった肝細胞マーカーの発現が維持されている一方で、一部の細胞で胆管細胞マーカー(CK7)の発現が上昇することを見出した。以上の結果から、われわれの分離したヒトiPS細胞由来HPCが、その一部は胆管などの細胞系列へと分化するものの、コロニー形成能を維持したまま長期増殖が可能なことを見出した。

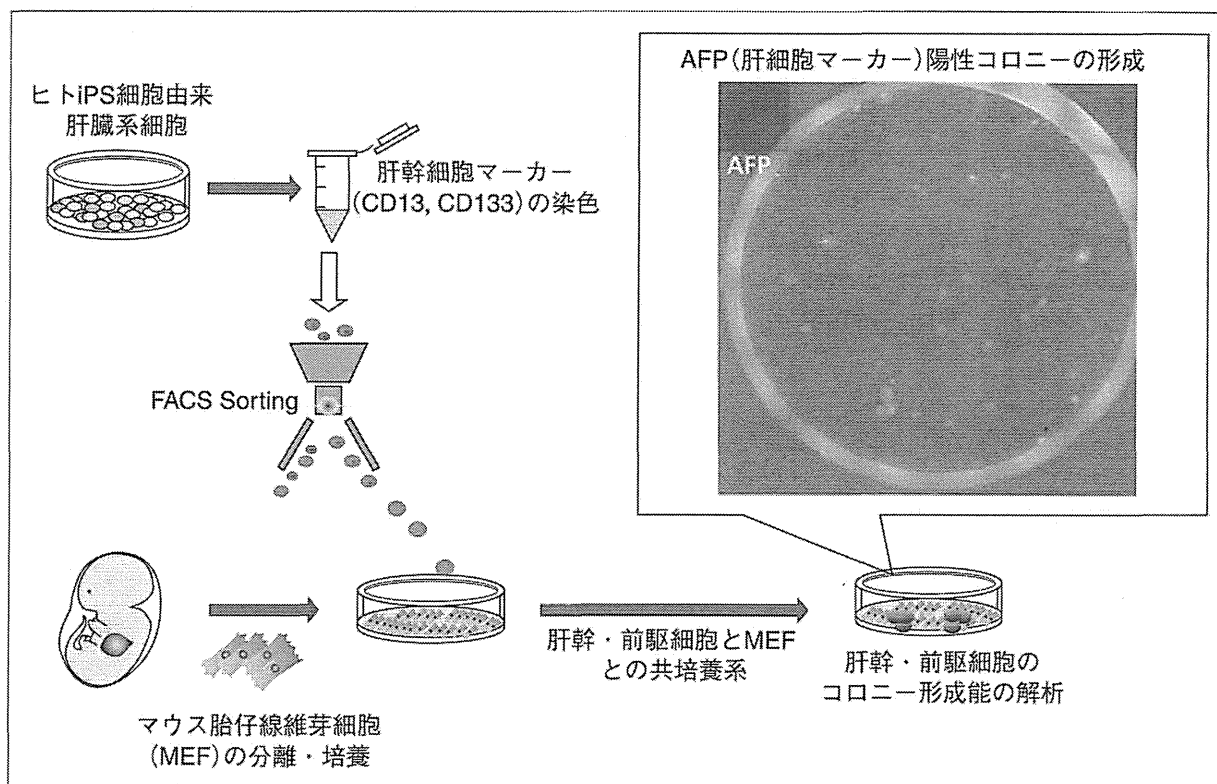


図5 正常成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞様細胞の性状解析

iPS細胞から分化誘導した肝臓系細胞中のCD13⁺CD133⁺画分をフローサイトメーターを用いて純化し、マウス胎児線維芽細胞(MEF)上で培養した。低密度で細胞を播種した際に、1細胞に由来するAFP陽性の大型コロニーが多数形成され、この画分に高増殖性と肝細胞系への分化能を持つ肝前駆細胞様細胞が多数含まれることを見出した。

肝幹・前駆細胞の特徴の一つは、さまざまな機能細胞への多分化能である。発生過程の肝臓では、肝芽細胞が増殖しつつ成熟肝細胞・胆管細胞へと分化していく。そこで、ヒトiPS細胞由来HPCの2方向分化能について検討した。肝臓は、外来薬物などの代謝の重要器官であり、成熟肝細胞はさまざまな薬物代謝酵素(cytochrome P450)を発現している。肝前駆細胞は、3次元培養による細胞間接着の促進により、より成熟した細胞へと分化することが知られている²²⁾。ヒトiPS細胞由来HPCをハンギングドロップ法により細胞凝集塊を作製することで細胞分化を誘導した結果、成熟肝細胞マーカーであるcytochrome P450遺伝子の発現が誘導されることがわかった。また、マウス肝前駆細胞を基底膜様の細胞外マトリクス(ラミニンなど)を含むゲル培地で培養することで、胆管様の上皮管腔構造が誘導されることが報告されている²³⁾。そこで、ヒトiPS細胞由来HPCでも同様に胆管様に分化可能か検討を行った。その結果、マトリゲル等を含むゲル培

地で培養しさまざまなサイトカインで刺激することで、極性を持つ上皮管腔構造が誘導されることがわかった。この一部は胆管細胞マーカーであるCK7を発現しており、ヒトiPS細胞由来HPCが胆管系への分化能を持つことが示された。以上の結果から、われわれが樹立したヒトiPS細胞由来HPCが試験管内での長期増殖能とともに、成熟肝・胆管細胞への分化能を持ち、高増殖性と多分化能という前駆細胞としての性質を保持した細胞であることが示された。

多能性幹細胞由来

肝幹・前駆細胞様細胞の応用・可能性

肝細胞の発現する薬物代謝酵素の発現量・活性は、個々人での個体差があることが知られている。さまざまな薬物代謝酵素の発現プロファイルの違いは、投与薬物の代謝量の差、さらには肝毒性や副作用の個人差の原因となる。新規創薬の過程や治療段階において、投与薬物による個人差を*in vitro*で簡便に判断できる系の構築

は非常に有用と考えられる。iPS細胞技術により、個人の遺伝子情報を反映した多能性幹細胞が血液などの容易に採取可能なサンプルから樹立可能になった。そこで、薬物代謝酵素の発現に関係するさまざまな遺伝的背景を持つ個人から多能性幹細胞を樹立した上で、肝幹・前駆細胞さらに成熟肝細胞への分化誘導を行うことで、薬物代謝の個人差を反映する肝細胞ライブラリーの作製が可能となる。われわれが今回樹立したヒトiPS細胞由来の肝前駆細胞様細胞は、高増殖性や分化能を持つ一方で凍結保存が可能という利点がある。今後、より効率的な成熟肝細胞への分化誘導系を構築していくことで、創薬などへの応用を可能にすることを計画している。

ヒトにおける肝分化の分子メカニズム・発生過程は、胎児等を実験に使用する倫理的課題などの問題からこれまで解析が困難であった。ヒトiPS細胞は倫理的課題を克服しつつ、生体の発生過程と類似した分化能を持つことが知られている。われわれが分離したヒトiPS細胞由来HPCも、マウスでの発生過程での解析結果と同様の細胞表面抗原マーカーを持つことがわかっている。したがって、ヒトiPS細胞からの分化誘導系が医療・創薬などの応用だけでなく、ヒトの発生過程を細胞レベルで再現し、そのメカニズムを解析するツールとして使用できる可能性が考えられる。ヒト多能性幹細胞はマウスと異なり相同組換えの効率が低頻度であり、遺伝子の改変等が困難という欠点があった。近年、zinc finger nucleaseやTAL effector nucleaseといった人工ヌクレアーゼを使用することで、ゲノムの任意の場所を改変・編集できる技術の開発が急速に進んでいる²⁴⁾²⁵⁾。今後、このような技術を組み合わせることで、今まで困難であったヒト細胞を用いた発生学の進展がみられると期待される。

文 献

- 1) Douarin NM. An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 1975 ; 53 : 427.
- 2) Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ* 1980 ; 9 : 269.
- 3) Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci* 2006 ; 11 : 1302.
- 4) Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002 ; 156 : 173.
- 5) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, et al. SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 2002 ; 250 : 332.
- 6) Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, et al. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 2003 ; 116 : 1775.
- 7) Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A, et al. Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol* 2009 ; 51 : 127.
- 8) Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1973.
- 9) Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 2009 ; 136 : 1951.
- 10) Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1114.
- 11) Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 34.
- 12) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145.
- 13) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861.
- 14) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011 ; 8 : 409.
- 15) Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, et al. Induction and monitoring of definitive and visceral

- endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 1542.
- 16) Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999 ; 284 : 1998.
- 17) Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 1998.
- 18) Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995 ; 373 : 699.
- 19) Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010 ; 51 : 297.
- 20) Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999 ; 18 : 2127.
- 21) Okada K, Kamiya A, Ito K, et al. Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells Dev* 2012 ; 21 : 1124.
- 22) Koide N, Shinji T, Tanabe T, et al. Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 161 : 385.
- 23) Tanimizu N, Miyajima A, Mostoy KE. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Mol Biol Cell* 2007 ; 18 : 1472.
- 24) Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 851.
- 25) Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. *Cell Stem Cell* 2012 Dec 12 [Epub ahead of print].

* * *

