The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ヒトiPS細胞技術を用いた新規in vitro肝細胞モデルの構築 |
| Author(s) | 三谷, 成二 |
| Citation | 大阪大学, 2019, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/72311 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

| 氏　名　（　三谷成二　） | |
|---|---|
| 論文題名 | ヒトiPS細胞技術を用いた新規in vitro肝細胞モデルの構築 |

論文内容の要旨

ヒトiPS細胞は様々な個人から作製可能であるなどの利点を有し、ヒトiPS細胞から分化誘導して得られる細胞は創薬研究等への応用が期待されている。中でも肝細胞は、創薬研究において、基礎研究として遺伝性肝疾患や肝指向性病原体研究など、非臨床研究として安全性試験や代謝試験など幅広い応用が期待されている。そのため、これまでにヒトiPS細胞から肝細胞を分化誘導する技術の開発が盛んにおこなわれ、肝細胞特異的な機能を有する細胞を効率的に分化誘導することが可能となった。さらに、α1-antitrypsin欠乏症などの遺伝性肝疾患患者から樹立したヒトiPS細胞由来の肝細胞がin vitroで病態を再現可能であること、肝硬変や肝がんなどの重篤な肝疾患の原因となるC型肝炎ウイルスのin vitro感染評価系としてのヒトiPS細胞由来肝細胞の有用性なども報告された。一方で、2013年時点では、C型肝炎ウイルスと同様に重篤な肝疾患の原因となり、新たなin vitro感染評価系の構築が望まれているB型肝炎ウイルスに関する報告はなされていない。また、生体の肝臓において、肝細胞は肝小葉の位置(zone 1, 2, 3と分けられる)に応じて異なる性質を示すことが知られている（liver zonation）。例えば、zone 3と呼ばれる中心静脈周囲の肝細胞は高い薬物代謝能を有している。しかし、liver zonation形成メカニズムは未解明な点が多く、ヒトiPS細胞からzone特異的な性質を有する肝細胞を作り分けることはできていない。そのため、本研究では、ヒトiPS細胞技術を用いたHBV in vitro感染評価系の構築に向けた検討と同時に、新たにzone特異的な性質を有する肝細胞を分化誘導する技術の開発を試みた。

まず、ヒトiPS細胞由来肝細胞のHBV in vitro感染評価系としての有用性を調べた(1)。はじめに、ヒトiPS細胞由来肝細胞におけるB型肝炎ウイルス（HBV）の感染、複製に関与する因子の遺伝子発現をqRT-PCR法により解析した。その結果、HBVの感染受容体として知られているナトリウムタウロコール酸共輸送体ポリペプチド（NTCP）やHBV-RNAの転写に関与するhepatocyte nuclear factor 4 alpha（HNF4α）などは、ヒトiPS細胞から肝細胞へ分化誘導することによって発現が上昇した。さらに、HBV粒子（HBV恒常発現細胞株HepG2.2.15.7細胞由来genotype D）を用いて、ヒトiPS細胞由来肝細胞へのHBV感染実験を実施した。その結果、HBV粒子を作用したヒトiPS細胞由来肝細胞において、HBV由来のRNAおよび構成タンパク質（HBsAg, HBcrAg）の産生が認められた。また、HBVを作用させたヒトiPS細胞由来肝細胞内からHBVゲノムの複製中間体であるsingle strand linear DNAも検出された。以上の結果から、ヒトiPS細胞由来肝細胞がHBVの感染複製能を有していることが示された。さらに、抗HBV薬である逆転写阻害剤としてentecavir、エントリー阻害剤としてMyrcludex-Bの薬効の評価を実施した。その結果、entecavirの作用により、培養上清中のHBVゲノム量は有意に低下し、またMyrcludex-Bの作用によりHBsAg陽性細胞の減少が認められた。このことから、ヒトiPS細胞由来肝細胞において抗HBV薬の薬効の評価が可能であることが示された。以上の結果より、ヒトiPS細胞由来肝細胞がHBVの生活環の解明や抗HBV薬開発に向けた新たなin vitro感染評価系として有用であることが示された。

つづいて、zone特異的な性質を有する肝細胞の作製を試みた(2)。生体の肝小葉構造は様々な細胞種によって規則的に構成されている。そこで、細胞間微小環境に着目し、肝細胞や胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、血管内皮細胞、肝星細胞、線維芽細胞のコンディショナルメディウム（CM）を用いてヒトiPS細胞由来肝細胞を培養し、zone 3肝細胞で高い活性を示す薬物代謝への影響を評価した。その結果、肝細胞のCM培養群では薬物代謝能が向上し、胆管上皮細胞のCM培養群では薬物代謝能が低下した。そのため、肝細胞及び胆管上皮細胞のCM培養を行ったヒトiPS細胞由来肝細胞において、さらにzone特異的な機能の評価を実施した。その結果、胆管上皮細胞のCM培養群ではzone 1特異的な機能（尿素合成や糖新生）が、肝細胞のCM培養群ではzone 3特異的な機能（グルタミン合成やCYP1A2活性）が優位に向上した。また、liver zonation形成に関与するWNT/β-cateninシグナルはzone 1肝細胞では抑制、zone 3肝細胞では活性化されていることが知られている。このWNT/β-cateninシグナルは胆管上皮細胞のCM培養群では抑制され、肝細胞のCM培養群では活性化されていた。以上の結果から、肝細胞および胆管上皮細胞のCM培養によってzone特異的性質を獲得することが明らかとなった。そのため、つづいて各zone特異的性質獲得の分子機序の解明を試みた。はじめに、胆管上皮細胞と肝細胞におけるWNTリガンド、インヒビターの発現プロファイルを取得した。その結果、肝細胞と胆管上皮細

胞両者においてWNTリガンドであるWNT7BおよびWNT8Bが高発現しており、一方で胆管上皮細胞においてのみWNTインヒビターであるWNT inhibitor-1（WIF-1）が高発現していた。そこで、肝細胞で高発現していたWNT7BおよびWNT8Bをzone 3特異的性質獲得に寄与する因子の候補とし、CMを作製する肝細胞においてWNT7BとWNT8Bをダブルノックダウンすると、肝細胞のCM培養によるzone 3特異的性質獲得の効果が優位に減弱した。また、WNT7BをヒトiPS細胞由来肝細胞において過剰発現させると、zone 3特異的な性質を獲得した。つづいて、胆管上皮細胞で高発現していたWIF-1をzone 1特異的性質獲得に寄与する因子の候補とし、CMを作製する胆管上皮細胞においてWIF-1をノックダウンすると、胆管上皮細胞のCM培養によるzone 1特異的性質獲得の効果が優位に減弱した。さらに、WIF-1をヒトiPS細胞由来肝細胞において過剰発現させると、zone 1特異的な性質を獲得した。以上の結果から、ヒトiPS細胞由来肝細胞のzone 3特異的な性質獲得にWNT7BおよびWNT8Bが、zone 1特異的な性質獲得にWIF-1が寄与していることが明らかとなった。以上の結果より、これまでのin vitroヒト肝細胞モデルにはなかったzone特異的な性質を有したヒト肝細胞が作製可能となった。

以上、本研究では、ヒトiPS細胞技術を利用して、HBV in vitro感染評価系の構築とzone特異的な性質を有する肝細胞の作製に成功した。これら本研究で得られた知見が、肝細胞を利用した創薬研究や生命科学研究に貢献することを期待する。

参考文献

1. Sakurai, F. Mitani, S., et al. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. Sci Rep 7, 45698 (2017).
2. Mitani, S., et al. Human ESC/iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Achieve Zone-Specific Hepatic Properties by Modulation of WNT Signaling. Mol Ther 25, 1420-1433 (2017).

様式7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名　（　三谷　成二　） | | |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | （職） | 氏　名 |
| | 主 査　教 授 | 水口　裕之 |
| | 副 査　教 授 | 橋本　均 |
| | 副 査　教 授 | 藤尾　慈 |

**論文審査の結果の要旨**

ヒトiPS細胞由来肝細胞は、同一ロットの細胞を大量かつ安定的に供給可能であり、様々な個人から作製可能であるという利点を有する。そのため、創薬研究におけるin vitro肝毒性評価系や肝指向性病原体のin vitro感染モデルなどへの応用が期待されている。しかし、現在、新たなin vitro感染モデルの構築が求められているB型肝炎ウイルスのin vitro感染モデルへの応用に向けた検討は報告されてい。また、生体の肝臓において、肝細胞は、肝小葉構造の位置（zone）に応じて異なる性質を示すことが知られている。しかしながら、現行の分化誘導法で得られるヒトiPS細胞由来肝細胞は肝細胞特異的な性質を示すものの、生体に存在するようなzone特異的性質を示す肝細胞をつくり分けることはできていない。そのため、本論文では、ヒトiPS細胞由来肝細胞がB型肝炎ウイルスのin vitro感染モデルとしての有用性を評価するとともに、新たな分化誘導技術の開発として、zone特異的な性質を有した肝細胞を分化誘導する技術の開発を試みた。本検討により以下の結果を得た。

1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞が、B 型肝炎ウイルスの感染複製能を有することを示した。

2. ヒト iPS 細胞由来肝細胞において、抗 HBV 薬の薬効を評価可能であることを示した。

3. ヒト iPS 細胞由来肝細胞が、胆管上皮細胞から産生される WNT inhibitor factor-1（WIF-1）の作用により zone 1 特異的な性質を獲得することを示した。

4. ヒト iPS 細胞由来肝細胞が、肝細胞から産生される WNT7B および WNT8B の作用により zone 3 特異的な性質を獲得することを示した。

以上、本論文では、ヒトiPS細胞由来肝細胞がHBVの感染複製能を示すこと、抗HBV薬の薬効を評価可能であることを明らかとし、新規HBV in vitro感染モデルとしての有用性を示した。そのため、既存のin vitro感染モデルでは難しかった、大規模な抗HBV薬スクリーニングや個人差、免疫応答に着目した検討などにヒトiPS細胞由来肝細胞の応用が期待される。さらに、ヒトiPS細胞由来肝細胞からzone特異的な性質を有した肝細胞の作製技術の開発に成功した。現行の分化誘導法で得られるヒトiPS細胞由来肝細胞は、創薬研究におけるin vitro肝毒性評価系として現在用いられているヒト初代培養肝細胞と比較して、その薬物代謝能がやや劣っていることが課題となっていたが、本研究で作製したzone 3肝細胞は、高い薬物代謝能を有しており、in vitro肝毒性評価系への応用も期待される。以上ことから、本論文は極めて意義深く、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。