



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (薬学)
報告番号	甲第1701号
学位記番号	第347号
氏名	奥村 啓樹
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	多能性幹細胞からの機能的な肝細胞の作製
論文審査担当者	主査： 木村 和哲 副査： 松永 民秀, 林 秀敏, 肥田 重明

名古屋市立大学学位論文

多能性幹細胞からの機能的な肝細胞の作製

平成 30 年度（2019 年 3 月）

名古屋市立大学大学院 薬学研究科

奥村 啓樹

一. 本論文は、2019年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 木村 和哲 教授

副査 林 秀敏 教授

肥田 重明 教授

松永 民秀 教授

二. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1. Hiroki Okumura, Anna Nakanishi, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga

Effect of Celecoxib on Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocytes Involves STAT5 Activation.

Drug Metab Dispos, **46**, 1519–1527 (2018)

2. Hiroki Okumura, Anna Nakanishi, Satoshi Toyama, Mai Yamanoue, Kana Yamada, Akane Ukai, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tomomi Miyamoto, Yoh-ichi Tagawa, Masumi Hirabayashi, Ichiro Miyoshi, Tamihide Matsunaga

Contribution of Rat Embryonic Stem Cells to Xenogeneic Chimeras in Blastocyst or 8-cell Embryo Injection and Aggregation.

Xenotransplantation, **26**, e12468 (2019).

三. 本論文の基礎となる研究は、松永 民秀 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

略語一覧

2-ME	2-mercaptoethanol
AFP	α -fetoprotein
ALB	Albumin
ASGR	Asialoglycoprotein receptor 1
B6D2F1	C57BL/6NCrCrIj♀×DBA/2NCrCrIj♂
bpV(phen)	Potassium bisperoxo (1,10-phenanthroline) oxovanadate (V) trihydrate
CAR	Constitutive androstane receptor
Cosmedium	Cosmedium 004 for Hepatocyte
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrome P450
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEX	Dexamethasone
DMEM/F12	DMEM/Ham's F-12 medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ES	Embryonic stem
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factors
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFR Matrigel	Growth Factor Reduced Matrigel
hCG	Human chorionic gonadotropin
HGF	Hepatocyte growth factor
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IL	Interleukin
iPS	Induced pluripotent stem
KO-DMEM	KnockOut DMEM
KSR	KnockOut serum replacement

L-Glu	L-Glutamine
Luciferin-IPA	Luciferin isopropyl acetal
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MMC	Mitomycin C
NEAA	Non-essential amino acids
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OME	Omeprazole
OSM	Oncostatin M
Pdx1	Pancreas and duodenum homeobox 1
PMS	Pregnant mare serum gonadotropin
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10
PXR	Pregnane X receptor
RIF	Rifampicin
RPMI + GlutaMax	Roswell Park Memorial Institute medium, GlutaMax supplement
Sall1	Spalt like transcription factor 1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAT	Tyrosine aminotransferase
TNF	Tumor necrosis factor
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase
VPA	Valproic acid

目次

第一章 序論	1
第二章 ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化における celecoxib の効果	4
2.1 緒言	4
2.2 実験方法	6
2.2.1 試薬及び細胞	6
2.2.2 細胞培養	8
2.2.3 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導	8
2.2.4 蛍光免疫染色	9
2.2.5 RT-qPCR 解析	9
2.2.6 CYP3A4 活性測定	12
2.2.7 ウェスタンブロッティング	12
2.2.8 統計学的解析	13
2.3 結果	14
2.3.1 Celecoxib を用いたヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化	14
2.3.2 Celecoxib のヒト iPS 細胞からの肝細胞分化に与える影響	16
2.3.3 COX 阻害及び PPAR γ 活性化作用が肝分化に与える影響	18
2.3.4 Celecoxib による STAT5 活性化作用が肝分化に与える影響	22
2.4 考察	24
2.5 小括	28
第三章 異種間キメラ動物作出において ES 細胞が最も肝臓に寄与する手法の 開発	29
3.1 緒言	29

3.2 実験方法.....	31
3.2.1 試薬及び細胞.....	31
3.2.2 実験動物.....	31
3.2.3 ラット ES 細胞の培養.....	32
3.2.4 8 細胞期胚及び胚盤胞の採取.....	32
3.2.5 注入法によるキメラ胚の作製.....	32
3.2.6 凝集法によるキメラ胚の作製.....	33
3.2.7 キメラ胚の子宮内移植.....	33
3.2.8 キメラマウス臓器の蛍光イメージング.....	34
3.2.9 qPCR 解析.....	34
3.2.10 免疫組織染色.....	35
3.2.11 統計学的解析.....	36
3.3 結果.....	37
3.3.1 ラット ES 細胞を用いた異種間キメラマウスの作出.....	37
3.3.2 キメラマウス臓器の蛍光イメージング.....	39
3.3.3 各臓器におけるラット ES 細胞の寄与率.....	41
3.3.4 キメラマウス肝臓におけるラット CYP2C6 発現.....	42
3.4 考察.....	44
3.5 小括.....	48
第四章 総括.....	49
謝辞.....	50
引用文献.....	53

第一章 序論

肝臓は多くの代謝酵素を豊富に発現しており、医薬品などの薬物代謝における中心的な臓器である。その中でも Cytochrome P450 (CYP) 3A4 は肝臓に存在する主要な薬物代謝酵素であり、臨床で使用される 50%以上の医薬品の代謝に関与する分子種である¹⁻⁴⁾。そのため、医薬品開発において肝臓での CYP3A4 による代謝は薬物動態を予測するうえで非常に重要である。

医薬品開発初期の薬物動態試験には一般的に実験動物が用いられるが、種差が存在するため、ヒトへの外挿は容易ではない。また、ヒト体内における薬物代謝を比較的正確に予想可能なヒト初代肝細胞や肝ミクロソームが *in vitro* 評価系としてよく利用されているが、創薬研究のために新鮮なヒトの肝臓を入手することは困難である⁵⁻⁷⁾。さらに、ヒト初代肝細胞は通常の培養条件では細胞増殖せず、培養後急速に薬物代謝酵素の活性が低下するなど問題点が存在する⁸⁻¹⁰⁾。そのため、十分な機能を有する良質な肝細胞を安定して使用することが難しく、医薬品開発における障害の一つとなっている。近年、免疫不全肝障害マウスにヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓の 70%以上が正常なヒト肝細胞に置換された PXB マウスが作製された。本マウスは高いレベルでヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターを発現しており、薬物動態研究や毒性研究に有用であることが示されている^{11, 12)}。また、本マウスの肝臓を灌流することで得られる PXB マウス由来新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells) も薬物代謝酵素遺伝子の発現や活性が高く、採取したばかりのヒト初代肝細胞に匹敵する機能を持つことが分かっている。しかしながら、非常に高価であることや、残存するマウス肝細胞による薬物代謝への影響が課題である。また、高置換率な PXB マウスの作製には高い増殖能を有する小児の凍結ヒト肝細胞が必要であるため、その細胞源の確

保が難しく、複数ロットを用いた試験ができないことも課題である。

CYP に代表される薬物代謝酵素には、その薬物代謝酵素活性を変化させる遺伝子多型の存在が広く知られており、これらの遺伝子多型は医薬品の血中濃度など体内動態に大きな影響を与える。また、この遺伝子多型の中には人種によりその種類や頻度が異なるものが存在する。例えば、プロトンポンプ阻害薬などの代謝に関与する CYP2C19 において、日本人ではおよそ 16% がその活性をほとんど有さない低代謝型であるのに対し、白人ではその割合は低い¹³⁾。同様に、CYP2C9 や CYP2D6、抱合反応に関与する uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 など多くの医薬品の代謝に関与する代謝酵素においても遺伝子多型の人種差があることが報告されている¹⁴⁾。そのため、医薬品開発においても遺伝子多型の個人差及び人種差による薬物動態の変化を考慮した評価が重要であると考えられる。

Embryonic stem (ES) 細胞や induced pluripotent stem (iPS) 細胞などの多能性幹細胞は、ほぼ無限の増殖能と様々な細胞に分化可能な分化多能性を有することから、目的の細胞を大量に作製することが可能である¹⁵⁾。また、iPS 細胞は線維芽細胞や血球などの体細胞にウイルスベクターやエピソーマルベクターを用いて *OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* といった初期化因子を導入することで作製されるため、既に遺伝的な背景の明らかな個人から作製することが可能である。そのため、ヒト iPS 細胞から作製した肝細胞は薬物動態試験や、個人差あるいは人種差を考慮した適正な薬物相互作用の評価に有用であると考えられる。しかしながら、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肝細胞の機能は十分ではなく、ヒト初代培養肝細胞と比較し CYP3A4 などの薬物代謝関連遺伝子の発現や薬物代謝活性が低いことが問題である。さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞には胎児肝臓に発現し、成人肝臓ではほとんど発現していないとされる CYP3A7 が高発現して

いるなど、未熟な状態であることが示唆されている。このため、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進させ、より成熟化させる必要がある。

近年、ヒト iPS 細胞から目的の細胞への分化誘導を促進する低分子化合物が相次いで報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。一般的に、低分子化合物は大量かつ高純度で合成が可能であり、コスト及びロット間差が低く、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に用いる分化誘導因子として有益であると考えられる。そこで本研究では、低分子化合物を分化誘導因子として用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に与える影響を検討するとともに、その作用機序についても解析を行った。

現在の技術では、ヒト初代肝細胞と同等な機能を有した多能性幹細胞由来肝細胞の作製は困難である。その原因の一つに、*in vitro* で生体臓器のような微小環境を模倣することが難しいことが挙げられる。臓器を構成する様々な細胞は、三次元的な秩序だった配置をとり、細胞同士が相互作用することで分化誘導されると言われている。近年、*in vitro* における臓器作製の試みとして 3D プリンターを用いた臓器作製や、肝細胞と血管内皮細胞、間葉系幹細胞の共培養による肝臓の原基作製が報告されている²⁰⁻²⁴⁾。しかし、いずれの方法においても作製した臓器は未熟な状態であり、臓器としての機能が不十分である。そのため、*in vitro* ではなく、*in vivo* において多能性幹細胞から肝細胞を作製する方が効果的であると考えられる。そこで、*in vivo* における多能性幹細胞からの機能的な肝細胞作製の試みとして、キメラ動物作出を介した動物体内での多能性幹細胞由来肝臓作製の可能性について検討した。

第二章 ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化における celecoxib の効果

2.1 緒言

医薬品開発における薬物動態試験に利用可能な肝細胞に求められている条件として、薬物代謝酵素の発現等、肝機能が高いこと及び安価で安定供給が可能であることが挙げられる。これまでにヒト iPS 細胞から肝細胞への分化方法として、特殊な培養器材を用いた立体培養法、他の細胞との共培養法、ウイルスベクターを用いて転写因子を強制発現させる方法などが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。これらの方法は、分化した細胞が肝細胞としての機能を獲得するために有用な方法であるが、操作が煩雑であることや、改変アデノウイルスのような特殊な材料を扱う技術が必要であることが課題である。そのため、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に複雑な工程を必要としない、簡便な方法の開発が望まれている。低分子化合物は大量かつ高純度で合成が可能であり、共培養用細胞やウイルスベクターを用いる方法よりもリスク、コスト及びロット間差が少ない。前述の立体培養法や共培養法などとは異なり、分化培地に低分子化合物を添加するのみで効果を発揮するため非常に簡便かつ再現性も高く、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導因子として有用であると考えられる。

本研究では低分子化合物に着目し、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を促進する低分子化合物の探索を行った。その中で肝細胞の成熟化に影響を与える化合物として celecoxib がヒットした。Celecoxib は non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) として用いられている低分子化合物であり、prostaglandin E2 などの炎症性メディエーター生成に関与する cyclooxygenase (COX) -2 を選択的に阻害することにより抗炎症作用、鎮痛作用及び解熱作用を示し、種々の疾患における消炎、鎮痛を目的として広く使用されている²⁸⁾。ま

た、NSAIDs は peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 活性化作用や Wnt/ β -Catenin シグナル阻害作用を示すことも報告されている²⁹⁻³²⁾。Celecoxib においては、signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 活性化抑制作用を有することが報告されている³³⁾。近年、celecoxib はラットにおいて肝がん形成抑制作用を示すとともに、STAT5 の活性化作用を介して発がんによる種々の CYP 発現量低下を抑制し、正常レベルへと回復させることが明らかとなった³⁴⁾。また、マウスにおいて STAT5 の欠損は肝臓での脂質代謝に関与する CYP 分子種やステロイドホルモンの代謝に影響を与えることが報告されており、STAT5 は肝機能に重要な転写因子であることが示唆されている³⁵⁻³⁷⁾。しかしながら、celecoxib がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化成熟にどのように影響を与えるかは未だ明らかとなっていない。

そこで本章では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に与える celecoxib の効果及びその作用機序について検討を行った。また、薬物動態試験に利用されている 48 時間培養したヒト初代肝細胞と比較し、作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物代謝酵素をはじめとする肝機能がどの程度であるか検討を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬及び細胞

ヒト iPS 細胞 (Fetch、Tic 及び Windy) は、ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 に *OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* 遺伝子を導入後、クローン化した細胞であり、国立成育医療研究センター梅澤明弘博士よりご供与いただいた。フィーダー細胞は mouse embryonic fibroblast (MEF) を使用した。凍結ヒト肝細胞 (lot. HPCH10/1310262; 20~71 歳 10 個体混合肝) はゼノテック社 (カンザス州レネクサ、米国) より、acetylsalicylic acid、dexamethasone (DEX)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (High Glucose)、DMEM/Ham's F-12 medium (DMEM/F12)、recombinant human growth hormone、meloxicam、mouse monoclonal anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody、oncostatin M (OSM)、rifampicin (RIF)、valproic acid (VPA) は和光純薬工業 (大阪) より、Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488)、Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488)、GlutaMax、KnockOut DMEM (KO-DMEM)、KnockOut serum replacement (KSR)、Roswell Park Memorial Institute medium、GlutaMax supplement (RPMI + GlutaMax)、Rhodamine Phalloidin は Thermo Fisher Scientific (マサチューセッツ州ウォルサム、米国) より、celecoxib、ketoprofen、ketoconazole、nimesulide、pioglitazone は東京化成工業 (東京) より、Accutase、dimethyl sulfoxide (DMSO)、pimozide はナカライテスク (京都) より、rabbit monoclonal anti-human hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α antibody、rabbit monoclonal anti-human STAT5 antibody、rabbit monoclonal anti-human phospho-STAT3 (p-STAT3) antibody、rabbit monoclonal anti-human phospho-STAT5 (p-STAT5) antibody は Cell Signaling Technology (マサチューセッツ州デンバー、米国) より、L-Glutamine (L-Glu)、non-essential amino acids (NEAA)、penicillin-streptomycin は Biological Industries (ベイト・ヘメク、イスラエル) より、Goat Anti-

Mouse IgG H&L (HRP)、Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)、mouse monoclonal anti-human albumin (ALB) antibody は abcam (ケンブリッジ、英国) より、2-mercaptoethanol (2-ME) は Sigma (ミズーリ州セントルイス、米国) より、fibroblast growth factor 2 (bFGF)、hepatocyte growth factor (HGF) は PeproTech (ニュージャージー州ロッキーヒル、米国) より、mitomycin C (MMC) は協和発酵キリン (東京) より、activin A は Shenandoah Biotechnology (フィラデルフィア州ウォーウィック、米国) より、Y-27632 は focus biomolecules (ペンシルベニア州プリマス・ミーティング、米国) より、fetal bovine serum (FBS) は biowest (ニュアイエ、仏国) より、Cosmedium 004 for Hepatocyte (Cosmedium 004) はコスモバイオ (東京) より、potassium bisperoxo (1,10-phenanthroline) oxovanadate (V) trihydrate (bpV(phen)) は Cayman Chemical (ミシガン州アナーバー、米国) より、rabbit polyclonal anti-human STAT3 antibody は Proteintech (イリノイ州シカゴ、米国) より、mouse monoclonal anti-human α -fetoprotein (AFP) antibody は Santa Cruz Biotechnology (テキサス州ダラス、米国) より、BlockAce は DS ファーマバイオメディカル (大阪) より、cell counting kit-8 は同仁科学研究所 (熊本) より、Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium, magnesium (D-PBS (-)) はタカラバイオ (滋賀) より、Growth Factor Reduced (GFR) Matrigel は Corning (ニューヨーク州コーニング、米国) より、Agencort RNAdvance Tissue Kit は Beckman Coulter (カリフォルニア州ブレア、米国) より、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix は東洋紡 (大阪) より、KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master mix ABI Prism は Kapa Biosystems (マサチューセッツ州ボストン、米国) より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

2.2.2 細胞培養

未分化なヒト iPS 細胞は Kondo らの報告を参考に、20% KSR、1% MEM NEAA、2 mM L-Glu、0.1 mM 2-ME、5 ng/mL bFGF を含む DMEM/F12 を用いて、MMC 処理により増殖能を不活化した MEF 上で培養した。

凍結ヒト肝細胞は thawing medium without additives (BIOPREDIC International、レンヌ、仏国) を用い、解凍した。解凍した肝細胞は additives for hepatocyte seeding medium (BIOPREDIC International) を添加した basal hepatic cell medium (BIOPREDIC International) に懸濁し、collagen type I にてコートした細胞培養用ディッシュに播種した。播種 12 時間後に培地を additives for hepatocyte culture medium (BIOPREDIC International) を添加した basal hepatic cell medium に交換し、36 時間培養した。

2.2.3 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞 (Fetch、Tic 及び Windy) から肝細胞への分化誘導は Kondo らの報告¹⁷⁾を基に行い、ヒト iPS 細胞株間での celecoxib 効果の比較検討実験を除き、実験にはヒト iPS 細胞 (Windy) を用いた。ヒト iPS 細胞を 0.5% FBS、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax 培地で 3 日間培養後、2% KSR、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax 培地でさらに 2 日間培養することで内胚葉へと分化させた。分化誘導 5 日目に、細胞を Accutase にて 5 分間処理することによって剥離し、あらかじめヒト iPS 細胞用培地にて 30 倍に希釈した GFR Matrigel でコートした細胞培養用 24 well-plate あるいは 96 well-plate に 1×10^5 cells/cm² で播種した。細胞播種後、20% KSR、1% GlutaMax、0.1 mM NEAA、0.1 mM 2-ME、1% DMSO を含む KO-DMEM で 7 日間培養することにより肝芽細胞へと分化させた。最後に、10 ng/mL HGF、20 ng/mL OSM、100 nM DEX、2 mM VPA を含む

Cosmedium 004 で 7 日間、2 mM VPA を除いた 10 ng/mL HGF、20 ng/mL OSM、100 nM DEX、2 mM VPA を含む Cosmedium 004 で 3 日間、Cosmedium 004 で 3 日間培養することにより肝細胞へ分化させた。

薬物代謝酵素の誘導剤処理は 40 μ M RIF を含む Cosmedium004 で回収前 48 時間培養することで行った。また、分化 16 日目から 8 日間 celecoxib を 25 μ M となるように培地に添加し、肝細胞への分化に与える影響について検討した。

2.2.4 蛍光免疫染色

分化誘導後の細胞を PBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde を用いて室温にて 20 分間固定処理し、0.1% Triton X-100 を用いて室温にて 10 分間膜透過処理を行った。その後、2% ウシ血清アルブミンを用いて室温にて 30 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、一次抗体は mouse monoclonal anti-human ALB antibody (1:200)、mouse monoclonal anti-human AFP antibody (1:100) あるいは rabbit monoclonal anti-human HNF4 α antibody (1:200) を用いて 4°C にて一晩反応させた。二次抗体は Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (1:500) あるいは Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (1:500) を用いて遮光下室温にて 60 分間反応させた。また、F-actin 染色時には二次抗体溶液に Rhodamine Phalloidin (1:200) を添加した。核染色は 1 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を遮光下室温にて 5 分間処理することで行った。染色後の細胞は、ECLIPSE Ni microscope (Nikon、東京) にて観察した。

2.2.5 RT-qPCR 解析

Total RNA はヒト iPS 細胞の分化誘導終了後、Agencort RNAdvance Tissue Kit の添付マニュアルに従い抽出した。RNA 量は、超微量紫外可視分光光度計

NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、cDNA の合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を使用し 0.5 μg の total RNA から添付マニュアルに従い、サーマルサイクラーを用いて 37°C にて 15 分間、50°C にて 5 分間、98°C にて 5 分間処理することで行った。

PCR プライマーは Table 2-1 に示したものをを用いた。Real-time PCR の反応混合液は KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master mix ABI Prism を用い、最終容量 10 μL で行った。反応は ABI 7300 real time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、95°C にて 3 分間プレインキュベーション後、95°C にて 3 秒間、60°C にて 31 秒間のサイクルを 40 サイクル行った。結果は内在性コントロールとして hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) を用いて補正し、算出した。

ポジティブコントロールとして、凍結ヒト肝細胞解凍直後 (HPHs 0 h) 及び凍結ヒト肝細胞 48 時間培養後 (HPHs 48 h) を用いた。

Table 2-1. Polymerase chain reaction (PCR) primer sequences

<i>Gene names</i>	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>ALB</i>	GAGCTTTTTGAGCAGCTTGG	GGTTCAGGACCACGGATAGA
<i>ASGR1</i>	AGGCAATGTGGGAAGAAAGA	CGGAGCGAGAGAACCAGTAG
<i>AFP</i>	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	TCTGCAATGACAGCCTCAAG
<i>CAR</i>	TGATCAGCTGCAAGAGGAGA	TGGATGTGCTGGATTTGGTA
<i>COX-2</i>	GCTGGAACATGGAATTACCC	TGCGGTACTCATTAAGACTGG
<i>CYP1A1</i>	CCTCTTTGGAGCTGGGTTTG	GCTGTGGGGGATGGTGAA
<i>CYP1A2</i>	CTTTGACAAGAAGAGTGTCCG	AGTGTCCAGCTCCTTCTGGAT
<i>CYP2B6</i>	ATGGGGCACTGAAAAAGACTGA	AGAGGCGGGGACACTGAATGAC
<i>CYP2C9</i>	GACATGAACAACCCTCAGGACTTT	TGCTTGTCGTCTCTGTCCCA
<i>CYP2C19</i>	GAACACCAAGAATCGATGGACA	TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA
<i>CYP2D6</i>	CCTACGCTTCCAAAAGGCTTTT	AGAGAACAGGTCAGCCACCACT
<i>CYP2E1</i>	GACCACCAGCACAACTCTGA	CCCAATCACCTGTCAATTT
<i>CYP3A4</i>	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
<i>HPRT</i>	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	TCAAGGGCATATCCTACAACA
<i>IL-1β</i>	GTGGCAATGAGGATGACTTGTTT	TAGTGGTGGTCGGAGATTCGTA
<i>IL-6</i>	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC	GCCTCTTTGCTGCTTTCACAC
<i>IL-8</i>	CTGATTTCTGCAGCTCTGTG	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
<i>NF-κB</i>	GATAGTTTCGGCGGTGGTAG	CATGCTTCATCCCAGCATT
<i>PXR</i>	AGGATGGCAGTGTCTGGAAC	AGGGAGATCTGGTCTCGAT
<i>TAT</i>	ATCTCTGTTATGGGGCGTTG	TGATGACCACTCGGATGAAA
<i>TNFα</i>	GGCAGTCAGATCATCTTCTCG	GCTGGTTATCTCTCAGCTCCAC
<i>UGT1A1</i>	CAGCAGAGGGGACATGAAAT	ACGCTGCAGGAAAGAATCAT

2.2.6 CYP3A4 活性測定

分化誘導後の細胞を PBS で 2 回洗浄し、3 μ M luciferin isopropyl acetal (Luciferin-IPA) を含む Cosmedium 004 で 24 時間培養した。CYP3A4 の阻害群には 10 μ M ketoconazole を同時に添加した。培養後、各 well から 50 μ L ずつ培養上清を白色 96-well plate へ移し、等量の Luciferin detection reagent を添加し、遮光下室温にて 20 分反応させた。反応終了後、各 well の発光量を Synergy 2 modular multi-mode reader (BioTek、バーモント州ウィヌースキー、米国) を用いて測定した。活性は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した各 well におけるタンパク質量で活性値を補正し算出した。

2.2.7 ウェスタンブロッティング

分化誘導 24 日目の細胞を 50 mM Tris·HCl (pH 6.8)、2% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、10% glycerol、10% 2-ME を含む細胞溶解液を用いて回収し、超音波による破碎処理後、100°C で 5 分間加熱処理を行った。各サンプルを 10%SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ、米国) を用いて PVDF メンブレンに転写した。その後、BlockAce を用いて室温にて 60 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、一次抗体は mouse monoclonal anti-human GAPDH antibody (1:1000)、rabbit polyclonal anti-human STAT3 antibody (1:2000)、rabbit monoclonal anti-human phospho-STAT3 (p-STAT3) antibody (1:2000)、rabbit monoclonal anti-human STAT5 antibody (1:2000) あるいは rabbit monoclonal anti-human phospho-STAT5 (p-STAT5) antibody (1:2000) を用いて 4°C にて一晩反応させた。TBS-T で洗浄後、二次抗体は Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (1:1000) あるいは Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (1:7000 あるいは 1:15000) を用いて室

温にて 60 分間反応させた。TBS-T で洗浄後、GAPDH の検出には Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific)、STAT3 及び STAT5 の検出には ECL Prime western blotting detection reagent (GE Healthcare、リトル・チャルフォント、英国)、p-STAT3 及び p-STAT5 の検出には SignalFire Elite ECL reagent (Cell Signaling Technology) を用いて検出を行った。検出及び解析は Amersham Imager 600 (GE Healthcare) を用いて行った。

2.2.8 統計学的解析

2 群間の比較は Student's t-test によって行った。多重比較は、分散分析を行った後、Tukey's HSD (honestly significant difference) test によって行った。その際の統計分析は、SPSS Statistics software package, version 25.0 (IBM Japan、東京) を用いて行った。

2.3 結果

2.3.1 Celecoxib を用いたヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に celecoxib が与える影響を調べるため、分化 16 日目から 24 日目までの 8 日間 celecoxib を添加した (Fig. 2-1A)。分化終了後の細胞は肝細胞に特徴的な多核で敷石状の形態を示し、PAS 染色においても陽性であった (Fig. 2-1B, C)。また、蛍光免疫染色により分化終了後の細胞のほとんどが ALB、AFP 及び HNF4 α 陽性を示した (Fig. 2-1D)。

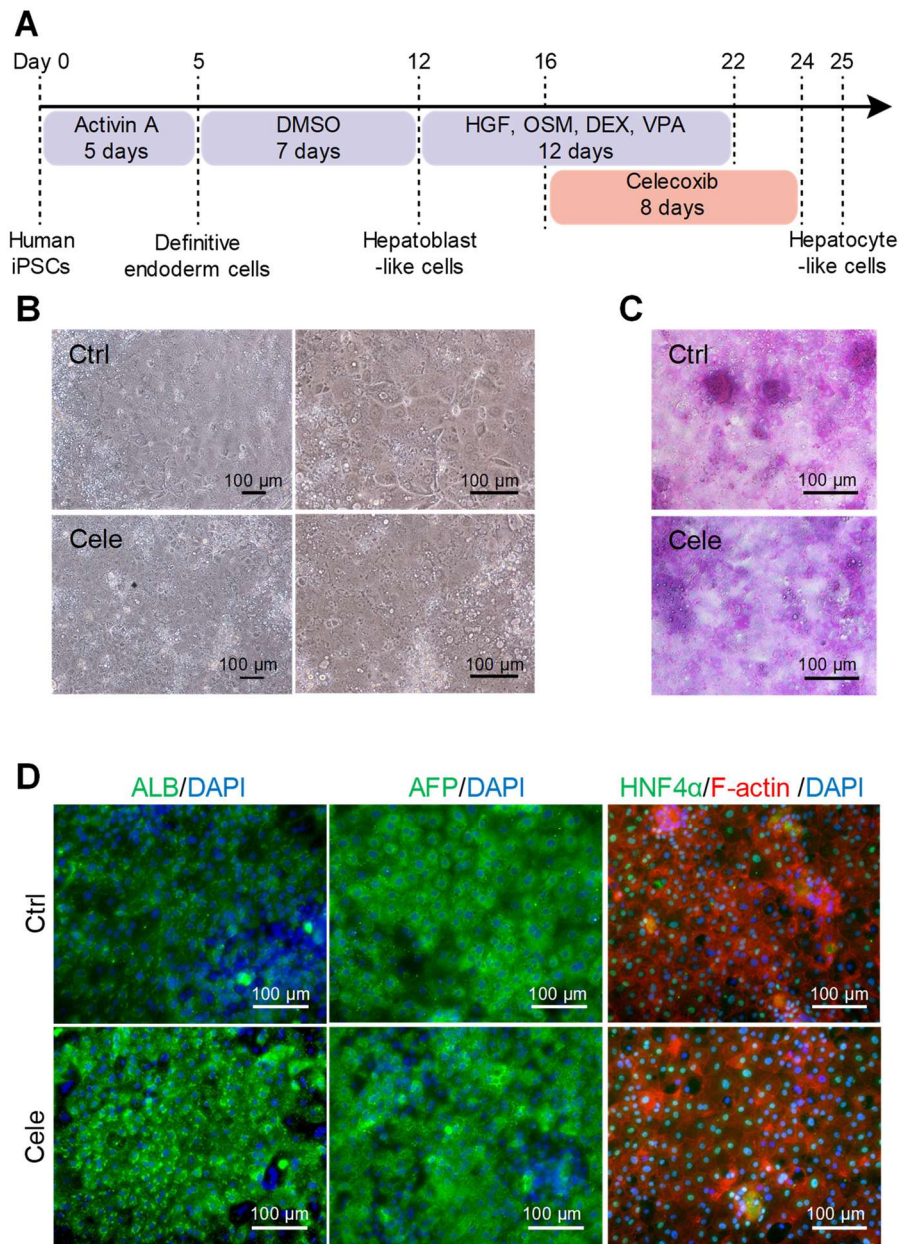


Figure 2-1. Hepatocyte differentiation from human iPSC cells using celecoxib.

(A) Schematic timeline for hepatocyte differentiation of human iPSC cells. (B) Morphology of differentiated hepatocytes. Each bar indicates 100 μm. (C) Images of PAS-stained differentiated hepatocytes. Each bar indicates 100 μm. (D) Immunofluorescence staining of various hepatocyte markers in differentiated hepatocytes. The images show immunofluorescence staining for ALB (left), AFP (center), and HNF4α (green) and F-actin (red) (right). Nuclei were counterstained with DAPI. Control (Ctrl) represents celecoxib-untreated hiHep, and celecoxib (Cele) represents celecoxib-treated hiHep. ALB, albumin; AFP, α-fetoprotein; HNF4α, hepatocyte nuclear factor 4α.

2.3.2 Celecoxib のヒト iPS 細胞からの肝細胞分化に与える影響

Celecoxib の肝細胞分化に及ぼす影響を評価するため、分化終了後の細胞における mRNA 発現量を調べた。Celecoxib により肝細胞マーカーである Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1) や tyrosine aminotransferase (TAT)、AFP の mRNA 発現量が有意に上昇した。また、核内受容体である Pregnane X receptor (PXR) や Constitutive androstane receptor (CAR)、薬物代謝酵素である UGT1A1 や CYP1A1、CYP3A4、CYP2B6 の mRNA の有意な発現上昇が確認された (Fig. 2-2)。この celecoxib による CYP3A4 発現量の増加はヒト iPS 細胞株 Fetch 及び Tic においても認められた (Fig. 2-3A)。さらに、celecoxib 処理群では RIF の処理により CYP3A4 遺伝子発現量が有意に増加し、RIF による CYP3A4 の誘導が確認された (Fig. 2-3B)。遺伝子発現量の変化と一致し、CYP3A4 の代謝活性も celecoxib 処理により有意に上昇した。また、この活性は CYP3A4 の阻害剤である ketoconazole によって抑制された (Fig. 2-3C)。

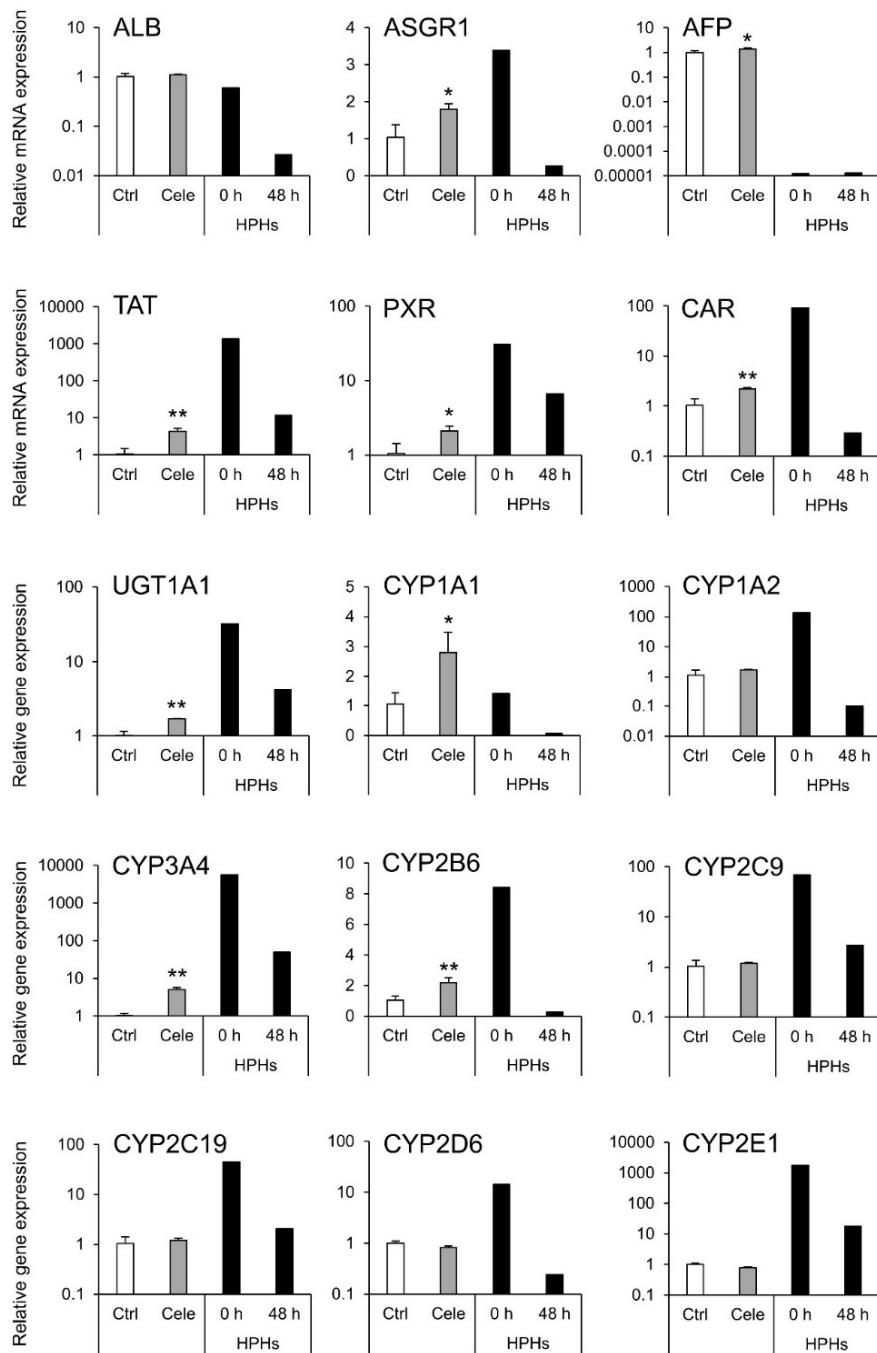


Figure 2-2. Effects of celecoxib on mRNA expression of hepatocyte markers.

RT-qPCR analysis of hepatocyte marker genes in hiHep. Relative mRNA expression levels in celecoxib-untreated hiHep [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Student's *t*-tests: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Ctrl. ALB, albumin; ASGR1, asialoglycoprotein receptor 1; AFP, α -fetoprotein; CAR, constitutive androstane receptor; CYP, cytochrome P450; PXR, pregnane X receptor; TAT, tyrosine aminotransferase; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; Ctrl, control (white); Cele, celecoxib (gray); HPHs, human primary hepatocytes (black).

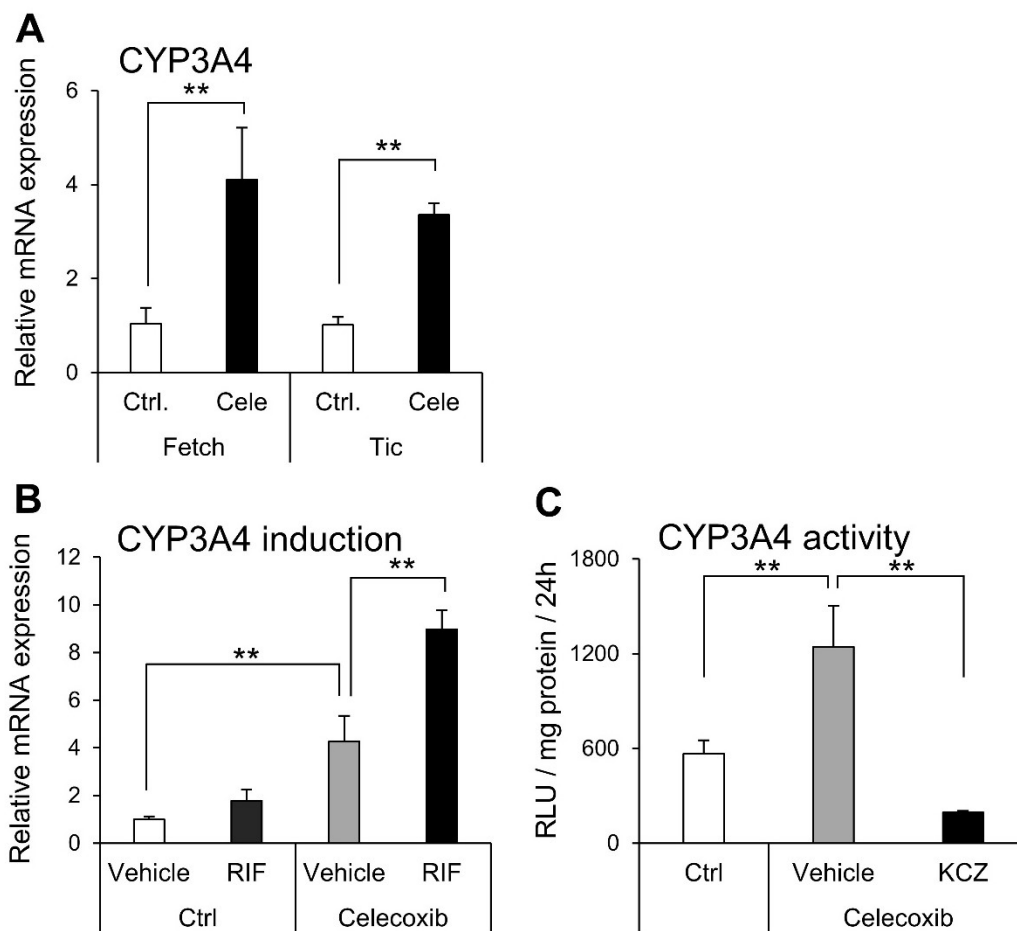


Figure 2-3. Activity and inducibility of CYP3A4 in hepatocytes differentiated from human iPS cells using celecoxib.

(A) CYP3A4 mRNA expression level was analyzed in hepatocytes differentiated from two human iPS cell lines (Fetch and Tic). Relative mRNA expression levels in each celecoxib-untreated hiHep [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test: $**p < 0.01$.

(B) Induction of CYP3A4 mRNA expression in hiHep with rifampicin. Relative mRNA expression levels in each celecoxib-untreated hiHep [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test: $**p < 0.01$. RIF, rifampicin.

(C) Metabolic activity of CYP3A4 in hiHep. Results are presented as mean \pm S.D. ($n = 4$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test. $**p < 0.01$. KCZ, ketoconazole.

2.3.3 COX 阻害及び PPAR γ 活性化作用が肝分化に与える影響

Celecoxib は COX 阻害や PPAR γ を活性化するなど様々な作用が報告されている。そのため、これらの作用が肝細胞分化に関わっているか検討を行った。COX-1 及び COX-2 の非選択的阻害剤である acetylsalicylic acid 及び ketoprofen、COX-2 の選択的阻害剤である meloxicam 及び nimesulide をそれぞれ添加した。しかしながら、celecoxib とは異なり、CYP3A4 及び TAT の遺伝子発現量増加は確認されなかった (Fig. 2-4)。

Celecoxib が PPAR γ を活性化しているか調べるため、PPAR γ シグナル下流の遺伝子発現量変化を調べた。PPAR γ シグナルの活性化は NF- κ B の阻害を介して炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている。Celecoxib 添加終了時の細胞では、NF- κ B 遺伝子発現量の減少が認められ、また、炎症性サイトカインである interleukin (IL) -1 β や IL-8、tumor necrosis factor (TNF) - α の遺伝子発現量も減少した。さらに、IL-6 や COX-2 遺伝子発現量も減少傾向にあった (Fig. 2-5A)。しかしながら、PPAR γ のアゴニストである pioglitazone の添加では、CYP3A4 遺伝子発現量増加は認められず、また、PPAR γ シグナル下流の Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) の阻害剤である bpV(phen) の celecoxib との併用による CYP3A4 遺伝子発現量抑制は認められなかった (Fig. 2-5B)。

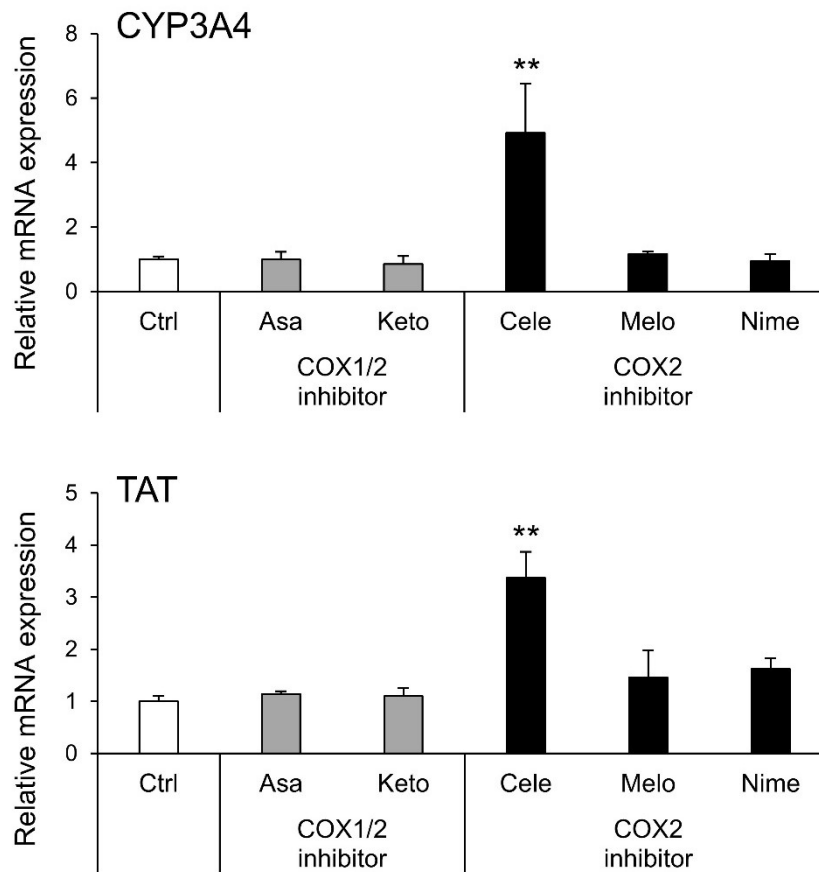


Figure 2-4. Effect of other COX inhibitors on hepatocyte differentiation.

RT-qPCR analysis of CYP3A4 and TAT mRNA expression levels in hiHep. Relative gene expression levels in [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test. $**p < 0.01$ vs. Ctrl. Asa, acetylsalicylic acid; Keto, ketoprofen; Cele, celecoxib; Melo, meloxicam; Nime, nimesulide; COX, cyclooxygenase; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; TAT, tyrosine aminotransferase.

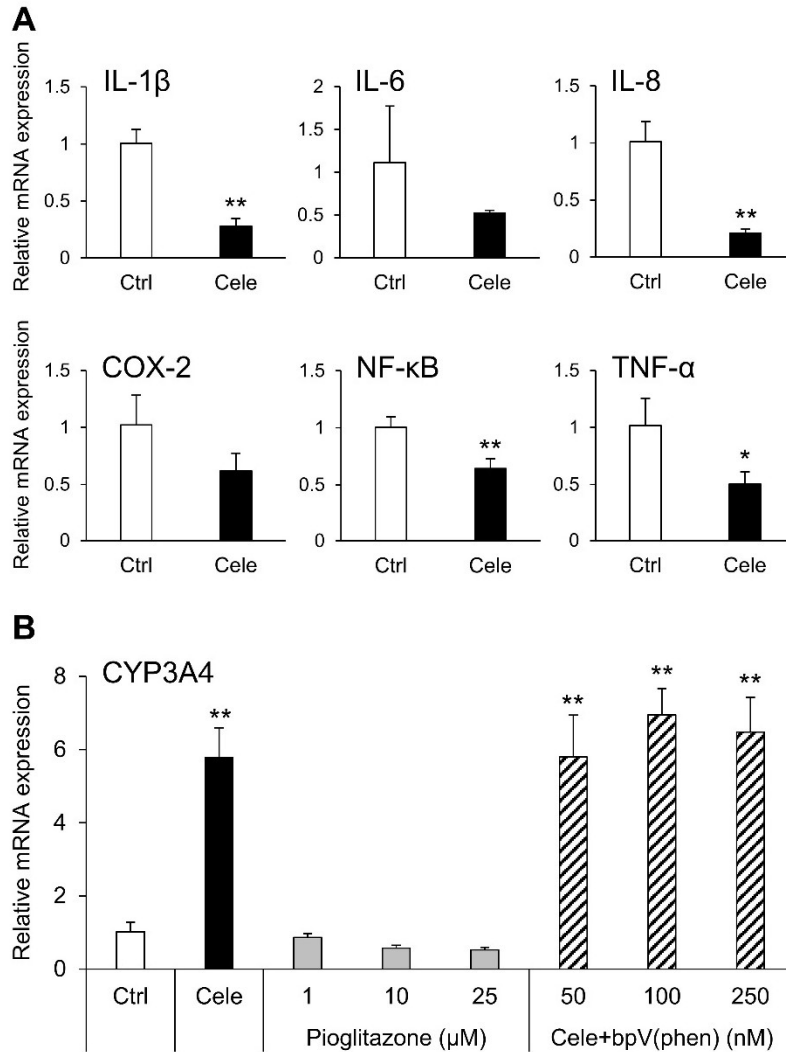


Figure 2-5. Influence of celecoxib on inflammatory cytokines and effect of PPAR γ activation on hepatocyte differentiation.

(A) RT-qPCR analysis of inflammatory marker mRNA expression in hiHep. Relative mRNA levels in celecoxib-untreated hiHep [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as mean \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Student's t -test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. corresponding Ctrl. IL, interleukin; COX, cyclooxygenase; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha. (B) RT-qPCR analysis of CYP3A4 mRNA levels in hiHep. Relative mRNA expression levels in celecoxib-untreated hiHep [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as mean \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test. ** $p < 0.01$ vs. Ctrl. Cele, celecoxib; bpV(phen), potassium bisperoxo (1,10-phenanthroline) oxovanadate (V) trihydrate.

2.3.4 Celecoxib による STAT5 活性化作用が肝分化に与える影響

Celecoxib は STAT3 を阻害し、STAT5 を活性化することが報告されている。この STAT3 及び STAT5 はともにリン酸化されることにより活性化するため、それぞれのリン酸化体の量をウエスタンブロッティングにより定量し、celecoxib が肝細胞分化過程において STAT3 及び 5 に影響を与えるか検討を行った。STAT3 では、celecoxib 添加群のリン酸化 STAT3 量はコントロール群と変化がなく、STAT3 には影響していないことが示唆された。一方、STAT5 では、リン酸化 STAT5 量及び STAT5 総量に対するリン酸化 STAT5 量が増加した (Fig. 2-6A, B)。さらに、STAT5 を阻害することが報告されている pimozone³⁸⁾を celecoxib と併用することにより、celecoxib による ASGR1 や CYP3A4 遺伝子発現量増加が抑制された (Fig. 2-6C)。しかし、STAT5 を活性化することが知られる成長ホルモン^{39, 40)}の添加では CYP3A4 遺伝子発現量増加は認められなかった (Fig. 2-6D)。

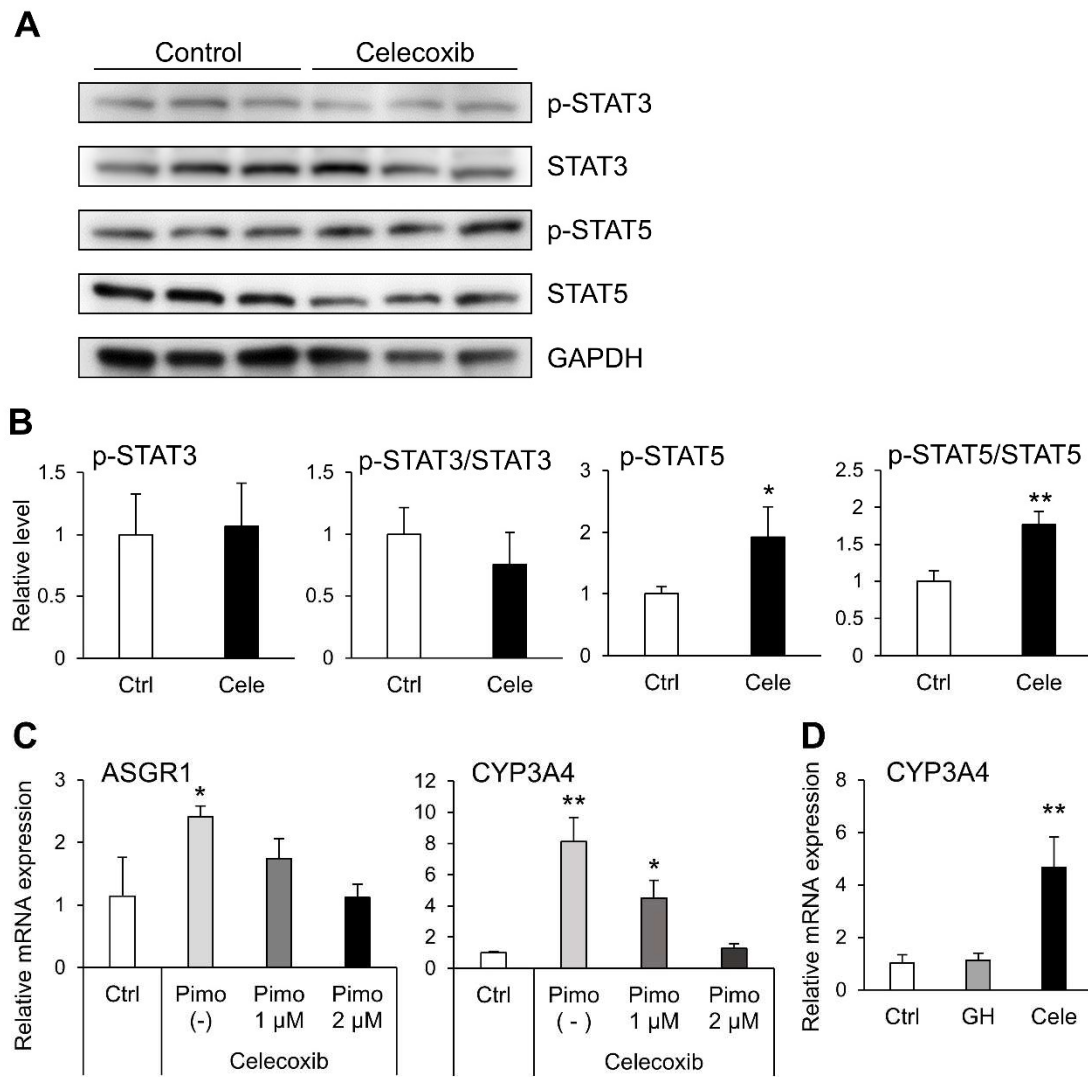


Figure 2-6. Effect of STAT5 activation on hepatocyte differentiation.

(A, B) Western blot analysis of STAT3 and STAT5. Representative blots are shown in (A). Quantified results are presented as means \pm SD ($n = 3$) in (B). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Ctrl. Ctrl, control; Cele, celecoxib. (C) RT-qPCR analysis of ASGR1 and CYP3A4 mRNA in hiHep co-incubated with celecoxib and pimozone (Pimo). Relative gene expression levels in [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Ctrl. (D) RT-qPCR analysis of CYP3A4 mRNA in hiHep. Relative gene expression levels in celecoxib-untreated hiHep [control (Ctrl)] were set to 1, and the values were normalized to HPRT levels. Results are presented as means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Tukey's HSD test. ** $p < 0.01$ vs. Ctrl. GH, growth hormone; Cele, celecoxib.

2.4 考察

薬物代謝酵素の中でも CYP3A4 は最も多くの医薬品の代謝に関与しており、CYP の阻害による毒性発現や活性化による薬効低減など、医薬品相互作用の多くに関わっている⁴¹⁾。分化誘導した肝細胞は celecoxib の添加により、コントロール群と比較して ASGR1 や TAT などの肝細胞成熟化マーカー、PXR や CAR などの核内受容体、UGT1A1 や CYP3A4 などの薬物代謝酵素関連遺伝子発現量が有意に増加した (Fig. 2-2)。また、celecoxib 添加群において、リファンピシンの添加により CYP3A4 の発現量が有意に上昇しており、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が誘導能を獲得していることが示唆された (Fig. 2-3B)。リファンピシンによる CYP3A4 の誘導は PXR を介して起こることが報告されている⁴²⁾。そのため、celecoxib による CYP3A4 誘導能の獲得は、PXR 発現の増加によるものと考えられる。また、CYP3A4 活性においても celecoxib の添加により有意な増加が確認され、また、ketoconazole の添加によりその活性は有意に減少した (Fig. 2-3C)。これらの結果から、celecoxib を用いて分化誘導した肝細胞は、celecoxib 添加により成熟化が促進していることが示唆された。

Celecoxib は COX を阻害することで抗炎症、鎮痛作用を示す NSAIDs の一つである。NSAIDs は COX 阻害作用だけではなく、Wnt/ β -カテニンシグナルの阻害など COX とは無関係な作用も有することが知られている。そのため、celecoxib 以外の NSAIDs による肝細胞分化に与える影響を検討した。非特異的な COX 阻害剤であるアスピリン、ketoprofen 及び COX-2 特異的な阻害剤である celecoxib、meloxicam、nimesulide をそれぞれ添加したところ、celecoxib のみで CYP3A4 の遺伝子発現量の増加がみられ、他の化合物では遺伝子発現量増加は認められなかった (Fig. 2-4)。また、これは TAT においても同様であった。これらのことから、celecoxib による CYP3A4 及び TAT の発現上昇は NSAIDs がもつ COX 阻害

作用やその他の作用によるものではないことが示唆された。

Celecoxib は PPAR γ を活性化することにより、NF- κ B の阻害や PTEN の活性化を介した Akt シグナルの阻害をすることが報告されている⁴³⁾。NF- κ B は活性化されると核内に移動し、炎症性サイトカインなどの炎症反応に必要な様々な遺伝子を活性化する⁴⁴⁾。また、Akt シグナルは幹細胞の維持に重要であるとされている^{45,46)}。そのため、celecoxib による PPAR γ 活性化が肝細胞分化に与える影響を調べた。Celecoxib 添加により、NF- κ B や TNF α 、COX-2 やインターロイキンなどの遺伝子発現量が減少しており、iPS 細胞由来肝細胞において celecoxib 添加により PPAR γ の活性化が起きていることが示唆された (Fig. 2-5A)。一方、PPAR γ のアゴニストである pioglitazone を添加しても CYP3A4 の発現量は増加しなかった。また、celecoxib と PTEN 阻害剤である bpV(phen)を併用しても CYP3A4 の発現量減少は確認されなかった (Fig. 2-5B)。以上のことから、celecoxib は PPAR γ を活性化しているものの、PPAR γ の活性化は CYP3A4 遺伝子発現量増加とは関与していないことが示唆された。

Celecoxib は STAT3 抑制作用を有していることが報告されている³³⁾。しかし、本研究では STAT3 のリン酸化体量及びリン酸化体比に変化は認められず、celecoxib により抑制されていないことが示唆された (Fig. 2-6A, B)。以前の報告では、celecoxib は 50 μ M 以上の高濃度で、STAT3 を活性化するタンパク質の結合を競合的に阻害することが示されている。本研究では、celecoxib を 25 μ M と報告よりも低い濃度で添加したため、競合阻害作用が現れず、STAT3 が抑制されなかったと考えられる。一方、STAT5 はリン酸化体量及びリン酸化体比ともに有意な増加が認められ、celecoxib 添加により活性化されていることが示唆された (Fig. 2-6A, B)。さらに、STAT5 を阻害することが報告されている pimoside と celecoxib を併用すると、celecoxib による CYP3A4 及び ASGR1 の遺伝子発現

量上昇が濃度依存的に抑制された (Fig. 2-6C)。これらのことから、celecoxib による肝細胞機能向上は STAT5 の活性化によって起こることが示唆された。しかし、STAT5 を活性化することが知られている成長ホルモン^{39, 40)}を添加しても CYP3A4 の遺伝子発現量上昇は認められなかった (Fig. 2-6D)。これまでに、成長ホルモンは下垂体より間欠的に分泌することが知られている^{47, 48)}。また、成長ホルモンによる STAT5 活性化は、成長ホルモンの間欠的な濃度変動によって短時間のうちに起こり、その活性化は長時間持続しないことが報告されている⁴⁹⁾。本研究では、同濃度の成長ホルモンを 8 日間培地に添加し続けているため、添加開始直後には STAT5 活性化が起こるものの、その活性化が持続せず、CYP3A4 遺伝子発現量が増加しなかったと考えられる。これらのことから、celecoxib は成長ホルモンとは異なり、STAT5 を持続的に活性化させ、この持続的な活性化が肝細胞の成熟化に重要であると考えられる。

これまでに、肝細胞分化に HNF4 α が重要な役割を果たすことが報告されている⁵⁰⁾。実際に、ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化過程において HNF4 α や NNF6 を過剰発現させることで、より機能的な肝細胞を得ることが可能であることが示されている^{51, 52)}。また、成長ホルモンは STAT5 を介して HNF4 α や NNF6 の転写を活性化させることが知られている⁵³⁾。これらの報告から、celecoxib による STAT5 活性化が HNF4 α や NNF6 のような転写因子の転写を調節することによりヒト iPS 細胞からの肝細胞分化に影響を与えている可能性がある。しかしながら、分化終了後の肝細胞における HNF4 α や NNF6 の遺伝子発現量には大きな変化は認められず、celecoxib が STAT5 の活性化を介し、どのように肝細胞分化へ影響を与えているかは分かっていない。STAT5 は他にも HNF3 γ や IGF-1 などの遺伝子の活性化や、Akt シグナルの活性化など様々なシグナルに影響を与える⁵⁴⁾。今後、STAT5 下流のどのシグナルが直接的に肝細胞分化に関与しているか検討

し明らかにすることで、より成熟したヒト iPS 細胞由来肝細胞作製の一助となる可能性がある。

本研究では、低分子化合物の添加という非常に簡便な方法で iPS 細胞からより機能的な肝細胞が誘導可能となった。Celecoxib を用いて分化誘導した肝細胞では、これまで発現量の低かった TAT や PXR、UGT1A1 や CYP3A4 遺伝子発現量の増加が認められた。しかしながら、その遺伝子発現量は 48 時間培養ヒト初代肝細胞と比較するといまだ低く、十分とは言えない。今後、すでに報告されている肝細胞分化に有効な低分子化合物を組み合わせるなど、より高機能的な肝細胞の分化誘導のために更なる検討が必要である。

2.5 小括

本研究では、celecoxib が STAT5 活性化を介してヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進することを示した。celecoxib は低分子化合物であるため、安価かつ異種成分を含まず、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導因子として有用であると考えられる。しかしながら、薬物代謝酵素の発現はヒト成熟肝細胞よりも低く、今後、より成熟した肝細胞への分化誘導方法を検討する必要がある。

第三章 異種間キメラ動物作出において ES 細胞が最も肝臓に寄与する手法の開発

3.1 緒言

近年、多能性幹細胞からの機能的な臓器の作製法として、胚盤胞補完法による *in vivo* での臓器作製が報告された^{55,56)}。この報告では、膵臓の発生や β 細胞の成熟化に必須の転写因子である *Pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox1) をノックアウトした *Pdx1* ノックアウトマウスの胚盤胞にラット多能性幹細胞を注入することによって、マウス体内にラット多能性幹細胞由来の機能的な膵臓を作製することに成功している。また、同様の方法でラット体内にマウス膵臓を作製し、この膵臓から分離した膵島を糖尿病マウスに移植することにより治療効果を示すことを報告しており、今後、同様の方法を用いて膵臓だけではなく様々な臓器が作製されることが予測される⁵⁷⁾。さらに、ヒト iPS 細胞をブタ受精卵内に注入することにより、ヒト iPS 細胞が受精卵に寄与することが報告され、将来的には本手法により異種動物体内でのヒト臓器作製が期待されている⁵⁸⁾。

腎臓においても同様に胚盤胞補完法による腎臓の作製が報告されており、腎臓発生に必須な遺伝子である *Sall1* (spalt like transcription factor 1) ノックアウトマウス受精卵を用いることで、マウス-マウス ES/iPS 細胞キメラマウス体内で多能性幹細胞由来腎臓が作製できることが示されている⁵⁹⁾。その一方で、同手法によるマウス体内でのラット多能性幹細胞由来腎臓の作製ができないことも同時に報告されている。これは腎臓発生の初期においてホストであるマウス細胞とラット多能性幹細胞由来細胞間における相互作用の欠如によるものと考えられている。この事実は胚盤胞補完法が必ずしも全ての臓器に適応できるわけ

ではないことを示唆しており、胚盤胞補完法の技術を用いた *in vivo* での臓器作製の成否には ES/iPS 細胞が欠損する標的臓器に対して十分に寄与し、補完できるかが重要であると考えられる。

胚盤胞補完法の技術は、受精卵と多能性幹細胞を用いたキメラ動物作出手法である胚盤胞注入法に基づいている。キメラ動物作出手法は、受精卵に多能性幹細胞を注入する注入法と、透明帯を除去した受精卵と多能性幹細胞を共培養して1つに凝集させる凝集法の2つに分類される⁶⁰⁻⁶²⁾。さらに、注入法は用いる宿主受精卵の発生段階により細分化される。以前より、マウス受精卵とマウス多能性幹細胞を用いた同種間キメラ動物の作出はトランスジェニックマウスの作製に広く用いられ、作出手法によるキメラ動物の作出効率や多能性幹細胞の生殖細胞系列への寄与が検討されている⁶³⁾。さらに、同種間キメラ動物の作出においては、胚盤胞補完法で用いられる胚盤胞よりも8細胞期胚を用いることで生殖細胞系列への寄与確率が向上することが知られている。また、マウス-ラット間の異種間キメラ動物が胚盤胞注入法だけではなく凝集法によっても作製可能であることが報告されている⁶⁴⁾。しかしながら、胚盤胞補完法への応用を目指した異種間キメラ動物の作出において、8細胞期胚注入法や8細胞期胚凝集法などキメラ動物作出手法によりキメラ動物の作出効率や各臓器（心臓・肺・肝臓・膵臓・腎臓）における異種多能性幹細胞由来細胞の寄与率がどのように変動するか、検討がなされていない。そこで本章では、胚盤胞補完法による異種多能性幹細胞由来肝臓作製の前段階として、キメラ動物作出手法によるキメラ動物の作出効率及び肝臓における異種 ES 細胞の寄与率の違いを比較し、*in vivo* での異種多能性幹細胞からの機能的な肝臓作製の可能性について検討した。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬及び細胞

ラット ES 細胞 (RGD ID: 10054021) は、蛍光タンパク質 (tdTomato) 遺伝子を導入したラットより樹立したものであり、生理学研究所 平林真澄博士よりご供与いただいた。フィーダー細胞は MEF を使用した。DMEM/F12、forskolin、CHIR99021、PD0325901、paraformaldehyde は和光純薬工業、Neurobasal Medium、N-2 supplement、B-27 supplement は Thermo Fisher Scientific、Rat ESGRO、EmbryoMax KSOM Mouse Embryo Media (KSOM 培地)、EmbryoMax 1M HEPES Buffer Solution は Merck Millipore、M2 培地、酸性タイロイド液は Sigma、L-Glu、NEAA、penicillin-streptomycin は Biological Industries、DMSO はナカライテスク、MMC は協和発酵キリン、D-PBS (-)用錠剤はタカラバイオ、FBS は biowest、KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master mix ABI Prism は Kapa Biosystems、O.C.T. compound は Sakura Finetek (東京)、QIAamp DNA Mini Kit は QIAGEN (メリーランド州ジャーマンタウン、米国)、セボフルラン吸入麻酔液「マイラン」はマイラン製薬株式会社 (大阪)、動物用ケタラール 50 (筋注用) は第一三共株式会社 (東京)、セラクター 2 % 注射液はバイエル薬品株式会社 (大阪)、human chorionic gonadotropin (hCG)、pregnant mare serum gonadotropin (PMS) はあすか製薬株式会社 (東京) より、リボン刺しゅう針 No.18 はクロバー株式会社 (大阪) より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

3.2.2 実験動物

実験に用いた B6D2F1 マウス、C57BL/6 マウス及び ICR マウスは、日本エスエルシー (静岡) から入手した。動物は、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 時間ごとの明暗サイクルで温度および湿度をコントロールした部

屋で飼育した。本研究は、名古屋市立大学動物実験ガイドラインに従って実施した。

3.2.3 ラット ES 細胞の培養

異種間キメラマウスの作製には、蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現したラット ES 細胞を用いた。ラット ES 細胞の培養は Yamaguchi らの報告⁶⁵⁾を参考に、2 mM L-Glu、10 μ M forskolin、3 μ M CHIR99021、1 μ M PD0325901、1,000 units/mL Rat ESGRO、N-2 supplement、B-27 supplement を含む DMEM/F12 と Neurobasal Medium の 1:1 混合培地を用いて、MMC 処理により増殖能を不活化した MEF 上で培養した。培地交換は毎日行い、3 日毎に継代培養を行った。

3.2.4 8 細胞期胚及び胚盤胞の採取

4 週齢の雌性 B6D2F1 マウスに PMS を 7.5 units/匹となるように腹腔内投与し、その 47-48 時間後に hCG を 7.5 units/匹となるように腹腔内投与することで過排卵を誘起させ、雄性 B6 マウスと 1 晩同居させた。翌朝、膣栓の確認を行った。8 細胞期胚の採取は、交配 2.5 日後 (hCG 投与から約 56 時間後) に卵管周辺を摘出し、卵管に注射針を挿入して M2 培地で灌流することにより 8 細胞期胚を得た。胚盤胞の採取は、交配 3.5 日後 (hCG 投与から約 87 時間後) に子宮を摘出し、子宮に注射針を挿入して M2 培地で灌流することにより受精卵を得た。得られた 8 細胞期胚及び胚盤胞は KSOM 培地中に移し、移植までの間培養を行った。

3.2.5 注入法によるキメラ胚の作製

6 cm ディッシュ上に、M2 培地とラット ES 細胞懸濁液の小滴を作り、ミネラルオイルで完全に覆ったのち、8 細胞期胚を 3 cm ディッシュ上の M2 培地に移

した。マイクロマニピレーターを用いて 8 細胞期胚内部へ割球を傷つけないようにゆっくりと注入ピペットを挿入し、ラット ES 細胞を 3-5 個注入した。注入を終えた 8 細胞期胚は一晩培養し、胚盤胞まで発生したものを移植に用いた。胚盤胞への注入では、注入ピペットを胚盤胞内部へ内部細胞塊を傷つけないように挿入し、胚盤胞腔にラット ES 細胞を 10-15 個注入した。注入を終えた胚盤胞はその日のうちに移植に用いた。

3.2.6 凝集法によるキメラ胚の作製

あらかじめ、6 cm ディッシュ上に刺繍針を押し付け等間隔に 12 個のマイクロウェルを作製し、これらを KSOM 培地の小滴及びミネラルオイルで覆うことで胚培養用ディッシュを作製した。胚培養用ディッシュのマイクロウェルに酸性タイロード液により透明帯を除去した 1 個あるいは 2 個の 8 細胞期胚を添加し、そこに 10-20 個程度の細胞からなるラット ES 細胞塊を加え、8 細胞期胚に接触させた。このまま一晩培養し、8 細胞期胚とラット ES 細胞塊を凝集させ、胚盤胞まで発生したものを移植に用いた。

3.2.7 キメラ胚の子宮内移植

5 週齢の雌性 ICR マウスを精管結紮した雄性 ICR マウスと 1 晩同居させた。翌朝、膣栓の確認を行い、膣栓のあったマウスを偽妊娠マウスとして実験に用いた。偽妊娠マウスにケタラル及びセラクタールを腹腔内投与し、麻酔した。麻酔後、子宮を体外に露出させ、27G 注射針を用いて子宮内へと通じる穴をあけた。キメラ胚を入れたガラスキャピラリーを、注射針により開けた穴に挿入し約 7 個のキメラ胚を移植した。逆側の子宮に対しても同様にしてキメラ胚を移植後、麻酔から覚めるまでマウスを 37°C のヒーターで暖めた。

3.2.8 キメラマウス臓器の蛍光イメージング

出生したマウスは実体蛍光顕微鏡 Leica M165 FC (Leica Microsystems、ヴェッツラー、独国) を用いて、体表面における tdTomato の蛍光を確認することで、キメラマウスであることを確認した。作出したキメラマウスは 4 週齢時に安楽死させ、肝臓、肺、脾臓、心臓及び腎臓を摘出し、実体蛍光顕微鏡にて観察を行った。観察後、各臓器の一部は免疫組織染色用に O.C.T compound により包埋し、ドライアイスを用いて凍結した。包埋したサンプルは、-80°C で保存した。残りの臓器全てをゲノム DNA 抽出用に用いた。

3.2.9 qPCR 解析

ゲノム DNA はマウスから摘出した臓器をホモジナイズし、QIAamp DNA Mini Kit の添付マニュアルに従い抽出した。PCR プライマーは Table 3-1 に示したものをを用いた。Real-time PCR の反応混合液は KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master mix ABI Prism を用い、最終容量 10 μ L で行った。反応は Eco Real Time PCR System (Illumina、カリフォルニア州サンディエゴ、米国) を用いて行った。ラット ES 細胞の寄与率は以下の算出式により導いた。

$$[Chimerism(rat)] = \frac{[DNA]_{r0}}{([DNA]_{m0} + [DNA]_{r0})} \times 100 \\ = (1 + e_m)^{C_{qm}} / \{(1 + e_r)^{C_{qr}} + (1 + e_m)^{C_{qm}}\} \times 100$$

$[DNA]_{m0}$: マウス DNA 初濃度、 $[DNA]_{r0}$: ラット DNA 初濃度、 C_{qm} : マウス C_q 値、 C_{qr} : ラット C_q 値、 e : PCR 効率。

Table 3-1. Real-time PCR primer sequences.

Animals	Gene	Primer Sequences
<i>Mus musculus</i>	<i>Transferrin</i>	Forward: 5'- TGA GTT TTG GGC ATG AAT GA -3'
<i>musculus</i>	<i>receptor (Tfr)</i>	Reverse: 5'- ACT TTT AAG CCC AGG CCA AT -3'
<i>Rattus</i>	<i>Transferrin</i>	Forward: 5'- CTC CAG ACC AAC CCT AGC AA -3'
<i>norvegicus</i>	<i>receptor (Tfr)</i>	Reverse: 5'- CAG GGC TTC ACT CAT GAA CA -3'

3.2.10 免疫組織染色

包埋した組織をクライオスタット (Leica Microsystems) により 10 μm の厚さで切り出し、スライドガラスに貼り付けた。その後の免疫組織染色は Katsuda らの報告を参考に行った⁶⁶⁾。スライドガラスに張り付けた切片を 4%paraformaldehyde により室温にて 20 分間固定処理し、Immunosaver (日新 EM、東京) を用いて 98°C で 45 分間処理することで抗原の賦活化を行った。その後、0.3% H_2O_2 により室温にて 30 分間内在性ペルオキシダーゼの不活化を行い、さらに Blocking One solution (ナカライテスク) を用いて室温にて 30 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、mouse monoclonal anti-rat CYP2C6 antibody (Santa Cruz Biotechnology) (1:200) を用いて 4°C にて一晩反応させた。二次抗体は Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (1:500) を用いて室温にて 2 時間反応させ、ImmPACT DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories、カリフォルニア州バーリングラム、米国) を用いて染色した。その後、ヘマトキシリンを用いて体比染色を行い、ECLIPSE Ni microscope (Nikon) にて観察した。

3.2.11 統計学的解析

多重比較は、分散分析を行った後、Tukey's HSD (honestly significant difference) test により行った。その際の統計分析は、SPSS Statistics software package, version 25.0 (IBM Japan) を用いて行った。

3.3 結果

3.3.1 ラット ES 細胞を用いた異種間キメラマウスの作出

マウス受精卵と tdTOMATO で標識したラット ES 細胞を用いて、8 細胞期胚凝集法、8 細胞期胚注入法、胚盤胞注入法によりマウス受精卵にラット ES 細胞の寄与したキメラ胚を作製した (Fig. 3-1A-D)。産仔の体表面を蛍光観察すると、一部の産仔において tdTOMATO の赤色蛍光が観察され、ラット ES 細胞の寄与したキメラマウスであることが示された (Fig. 3-1E)。キメラマウスの作出率は作出手法により異なり、2 つの胚を用いた 8 細胞期胚凝集法 (Two-embryo) では 3.3%、8 細胞期胚注入法では 4.7%、胚盤胞注入法では 12.5%であった (Table 3-2)。しかしながら、1 つの胚のみを用いた 8 細胞期胚凝集法 (One-embryo) においては、マウス出生率が非常に低く、キメラマウスは得られなかった。そのため、以降の実験では 2 つの胚を用いた 8 細胞期胚凝集法により作出されたキメラマウスを解析に用いた。

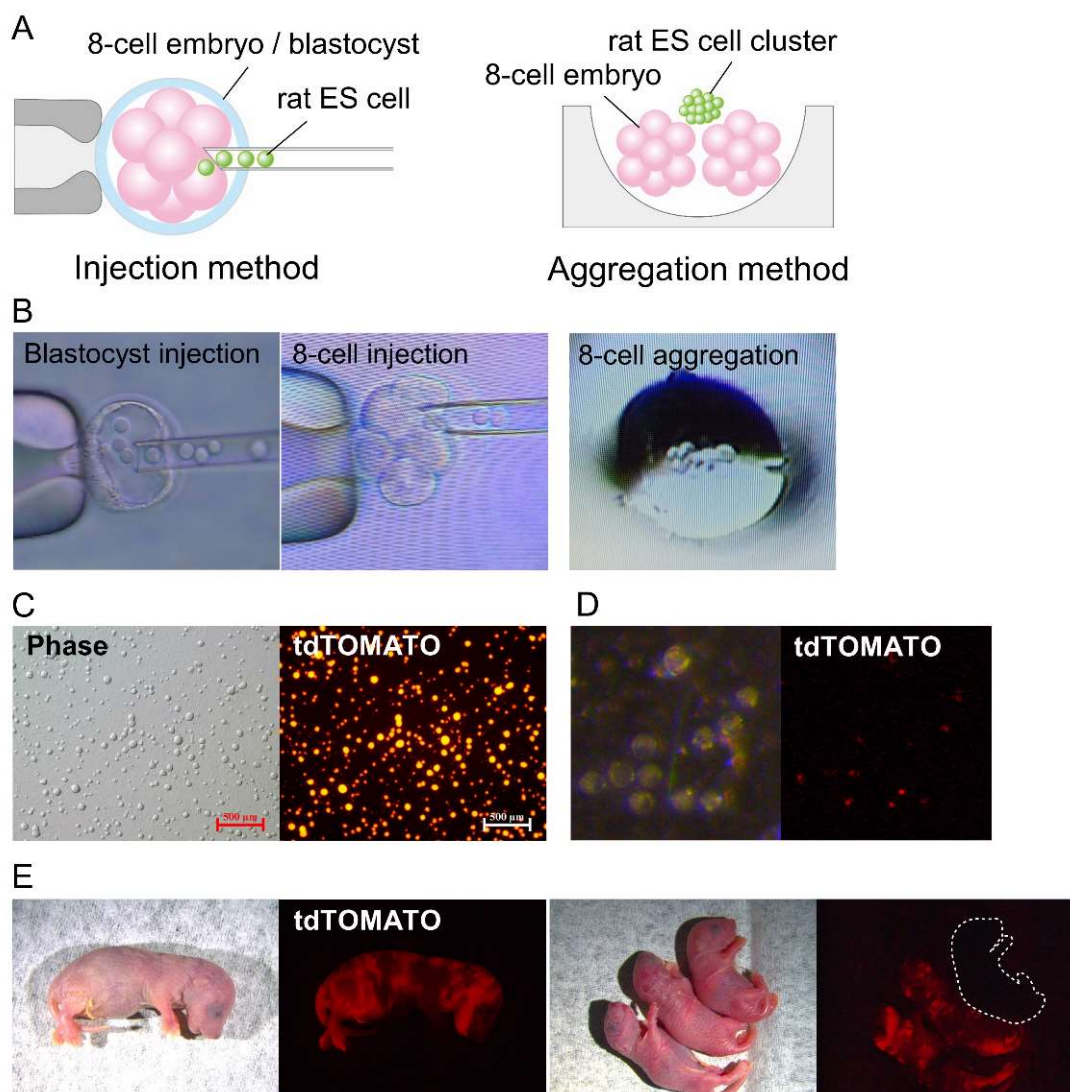


Figure 3-1. Generation of chimeric mice using rat ES cells via three different methods.

(A) Schematic diagram illustrating the injection and aggregation methods for introducing rat ES cells into mouse embryos. (B) Images of blastocyst injection, 8-cell injection, and 8-cell aggregation. (C) Uninjected rat ES cells (left) and tdTOMATO fluorescence (right). (D) Chimeric embryos after rat ES cell injection (left) and tdTOMATO fluorescence (right). (E) Fluorescence images of neonatal chimeric mice. The white dotted line represents a non-chimeric mouse. Scale bar: 500 μ m.

Table 3-2. Generation of interspecies chimeric mice with rat ES cells using three different generation methods.

Generation method		Number of transplanted embryos	Borne mice		
			Number of pups	Number of non-chimeric mice	Number of chimeric mice
8-cell aggregation	One-embryo	98	7	7	0
	Two-embryo	244	40	32	8
8-cell injection		149	39	32	7
Blastocyst injection		64	28	20	8

3.3.2 キメラマウス臓器の蛍光イメージング

ラット ES 細胞のそれぞれの臓器への寄与を明らかにするため、キメラ胚を移植することで得られた全てのマウスから 4 週齢時に肝臓、脾臓、心臓、肺、及び腎臓を摘出し、蛍光イメージングを行った。摘出したキメラマウスの臓器は通常のマウスと比較し、大きさや形に特に異常は認められなかった。臓器の蛍光強度は個体ごとで異なるものの、腎臓を除く全ての臓器で tdTOMATO の蛍光が観察された。また、胚盤胞注入法で作出された全てのキメラマウスの肝臓における tdTOMATO の蛍光は非常に弱かった。一方、8 細胞期胚凝集法や 8 細胞期胚注入法で作出されたキメラマウスにおいては、肝臓における蛍光が胚盤胞注入法のものよりも強い傾向にあった。さらに、臓器内部へのラット ES 細胞の寄与を確認するため、臓器切片を作製し蛍光観察を行った。臓器の蛍光観察結果と同様に、胚盤胞注入法で作出したキメラマウスでは肝臓における tdTOMATO 陽性部がほとんど認められず、8 細胞期胚凝集法や 8 細胞期胚注入法で作出されたキメラマ

ウスでは陽性部が確認された (Fig. 3-2)。

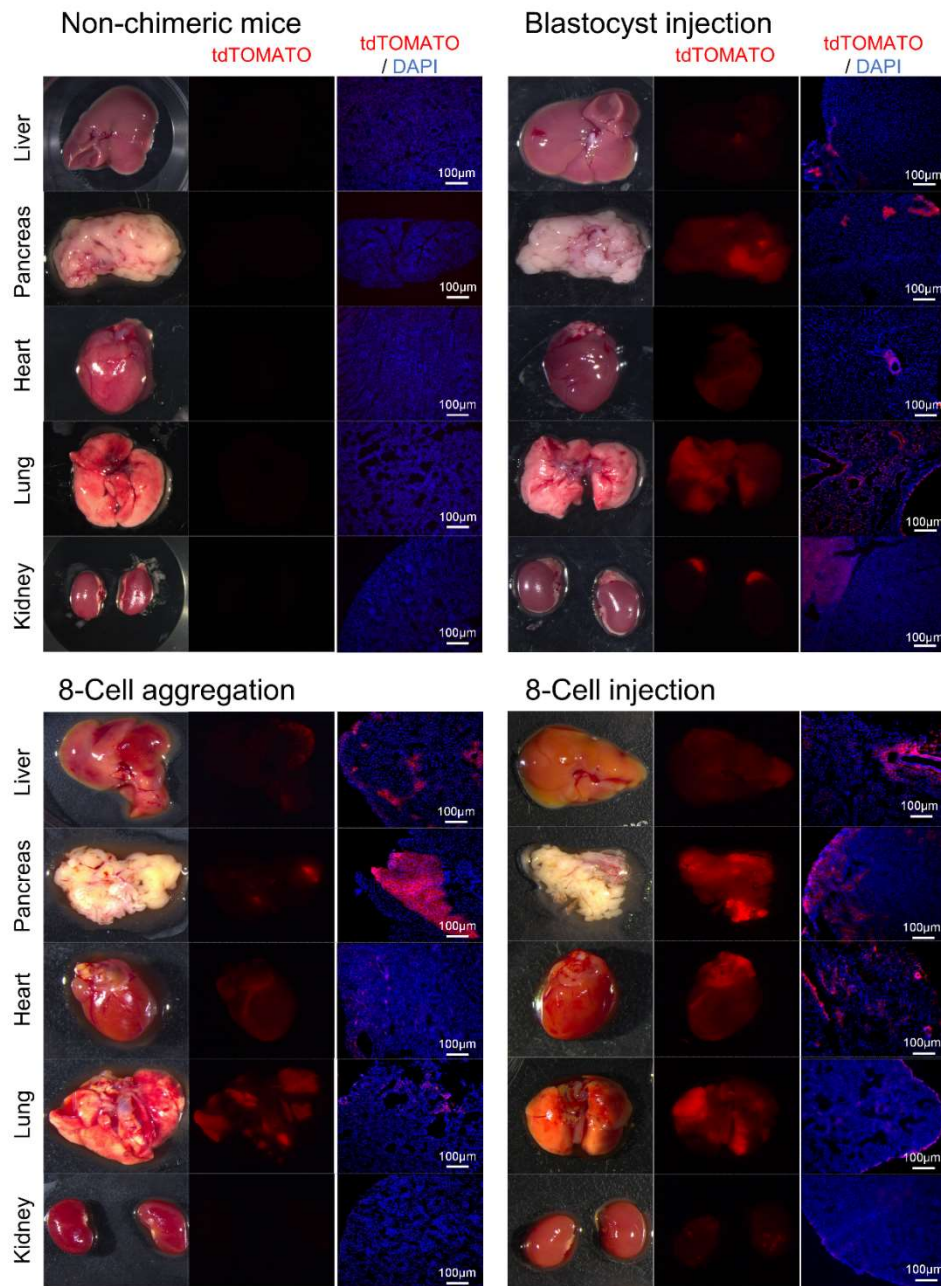


Figure 3-2. Contribution of rat ES cells to different organs in chimeric mice.

The liver, pancreas, heart, lungs, and kidneys were harvested from non-chimeric and chimeric mice generated *via* 8-cell aggregation, 8-cell injection, and blastocyst injection. Whole organs were imaged for tdTOMATO expression, and tissue sections show the contribution of rat ES cells to the interior of the organs (counterstained with DAPI, blue).

3.3.3 各臓器におけるラット ES 細胞の寄与率

各臓器へのより正確なラット ES 細胞の寄与率を確認するため、ゲノム DNA を qPCR 法で解析する新たな算出手法を考案した。本手法により正確に寄与率が算出できているか検討するため、マウス ES 細胞とラット ES 細胞を任意の割合で混合したサンプルからゲノム DNA を抽出し、本手法により寄与率を算出した。算出された寄与率は、ラット ES 細胞を混合させた割合である理論値と非常に近く、正確に算出されていることが示された。

各臓器におけるラット ES 細胞の寄与率を測定するため、切片作製に必要な一部を除き、臓器全体をホモジナイズし、ゲノム DNA を調製した。キメラマウスの各臓器から得られたゲノム DNA を qPCR 法で解析すると、胚盤胞注入法で作出したキメラマウスでは肝臓へのラット ES 細胞の寄与はほとんど認められなかった。一方、8 細胞期胚注入法では肝臓へのラット ES 細胞の寄与が認められた。また、その寄与率は胚盤胞注入法で作出したキメラマウスと比較し有意に高かった (Fig. 3-3B)。その他の臓器に関しては作出手法による有意な差は確認されず、また、腎臓では作出手法によらずラット ES 細胞の寄与はほとんど認められなかった。

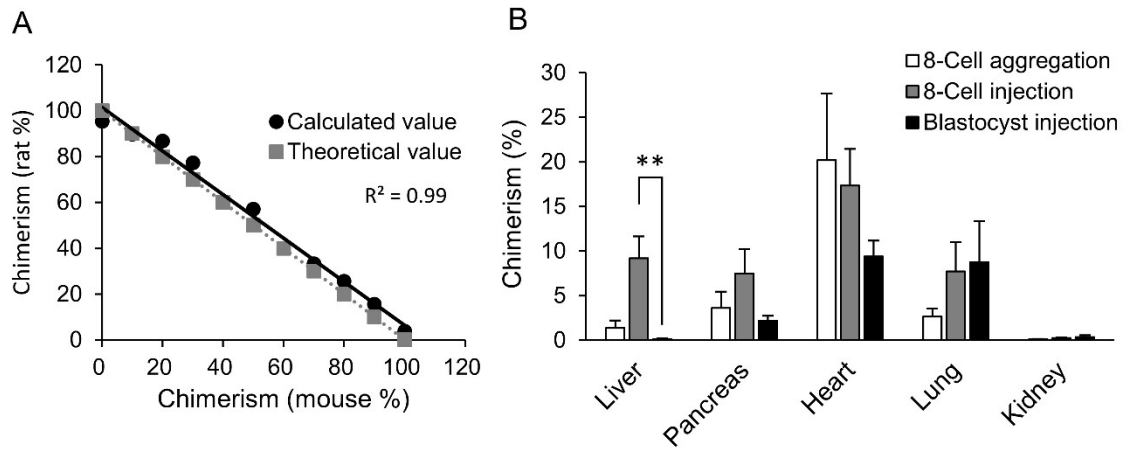


Figure 3-3. Calculation of the rate of contribution of rat ES cells to the organs of chimeric mice.

(A) Validation of the contribution rate calculation method. (B) The contribution rate of rat ES cells in each organ. The results are presented as mean \pm SE (8-cell aggregation, $n = 3$; 8-cell injection, $n = 6$; blastocyst injection, $n = 6$). ** $P < 0.01$, Tukey's HSD test.

3.3.4 キメラマウス肝臓におけるラット CYP2C6 発現

ラット ES 細胞由来肝細胞がキメラマウス肝臓内でラット薬物代謝酵素を発現しているか調べるため、マウス CYP2C アイソフォームと交差反応しない、ラット CYP2C6 特異的抗体を用いて免疫染色を行った。8 細胞期胚注入法及び凝集法で作出したキメラマウス肝臓において、ラット CYP2C6 陽性細胞が検出された一方、胚盤胞注入法で作出されたキメラマウス肝臓ではラット CYP2C6 陽性細胞はほとんど検出されなかった (Fig. 3-4)。また、キメラマウス肝臓内におけるラット ES 細胞由来肝細胞の特定の部位への寄与の偏りは認められなかった。

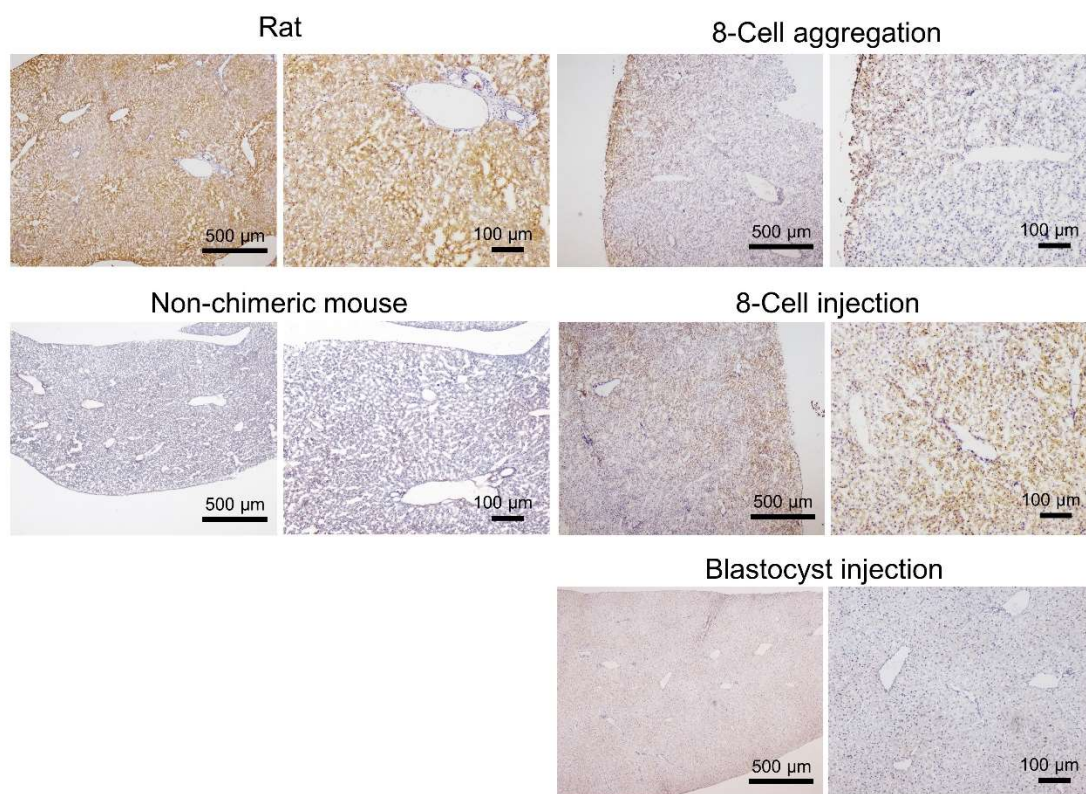


Figure 3-4. Immunostaining of chimeric mouse liver sections with anti-rat CYP2C6 antibody.

The livers of two chimeric mice, created using different methods, were immunostained, and the representative one of each group were shown.

3.4 考察

本研究では、8細胞期胚注入法、8細胞期胚凝集法、胚盤胞注入法という3つの異なる手法を用いて、それぞれ異種間キメラマウスの作出に成功した。キメラマウスの作出率は胚盤胞注入法で最も高く、胚盤胞注入法がキメラマウスを最も効率良く作出できることが示唆された (Table 3-2)。しかし、ラット ES 細胞の寄与率は臓器によって異なるものの、8細胞期胚注入法で作出したキメラマウスにおいてより高い傾向にあった (Fig. 3-3)。

胚盤胞を用いた場合と比較し、8細胞期胚を用いた場合にキメラマウスの作出率が低下した。この原因として、32 から 64 個の細胞からなる胚盤胞と比較し、8細胞期胚では胚におけるマウス細胞に対するラット ES 細胞の割合が高いことが考えられる。また、1つの胚を用いた凝集法では2つの胚を用いた凝集法と比較し出生率が低かった。本研究では、胚とラット ES 細胞を凝集させる際に、胚の数に依らず同数のラット ES 細胞を用いた。そのため、1つの胚を用いた凝集法では2つの胚を用いた際と比較し、作製されたキメラ胚に対するラット ES 細胞の寄与率が高くなった可能性がある。これまでに、胚における異種細胞の高率な寄与は奇形形成や生存率低下を引き起こすことが報告されている^{55, 64)}。本研究においても、妊娠マウスから帝王切開により産仔を得る際に、発生が止まった胎児が観察された (Fig. 3-5)。この個体の蛍光観察から、ほぼ全身にラット ES 細胞の寄与が確認され、高いラット ES 細胞の寄与が個体発生の停止原因と考えられる。以上のことから、初期胚における高いラット ES 細胞の寄与が子宮内でのキメラ胚の発生を阻害し、出生率の低下に繋がっていると考えられる。しかしながら、脾臓や胸腺においては全てがラット ES 細胞由来となっても個体発生が起きていることから、これらの臓器以外へのラット ES 細胞の高い寄与が個体発生に影響を与えていると推察される。近年、内胚葉系列への分化に重要な遺伝子で

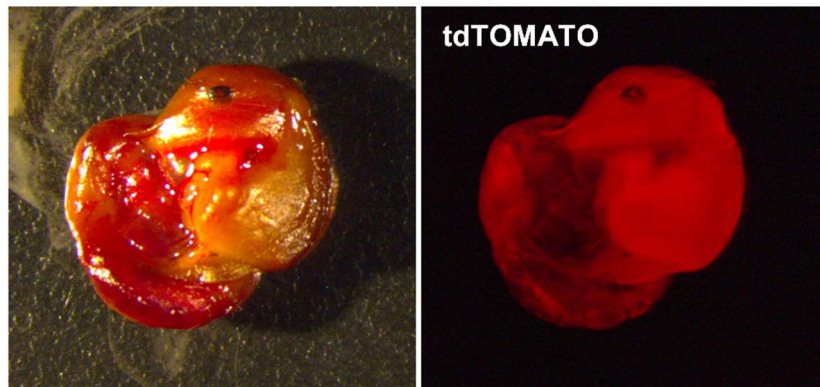


Figure 3-5. Observation of fluorescence in an embryo whose generation stopped halfway.

ある *Mixl1* を強制発現させたマウス ES 細胞を用いてキメラマウス作製を行うことで、マウス ES 細胞の肝臓や肺といった内胚葉系列組織への寄与が増加し、中胚葉や外胚葉系列組織への寄与が減少するなどマウス ES 細胞の寄与方向をコントロールできることが報告された⁶⁷⁾。今後、CRISPR/Cas9 のような遺伝子編集技術を用いて、ES/iPS 細胞の外胚葉や中胚葉への分化に重要な転写因子をノックアウトし、キメラマウス形成に用いる ES/iPS 細胞の標的臓器以外への分化を阻害することで上記のような発生へのラット ES/iPS 細胞の影響を防ぐことができる可能性がある。

一般に、ES 細胞の組織への寄与率はキメラマウスの組織切片を染色し、その ES 細胞由来組織の面積比から算出される。しかし、この手法では多くの切片を免疫染色し、面積を計算する必要があるため非常に煩雑であるうえ、切片を作製した臓器の一部からしか寄与率を算出することができない。蛍光観察からキメラマウスにおける ES 細胞の臓器への寄与は一様ではないと考えられるため、切片からの寄与率算出では臓器全体における寄与率を反映しているとは言い難い。これらの問題を解決するため、キメラマウス臓器から抽出したゲノム DNA を用いて寄与率の算出を行った。本手法を用いて解析を行うと、理論値と非常に近い値が算出され、正確にラット ES 細胞の割合が算出できていることが示唆された

(Fig. 3-3A)。このことから、本解析手法はキメラマウスにおける ES 細胞の組織への寄与率を算出するのに有用であると考えられる。本手法を用いることで、免疫染色などを行うことなく非常に簡便に、臓器全体の異種細胞割合を算出することが可能である。

臓器毎にラット ES 細胞の寄与率を算出すると、腎臓以外の臓器ではラット ES 細胞の寄与が確認された一方、腎臓では作出手法によらず、ラット ES 細胞の寄与がほとんど認められなかった。この結果は、近年報告された *Sall1* ノックアウトマウス受精卵とラット多能性幹細胞を用いた胚盤胞補完法による腎臓の作出ができないことと一致している⁵⁹⁾。一方、肝臓においては胚盤胞注入法により作出したキメラマウスではほとんどラット ES 細胞の寄与が認められなかったのに対し、8 細胞期胚注入法では寄与率の有意な上昇が認められた (Fig. 3-3B)。加えて、その寄与率は胚盤胞注入法により作出したキメラマウスの脾臓におけるラット ES 細胞の寄与率と比較しても高かった。また、8 細胞期胚凝集法及び 8 細胞期胚注入法により作出されたキメラマウス肝臓内でラット肝細胞から CYP2C6 が産生されていることが示された (Fig. 3-4)。これらの結果は腎臓の場合とは異なり、将来的に胚盤胞補完法による脾臓の作製と同様、8 細胞期胚を用いた補完法により肝臓の作製が可能であることを示唆している。残念ながら、現状では補完法に応用可能な肝臓発生のカギとなるマスター遺伝子は見つかっておらず、本研究において 8 細胞期胚補完法による異種肝臓作製が可能であるか検証を行うことはできなかった。しかし、ALB プロモーター下に単純ヘルペスウイルス I 型チミジンキナーゼを発現させた ALB-TK マウスや、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼノックアウトマウス (*Fah*^{-/-}マウス)、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター発現マウス (*uPA* マウス) など、出生後に肝炎を誘発可能なマウスをホストに用いることでキメラマウス肝臓におけるラット ES 細胞由

来肝細胞の割合を向上させることが可能かもしれない⁶⁸⁻⁷⁰。今後、胚盤胞補完法と同様に 8 細胞期胚補完法でもほぼ全てが多能性幹細胞由来からなる機能的な肝臓が作製可能であるか詳細な検討が必要である。

ラット ES 細胞の寄与率は、胚盤胞注入法で作出したキメラマウスでは肝臓や脾臓で低く、心臓で高いなど個体内でばらつきが大きく、臓器毎で寄与率に大きな偏りがあった。一方、8 細胞期胚注入法で作出したキメラマウスでは寄与のない腎臓を除き、それぞれの寄与率がおおよそ 10%程度と、個体内での臓器毎のばらつきが小さく、寄与率が比較的均一であった (Fig. 3-3B)。これまでに、8 細胞期胚までの割球はドナー受精卵と凝集させることで全ての組織に寄与する多能性を有していることが報告されている⁷¹⁻⁷³。その一方で、胚盤胞の内部細胞塊はすでにその後の細胞運命が決まった状態にあり、胚盤胞の発生に従い、空間的に異なる胚盤葉および原始内胚葉区画へと徐々に分離される⁷⁴⁻⁷⁶。8 細胞期胚に異種 ES 細胞を注入すると、宿主受精卵の割球とともに異種 ES 細胞が増殖し、コンパクションを経て内部細胞塊に均一に異種 ES 細胞が寄与した胚盤胞になると考えられる。その一方で、胚盤胞腔へと注入された異種 ES 細胞は内部細胞塊へと寄与するものの、その寄与は均一ではなく、内部細胞塊の胚盤胞腔面に多く寄与するなど偏りが生じることが想定される。この偏りが胚盤胞注入法における臓器毎での寄与率のばらつきに繋がっているものと考えられる。

3.5 小括

本研究により、異種間キメラマウスにおいて 8 細胞期胚注入法により肝臓への多能性幹細胞の寄与が有意に上昇し、ラット ES 細胞由来肝細胞が肝臓内に存在することが明らかとなった。このことから、キメラ動物作出による多能性幹細胞由来臓器の作製、特に肝臓の作製において 8 細胞期胚注入法が有用であると考えられる。

第四章 総括

本研究では、安価かつ安定性が高く、異種成分を含まない低分子化合物を用いることでヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能を向上させることが可能であることを示した。低分子化合物は取り扱いが容易であるため、ヒト iPS 細胞から創薬研究における薬物動態試験に必要な一定の品質の肝細胞を安定的に供給することが可能になるものと考えられる。

また、本研究では動物体内での多能性幹細胞由来肝臓作製についても検討を行った。これまで異種間キメラ動物の作出で行われていなかった 8 細胞期胚注入法により、肝臓に多能性幹細胞由来細胞が寄与することを示した。今後、この手法を応用することにより動物体内で多能性幹細胞由来の機能的な肝臓が作製可能となり、将来的には創薬研究における薬物動態試験への利用や肝細胞移植医療の細胞供給源として利用されることが期待される。その一方で、動物体内での臓器作製には、ヒト iPS 細胞を用いても作製が可能であるかといった技術的な問題に加え、脳や生殖器系列への寄与や、ヒト臓器作製のために動物を供することといった倫理的な問題などの課題が存在する。慎重に研究を進め、これらの課題を一つ一つクリアしていくことが望まれる。

謝辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 松永 民秀 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、格別の御配慮と御激励を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 鈴木 匡 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学 木村 和哲 教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞情報学分野 林 秀敏 教授ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科衛生化学分野 肥田 重明 教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際し、機会ある毎に貴重な御助言、御激励を賜りました琉球大学大学院医学系研究科薬物治療学講座 中村 克徳 教授 (前 名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 准教授) に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、寛容に御支援、御助力を頂きました東北大学大学院医学研究科医用動物学分野 三好 一郎 教授 (前 名古屋市立大学大学院医学研究科病態モデル医学分野 教授) に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、親身なる御指導、有益な御助言を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 岩尾 岳洋 准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ラット iPS/ES 細胞をご供与頂きました生理学研究所遺伝子改変動物作製室 平林 真澄 准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、キメラ動物作製手法について御指導くださいました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分野 田川 陽一 准教授に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、終始丁寧な御助言と御指導を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 坡下 真大 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、有益な御助言とご協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 菊池 千草 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、胚操作や動物実験手法など終始丁寧に御指導くださいました沖縄科学技術大学院大学実験動物セクション 宮本 智美 氏 (前 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター) に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、ヒト iPS 細胞をご供与頂きました国立成育医療研究センター研究所 阿久津 英憲 博士、宮川 世志幸 博士、大喜多 肇 博

士、清河 信敬 博士、豊田 雅士 博士ならびに梅澤 明弘 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、動物の飼育管理をしてくださいました名古屋市立大学医学部実験動物飼育施設の皆様に深く感謝致します。

研究途上、種々の御便宜を図ってくださいました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野ならびに薬学部臨床薬学教育研究センターの卒業生、在室生ならびに研究員に感謝致します。

最後に本研究に供された多くの動物の冥福を心から祈ります。

引用文献

- 1) Bu HZ: A literature review of enzyme kinetic parameters for CYP3A4-mediated metabolic reactions of 113 drugs in human liver microsomes: structure-kinetics relationship assessment. *Curr Drug Metab*, **7**, 231-249 (2006).
- 2) Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ: Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem*, **261**, 5051-5060 (1986).
- 3) Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ, Xie HG: Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*, **39**, 699-721 (2007).
- 4) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, **270**, 414-423 (1994).
- 5) Lake BG, Price RJ, Giddings AM, Walters DG: In vitro assays for induction of drug metabolism. *Methods Mol Biol*, **481**, 47-58 (2009).
- 6) Olsen AK, Hansen KT, Friis C: Pig hepatocytes as an in vitro model to study the regulation of human CYP3A4: prediction of drug-drug interactions with 17 alpha-ethynylestradiol. *Chem Biol Interact*, **107**, 93-108 (1997).
- 7) Puviani AC, Ottolenghi C, Tassinari B, Pazzi P, Morsiani E: An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **121**, 99-109 (1998).
- 8) Borlak J, Klutcka T: Expression of basolateral and canalicular transporters in rat

- liver and cultures of primary hepatocytes. *Xenobiotica*, **34**, 935-947 (2004).
- 9) Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH: An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*, **189**, 233-246 (2003).
 - 10) Swift B, Pfeifer ND, Brouwer KL: Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*, **42**, 446-471 (2010).
 - 11) Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, Tateno C: In vitro evaluation of cytochrome P450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metab Pharmacokinet*, **25**, 539-550 (2010).
 - 12) Kamimura H, Nakada N, Suzuki K, Mera A, Souda K, Murakami Y, Tanaka K, Iwatsubo T, Kawamura A, Usui T: Assessment of chimeric mice with humanized liver as a tool for predicting circulating human metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet*, **25**, 223-235 (2010).
 - 13) Man M, Farmen M, Dumauual C, Teng CH, Moser B, Irie S, Noh GJ, Njau R, Close S, Wise S, Hockett R: Genetic variation in metabolizing enzyme and transporter genes: comprehensive assessment in 3 major East Asian subpopulations with comparison to Caucasians and Africans. *J Clin Pharmacol*, **50**, 929-940 (2010).
 - 14) Kurose K, Sugiyama E, Saito Y: Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet*, **27**, 9-54 (2012).

- 15) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861-872 (2007).
- 16) Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, Schreiber SL, Melton DA: Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, **4**, 348-358 (2009).
- 17) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T: Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PloS One*, **9**, e104010 (2014).
- 18) Shan J, Schwartz RE, Ross NT, Logan DJ, Thomas D, Duncan SA, North TE, Goessling W, Carpenter AE, Bhatia SN: Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation. *Nat Chem Biol*, **9**, 514-520 (2013).
- 19) Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, Sharifi-Zarchi A, Aghdami N, Baharvand H: Treatment of human embryonic stem cells with different combinations of priming and inducing factors toward definitive endoderm. *Stem Cells Dev*, **22**, 1419-1432 (2013).
- 20) Do A-V, Khorsand B, Geary SM, Salem AK: 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater*, **4**, 1742-1762 (2015).
- 21) Murphy SV, Atala A: 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*, **32**, 773-785 (2014).
- 22) O'Brien CM, Holmes B, Faucett S, Zhang LG: Three-dimensional printing of nanomaterial scaffolds for complex tissue regeneration. *Tissue Eng Part B, Rev*,

- 21**, 103-114 (2015).
- 23) Ramachandran SD, Schirmer K, Munst B, Heinz S, Ghafory S, Wolf S, Simon-Keller K, Marx A, Oie CI, Ebert MP, Walles H, Braspenning J, Breitkopf-Heinlein K: In Vitro Generation of Functional Liver Organoid-Like Structures Using Adult Human Cells. *PloS One*, **10**, e0139345 (2015).
- 24) Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, **499**, 481-484 (2013).
- 25) Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H: The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, **33**, 4526-4534 (2012).
- 26) Subramanian K, Owens DJ, Raju R, Firpo M, O'Brien TD, Verfaillie CM, Hu WS: Spheroid culture for enhanced differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells. *Stem Cells Dev*, **23**, 124-131 (2014).
- 27) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, Nagamoto Y, Watanabe H, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H: Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1alpha transduction. *J Hepatol*, **57**, 628-636 (2012).
- 28) Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G: Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 736-747 (2006).

- 29) Deng Y, Su Q, Mo J, Fu X, Zhang Y, Lin EH: Celecoxib downregulates CD133 expression through inhibition of the Wnt signaling pathway in colon cancer cells. *Cancer Invest*, **31**, 97-102 (2013).
- 30) Gitau SC, Li X, Zhao D, Guo Z, Liang H, Qian M, Lv L, Li T, Xu B, Wang Z, Zhang Y, Xu C, Lu Y, Du Z, Shan H, Yang B: Acetyl salicylic acid attenuates cardiac hypertrophy through Wnt signaling. *Front Med*, **9**, 444-456 (2015).
- 31) Puhl AC, Milton FA, Cvorovic A, Sieglaff DH, Campos JC, Bernardes A, Filgueira CS, Lindemann JL, Deng T, Neves FA, Polikarpov I, Webb P: Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor gamma regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nucl Recept Signal*, **13**, e004 (2015).
- 32) Tai WP, Hu PJ, Wu J, Lin XC: The inhibition of Wnt/beta-catenin signaling pathway in human colon cancer cells by sulindac. *Tumori*, **100**, 97-101 (2014).
- 33) Reed S, Li H, Li C, Lin J: Celecoxib inhibits STAT3 phosphorylation and suppresses cell migration and colony forming ability in rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **407**, 450-455 (2011).
- 34) Arellanes-Robledo J, Salcido-Neyoy ME, Marquez-Quinones A, Garcia-Roman R, Beltran-Ramirez O, Le Berre V, Sokol S, Francois JM, Villa-Trevino S: Celecoxib activates Stat5 and restores or increases the expression of growth hormone-regulated genes in hepatocarcinogenesis. *Anticancer Drugs*, **21**, 411-422 (2010).
- 35) Baik M, Kim J, Piao MY, Kang HJ, Park SJ, Na SW, Ahn SH, Lee JH: Deletion of liver-specific STAT5 gene alters the expression of bile acid metabolism genes and reduces liver damage in lithogenic diet-fed mice. *J Nutr Biochem*, **39**, 59-67 (2017).

- 36) Barclay JL, Nelson CN, Ishikawa M, Murray LA, Kerr LM, McPhee TR, Powell EE, Waters MJ: GH-dependent STAT5 signaling plays an important role in hepatic lipid metabolism. *Endocrinol*, **152**, 181-192 (2011).
- 37) Holloway MG, Cui Y, Laz EV, Hosui A, Hennighausen L, Waxman DJ: Loss of sexually dimorphic liver gene expression upon hepatocyte-specific deletion of Stat5a-Stat5b locus. *Endocrinol*, **148**, 1977-1986 (2007).
- 38) Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, Gashin LB, Terrell S, Klitgaard JL, Santo L, Addorio MR, Ebert BL, Griffin JD, Frank DA: The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood*, **117**, 3421-3429 (2011).
- 39) Baik M, Yu JH, Hennighausen L: Growth hormone-STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, **1229**, 29-37 (2011).
- 40) Martinez CS, Piazza VG, Ratner LD, Matos MN, Gonzalez L, Rulli SB, Miquet JG, Sotelo AI: Growth hormone STAT5-mediated signaling and its modulation in mice liver during the growth period. *Growth Horm IGF Res*, **23**, 19-28 (2013).
- 41) Evers R, Dallas S, Dickmann LJ, Fahmi OA, Kenny JR, Kraynov E, Nguyen T, Patel AH, Slatter JG, Zhang L: Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome p450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices: a white paper. *Drug Metab Dispos*, **41**, 1598-1609 (2013).
- 42) Sinz M, Wallace G, Sahi J: Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical. *AAPS J*, **10**, 391-400 (2008).
- 43) Chu TH, Chan HH, Kuo HM, Liu LF, Hu TH, Sun CK, Kung ML, Lin SW, Wang

- EM, Ma YL, Cheng KH, Lai KH, Wen ZH, Hsu PI, Tai MH: Celecoxib suppresses hepatoma stemness and progression by up-regulating PTEN. *Oncotarget*, **5**, 1475-1490 (2014).
- 44) Ben-Neriah Y, Karin M: Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*, **12**, 715-723 (2011).
- 45) Romorini L, Garate X, Neiman G, Luzzani C, Furmento VA, Guberman AS, Sevlever GE, Scassa ME, Miriuka SG: AKT/GSK3beta signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival. *Sci Rep*, **6**, 35660 (2016).
- 46) Zhang HF, Wu C, Alshareef A, Gupta N, Zhao Q, Xu XE, Jiao JW, Li EM, Xu LY, Lai R: The PI3K/AKT/c-MYC Axis Promotes the Acquisition of Cancer Stem-Like Features in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cells*, **34**, 2040-2051 (2016).
- 47) Jaffe CA, Friberg RD, Barkan AL: Suppression of growth hormone (GH) secretion by a selective GH-releasing hormone (GHRH) antagonist. Direct evidence for involvement of endogenous GHRH in the generation of GH pulses. *J Clin Invest*, **92**, 695-701 (1993).
- 48) Robinson IC: Control of growth hormone (GH) release by GH secretagogues. *Novartis Found Symp*, **227**, 206-220; discussion 220-204 (2000).
- 49) Gebert CA, Park SH, Waxman DJ: Regulation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 5b activation by the temporal pattern of growth hormone stimulation. *Mol Endocrinol*, **11**, 400-414 (1997).
- 50) Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA: Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls

- the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet*, **34**, 292-296 (2003).
- 51) Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K: Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, **28**, 250-259 (2013).
 - 52) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. *Mol Ther*, **20**, 127-137 (2012).
 - 53) Lahuna O, Rastegar M, Maiter D, Thissen J-P, P. Lemaigre F, G. Rousseau G. Involvement of STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) and HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) in the Transcriptional Control of the hnf6 Gene by Growth Hormone. *Mol Endocrinol*, **14**, 285-294 (2000).
 - 54) Eleswarapu S, Ge X, Wang Y, Yu J, Jiang H: Growth hormone-activated STAT5 may indirectly stimulate IGF-I gene transcription through HNF-3 {gamma}. *Mol Endocrinol*, **23**, 2026-2037 (2009).
 - 55) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H: Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, **142**, 787-799 (2010).
 - 56) Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H: Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs.

- Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 4557-4562 (2013).
- 57) Yamaguchi T, Sato H, Kato-Itoh M, Goto T, Hara H, Sanbo M, Mizuno N, Kobayashi T, Yanagida A, Umino A, Ota Y, Hamanaka S, Masaki H, Rashid ST, Hirabayashi M, Nakauchi H: Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature*, **542**, 191-196 (2017).
- 58) Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, Suzuki K, Bogliotti YS, Cuello C, Morales Valencia M, Okumura D, Luo J, Vilarino M, Parrilla I, Soto DA, Martinez CA, Hishida T, Sanchez-Bautista S, Martinez-Martinez ML, Wang H, Nohalez A, Aizawa E, Martinez-Redondo P, Ocampo A, Reddy P, Roca J, Maga EA, Esteban CR, Berggren WT, Nunez Delicado E, Lajara J, Guillen I, Guillen P, Campistol JM, Martinez EA, Ross PJ, Izpisua Belmonte JC: Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell*, **168**, 473-486.e415 (2017).
- 59) Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H: Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol*, **180**, 2417-2426 (2012).
- 60) Pluck A, Klasen C: Generation of chimeras by microinjection. *Methods Mol Biol*, **561**, 199-217 (2009).
- 61) Pluck A, Klasen C: Generation of chimeras by morula aggregation. *Methods Mol Biol*, **561**, 219-229 (2009).
- 62) Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A: Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature*, **365**, 87-89 (1993).
- 63) Guo J, Wu B, Li S, Bao S, Zhao L, Hu S, Sun W, Su J, Dai Y, Li X: Contribution

- of Mouse Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Chimeras through Injection and Coculture of Embryos. *Stem Cells Int*, **2014**, 409021 (2014).
- 64) Bozyk K, Gilecka K, Humiecka M, Szpila M, Suwinska A, Tarkowski AK: Mouse<-->rat aggregation chimaeras can develop to adulthood. *Dev Biol*, **427**, 106-120 (2017).
- 65) Yamaguchi T, Hamanaka S, Nakauchi H: The generation and maintenance of rat induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*, **1210**, 143-150 (2014).
- 66) Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi RU, Yamamoto Y, Camargo FD, Ochiya T: Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell*, **20**, 41-55 (2017).
- 67) Kobayashi T, Kato-Itoh M, Nakauchi H: Targeted organ generation using Mixl1-inducible mouse pluripotent stem cells in blastocyst complementation. *Stem Cells Dev*, **24**, 182-189 (2015).
- 68) Bissig KD, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV, Verma IM: Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest*, **120**, 924-930 (2010).
- 69) Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M, Ito M, Suematsu M, Peltz G, Nakamura M, Suemizu H: The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun*, **405**, 405-410 (2011).
- 70) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K: Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to

- drugs. *Am J Pathol*, **165**, 901-912 (2004).
- 71) Kelly SJ: Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool*, **200**, 365-376 (1977).
- 72) Pinyopummin A, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H: Development of single blastomeres from 4-cell stage embryos after aggregation with parthenogenones in mice. *Jpn J Vet Res*, **42**, 119-126 (1994).
- 73) Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz M: Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development*, **132**, 479-490 (2005).
- 74) Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J: Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell*, **10**, 615-624 (2006).
- 75) Meilhac SM, Adams RJ, Morris SA, Danckaert A, Le Garrec JF, Zernicka-Goetz M: Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, **331**, 210-221 (2009).
- 76) Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK: Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*, **135**, 3081-3091 (2008).