

In vitroおよびin vivoにおける肝疾患の治療法開発系

In vitro and in vivo analyses for therapy of liver diseases

紙谷 聰英

Akihide Kamiya

東海大学 医学部医学科 基礎医学系分子生命科学領域(教授)

Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine (Professor)

KEYWORD ▶

多能性幹細胞

病態モデル

ゲノム編集

はじめに

01

本稿では、ヒト病態モデルの再現におけるin vitro、in vivo実験系の現状を概説し、それらの知見からヒトとマウスなどの実験動物の種差と病態解析との関係について述べる。肝臓における様々な代謝酵素には種差があり、薬物代謝や胆汁酸合成など肝臓の主要な機能においてマウス独自の代謝系が存在する。ゲノム編集技術の進展により、ヒト疾患に関する変異のin vitro、in vivoでの効率的な誘導が可能となってきた。そこで、ヒト肝細胞を用いた培養系やヒトに近づけた代謝系を持つ遺伝子改変マウスの作製などを通じて、よりヒト病態を再現するモデル系の確立法とその有用性について解説する。

肝臓の機能と肝疾患の関連

02

肝臓は生体内最大の臓器であり、血清タンパク質の合成、胆汁の分泌、アルコールや外来薬物の分解、糖・脂質代謝など様々なな代謝機能を通じて、生体のホメオスタシス維持を行っている。そのため、肝臓の機能破綻は重大な疾患につながる。例えば、肝炎ウイルスの持続感染や肥満・運動不足によって脂肪肝（肝臓への脂質の異常蓄積）が誘導される。脂肪肝患者のほとんどは良性であるが、一部は慢性肝炎から肝硬変・肝癌などの重篤な疾患を引き起こす。これらの進行した肝疾患に対しては肝臓移植が根治法となるが、脳死移植におけるドナー不足や生体肝移植における健常人ドナーへの侵襲性といった問題がある。そこで、このような重篤な肝疾患に対する新たな治療法の開発が望まれている。

肝臓の様々な代謝機能を司る細胞が肝細胞（肝実質細胞）であり、肝臓の幅広い代謝機能を担う数多くの代謝関連タンパク質を発現している。したがって、これらの代謝関連タンパク質

やその転写発現を司る転写制御因子の変異・欠損は、肝疾患の病態の増悪化などにつながる可能性がある。例えば、PNPLA3は脂肪滴膜に局在するトランスアミラーゼやリパーゼの制御タンパク質であり、GWAS解析から代謝機能障害関連脂肪肝炎（MASH）への関与が指摘されている¹⁾。また、脂肪酸代謝を制御する転写制御因子とMASHとの関連も複数報告されている。BCL6は免疫系の胚中心形成に必須の転写制御因子だが、肝臓では脂質代謝や薬物代謝酵素の発現制御に関係する^{2, 3)}。我々を含む複数のグループが、肝特異的Bcl6欠損マウスを用いた解析から、脂肪肝やMASHの病態進行、肝発癌の過程にBCL6が促進的に作用することを報告している^{4, 5)}。PNPLA3とBCL6は脂肪性肝疾患の有望な治療ターゲットと考えられているが、Pnpla3欠損マウスを用いた解析でPNPLA3と脂肪性肝疾患との関連は見出されなかったとする報告や⁶⁾、病態モデルマウスにおけるBCL6の過剰発現が慢性肝炎に抑制的に作用するといった報告も存在する⁷⁾。このように、肝機能遺伝子と肝病態との関連性には未だ不明な点が多い。

発生過程において肝臓は、腸管の一部が心筋・横隔膜からの液性因子を介した刺激を受けて肝芽として分化することから始まる。その後、胎生中期の肝臓は造血器官として造血幹細胞の増幅・各種の血液細胞への分化の場として働いた後、成体では代謝器官としての様々な機能を獲得していく。この時期の血液細胞と肝前駆細胞との相互作用が肝の発生過程に重要であることがわかっており、肝成熟を促進する因子としてオンコスタチンM（OSM）が同定されている⁸⁾。また、肝臓には肝細胞以外に様々な種類の非実質細胞が存在しており、肝内胆管を形成する胆管細胞、毛細血管網を形成する類洞内皮細胞、肝内線維芽細胞でありビタミンなどを蓄積する星細胞、肝内マクロファージであるクッパー細胞などがこれにあたる。肝細胞と胆管細胞は同じ肝前駆細胞を起源としている。また、星細胞は肝傷害の過程で活性型に変化し、コラーゲンなどの合成・分泌を通じて肝線維化に重要な役割を果たしている。そのため、これらの細胞は胆汁うつ滞疾

患や肝硬変・肝癌形成における原因細胞として、治療のターゲットに考えられている。

肝疾患のターゲット同定や治療法開発において、マウスなどのモデル動物が重要な役割を果たしているが、マウスとヒトの種差に起因する問題点も多い。例えば、肝臓の重要な機能の一つである薬物代謝は、Cytochrome P450(CYP)加水分解酵素ファミリーによって担われている。しかし、CYPの活性や発現には種差があり、マウスとヒトでは発現する酵素群の種類の違いから、薬物や外来からの化合物に対する肝臓での分解活性が異なり、ヒトの肝疾患再現の障害になっている。その解決手段の一つとして、ヒト肝細胞培養による病態解析系の構築が進められている。ヒト肝細胞の培養は主に肝移植ドナーや肝癌の切除サンプルから得られた初代ヒト肝細胞が用いられているが、安定供給や数量の面での問題が多い。近年、ヒト多能性幹細胞(Embryonic Stem cells:ES細胞、induced Pluripotent Stem cells:iPS細胞)の樹立や肝細胞系への分化誘導法の開発により、ヒト多能性幹細胞を用いた肝病態解析モデルの開発が進められている。また、最近ではゲノム編集技術の進展により、多能性幹細胞やそこから分化した細胞に対して任意の遺伝子欠損や改変を行うことができる。特に、CRISPR/Cas9の開発によって簡便・高確率に様々な細胞のゲノム改変が可能になっている。この手法を用いて、疾患を誘導する遺伝子変異を多能性幹細胞などに導入したうえで機能細胞に分化させ、疾患のフェノタイプをin vitroで解析する手法が様々な臓器の細胞で開発されている。ヒトiPS細胞由来肝細胞にゲノム編集を行い、肝炎ウイルス感染受容体や代謝関連遺伝子の変異を誘導することで、様々な疾患やウイルス生活環の解析が行われている。また、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスや、ヒト類似の代謝経路を持つ遺伝子改変マウスなど、in vivoでもヒト環境を模した病態再現系が構築されている。以降の章では、このようなヒト肝疾患のin vitro、in vivoモデルについて紹介する。

多能性幹細胞を用いた 肝細胞・肝組織培養系と疾患解析への応用 03

ES細胞やiPS細胞は、高増殖能と様々な臓器の機能細胞への多分化能を有する多能性幹細胞であり、再生医療や様々な疾患解析の有用なツールとして注目されている。ES細胞やiPS細胞からの肝細胞への分化誘導は、生体の肝分化をin vitroで模倣する形で行われており、Activin、fibroblast growth factor(FGF)、hepatocyte growth factor(HGF)、OSMといったサイトカインの連続添加により、内胚葉前駆細胞、肝幹・前駆細胞、胎生肝細胞、成熟肝細胞へ連続的に分化させることができる⁹。また、肝前駆細胞の段階で細胞表面抗原を指標に純化・拡大培養を行った後、肝成熟化を促進することで、効率的に多数の成熟肝細胞を得る系が樹立されている。例えば、我々はマウス胎仔・成体肝臓における肝前駆細胞の解析から、CD13、CD133と

いった肝前駆細胞特異的表面抗原を同定した¹⁰。さらに、ヒトiPS細胞から肝臓系細胞を誘導した後に、抗CD13およびCD133抗体を用いてヒトiPS細胞由来肝前駆細胞を純化・拡大培養し、成熟肝細胞へと分化誘導可能な系を報告している^{11、12}。他にも、carboxypeptidase Mなどがヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞のマーカーとして知られ、細胞の純化培養に用いられている¹³。

これらのヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞は、長期拡大培養や凍結保存が可能であるため、少数の細胞でも効率的に利用することができる。また、分化培地に置換することで成熟肝細胞様の機能を誘導可能であり、ヒト肝細胞の解析や治療モデルへの応用に適すると考えられる。一方、初代ヒト肝細胞の培養系と比較すると肝機能遺伝子の発現レベルが低いなどの問題点もある。これに対しては、肝臓特異的な転写制御因子などを分化誘導過程で導入することで、肝分化・肝成熟の効率化が可能である。例えば、多能性幹細胞から内胚葉前駆細胞などを誘導する分化系の初期段階では、hepatocyte nuclear factor(HNF)1αやHNF4αなどの転写制御因子をアデノウイルスで導入することで効率が上昇することが知られている¹⁴。我々は、肝発生過程で発現変化する転写制御因子群の網羅的発現解析の結果を用いて、幼弱な肝細胞の成熟化を促進する新規転写制御因子のスクリーニングを行った(図1)。その結果、KLF15の強制発現によってヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の成熟肝機能をより効率的に誘導できることを見出している。KLF15は肝機能遺伝子の上流領域に結合してその活性を誘導するだけでなく、p57の発現誘導を介して細胞周期を抑制することで肝前駆細胞の分化段階を制御することが示唆された¹⁵。

一方、肝前駆細胞を細胞外マトリックスに包埋培養することで、胆管系組織を誘導することができる¹¹。そこで、ゲノム編集技術を用いて胆管疾患の原因遺伝子変異を持つヒトiPS細胞を樹立し、肝前駆細胞、さらに胆管様細胞へと分化誘導することで、胆管疾患のフェノタイプのin vitro再現を試みた(図1)。多発肝嚢胞症は肝内に多数の嚢胞が生じる遺伝性疾患であり、肝臓にのみ嚢胞が多発する常染色体優性多嚢胞性肝疾患(ADPLD)などが知られる。ADPLDはProtein Kinase C substrate 80K-H(PRKCSH)やSEC63などの纖毛関連遺伝子が病因遺伝子として同定されている。そこで、PRKCSHを欠損させたヒトiPS細胞をゲノム編集により樹立した後に、肝前駆細胞・胆管細胞へと分化誘導することで、in vitroでの多発肝嚢胞の病態再現系を構築した。その結果、PRKCSH欠損ヒトiPS細胞に由来する肝前駆細胞では、胆管細胞への分化能が亢進していることを見出した¹⁶。この結果は、PRKCSHを含む纖毛からのシグナルが肝前駆細胞の胆管細胞への分化能を制御することを示唆しており、多発肝嚢胞症の治療法開発につながることが期待される。

実際の生体内の臓器は3次元構造を取っており、in vitroでの機能を正確に再現するためには、本来の構造を模倣する形で、細胞を平面培養ではなく立体培養条件で培養する必要がある。さらに、肝臓は肝細胞だけでなく星細胞などの多種類の非実質

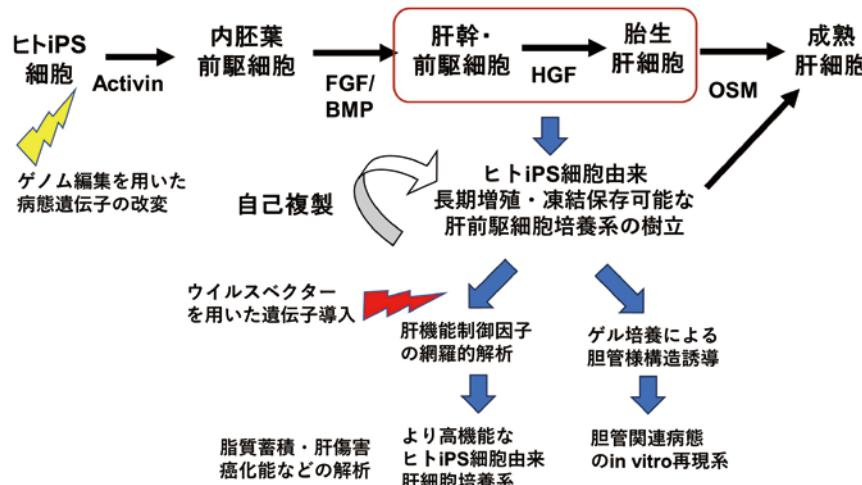


図1 ヒトiPS細胞由来細胞を用いた病態再現系
病態解析のための遺伝子操作として、iPS細胞にゲノム編集を行うことで病態関連因子の変異を誘導する方法や、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞にレトロウイルス等で遺伝子導入を行う方法がある。
得られた細胞を肝細胞・胆管細胞などへ分化誘導し、病態解析などに用いる。

細胞を含んでおり、細胞間相互作用が様々な肝機能を制御している。そこで、ヒトiPS細胞から誘導した肝前駆細胞にヒト内皮細胞株、線維芽細胞株を共培養すると、肝前駆細胞の細胞接着・自己凝集能や非実質細胞からのパラクラインシグナルによって立体的なLiver budが形成される¹⁷⁾。また、特定の条件下でヒトiPS細胞を誘導すると、肝細胞とクッパー細胞、星細胞、胆管様細胞などの他の肝非実質細胞に分化可能である。そこで、ヒトiPS細胞から肝細胞および他の実質細胞を分化誘導した後に、それらを共培養することでヒト由来の肝臓様構造体を人工的に作製する試みが報告され、肝臓オルガノイドと呼ばれる¹⁸⁾。このようなヒト肝臓オルガノイドでは、培養液に過剰な脂肪酸を添加することで肝細胞内の脂質蓄積が誘導され、炎症性サイトカインの発現、星細胞の活性化およびそれに伴う細胞外マトリックスの発現と蓄積が引き起こされた¹⁹⁾。この系を用いることで、in vitroでヒトMASHの病態を模倣し、薬物または阻害剤添加の効果を評価することができる。ヒト肝臓様構造を人工的に再現する別の方法として、脱細胞化肝組織由来の細胞外マトリックスを使用した系が報告されている。例えば、ラット肝臓をデシル硫酸ナトリウムで灌流して脱細胞化し、外来性肝細胞を灌流して人工肝臓を再構成できる²⁰⁾。このような脱細胞化組織は、肝小葉構造を維持する細胞外マトリックス構造を有しており、外部から細胞を播種することで肝臓本来の立体構造の再現が可能である。この方法を用いて、ヒト脂肪肝のin vitro再現実験が確立された。ヒトiPS細胞由来肝細胞と非実質細胞を、脱細胞化したラット肝臓に接種してヒト人工肝臓を作製できる。この際に、SIRT1遺伝子抑制により肝代謝異常を誘導することで、ヒト疾患と同様の脂肪肝や肝炎をin vitroで再現した系が報告されている²¹⁾。これらの新しいin vitro培養・疾患モデルやゲノム編集技術は、MASH治療の新薬開発に有用である。

In vivoゲノム編集技術を応用した 肝疾患解析系の構築

04

In vivoの動物モデルにおいても、種差を軽減しヒト型の疾患を模倣する系の構築が進んでいる。ヒト肝細胞は、発現する酵素群などの差異からマウスなどのげっ歯類肝細胞とは異なる機能を持つことが知られる。そこで、免疫不全マウスと肝傷害マウスを掛け合わせ、移植ヒト肝細胞を生着・増幅可能な系が構築されている。例えば、アルブミンプロモーターuPAトランスジェニックマウスとScidマウスを組み合わせ、自然発症的に起こる肝傷害を移植した成熟ヒト肝細胞で相補することで、肝細胞全体の90%以上をヒト肝細胞に置き換えたキメラマウスの安定的作出法が報告された²²⁾。B型、C型などの肝炎ウイルスはヒトやチンパンジーなどの靈長類の肝細胞にしか感染能力がないため、これらの感染実験の動物モデルを構築することは困難であった。そこで、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染系が構築され、抗ウイルス薬の解析などに使用されている^{23, 24)}。また、このキメラマウスはヒト型CYPなどの薬物代謝酵素・トランスポーターを発現しており、実験動物内でヒト型の薬物動態を予測可能な系として使用されている²⁵⁾。さらに、Ornithine transcarbamylase (OTC)欠損症などの疾患患者からのヒト肝細胞を移植したキメラマウスが作製され、病態のin vivo再現に用いられている²⁶⁾。このようなキメラマウスは、肝臓における肝細胞のみがヒト化され、他の組織・臓器の細胞はマウスのままであるため、多臓器間の関連性を解析する際に差異が生じる。肝外より供給され肝細胞に作用するマウス由来液性因子がヒト型の受容体を効率的に活性化できるかは、液性因子ごとに異なる。例えば、マウス成長ホルモンはヒト肝細胞に存在するヒト成長ホルモン受容体を活性化できないため、このキメラマウスではマウス下垂体から供給される成長ホルモンが肝臓内の肝細胞の増殖や

代謝機能を十分に誘導できず、脂肪肝を発症しやすい²⁷⁾。また、キメラマウス作製に免疫不全マウスを使用しているために、免疫反応が存在せず、炎症反応などを介する病態再現などに課題がある。

そこで、肝細胞中のマウス特異的な代謝酵素を人為的に欠損させることで、着目する代謝経路に関してヒトに類似した活性をマウスに付与するという手法が考えられる。胆汁は肝臓から分泌されたものが胆のう・小腸へと供給され、脂質の消化・吸収に重要な役割を果たしている。胆汁は、胆汁酸・リン脂質・コレステロールが主成分であるが、特に胆汁酸は肝細胞で合成され細胞膜のトランスポーターを通じて微小胆管系に排出される(1次胆汁酸)。その後、肝内胆管・胆のうを通じて小腸に排出された胆汁酸は、腸内細菌によって2次胆汁酸へと代謝された後に、食事中の脂質のミセル化などを行う。その後、ごく一部は糞便などとともに体外に排出されるが、ほとんどは回腸で再吸収され肝細胞へと戻る。この過程を腸肝循環と呼び、体内の胆汁酸量(胆汁酸プール)を調節する重要な機構となっている。一方で、胆汁酸は脂質のミセル化などの界面活性作用のために非常に疎水性の高い構造が含まれており、細胞への毒性などを持っている。そのため、胆管や肝細胞の異常により胆汁うっ滞を生じることで、肝臓での炎症・肝硬変などの疾患につながる。家族性胆汁うっ滞症(PFIC)は、種々の遺伝子変異により肝細胞から胆汁が排泄できなくなり、肝細胞内に胆汁がうっ滞し細胞傷害を受ける常染色体潜性遺伝疾患である²⁸⁾。PFIC1型(ATP8B1)、PFIC2型(ABCB11)、PFIC3型(ABCB4)などの種類があり、肝細胞膜上の胆汁トランスポーター関連遺伝子などが原因遺伝子として報告されている²⁹⁾。例えば、ABCB11は肝細胞から胆汁内に胆汁酸を輸送する膜タンパク質であり、ABCB4はリン脂質を輸送するタンパク質である。そのため、ABCB11変異は肝細胞内に胆汁酸が蓄積し肝傷害を誘発する。また、ABCB4変異は胆汁内のリン脂質濃度の低下により胆汁の疎水性・細胞毒性が上昇し、胆汁うっ滞・肝傷害につながる。このようなPFICのモデル動物として、*Abcb4*や*Abcb11*を欠損させたマウスが作製されているが、ヒトPFIC疾患と比較して、その病態の進行が抑制されていた。その原因として考えられるのが、ヒトとマウスでの胆汁酸組成の差異である。マウス独自の胆汁酸代謝酵素であるCYP2A12、2C70の作用により、マウス胆汁内ではミュリコール酸などの親水性胆汁酸が多く含まれる。一方で、ヒトではより疎水性の胆汁酸が多く含まれ、胆汁内の胆汁酸の疎水性、つまり細胞傷害活性はヒトとマウスで大きく異なる。*Cyp2a12*、*2c70*の2重欠損マウス(CYPDKOマウス)は、このマウス独自の胆汁酸代謝経路が欠損するために、ヒトに類似した疎水性胆汁酸中心の胆汁酸プールを持つ³⁰⁾。そこで、我々の研究グループでは、このCYPDKOマウスにPFICの原因遺伝子欠損を誘導し、よりヒトに近い病態モデルの作出を行った。

この目的のため、既に存在する遺伝子変異マウスに新しい遺伝子変異を導入する方法として、アデノ随伴ウイルス(AAV)によるin vivoゲノム編集法を用いた。肝臓特異的プロモーターを

保持するAAVを用いて*SaCas9*遺伝子を発現させ、ヒトU6プロモーターを保持したAAVを用いて対象遺伝子に対するgRNAを発現させることで、肝臓特異的な遺伝子変異を迅速に誘導できるか検討を行った³¹⁾。ここで用いた変異GFPトランスジェニックマウスは、エクソン領域に終止コドンが挿入されており、通常の状態では蛍光を発しない。変異GFP遺伝子に結合するgRNAを用いて遺伝子変異を行い、挿入された終止コドンを排除することでGFPの蛍光を回復できるため、ゲノム編集効率の評価系として利用できる³²⁾。その結果、*SaCas9*の発現にヒトアンチトリプシンプロモーターを用いることで、効率的に肝臓でのゲノム編集が誘導できること、この時、他の臓器ではほとんどゲノム編集が起らうことを見出している(図2)。

このin vivoゲノム編集系を用いることで、PFIC3の原因遺伝子である*Abcb4*欠損マウスの迅速な作製が可能となった。AAVによる*SaCas9/Abcb4*gRNAの導入により胆汁内のリン脂質濃度が顕著に抑制され、肝細胞におけるリン脂質トランスポーターの欠失が確認された(図3)。野生型マウスで*Abcb4*を欠損させた場合(WT/*Abcb4*KO)と比較して、CYPDKOマウスで*Abcb4*を欠損させた場合(CYPDKO/*Abcb4*KO)では、血清肝傷害マーカー(AST、ALT、ALP)や肝臓での炎症・線維化関連遺伝子の発現誘導、偽胆管増生や炎症細胞浸潤、肝組織におけるコラーゲン沈着の高い誘導が見られ、ヒト胆汁酸組成によって*Abcb4*による肝傷害・線維化が顕著に増強されることが明らかとなった。肝臓における胆汁酸組成について解析した結果、*Abcb4*欠損によって肝内胆汁酸量が同様に増加する一方で、CYPDKOマウスではWTマウスと比較してより疎水性の胆汁酸で占められており、この胆汁酸のヒト型への組成変化がPFICの病態に大きな影響を与えることを見出した³¹⁾。このように、ヒト疾患をin vivoで再現するには、ヒトと実験動物の間での代謝などの種差の影響が重要と考えられた。

まとめ

05

肝臓を含めた様々な臓器の疾患の解析において、病態モデルは重要な役割を果たしている。ゲノム編集技術の確立によって、病態関連遺伝子の変異を誘導することがin vitro、in vivoの両方で容易になった。また、培養技術の進歩によって、特に臓器の3次元構造を試験管内で再現するオルガノイド培養系を用いた脂肪肝炎モデルの利用が進んでおり、ヒトの遺伝子多型と肝病態との関連などが解析されている³³⁾。今後、他の臓器でもこのような新しい技術を用いた病態解析系が確立していくと予想される。

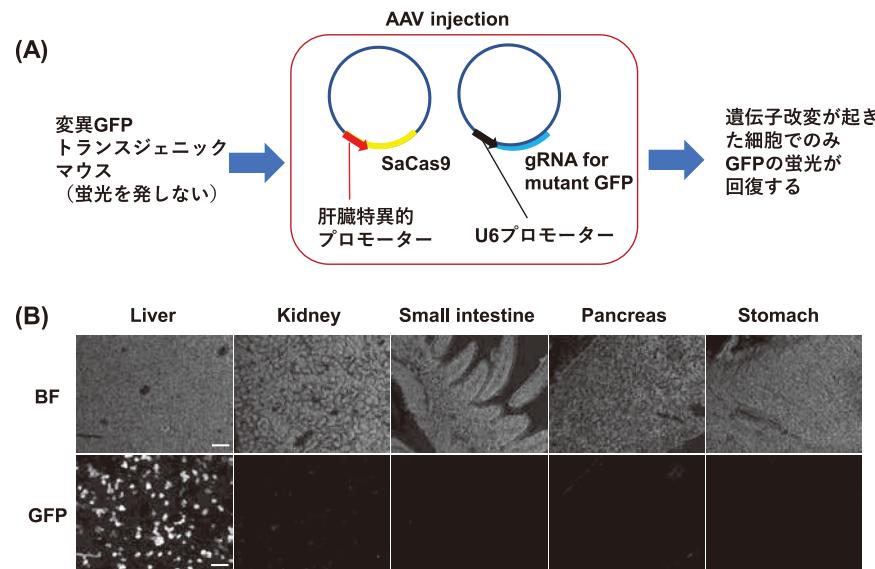


図2 変異GFPトランジジェニックマウスを用いた肝特異的ゲノム編集効率の評価
(A) AAVを用いたin vivoゲノム編集法の評価系の模式図。(B) AAV感染後の各臓器におけるGFP蛍光の回復。遺伝子改変の起こった肝臓でのみ蛍光が観察された。White line, 100 μm. (文献31より改変)

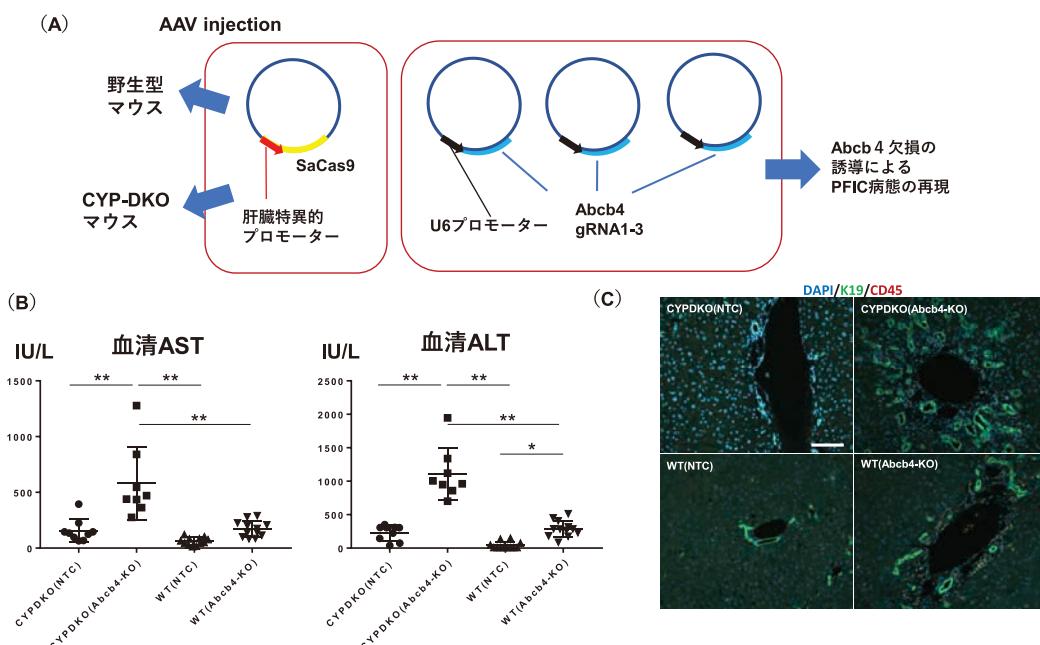


図3 AAVによるin vivoゲノム編集法を用いたPFIC3モデル動物の作出
(A) 野生型およびCYPDKOマウスにおけるAbcb4欠損誘導系の模式図。(B) 血清肝傷害マーカー(AST, ALT)のAbcb4欠損による上昇。(C) K19(偽胆管細胞)およびCD45(浸潤血液細胞)のCYPDKOマウス肝臓におけるAbcb4欠損による誘導。White line, 100 μm. (文献31より改変)

参考文献

1. S. Romeo, J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, LA. Pennacchio, E. Boerwinkle, JC. Cohen, and HH. Hobbs. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008, 40, 1461-1465.
2. CR. LaPensee, G. Lin, AL. Dent, and J. Schwartz. Deficiency of the transcriptional repressor B cell lymphoma 6 (Bcl6) is accompanied by dysregulated lipid metabolism. *PLoS One.* 2014, 9, e97090.
3. H. Chikada, K. Ida, E. Ando, Y. Inagaki, A. Sakamoto, and A.

- Kamiya. Establishment and analysis of a mouse model that regulates sex-related differences in liver drug metabolism. *Lab Invest.* 2018, 98, 1500-1511.
- MA. Sommars, K. Ramachandran, MD. Senoglage, CR. Futtner, DM. Germain, AL. Allred, Y. Omura, IR. Bederman, and GD. Barish. Dynamic repression by BCL6 controls the genome-wide liver response to fasting and steatosis. *eLIFE.* 2019, 8, e43922
- H. Chikada, K. Ida, Y. Nishikawa, Y. Inagaki, and A. Kamiya. Liver-specific knockout of B cell lymphoma 6 suppresses progression of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep.* 2020, 10, 9704.

6. MK. Basantani, MT. Sitnick, L. Cai, DS. Brenner, NP. Gardner, JZ. Li, G. Schoiswohl, K. Yang, M. Kumari, RW. Gross, R. Zechner, and EE. Kershaw. Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2011, 52, 318-329.
7. H. Zhang, Y. Li, C. Zhang, K. Huang, J. Zhao, S. Le, L. Jiang, H. Liu, P. Yang, X. Xiao, J. Yu, J. Wu, P. Ye, and J. Xia. B-cell lymphoma 6 alleviates nonalcoholic fatty liver disease in mice through suppression of fatty acid transporter CD36. *Cell Death Dis.* 2022, 13, 359.
8. A. Kamiya, T. Kinoshita, Y. Ito, T. Matsui, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, and A. Miyajima. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.* 1999, 18, 2127-2136.
9. T. Touboul, NR. Hannan, S. Corbineau, A. Martinez, C. Martinet, S. Branchereau, S. Mainot, H. Strick-Marchand, R. Pedersen, J. Di Santo, A. Weber, and L. Vallier. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology.* 2010, 51, 1754-1765.
10. A. Kamiya, S. Kakinuma, Y. Yamazaki, and H. Nakauchi. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology.* 2009, 137, 1114-1126, 1126 e1111-1114.
11. A. Yanagida, K. Ito, H. Chikada, H. Nakauchi, and A. Kamiya. An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. *PLoS One.* 2013, 8, e67541.
12. K. Tsuruya, H. Chikada, K. Ida, K. Anzai, T. Kagawa, Y. Inagaki, T. Mine, and A. Kamiya. A Paracrine Mechanism Accelerating Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatic Progenitor-Like Cells. *Stem Cells Dev.* 2015, 24, 1691-1702.
13. T. Kido, Y. Kou, K. Suzuki, A. Kobayashi, Y. Miura, EY. Chern, M. Tanaka, and A. Miyajima. CPM Is a Useful Cell Surface Marker to Isolate Expandable Bi-Potential Liver Progenitor Cells Derived from Human iPS Cells. *Stem Cell Reports.* 2015, 5, 508-515.
14. K. Takayama, M. Inamura, K. Kawabata, K. Katayama, M. Higuchi, K. Tashiro, A. Nonaka, F. Sakurai, T. Hayakawa, MK. Furue, and H. Mizuguchi. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. *Mol Ther.* 2012, 20, 127-137.
15. K. Anzai, K. Tsuruya, K. Ida, T. Kagawa, Y. Inagaki, and A. Kamiya. Kruppel-like factor 15 induces the development of mature hepatocyte-like cells from hepatoblasts. *Sci Rep.* 2011, 11, 18551.
16. A. Kamiya, H. Chikada, K. Ida, E. Ando, K. Tsuruya, T. Kagawa, and Y. Inagaki. An in vitro model of polycystic liver disease using genome-edited human inducible pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2018, 32, 17-24.
17. T. Takebe, K. Sekine, M. Kimura, E. Yoshizawa, S. Ayano, M. Koido, S. Funayama, N. Nakanishi, T. Hisai, T. Kobayashi, T. Kasai, R. Kitada, A. Mori, H. Ayabe, Y. Ejiri, N. Amimoto, Y. Yamazaki, S. Ogawa, M. Ishikawa, Y. Kiyota, Y. Sato, K. Nozawa, S. Okamoto, Y. Ueno, and H. Taniguchi. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 2017, 21, 2661-2670.
18. HJ. Kim, G. Kim, KY. Chi, H. Kim, YJ. Jang, S. Jo, J. Lee, Y. Lee, DH. Woo, C. Han, SK. Kim, HJ. Park, and JH. Kim. Generation of multilineage liver organoids with luminal vasculature and bile ducts from human pluripotent stem cells via modulation of Notch signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2023, 14, 19.
19. R. Ouchi, S. Togo, M. Kimura, T. Shinozawa, M. Koido, H. Koike, W. Thompson, RA. Karns, CN. Mayhew, PS. McGrath, HA. McCauley, RR. Zhang, K. Lewis, S. Hakozaki, A. Ferguson, N. Saiki, Y. Yoneyama, I. Takeuchi, Y. Mabuchi, C. Akazawa, HY. Yoshikawa, JM. Wells, and T. Takebe. Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metab.* 2019, 30, 374-384, e376.
20. BE. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, ML. Izamis, MA. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, ML. Yarmush, and K. Uygun. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.* 2010, 16, 814-820.
21. A. Collin de l'Hortet, K. Takeishi, J. Guzman-Lepe, K. Morita, A. Achreja, B. Popovic, Y. Wang, K. Handa, A. Mittal, N. Meurs, Z. Zhu, F. Weinberg, M. Salomon, JJ. Fox, CX. Deng, D. Nagrath, and A. Soto-Gutierrez. Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells with Modifiable SIRT1 Metabolism. *Cell Metab.* 2019, 30, 385-401, e389.
22. C. Tateno, Y. Yoshizane, N. Saito, M. Kataoka, R. Utoh, C. Yamasaki, A. Tachibana, Y. Soeno, K. Asahina, H. Hino, T. Asahara, T. Yokoi, T. Furukawa, and K. Yoshizato. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004, 165, 901-912.
23. M. Tsuge, N. Hiraga, H. Takaishi, C. Noguchi, H. Oga, M. Imamura, S. Takahashi, E. Iwao, Y. Fujimoto, H. Ochi, K. Chayama, C. Tateno, and K. Yoshizato. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology.* 2005, 42, 1046-1054.
24. N. Hiraga, M. Imamura, M. Tsuge, C. Noguchi, S. Takahashi, E. Iwao, Y. Fujimoto, H. Abe, T. Maekawa, H. Ochi, C. Tateno, K. Yoshizato, A. Sakai, Y. Sakai, M. Honda, S. Kaneko, T. Wakita, and K. Chayama. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett.* 2007, 581, 1983-1987.
25. M. Katoh, T. Sawada, Y. Soeno, M. Nakajima, C. Tateno, K. Yoshizato, and T. Yokoi. In vivo drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J Pharm Sci.* 2007, 96, 428-437.
26. G. Sugahara, C. Yamasaki, A. Yanagi, S. Furukawa, Y. Ogawa, A. Fukuda, S. Enosawa, A. Umezawa, Y. Ishida, and C. Tateno. Humanized liver mouse model with transplanted human hepatocytes from patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2021, 44, 618-628.
27. C. Tateno, M. Kataoka, R. Utoh, A. Tachibana, T. Itamoto, T. Asahara, F. Miya, T. Tsunoda, and K. Yoshizato. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology.* 2011, 152, 1479-1491.
28. ED. Pfister, C. Droge, R. Liebe, A. Stalke, N. Buhl, A. Ballauff, T. Cantz, E. Bueltmann, J. Stindt, T. Luedde, U. Baumann, and V. Keitel. Extrahepatic manifestations of progressive familial intrahepatic cholestasis syndromes: Presentation of a case series and literature review. *Liver Int.* 2022, 42, 1084-1096.
29. LN. Bull and RJ. Thompson. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2018, 22, 657-669.
30. A. Honda, T. Miyazaki, J. Iwamoto, T. Hirayama, Y. Morishita, T. Monma, H. Ueda, S. Mizuno, F. Sugiyama, S. Takahashi, and T. Ikegami. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *J Lipid Res.* 2020, 61, 54-69.
31. K. Tsuruya, K. Yokoyama, Y. Mishima, K. Ida, T. Araki, S. Ieda, M. Ohtsuka, Y. Inagaki, A. Honda, T. Kagawa, and A. Kamiya. Abcb4-defect cholangitis mouse model with hydrophobic bile acid composition by in vivo liver-specific gene deletion. *J Lipid Res.* 2024, 65, 100616.
32. H. Miura, J. Imafuku, A. Kurosaki, M. Sato, Y. Ma, G. Zhang, A. Mizutani, K. Kamimura, CB. Gurumurthy, D. Liu, and M. Ohtsuka. Novel reporter mouse models useful for evaluating in vivo gene editing and for optimization of methods of delivering genome editing tools. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021, 24, 325-336.
33. M. Kimura, T. Iguchi, K. Iwasawa, A. Dunn, WL. Thompson, Y. Yoneyama, P. Chaturvedi, AM. Zorn, M. Wintzinger, M. Quattrocelli, M. Watanabe-Chailland, G. Zhu, M. Fujimoto, M. Kumbaji, A. Kodaka, Y. Gindin, C. Chung, RP. Myers, GM. Subramanian, V. Hwa, and T. Takebe. En masse organoid phenotyping informs metabolic-associated genetic susceptibility to NASH. *Cell.* 2022, 185, 4216-4232, e4216.

受理日：2024年11月1日