

令和元年6月20日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15050

研究課題名(和文) イヌの皮膚線維芽細胞から肝細胞への直接分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Direct reprogramming to differentiate into hepatocyte-like cells from canine cutaneous fibroblast

研究代表者

久末 正晴 (Hisasue, Masaharu)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80333144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々はFoxa1およびHnf4 を犬BMSCに挿入し肝臓細胞へ分化させるダイレクトプログラミングを行った。犬のBMSCの性状はプラスチック接着性、脂肪、骨および軟骨への分化、および表面高原解析を行った。ウイルスベクターによりFoxa1およびHnf4 をBMSCに挿入し肝細胞への分化を試みた。細胞形態は、敷石状、上皮系の携帯を示し、アルブミン、カドフェリンのm-RNAおよびタンパク発現が認められLDL代謝および尿素産生が認められた。本研究の結果から機能的な犬分化誘導細胞(iHep)が作成され創薬研究や肝疾患への臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬では、現在多くの肝疾患が見られるが移植医療をはじめとする根本的な治療法は確立されていない。また、肝組織は長期培養が困難であり、創薬開発のために多数の動物実験を実施せざるをえず、不必要な多くの命が失われている。我々は、ダイレクトリプログラミングという簡便に繊維芽細胞から肝細胞を作成することを目指しさまざまな組織からの肝細胞作成を行ってきた。本研究では皮膚の細胞からの分化を目指したが、最終的には骨髄組織中に存在する細胞群であるcBMSCからの分化誘導が最も効率よく、かつ高品質の肝細胞を作成できた。以上の研究成果は、今後薬剤スクリーニングおよび肝疾患の移植医療発展に大きく貢献するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied direct reprogramming in differentiating of canine BMSCs by transfecting Foxa1 and Hnf4a into hepatocyte-like cells. The characterization of cBMSC was proved by plastic adherent, differentiation into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes, and analysis of cell surface antigens. A virus mixing Foxa 1 and Hnf 4 was transfecting to cBMSCs, and iHep cells was differentiated. Morphology of iHep cells was exhibited circular to equilateral circular shapes. Expression levels of ALB and CDH m-RNA were increased approximately 5,000 and 10,000 times compared to cBMSC, respectively. Protein expression ALB and E-CDH was confirmed by immunohistochemistry, and LDL metabolic ability and Urea production were increased. In the present study, canine BMSCs were successfully induced into functional iHep cells, and they were expected to provide insights into the construction of liver models in drug discovery research and potential therapeutics for liver disease.

研究分野：再生医療

キーワード：ダイレクトリプログラミング 骨髄 肝臓 再生 ウイルスベクター 幹細胞 皮膚 イヌ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肝細胞の分化に関連した2つの転写因子である Hnf4 α と Forkhead box(Fox)遺伝子を導入することで、マウスの皮膚細胞を肝細胞へと直接に変化させることが明らかとなった(Suzuki A, Nature, 2011)。驚くべきことに、この細胞は肝細胞と同じ形態および機能的な特徴をもったまま培養下での増殖・維持が可能であり、肝臓へ移植すると障害をうけた肝臓組織を機能的に再構築することが可能であった。この手法はダイレクトリプログラミング法と呼ばれ、煩雑な幹細胞の初期化やがん遺伝子の挿入、安全性試験の一部省略が可能であり、イヌでもこのような簡便な手法による肝細胞分化誘導法を確立こととした。

マウスでダイレクトリプログラミング法による肝細胞分化が報告されているが、イヌでは実現していない。これまで申請者は、世界で唯一イヌの骨髄や脂肪組織から肝細胞への分化誘導を行ってきた(Neo et al, Vet Res Sci, 2006, Fujimoto, 日本再生医療学会, 2013)。しかし、これらの細胞では侵襲性が高くかつその分化誘導は容易ではない。また、マイクロアレイ解析でも、肝細胞へ完全分化しているとは言いがたい結果であった。近年、移植を実施した人の肝硬変患者も年間 7255 人(2013 年統計)と急速に増加し、かつイヌの重度肝疾患は増加しつつあり、再生医療の応用も強く要望されていた。

2. 研究の目的

我々は、予備研究として成イヌの皮膚線維芽細胞から肝様細胞への分化を試みた。その結果、一部の細胞はアルブミンを発現する肝様細胞が認められ、本研究では以下の点について研究を遂行することとした。

①効率の良い培養条件の選定

導入遺伝子・レトロウイルスベクター濃度・増殖因子・サイトカインの検討

②分化誘導肝様細胞の性状・機能解析

マイクロアレイによる網羅的解析、グリコーゲンの蓄積、アルブミンの分泌、脂質代謝、アンモニア代謝など

③実験動物に対する生着効果と有効性の検討

3. 研究の方法

まず、健常犬の皮膚組織から繊維芽細胞を単離し、繊維芽細胞の Cell line を確立した。その後、健常イヌの骨髄血から単核細胞を分離し、レトロウイルスベクターを用い Foxa1 および Hnf4 α 遺伝子導入した。しかしながら、一部で肝臓様の細胞が認められるものの、その出現頻度も極めて低く培養中に消失するなど、安定した分化誘導を行うには至らなかった。その他、犬腎繊維芽細胞株を用いてダイレクトリプログラミングを行った。しかしながら、一部の細胞でアルブミン陽性細胞が認められたが、やはりその発現は低く肝細胞への分化には至らなかった。

そこで我々は犬の骨髄由来の繊維芽細胞に着目し、中でも肝細胞含有率の高い骨髄由来間葉系幹細胞からの分化誘導に着目し研究を行った。犬の骨髄から細胞を採取し接着培養した細胞を BMSCs とした。BMSCs の性質は、フローサイトメトリーおよび骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能により評価した。レトロウイルスベクターを用い Foxa1 および Hnf4 α 遺伝子を BMSCs に導入し、遺伝子導入後 20 日まで培養を行った。肝細胞への分化度は、形態学的観察、PCR および免疫細胞化学により評価した。

【結論】

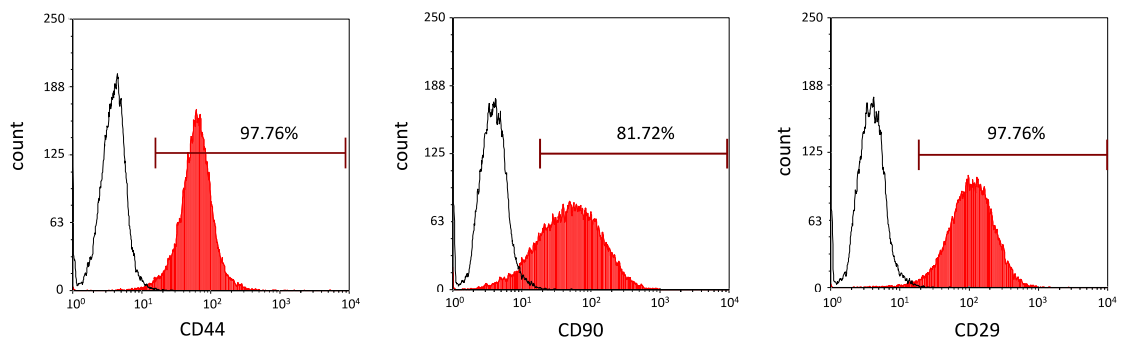
4. 研究成果

フローサイトメトリー解析の結果、単離培養した BMSCs における CD29,CD44,CD90 の陽性率はそれぞれ 97.76%、97.76%、81.72%であった。さらに、骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能も確認された。

Foxa1、Hnf4a の遺伝子導入の結果、遺伝子導入後 day20 において円形～不定形の形態を示す細胞集団が出現した。細胞骨格である F-actin を蛍光染色した結果、遺伝子導入前の BMSC においては細胞質全体に繊維状に分布していたのに対し、Day20 において円形～不定形の形態を示す細胞は細胞膜直下に多く分布していた。

定量的 PCR の結果、day0 に比べ day20 において Albumin および E-cadherin 遺伝子の発現量が増加した。また、免疫細胞化学では day0 に比べ day20 の細胞において Albumin および E-cadherin タンパク質の産生が確認された。今回、骨髄から単離されたイヌ BMSCs から Albumin を発現する肝細胞様細胞へと分化することができた。

図 1 イヌ BMSCs のフローサイトメトリー解析結果



The expression of cell surface molecules in canine cBMSCs was assessed by flow cytometry. This histogram shows the expression of cell surface molecules in canine cBMSCs. The red-filled portions represent cells labeled with the indicated cell surface molecules, and the black lined portions represent negative isotype controls.

図 2 イヌ BMSCs の脂肪、骨、軟骨の分化

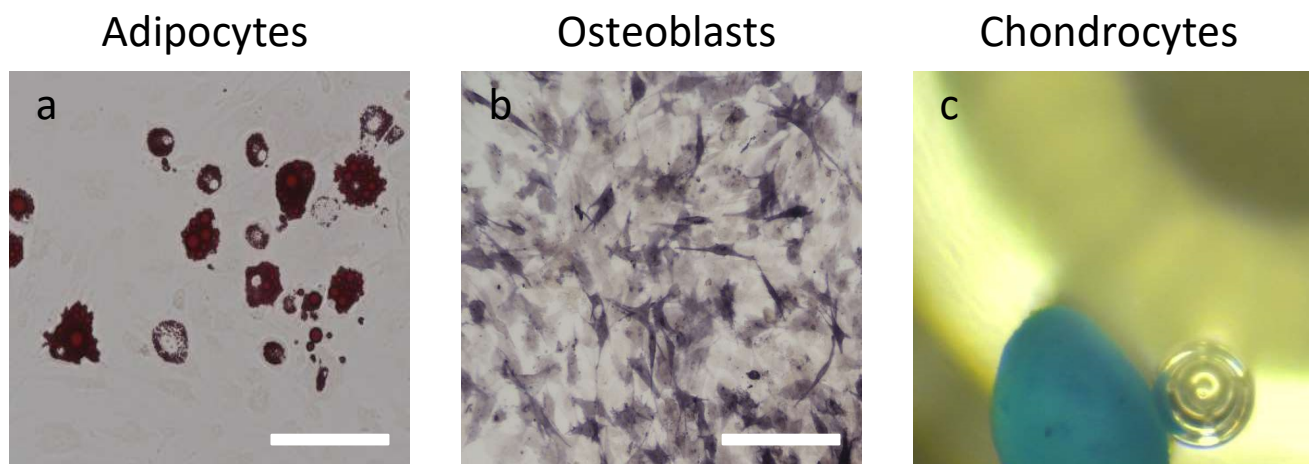
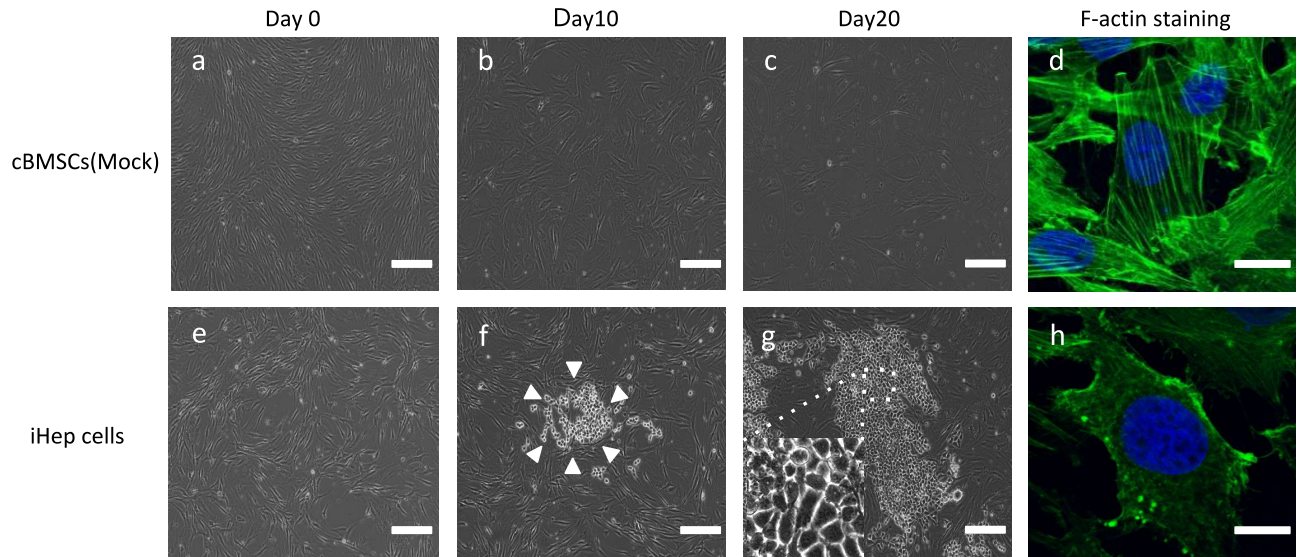


Figure. 2. Tri-lineage differentiation ability of cBMSCs. a) Staining with Oil Red O indicates differentiation into adipocytes, b) Alkaline phosphatase staining indicates differentiation into osteoblasts, and c) Alcian blue staining indicates differentiation into chondrocytes. Observation after differentiation to chondrocytes was performed with a stereomicroscope. Scale bars, 100 μ m.

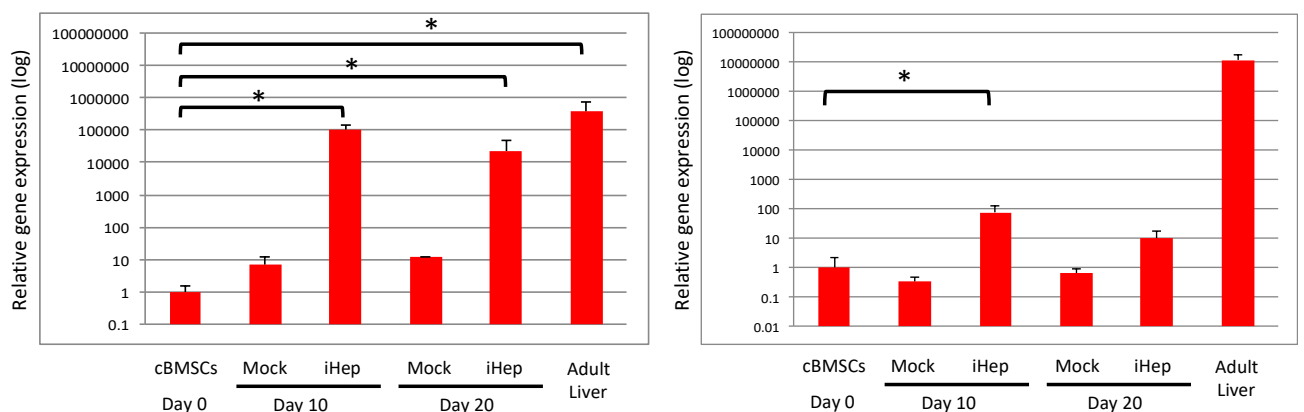
図3 肝細胞の分化誘導細胞の形態変化



Morphologies of (a, b, c, d) mock-infected cBMSCs and (e, f, g, h) iHep cells.

Morphology of canine iHep cells showed exhibited circular to equilateral circular shapes, and they formed colonies (f, g). The arrowheads (f) indicate a cluster formed by cBMSCs-derived hepatocyte-like cells. The Mock group consistently exhibited a spindle-shape morphology throughout culture. (d, h) F-actin staining revealed cytoskeleton structure, and the picture was observed with a confocal microscope. In iHep cells, strong fluorescence was observed within the cell membrane. In the Mock group, a filamentous cytoskeleton (F-actin) was clearly observed in the cytoplasm. Day, days after transfection of cells. Scale bars, (a, b, c, e, f, g) 200 μ m, (d, h) 7.5 μ m

図4 iHepのアルブミンおよびE-カドフェリンのm-RNA発現

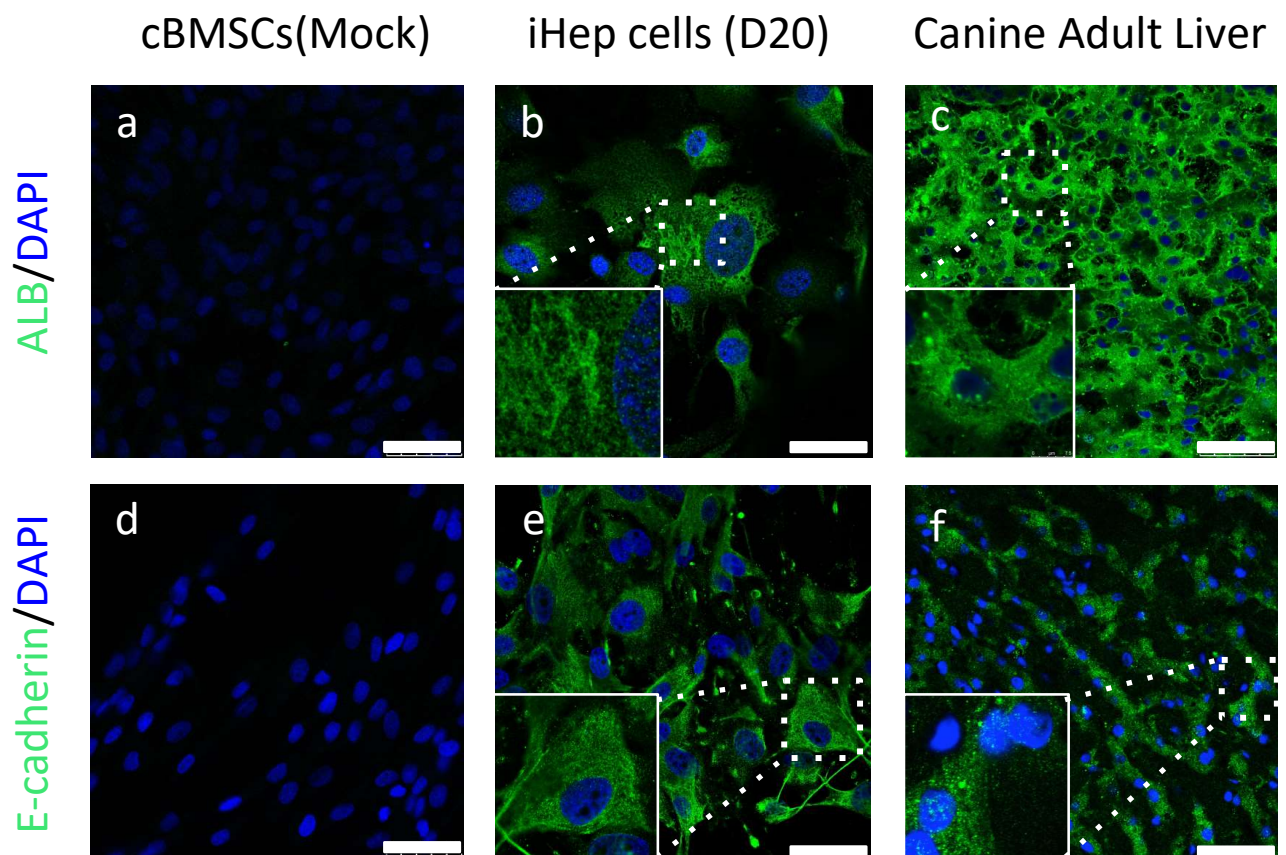


Gene expression analysis for iHep cells, qualitative and quantitative RT-PCR were performed for gene expression analysis of iHep cells. (a) Qualitative PCR of transfected genes, Foxa1 and Hnf4 α , were expressed in iHep cells in culture on day 10 and 20, respectively. (b) Qualitative

PCR analysis revealed that transthyretin (TTR), albumin (ALB), alpha-fetoprotein (AFP), tyrosine aminotransferase (TAT), alpha 1-antiproteinase (alpha 1-AT), and the cytochrome P450 group (CYP3A12 and 2E1) genes in iHep cells on day 10 and 20, respectively.

(c) Gene expression analyses by quantitative PCR in iHep cells. The expression levels of iHep on each day were shown as a ratio of compared cBMSCs (Day 0), respectively. P values were calculated based on t-test, comparing ALB or CDH gene expression levels of iHep cells and cBMSCs (Mock) with those of cBMSC (Day 0), and were considered significantly different at $P < 0.05$. Day, days after transfection of cells.

図5 iHepのアルブミンおよびE-カドフェリンの免疫染色



Immunostaining analysis demonstrated the differentiation of cBMSCs into iHep cells. Mock-infected cBMSCs, iHep cells, and canine adult liver were stained with anti-Albumin (a, b, c) and anti-E-cadherin (d, e, f). Nuclei were stained with DAPI. The area enclosed by the dashed line is magnified at the lower left of each panel. D, days after transfection of cells. Scale bars, 50 μm . g) Graph shows the percentage of cells marked with Albumin or E-cadherin in Mock infected cBMSCs and iHep cells (400-800 cells were counted for each cell).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

〔図書〕（計 1 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：鈴木淳史

ローマ字氏名：Suzuki Atsushi

研究協力者氏名：根尾櫻子

ローマ字氏名：Neo Sakurako

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。