

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19370

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の効率的な新規培養法の構築

研究課題名(英文) Construction of the new and efficient culture method of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells

研究代表者

鶴谷 康太 (TSURUYA, Kota)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00725377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞(hiPS)の網羅的な表面分子の検討より、サイトカインとしてEpidermal Growth Factor(EGF)、Neuregulin1(NRG1)の添加が増殖性に重要であった。また、足場材料としてラミニン511のFragment上にて培養することで、hiPS/ES細胞由来肝前駆細胞の高い増殖能を維持でき、フィーダー細胞として使用していた胎児繊維芽細胞を代替可能であることを見出した。これらの条件を検討することで、hiPS細胞由来の長期肝前駆細胞の培養系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Among the analyses of cell surface receptors, we found that proliferative ability of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells (HPCs) was significantly induced by addition of both Epidermal Growth Factor(EGF) and Neuregulin1(NRG1). Moreover, we revealed that HPCs maintained high proliferative ability on the human laminin-511 fragments as substitute for culturing on mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as feeder cells. Based on these results, we established stably and long-term expansion culture system of human iPS cell-derived HPCs.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ヒトiPS細胞 肝前駆細胞 フィーダーフリー

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は体内最大の臓器であり、代謝・合成・排出・解毒などを司り、恒常性の維持において重要な役割を担っている。また、肝臓は特徴的な高い再生能力を有しており、通常の再生時には機能細胞である成熟肝細胞が一時的に肥大・増殖し、元の臓器の機能・大きさを回復する。しかしながら、劇症肝炎や慢性肝疾患の終末像である肝硬変により肝臓の構造と機能を修復できないほどに損傷すると肝不全を呈する。肝不全の根治療法として肝移植が有効であるが、脳死ドナーがいまだ少ない本邦は慢性的なドナー不足の状態であり、高度な手技・合併症の点もあり、普及が困難となっている。そこで、幹細胞を用いた細胞移植療法が肝不全に対する新規治療手段として期待される。また、肝臓は薬物代謝の中心的な臓器であり、肝細胞機能を有する細胞がヒト多能性幹細胞から作製されれば、薬物動態試験・毒性試験などに供することで効率的な創薬研究が可能となる。

ヒト人工多能性幹 (hiPS) 細胞は生体内のすべての細胞に分化できる「多能性」を有しており、自らの体細胞から作製でき免疫の拒絶を受けないことから、細胞移植治療のソースとして理想的である。肝細胞移植等の再生医療や創薬への応用を行うには、分化誘導した機能的肝細胞を大量に準備する必要がある。成熟肝細胞は生体外では増殖能力に乏しいが、成熟肝細胞の前駆体である肝前駆細胞は高い増殖能と肝細胞への分化能を持つため、肝前駆細胞から肝細胞への分化誘導技術と組み合わせることによって、大量の機能的肝細胞の供給が可能になる。hiPS 細胞の肝臓系細胞への分化誘導は、肝発生の各分化段階に適した液性因子などを順次作用させる系が報告されている。hiPS 細胞に TGFβ ファミリーに属する Activin A の添加することで、内胚葉系細

胞共通の前駆細胞である Definitive endoderm へと分化させる。その後、fibroblast growth factor (FGF)、bone morphogenetic factor 4 (BMP4)、肝細胞増殖因子 (HGF) と連続的にサイトカインを添加することで、幼若肝細胞へと分化誘導を行う。(Si-Tayeb K, et al. Hepatology 2010)。

我々は、上記の hiPS 細胞を肝臓系細胞へと分化誘導する培養系で、CD13 (aminopeptidase N) と CD133 (Prominin 1) 両陽性細胞集団に高増殖性と、肝細胞・胆管系細胞へ分化する 2 方向分化能をもち、また自己複製能をもつ集団、すなわち肝前駆細胞が濃縮されていることを報告した (Yanagida A, Kamiya A, et al. PLoS One 2013)。

また、hiPS 細胞由来 CD13+CD133+肝前駆細胞の網羅的な表面分子の解析により、EGFR・ErbB2 (CD340)・IGF-1R (CD221)・Fn14 (CD266, TNFRSF14) といった細胞表面受容体が hiPS 細胞由来肝前駆細胞に強く発現しており、さらに細胞増殖に関与していることを報告している (Tsuruya K, Kamiya A, et al. Stem Cells Dev. 2015)。

さらに、肝前駆細胞の高増殖性の維持には細胞外基質やフィーダー細胞との相互作用、そしてフィーダー細胞が産生するさまざまな増殖因子が重要である。しかしながら、この外的因子がどのような機構で肝前駆細胞の増殖能を制御しているかは不明確である。

## 2. 研究の目的

hiPS 細胞を用いた再生医療の実用化には高品質性を保ち、病原体をできるだけ排除するためにも、既知の成分よりなる合成培地を用いた培養条件が必要である。

本研究では、網羅的スクリーニングにより得た細胞表面分子のプロファイルに基づ

き、適切な添加因子と足場材料の選定を行い、hiPS 由来肝前駆細胞のフィーダー細胞無しでさらに Define された成分のみを含む安全な新規培養系の確立を目的とした

### 3. 研究の方法

より安定して hiPS 細胞を肝細胞系列へと分化誘導可能な方法を探索した結果、Cellartis® Hepatocyte Differentiation System を用いて肝前駆細胞へ分化誘導を行った。フィーダー細胞である胎児繊維芽細胞 ( mouse embryonic fibroblasts; MEF ) 上に播種した後、EGF、HGF 存在下で増殖に関与すると考えられる受容体に対するリガンドを添加し、増殖能の評価( コロニー形成アッセイ ) を行った。

また、MEF の代替となる足場材料の検討として、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン 511 などでの維持培養が可能であるか検討した。

次に、今までの hiPS 細胞由来肝前駆細胞の維持培養系では FCS の添加が必要であるが、様々な血清代替条件の検討を行い、肝前駆細胞の維持培養が可能であるか検討した。

### 4. 研究成果

hiPS 細胞より Cellartis® Hepatocyte Differentiation System を用いて Progenitor cell まで培養した細胞は、その殆どが CD13・CD133 両陽性細胞であり、我々が以前の分化誘導系と同様の肝前駆細胞が高頻度に得られると考えられた。そこでこの系を用いて、液性因子および細胞外マトリクスの必要性について検討した。

その結果、hiPS 細胞由来肝前駆細胞の網羅的な表面分子の検討より、サイトカインとして Epidermal Growth Factor( EGF )、Neuregulin1 ( NRG1 ) の添加が細胞増殖

に重要であることを見出した。

また、足場材料としてラミニン 511 の Fragment 上にて培養することで、hiPS/ES 細胞由来肝前駆細胞の高い増殖能を維持でき、フィーダー細胞として使用していた MEF を代替可能であることを見出した。

次に、chemically defined serum-free culture condition の構築の検討を行った。様々な血清代替条件の検討を行い、ラミニン 511 上において、SIGMA® Serum Replacemnt3 を使用することで、hiPS 由来肝前駆細胞の維持培養が可能であった。

以上より、hiPS 細胞由来の長期肝前駆細胞の培養系を確立した。今後、chemically defined serum-free culture condition の構築の為に、本培養系を用いた検討を進めると共に、レトロウイルス等を用いた遺伝子発現により肝前駆細胞の増殖等に重要な因子の探索を進める予定である。

### 5. 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

- (1) Kagawa T, Adachi Y, Hashimoto N, Mitsui H, Ohashi T, Yoneda M, Hasegawa I, Hirose S, Tsuruya K, Anzai K, Mine T. Loss of organic anion transporting polypeptide 1B3 function causes marked delay in indocyanine green clearance without any clinical symptoms. *Hepatology* 65: 1065-1068, 2017. ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

- (1) 紙谷聡英、鶴谷康太、近田裕美 「転写因子の制御による肝前駆細胞の成熟化」第 24 回肝細胞研究会 ( 平成 29 年 6 月 30 日、旭川市文化会館、北海道旭

川市)

〔図書〕(計 0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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴谷 康太 (TSURUYA, Kota)  
東海大学・医学部・助教  
研究者番号：00725377

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )