

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09094

研究課題名(和文) Nrf2を介した間葉系幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Role of Nrf2 signaling in development of hepatocyte like cells

研究代表者

高須 千絵 (TAKASU, Chie)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師

研究者番号：70582823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回HLC分化誘導におけるnuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)の働きにつき研究を行った。Nrf2の核内移行(活性化)はStep2である肝細胞分化段階より認められ、Activin A使用群よりNrf2活性化作用を持つGSK3阻害剤使用群で多く認められた。GSK3阻害剤によるNrf2の核内移行はHLC機能の向上に寄与していると考えられ、Nrf2は機能的HLC作成のtargetとなると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回GSK3阻害剤によるNrf2の核内移行はHLC機能の向上に寄与していると考えられた。MSCからHLCへの分化誘導の過程において、Nrf2活性化によりHLCへの分化効率が上昇すれば、低侵襲かつ迅速に移植が可能となり、画期的な治療につながり得ると考えられる。肝移植における慢性的ドナー不足を考慮すると、機能的肝細胞を倫理上の問題なく安全に確保できる手法の開発の恩恵は計り知れないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The generation of hepatocytes derived from human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) could be a promising source of alternative human hepatocytes. As Nrf2 signaling showed protective role in liver regeneration, we investigated the role of Nrf2 in differentiation of hepatocyte-like cells (HLCs).

The nucleus translocation of Nrf2 was significantly occurred since day 11 through the progression of differentiation of HLCs. The nucleus translocation of Nrf2 in GSK3 inhibitor treated group was obviously higher than the other groups at day 11 (step 2). Moreover, the nucleus translocation of Nrf2 in GSK3 inhibitor treated group was notably higher than other groups in step 3. Luciferin-IPA Activity of GSK3 inhibitor treated group was higher than other 3 groups. Nrf2 was activated in during the procedure of HLCs differentiation step. Nrf2 might be a notable target in developing high functional human HLCs.

研究分野：再生医療、医歯薬学、外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：heparocyte like cell ADSC

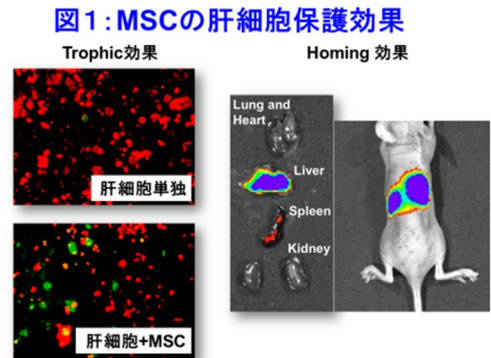
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 新たな donor source の必要性 (MSC から HLC への分化誘導)

抗ウイルス剤などの進歩により肝疾患領域の治療は近年大きく進んでいるが、非代償性肝硬変など重篤な肝疾患に対して根治を期待できる治療は未だ肝移植のみである。一方で肝移植には慢性的なドナー不足、手術侵襲、免疫拒絶、医療費などの多くの問題があり、その実施は限られている。これらの問題に対し、幹細胞を用いた肝臓再生療法は、低侵襲、免疫拒絶を伴わない移植が可能、複数回の移植が可能、経静脈・動脈投与が可能、低コストである点などがメリットとして挙げられ、再生能を有する移植可能な成熟肝細胞を生体外で安定かつ安全に供給する方法が盛んに研究されている。

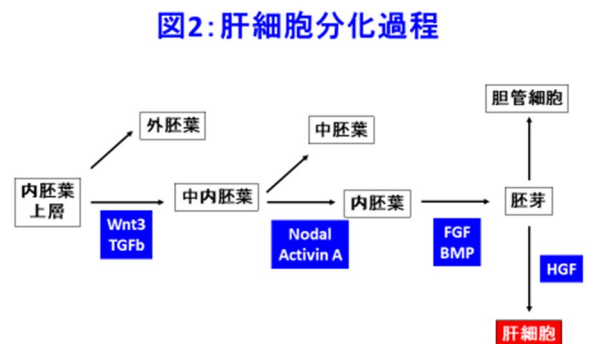
肝細胞の donor source としては、胚性幹細胞 (ES 細胞 = embryonic stem cell) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞 = induced pluripotent stem cells)、間葉系幹細胞 (MSC = Mesenchymal stem cells) が挙げられる。iPS 細胞と ES 細胞を用いた肝細胞誘導に関しては多くの protocol が報告されており、比較的安全性の高い機能的肝細胞の作製がなされるようになっているが (Mol Ther. 2011) iPS 細胞における遺伝子のダメージ・拒絶の可能性、また、ES 細胞における倫理的問題など、様々な問題点が指摘されており、臨床応用には未だ長い道のりである。これらの諸問題を解決するのが MSC であるが、MSC からの肝細胞誘導に関しては未だ十分な protocol が確立されていない。我々は、肝切除虚血再灌流障害モデルマウスを用いて、MSC 移植が、Trophic 効果 (J Surg Res. 2013) 及び Homing 効果 (J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014) を有し、術後肝傷害を軽減し、肝再生を促進することを既に報告しており、MSC の取り扱いに関しては精通している (図 1)。



MSC は増殖力に富み特殊な培養条件を要さないため、in vitro での通常培養により簡便に十分な細胞数を確保することができる。また、虚血性心疾患や脳梗塞、筋萎縮性側索硬化症などの神経疾患などにおいて、MSC は成長因子やサイトカインの産生および免疫調節を介して、障害組織の再生を促進することが報告されており (Cell Transplant. 2015) 肝臓の再生においても有用と考えられる。MSC からの安定的かつ効率的 HLC 分化誘導の protocol の確立は喫緊の課題である。

(2) MSC の効率的 HLC 分化誘導

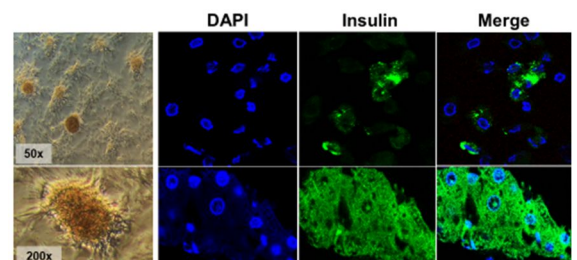
消化器官の形成初期において、心原性中胚葉から分泌される線維芽細胞増殖因子 (FGF) と横中隔から分泌される骨形成因子 (BMP) のシグナルを受け、前腸の一部から肝芽細胞が形成される。肝芽細胞は横中隔へ進入し、肝臓の前駆体である肝芽を形成する。肝芽は横中隔から分泌される肝細胞増殖因子 (HGF) などのシグナルにより肝細胞と胆管上皮細胞へ分化していく (図 2)。幹細胞からの肝細胞分化誘導には、この過程を in vitro で再現することが鍵となる。多くの分化誘導法では、未分化細胞に初期発生で重要なサイトカインである Wnt、TGF β や、内胚葉系譜に分化させるに効果的な Nodal、activin A を添加し内胚葉系細胞に導いたあとに、FGF、BMP、HGF によって肝細胞に分化させ、OsM、Dex、nicotinamide などにより肝細胞の成熟化を促す方法がとられている (Hepatology. 2007, Stem Cells. 2007)。



我々はこれらの知見に加え、これまで行ってきた MSC からの膵島細胞様の機能を持つ IPC (Insulin producing cell) への分化誘導の経験をふまえ (図 3) より安定的かつ効率的な MSC からの HLC への分化誘導 protocol の確立を目指す。IPC への分化誘導においては、これまで

図 3: MSC から分化誘導した IPCs

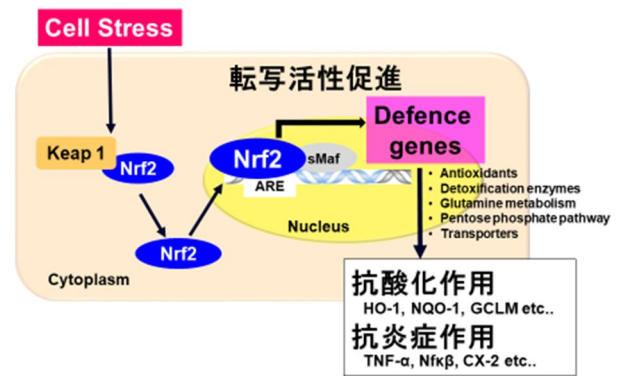
我々が癌幹細胞研究において多数報告してきたエピジェネティック修飾に関与し、スフェア形成に大きく関わる Histone deacetylase inhibitor (HDACi) を分化誘導条件に添加し 2 step protocol とすることで IPC への分化誘導が短時間で可能となり、また MSC の 3 次元培養により作成効率の改善をはかっている。iPS 細胞からの肝細胞成熟の促進においても HDACi の効果が報告されていることから (Plos One 2014) MSC からの HLC 誘導における効果が期待できる。さらに、HDACi に加えて、より効率的に MSC から HLC への分化誘導を可能とする新規因子として、これまで研究を行ってきた酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 に着目した。



(3) Nrf2 による酸化ストレス制御

非ストレス状態下では、Nrf2 は Keap1 に捕捉されプロテアソームによって分解される。細胞に酸化ストレスにさらされると、Keap1 による Nrf2 抑制機構は解除され、Nrf2 は分解されずに安定化し、核移行した Nrf2 が防御遺伝子の発現を誘導する(図4)。Nrf2 の活性化による Antioxidant や Heat Shock Protein (HSP) の発現誘導は、活性酸素種(ROS)への耐性による細胞保護効果や DAMPs などによる炎症 Cascade の抑止効果が期待され、MSC の HLC への分化誘導過程においても、Nrf2 の活性化は抗酸化作用、抗炎症作用による細胞保護効果が期待できる。

図4: Nrf2 pathway



Nrf2 inducer である Dimethyl Fumarate (DMF) は、欧米において乾癬の治療薬として広く用いられており、近年は多発性硬化症における有用性が実証されている。我々はすでに肝虚血再灌流 (Takasu C. et al. World J Gastroenterol. 2017) 薬剤性腎症モデル (Takasu C. et al. Transplantation. 2015) において抗酸化・抗炎症作用により臓器保護効果を有することを報告しており、その臨床応用が期待される。

(4) 3D culture system を用いた効率的分化

三次元培養は平面培養(従来の単層培養法)よりも、細胞外マトリクスを介して適切な空間配置を取って細胞凝集体を形成する方が機能的に優れていることが既に報告されている。また平面培養では継代培養を重ねると細胞の機能が消失し生体機能を維持した状態での細胞培養が難しいと言われている。我々はすでに MSC からの IPC 分化誘導において、3次元培養に着手し、スフェロイド作成に成功している。そこで 3次元培養を DMF を用いた分化誘導方法と組み合わせることで、短期間かつ効率的な MSC からの HLC 分化・誘導が期待できる。

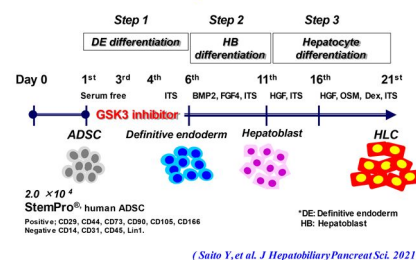
2. 研究の目的

各種幹細胞治療の臨床導入が進まぬ現在、採取量が豊富・自己由来であれば倫理的問題が少ない・遺伝子導入などの DNA ダメージがない、などの有用性のために臨床応用が比較的容易である MSC に着目した。MSC は中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞であり、通常は間葉系に属する細胞(骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞など)へと分化する。しかし、微小環境の変化によりグリア細胞(外胚葉由来)、肝細胞(内胚葉由来)など、中胚葉性でない組織にまで分化できる可塑性を持っていることが示されている。これまでに、MSC に Nrf2 を過剰発現させることで、骨芽細胞への分化誘導を促進し(Biochem Biophys Res Commun. 2017) iPS 由来神経幹細胞から神経細胞・星状細胞への分化を刺激すること(Neurochem Int. 2017)などが報告されている。今回 DMF が、MSC から HLC への分化誘導の過程において、1. 内胚葉への形質転換を促進する、2. 胚葉転換後、肝芽細胞への分化を促進する、あるいは 3. HLC への成熟過程を促進する(図5) ことで HLC への分化効率が上昇すれば、低侵襲かつ迅速に移植が可能となり、画期的な治療につながり得ると考えられる。さらに 3次元培養による作成効率の上昇は、既に臨床応用されている MSC 移植を迅速かつ効果的に臨床応用へ導くものである。

3. 研究の方法

ヒト ADSC を用いて確立した 3-step protocol (Step1:胚葉転換による胚体内胚葉(DE)細胞誘導、Step2:肝内胚葉(HE)細胞誘導、Step3:肝細胞様細胞誘導)を用い 21 日間で HLC を作成し、各 step における Nrf2 の動きにつき検討を行った(図5)。

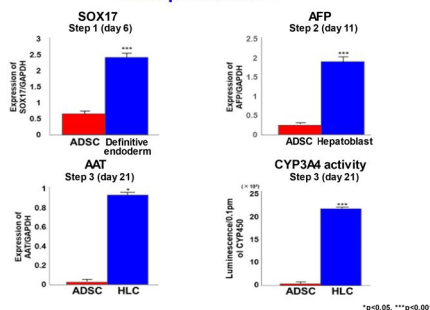
図5: HLC differentiation - 3 Step Protocol -



4. 研究成果

3 step protocol による HLC の作成

図6: HLC differentiation - 3 Step Protocol -

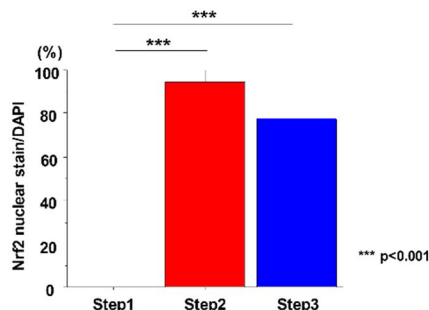
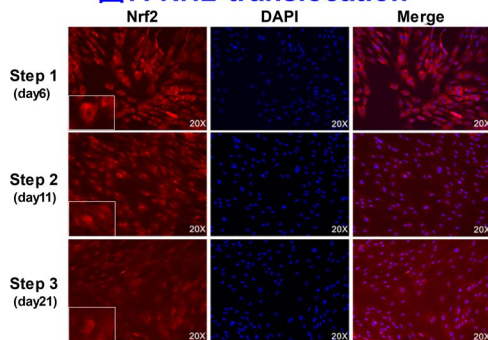


Step1 での内胚葉転換時の SOX17、Step2 終了時の肝芽細胞誘導の指標となる AFP、また Step3 終了時の Hepatocyte の成熟遺伝子の AAT 発現や薬剤代謝の指標となる Cyp3A4 活性についても、ADSC に比し有意に高く良好な HLC が誘導できていることを確認した(図6)。

(Saito Y. et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2021)

Nrf2 の核内移行 (活性化)

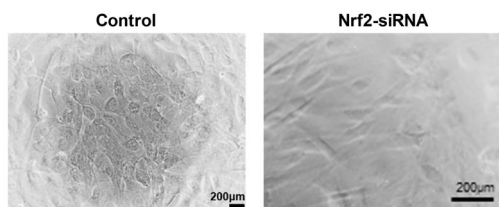
図7: Nrf2 translocation



各 STEP における Nrf2 の核内移行を蛍光免疫染色で確かめると、胚葉転換時の STEP 1 では Nrf2 は細胞質に存在しているのに対し、肝芽細胞への分化がはじまる Step 2 の段階ではほとんどが全ての Nrf2 が核内移行し、その状態が STEP 3 の HLC 誘導まで維持されていた (図 7)。

Si-Nrf2 による Morphology change

図8: Morphology - Step 3 (day 21)-

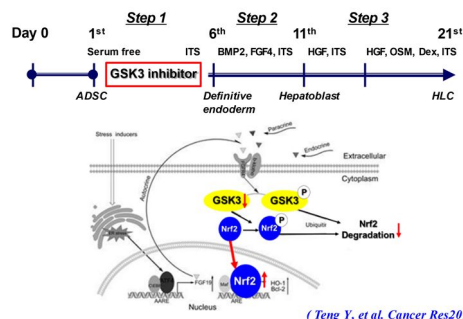


通常は step 1 の ADSC の段階で紡錘状であったものが 21 日目では多角の hepatocyte 様の細胞形態を示すが、Nrf2 をノックダウンすると 21 日目でも細胞形態は紡錘状の形態にとどまっております、分化が阻害されていると考えられた (図 8)。

GSK3 阻害剤による Nrf2 活性化の可能性

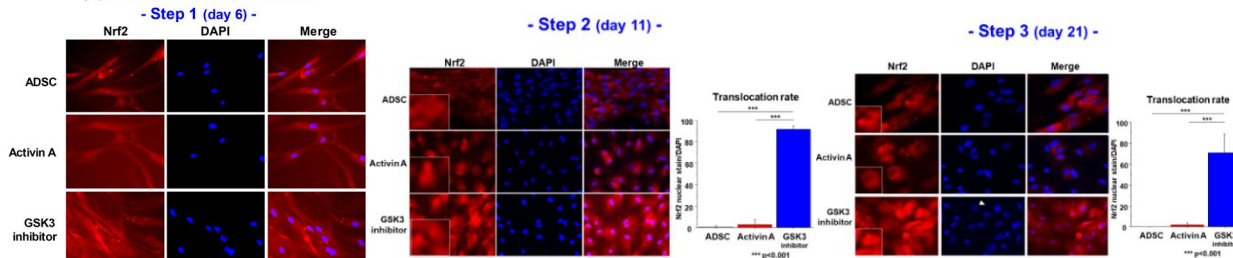
我々が用いている分化 protocol では、Step 1 での内胚葉への胚葉転換において GSK3 阻害剤を用いており、GSK3 は Nrf2 の分解を促進すると報告されていることから、GSK3 阻害剤を用いることで Nrf2 の核内移行を誘導しさらなる活性化を起こしていると考えられた。そこで通常 Step 1 の胚葉転換において使われる、TGF スーパーファミリーに属するアクチビン A と、我々がもちいた GSK3 阻害剤で Nrf2 の活性化を比較検討することとした (図 9)。

図9: 3 Step Protocol



Activin A vs, GSK3 阻害剤による Nrf2 活性化の検討

図10: Nrf2 translocation



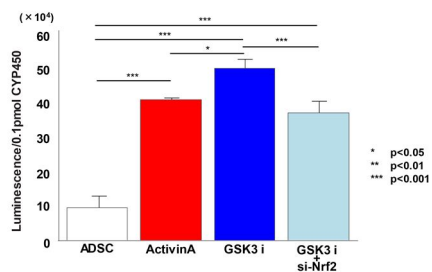
Step 1 の胚葉転換期においては、Activin A, GSK3 阻害剤ともに Nrf2 の核内移行は認められず、Step 2 の分化段階においては、Nrf2 の核内移行は Activin A 群でも少数認められたが、GSK3 阻害薬使用群では高率に核内移行を認めた。Step 3 においても、GSK3 阻害薬使用群では Nrf2 の多くは核内に認められ、活性が維持されている状態であった (図 10)。

Activin A vs, GSK3 阻害剤による HLC function

HLC の hepatocyte としての機能を薬剤代謝の指標である Cyp3A4 活性でみると、GSK3 阻害剤使用群で最も高く、GSK3 阻害剤使用群で Nrf2 をノックアウトすると Activin A と同等レベル

に低下するという結果となり、GSK3 阻害剤は HLC の機能を向上させていると考えられた (図 11)。

図11 :CYP3A4 activity



以上より、Nrf2 の核内移行は Step2 より認められ、ActivinA 使用群より GSK3 阻害剤使用群で多く認められた。GSK3 阻害剤による Nrf2 の核内移行は HLC 機能の向上に寄与していると考えられ、Nrf2 は機能的 HLC 作成の target となると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Y, Ikemoto T, Morine Y, Shimada M	4. 巻 51
2. 論文標題 Current status of hepatocyte-like cell therapy from stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surg Today.	6. 最初と最後の頁 340-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yu, Tetsuya Ikemoto, Kazunori Tokuda, Katsuki Miyazaki, Shinichiro Yamada, Satoru Imura, Masato Miyake, Yuji Morine, Seiichi Oyadomari, Mitsuo Shimada	4. 巻 28
2. 論文標題 Effective three-dimensional culture of hepatocyte-like cells generated from human adipose-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci.	6. 最初と最後の頁 705-715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高須千絵, 森根 裕二, 池本 哲也, 齋藤 裕, 山田 眞一郎, 寺奥 大貴, 沖川 昌平, 島田 光生
2. 発表標題 間葉系幹細胞から肝細胞様細胞の誘導におけるNrf2の働きに関する検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 勲, 齋藤裕, 池本哲也, 徳田和憲, 宮崎克己, 山田眞一郎, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞ADSCからのSuper HLC（肝細胞様細胞）の創出
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田和憲, 池本哲也, 島田光生, 齋藤裕, 吉川雅登, 山田眞一郎, 荒川悠佑, 居村暁, 森根裕二
2. 発表標題 亜鉛イオンに着目したADSCから製造したInsulin-producing cell 成熟度に関する検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saito Y, Ohta S, Ikemoto T, Iwahashi S, Morine Y, Imura S, Yamada S, Shimada M
2. 発表標題 The new role of zinc ion in insulin-producing cells differentiation from adipose derived mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 European Society for Organ Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤裕, 居村暁, 宮崎克己, 吉川雅登, 荒川悠佑, 池本哲也, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 脳死肝移植ドナー不足解消に向けての取り組み
3. 学会等名 第37回日本肝移植学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 裕 (SAITO Yu) (50548675)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森根 裕二 (MORINE Yuji) (60398021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・准教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関