

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月9日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790673

研究課題名（和文） HGFによる肝細胞分化誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms for hepatic differentiation by HGF

研究代表者

高見 陽一郎 （TAKAMI YOICHIRO）

熊本大学・発生医学研究所・厚労科研研究員 B

研究者番号：10500473

研究成果の概要（和文）：本研究は、iPS細胞を用いて肝細胞分化におけるHGFの作用機序を詳細に解析することにより、未だ十分に解明されていない肝細胞分化誘導メカニズムを解明することを目的とした。本研究で、iPS細胞の作製方法により分化誘導した細胞の性質に違いが認められること、またミトコンドリア機能がiPS細胞の分化や細胞のリプログラミングに関わっていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the mechanisms for HGF-promoted hepatic differentiation from iPS cells which are still unknown. In this study, we found that (1) the characters of differentiated cells from iPS cells may change according to the generation procedures of iPS cells, and (2) mitochondrial functions were associated with the feature of differentiated cells and cellular reprogramming.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：HGF・iPS細胞・分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

2007年に京都大学の山中らのグループによるヒトiPS細胞(induced pluripotent stem cells; 誘導多能性幹細胞)の樹立(Takahashi K *et al.*, *Cell*, 2007)が報告され、iPS細胞を用いた再生医療が実現されることに大きな期待が集まった。これまでに

胚性幹細胞(embryonic stem cell; ES細胞)を用いた肝細胞分化の研究は多くなされており、例えばマウスES細胞から分化誘導した肝細胞を治療に使い、肝疾患モデルマウスの生存率を改善した報告がなされている(Ishii T *et al.*, *Stem Cells*, 2007)。また、ヒトES細胞でも*in vitro*で肝細胞へ分化誘

導した報告はなされているが、その数は少ない。これまでの ES 細胞から肝細胞への分化誘導では Activin A、FGF や HGF (hepatocyte growth factor ; 肝細胞増殖因子) といった複数の因子を組み合わせた多段階の誘導法がとられている。中でも HGF は、これらの多くの研究で共通して用いられる増殖因子である。

HGF は最も強力な肝再生因子として Gohda & Tsubouchi らにより発見された増殖因子である (Gohda E *et al*, *J Clin Invest*, 1988)。一方、HGF ノックアウトマウスでは肝発生が傷害されて胎生致死になることや ES 細胞から肝細胞への分化には HGF が必要であることも明らかにされており、これらの事実は HGF が肝細胞への分化において極めて重要な役割を果たしていることを示している。しかし HGF の肝細胞分化の作用機序はまだほとんど解明されていない。そこで、iPS 細胞を用いて肝細胞分化における HGF の作用機序を詳細に解析することにより、肝細胞分化において重要な新規因子の発見、さらにはそれらの因子を利用したより効率的な肝細胞への分化誘導法の確立につなげることができるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、i) ES 細胞で行われてきたいくつかの肝細胞分化誘導法を参考にして、iPS 細胞を肝細胞に分化させる。そして、ii) プロテオーム解析や DNA マイクロアレイなどの網羅的な解析手法を用いて HGF の作用に関連した因子を絞り込み、肝細胞分化に必須の新規因子を同定することを目的とする。また、iii) 上記の解析により同定した因子、すなわち肝細胞分化において重要と考えられるタンパク質あるいは遺伝子を導入または誘導することにより、肝細胞分化が誘導されるかどうかを検証する。これにより、肝細胞分

化に必要な新規因子の同定と効率的な肝細胞分化誘導法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) iPS 細胞を肝細胞に分化させる。

これまで、*in vitro* で ES 細胞から肝細胞への分化には、activin A、oncostatin M あるいは BMP-4 といった分化誘導因子や FGF (fibroblast growth factor)、HGF などの増殖因子を用いた、複数のステップを経た段階的な誘導方法がとられている (Teratani *et al*, *Hepatology*, 2005、他多数)。このようないくつかの報告を参考に、iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導する。肝細胞の指標としては、 $\alpha$ -fetoprotein など既知の肝細胞マーカー発現に加え、アルブミン合成能、アンモニア除去能およびシトクロム P450 発現などを用いる。

ヒト iPS 細胞についても、Cai らの方法 (Cai *et al*, *Hepatology*, 2007) など、ES 細胞での報告を参考にして分化方法の検討を行う。

(2) プロテオーム解析及びマイクロアレイ解析により iPS 細胞の肝細胞分化誘導に関わる因子を探索する。

プロテオーム解析は主に 2 次元電気泳動法を用いる。肝細胞への分化過程において HGF により発現が変動するタンパク質の発現パターンを調べる。異なる分化誘導法での誘導過程において、HGF により変動するタンパク質の発現パターンを比較し、共通して HGF により発現が増加/減少するものを抽出する。この方法で、肝細胞分化でより重要な因子を絞り込む。また、iPS 細胞の肝細胞分化誘導に関わる因子の絞り込みと機能解析を行う。

プロテオーム解析で抽出した同定因子の機能を siRNA や抗体を用いて検証し、肝細胞分化に必要な因子であるかどうかを検証する。プロテオーム解析により抽出した同定因子

が真に肝細胞分化に関連する因子であることがわかれば、i) これらの遺伝子を iPS 細胞に導入し発現させる方法、ii) 薬剤などにより誘導させる方法の 2 つの方法により肝細胞に分化させることができるかどうか検証する。

#### 4. 研究成果

(1) HGF による肝細胞分化誘導メカニズムの解析

① iPS 細胞を利用して肝細胞分化誘導メカニズムを解明することを目的に、4 種類 (レトロウイルスベクターで作製したもの 2 種類及びプラスミドベクターで作製したもの 2 種類) のマウス iPS 細胞を用いて、ES 細胞で行われてきた胚葉体形成を介した肝細胞分化誘導法を検討した。しかし、検討の過程で用いた 4 種類の iPS 細胞は細胞株間の性質の差が大きく、特に、同じ分化誘導法を用いても分化誘導の最初のステップである胚葉体形成能や誘導される細胞の形態が iPS 細胞の作製方法により異なることが分かった。

② 分化誘導メカニズムの解析あるいは細胞移植への応用を考える上で、このような細胞株間の性質の差を十分に理解することは極めて重要な課題であると考え、まず cDNA マイクロアレイを用いて 4 種類の iPS 細胞の胚葉体形成により変動する遺伝子を比較した。その結果、いくつかのプロテアーゼまたはプロテアーゼインヒビター遺伝子の発現パターンが、胚葉体により大きく異なることが分かった。これら同定した遺伝子はヒストン H3 のプロセッシングに関与する可能性があり、このことは、iPS 細胞の作製方法による細胞株間の性質・形態の差にヒストンのプロセッシングが関わっていると考えられた。

③ また、これらマウス iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導させたところ、プラスミドベクターで

作製した iPS 細胞ではレトロウイルスベクターのもの比べて分化した肝細胞様細胞 (PAS 染色陽性、ICG 染色陽性細胞) で非常に多くの脂肪滴が認められた。このことから細胞内でのミトコンドリア機能や脂質代謝が iPS 細胞の性質や分化経路に深く関わっていることが示唆された。

(2) iPS 細胞分化誘導におけるミトコンドリア機能の影響についての検討

① 平成 22 年 10 月より熊本大学発生医学研究所に移動し、ヒト iPS 細胞を用いた研究を開始した。前年度までのマウス iPS 細胞を用いた研究から、細胞内での脂質代謝をはじめとするエネルギー代謝の違いが iPS 細胞の性質や分化経路に深く関わっていることが分かってきた。また近年、iPS 細胞の分化や細胞のリプログラミングの過程に細胞内のエネルギー生産機構であるミトコンドリアの機能や代謝が深く関与していることを示唆する報告もなされている。そこで、種々の線維芽細胞からヒト iPS 細胞を作製し、ミトコンドリア機能と iPS 細胞の分化との関連について検討を行った。またミトコンドリア機能異常のモデル細胞として、ミトコンドリア病患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、リプログラミング過程あるいは三胚葉への分化経路におけるミトコンドリア機能の変化についても同時に検討した。

① 健康者由来 iPS 細胞として 201B7 細胞を用い、Ethidium Bromide によりミトコンドリア DNA を除去した iPS 細胞 ( $\rho 0$ -iPS 細胞) を作製を試みた。その結果、Ethidium Bromide 添加により iPS 細胞でのミトコンドリア DNA は顕著に減少し  $\rho 0$  になったと考えられたが、この iPS 細胞は継代すると死滅してしまい維持培養することができなかった。従ってミトコンドリア機能を完全に抑制することで分

化誘導を行うのは困難と考えられた。

②次にミトコンドリア病患者由来線維芽細胞から iPS を誘導し、分化に及ぼす影響について検討した。変異部位の異なるミトコンドリア病患者由来線維芽細胞から SeV ベクターを用いた方法で iPS 誘導を行ったところ、一部の症例で iPS の樹立効率が健常者に比べて顕著に低下していることが分かった。このことはミトコンドリア機能の低下が細胞のリプログラミングを阻害していることを示唆しており、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

## 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 8 件)

- ① Nosaki T, Uto H, Takami Y, Oku M, Fukumoto M, Mera K, Nishida C, Tokunaga K, Sogabe A, Oketani M, Ido A, Kurono Y, Tsubouchi H. High serum thioredoxin levels were reduced after tonsillectomy in patients with IgA nephropathy. *Intern Med* 51:559-565 (2012). (査読 有)
- ② Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin levels are potential prognostic markers among patients with HCV-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 17:4890-4898 (2011). (査読 有)
- ③ Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Arima S, Hashimoto S, Nasu Y, Takami Y, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat. *Biochem Biophys Res Commun*, 407:163-168 (2011). (査読 有)
- ④ Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of

novel biomarkers. *Proteome Sci* 8:70 (2010).

(査読 有)

⑤ 宇都浩文、高見陽一郎、坪内博仁 肝発癌予防につながる高機能性食品の探索 *Functional Food*, Vol. 3, 150-154 (2009)

(査読 無)

⑥ Tokunaga K, Uto H, Takami Y, Mera K, Nishida C, Yoshimine Y, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Nosaki T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 levels are increased in patients with IgA nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 399:144-149 (2010). (査読 有)

⑦ Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol Res* 40:438-445 (2010). (査読 有)

⑧ Takami Y, Uto H, Takeshita M, Kai H, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 40:337-345 (2010). (査読 有)

[学会発表] (計 12 件)

① 高見陽一郎、山田祥慎、片山朋彦、濱崎誠、房木ノエミ、江良択実 難治性疾患由来外来因子フリーiPS細胞の樹立 第8回宮崎サイエンスキャンプ、2012年2月18日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎)

② Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kure T, Kumagai K, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin levels may predict mortality in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular

carcinoma. The International Liver Cancer Association 2011 Fifth Annual Conference, 2011.9.3, Hong Kong Convention and Exhibition Centre (Hong Kong, China).

③ Tamai T, Uto H, Takami Y, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of serum MnSOD levels in patients with hepatitis C virus (HCV)-related chronic liver disease. The 7th APASL Single Topic Conference "Hepatitis C Virus", 2010.12.18, Makuhari Messe (Chiba, Japan).

④ 高見陽一郎、宇都浩文、佐藤悠子、熊谷公太郎、呉建、玉井努、森内昭博、嵯山敏男、桶谷真、井戸章雄、坪内博仁 誘導型多能性幹細胞 (iPS 細胞) は肝細胞への分化過程で脂肪化した肝細胞様細胞を生じる 第 42 回日本臨床分子形態学会・学術集会、2010 年 9 月 25 日、東レ総合研修センター (静岡)

⑤ 佐藤悠子、宇都浩文、高見陽一郎、佐々木文郷、熊谷公太郎、最勝寺晶子、小田耕平、呉建、馬渡誠一、玉井努、森内昭博、桶谷真、井戸章雄、中島知明、岡上武、坪内博仁 ALT が正常を維持する C 型肝炎ウイルス持続感染者の血清プロテオミクス 日本プロテオーム学会 2010 年会、2010 年 7 月 26 日、東京ベイホテル東急 (東京)

⑥ 佐々木文郷、井戸章雄、高見陽一郎、熊谷公太郎、岩下祐司、指宿和成、隈元亮、上村修司、嵯山敏男、宇都浩文、桶谷真、坪内博仁 腸管マクロファージに発現するオステオアクチビンは腸炎を軽減する 第 47 回日本消化器免疫学会総会、2010 年 7 月 8 日、大津プリンスホテル (滋賀)

⑦ 高見陽一郎、宇都浩文、玉井努、最勝寺晶子、橋口正史、熊谷公太郎、呉建、馬渡誠一、森内昭博、桶谷真、井戸章雄、佐藤悠子、中

島知明、岡上武、坪内博仁 血清 MnSOD は非アルコール性脂肪肝炎と HCV 関連慢性肝疾患のバイオマーカーである 第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 27 日、ホテルメトロポリタン山形 (山形)

⑧ Nasu Y, Ido A, Tanoue S, Hashimoto S, Sasaki F, Takami Y, Kanmura S, Setoyama H, Funakawa K, Moriuchi A, Sakiyama T, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H Hepatocyte growth factor stimulates the migration of gastric epithelial cells by altering the intracellular localization of the tight junction protein ZO-1 Digestive Disease Week (DDW) 2010, 2010.5.1, New Orleans Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA).

⑨ 佐々木文郷、井戸章雄、高見陽一郎、熊谷公太郎、上村修司、森内昭博、嵯山敏男、宇都浩文、桶谷真、坪内博仁 炎症性腸疾患における炎症のフィードバック調節因子 osteoactivin の役割の解明、第 96 回日本消化器病学会総会、2010 年 4 月 22 日、朱鷺メッセ (新潟)

⑩ Takami Y, Uto H, Tamai T, Satoh Y, Moriuchi A, Funakawa K, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H The serum levels of manganese superoxide dismutase (MnSOD) are elevated in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 60th The Liver Meeting 2009, 2009.11.2, Hynes Convention Center (Boston, USA).

⑪ 高見陽一郎、宇都浩文、玉井努、佐藤悠子、熊谷公太郎、呉建、馬渡誠一、森内昭博、長谷川将、桶谷真、井戸章雄、中島知明、岡上武、坪内博仁 血清 MnSOD 濃度の非アルコ

ール性脂肪性肝疾患における臨床的有用性の検討 第 17 回日本消化器関連学会週間、2009 年 10 月 15 日、京都国際会館（京都）

⑫ 高見陽一郎、宇都浩文、竹下正彦、甲斐久博、赤松絵奈、森内昭博、長谷川将、桶谷真、井戸章雄、片岡寛章、坪内博仁  
Proanthocyanidin は platelet-derived growth factor による肝星細胞の活性化を抑制する 第 45 回日本肝臓学会総会、2009 年 6 月 5 日、神戸ポートピアホテル（神戸）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

①名称：非アルコール性脂肪性肝炎を推定するための検出方法

発明者：坪内博仁、宇都浩文、岡上武、高見陽一郎

権利者：財団法人宮崎県産業支援財団、国立大学法人鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2009-131853

出願年月日：平成 21 年 6 月 1 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

①名称：肝線維化抑制剤

発明者：高見陽一郎、坪内博仁、宇都浩文、片岡寛章、竹下正彦

権利者：財団法人宮崎県産業支援財団、国立大学法人鹿児島大学、国立大学法人宮崎大学、南日本酪農協同株式会社

種類：特許

番号：特許第 4 8 2 2 2 9 1 号

取得年月日：平成 23 年 9 月 16 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高見 陽一郎 (TAKAMI YOICHIRO)

熊本大学・発生医学研究所・厚労科学研究員 B

研究者番号：10500473

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：