

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：82515

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591002

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた肝不全に対する移植療法の開発

研究課題名(英文) Development of transplantation of hepatocytes produced from iPS cells to liver failure

研究代表者

富澤 稔 (TOMIZAWA, Minoru)

独立行政法人国立病院機構下志津病院(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：90334193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Activin Aを主体とするiPS細胞のfeeder-free培地を開発した。肝細胞に特異的な転写因子C/EBP alpha, GATA4, HEX, FoxA2をiPS細胞に導入して培地にOncostatin M, EGF, RAを導入すると肝芽細胞に分化することを見いだした。ブドウ糖、アルギニンを除きガラクトース、オルニチンを添加した培地をiPS細胞とヒト初代培養肝細胞の共培養に添加すると、3日でiPS細胞が死滅し肝細胞のみを選択することが可能な培地(hepatocyte selection medium)を開発した。

研究成果の概要(英文)：A medium with Activin A was developed for feeder-free culture of iPS cells. iPS cells differentiated to hepatoblasts from iPS cells transfected with C/EBP alpha, GATA4, HEX, and FoxA2 in a medium with Oncostatin M, EGF, and RA. Hepatocyte selection medium was developed without glucose or arginine, supplemented with galactose and ornithine. When HSM was added to co-culture of iPS cells and human primary hepatocytes, iPS cells died and hepatocytes survived. Hepatocytes were successfully purified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：iPS cells 肝細胞 転写因子 増殖因子 糖新生 尿素サイクル

1. 研究開始当初の背景

- 肝不全は機能する肝細胞が極度に減少する致命的な病態である。iPS 細胞は多彩な細胞に分化する能力を有する。iPS 細胞から肝細胞を製造して肝不全症例に移植することができれば、根本的な治療法になる。
- iPS 細胞は通常マウス線維芽細胞をフィーダー細胞として培養する。しかし移植するには異種タンパクへの曝露は好ましくない。そこで無フィーダー培地を開発する必要がある。
- iPS 細胞から肝細胞を分化誘導した場合、iPS 細胞が残存した状態で移植すると発癌の危険がある。したがって残存する iPS 細胞を消去する方法を開発する必要がある。
- ブドウ糖、アルギニンは細胞の生存に必須なので両者を培地から除くと細胞は死滅する。しかし肝細胞は糖新生、尿素サイクルに関連する一連の酵素群が発現しているのでガラクトース、オルニチンを添加すると生存することが期待される。

2. 研究の目的

iPS 細胞の無フィーダー培地を開発する。iPS 細胞から肝細胞を製造する方法を開発する。iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導する方法を開発する。iPS 細胞と初代培養肝細胞の共培養から iPS 細胞を死滅させ肝細胞のみを選択する培地を開発する。

3. 研究の方法

- マウス embryonic stem cells は Activin A にて内胚葉へ分化する。そこで iPS 細胞に Activin A を添加したところ、未分化能を維持することを偶然見いだした。そこで Activin A に small molecules を添加して iPS 細胞を継代培養し、未分化能を解析した。
- 肝細胞に特異的な転写因子 C/EBP alpha, GATA4, HEX, FoxA2 を iPS 細胞に導入した。培地に種々の増殖因子を添加して培養し7日後 RNA を抽出して肝細胞に特異的な遺伝子の発現を解析した。
- PS 細胞から肝細胞への分化誘導は現状では困難なので肝細胞のモデルとして初代培養肝細胞と iPS 細胞の共培養にブドウ糖とアルギニンを除き、ガラクトースとオルニチンを添加した培地 (hepatocyte selection medium, HSM) で培養した。

4. 研究成果

- Activin A, CHIR99021 を添加すると 12 passage まで継代が可能であり、未分化能を維持することが確認された。iPS 細胞の無フィーダー培地が開発された。
- iPS 細胞に C/EBP alpha, GATA4, HEX,

FoxA2 を導入し、培地に Oncostatin M, epidermal growth factor, retinoic acid を添加すると肝芽細胞に分化することが確認された。

- iPS 細胞と初代培養肝細胞の共培養に HSM を添加すると3日で iPS 細胞は死滅し肝細胞が生存することを確認した。

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)

- Tomizawa, M., Shinozaki, F., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Sueishi, M., and Yoshida, T. (2011) Activin A maintains pluripotency markers and proliferative potential of human induced pluripotent stem cells. *Exp Therap Med* 2, 405-408.
- Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2012) Single-step protocol for the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatic progenitor-like cells. *Biomed Rep* 1, 18-22.
- Tomizawa M., Shinozaki F., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M., Yoshida T. (2012) Insulin-like growth factor I receptor involvement in proliferation of NOR-P1 cells in serum-free media. *J Cell Biochem* 113, 2714-2720.
- Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2013) Activin A is essential for feeder-free culture of human induced pluripotent stem cells. *J Cell Biochem* 114, 584-588.
- Tomizawa M., Shinozaki F., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M., Yoshida T. (2012) Plasmid DNA introduced into cultured cells with diagnostic ultrasound. *Oncology Rep* 27, 1360-1364.
- Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2013) Survival of primary human hepatocytes and death of induced pluripotent stem cells in media lacking glucose and arginine. *PLoS ONE* 8, e71897.
- Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2013) Niclosamide suppresses hepatoma cell proliferation via the Wnt pathway. *OncoTargets and Therapy* 6, 1685-1693.

- Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2014) Frizzled-2: A potential novel target for molecular pancreatic cancer therapy. *Oncology Lett* 7, 74-78.

〔学会発表〕(計 9件)

- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2011) 肝細胞分化を目指したヒト iPS 細胞に対する増殖因子の分化誘導能の検討. 第15回日本肝臓学会大会
- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2012) iPS 細胞から肝細胞分化を目指した転写因子の解析 第98回日本消化器病学会総会
- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2012) Activin A を主体とするヒト iPS 細胞の無フィーダー培地の開発. 第11回日本再生医学会総会
- Tomizawa, M., Shinozaki, F., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Sueishi, M., Yoshida, T. Induced pluripotent stem cells maintained pluripotency markers with Activin A in feeder free culture. 10th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research (ISSCR)
- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2012) ヒト iPS 細胞において Sox17 の発現を亢進させる増殖因子の検討 第16回日本肝臓学会大会
- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2013) iPS 細胞が死滅し肝細胞が生存する培地の開発 第12回日本再生医療学会総会
- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2013) iPS 細胞が死滅し肝細胞が生存する培地の開発 第49回日本肝臓学会総会
- 富澤稔、篠崎文信、杉山隆夫、山本重則、末石眞、吉田孝宣 (2013) iPS 細胞が死滅し肝細胞が生存する培地 第17回日本肝臓学会大会
- 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、末石眞 (2014) iPS 細胞が死滅し初代培養肝細胞が生存する培地 第13回日本再生医療学会総会

〔図書〕(計 1件)

- Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2013) Induced pluripotent stem cells as a source of hepatocytes. In: *Pluripotent stem cells*, ed.

Deepa Bhartiya and Nibedita Lenka, Rijeka, Croatia, InTech, 517-528.

〔産業財産権〕
出願状況(計 3件)

1. 名称: ヒト多能性幹細胞から肝前駆細胞への分化誘導方法

発明者: 富澤稔
権利者: 千葉大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-080708
出願年月日: 平成 24 年 3 月 30 日
国内外の別: 国内

2. 名称: Composition for culturing pluripotent stem cells and use thereof.

発明者: 富澤稔
権利者: 千葉大学
種類: 特許
番号: US patent 13/331311
出願年月日: 平成 24 年 6 月 28 日
国内外の別: 国際

3. 名称: 人工多能性幹細胞から分化した肝細胞を含む細胞群から、肝細胞からなる細胞培養物を得る方法

発明者: 富澤稔
権利者: 千葉大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-286978
出願年月日: 平成 24 年 12 月 28 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称: 胚性幹細胞から肝芽細胞を得る方法

発明者: 富澤稔
権利者: 千葉大学
種類: 特許
番号: 特許第 5257971
取得年月日: 平成 25 年 5 月 2 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 稔 (TOMIZAWA, Minoru)

独立行政法人国立病院機構下志津病院・臨床研究部・室員

研究者番号: 90334193

研究者番号:

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

大平 美紀 (OHIRA, Miki)
千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセ
ンター・がんゲノム研究室・室長
研究者番号：20311384