

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670373

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝幹細胞の自己複製を制御する内在性および外来性miRNAの解析

研究課題名(英文) Analyses of intrinsic and extrinsic miRNA regulating proliferation of human iPS cell-derived hepatoblasts.

研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：30321904

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)：ヒトiPS細胞は多能性と高増殖性を持ち再生医療の重要なソースである。我々はヒトiPS細胞から肝前駆細胞の誘導・培養系を構築している。そこで、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の長期培養における性状解析を行った。その結果、この細胞に強く発現する細胞表面抗原を複数同定した。例えば、CD221(IGF1 receptor)はヒトiPS細胞由来肝前駆細胞に強く発現する一方で、そのリガンドであるIGFは肝前駆細胞の増殖を支持するフィーダー細胞に発現することを見出した。以上の結果から、フィーダー細胞とヒトiPS細胞由来肝前駆細胞との間にパラクライン的相互作用による増殖制御機構が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human iPS cells can be differentiated into hepatocytic cells by the serial cytokine stimulation. We previously found that hepatic progenitor-like cells (HPCs) were enriched in the CD13+CD133+ cell fraction of iPS-differentiated cells. In this study, we focused on the cell surface molecules and analyzed the characteristics of human iPS cell-derived HPCs. CD221 (IGF1 receptor) was down-regulated during the long-term culture. After the replating step, positive and negative cells of these surface markers were cultured. Then, CD221+ cells had high proliferative ability compared with CD221- cells. The proliferative ability of HPCs was suppressed by the neutralizing antibody and specific inhibitor of CD221. In addition, IGF-1 and IGF-2 were produced by mouse embryonic fibroblast, which are used as feeder cells in our culture system. Now, we analyze expression of miRNA regulating hepatoblast proliferation and differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：幹細胞 iPS細胞 肝臓 miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体のホメオスタシスを司る重要器官であり、肝炎ウイルス感染・アルコール過剰摂取などによる慢性肝炎は、肝硬変・肝癌などの末期肝疾患の原因となる。その根治療法として肝臓移植が用いられるが、ドナー不足（脳死移植）やドナーへの侵襲性（生体移植）という問題があり、幹細胞を用いた細胞移植療法が次世代の治療として期待されている。そのために、生体臓器由来または多能性幹細胞由来の未分化肝幹・前駆細胞を *in vitro* で効率的に増殖した後に成熟肝細胞へと分化誘導する系を開発する必要がある。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞分化系を用いて *in vitro* での肝幹・前駆細胞の未分化性維持・増幅の分子メカニズムの解明を目的とする。

胎生肝臓からの肝幹・前駆細胞の表面抗原マーカーの探索や増殖・分化を制御する転写因子の解析（Kamiya et al., *Hepatology* 2008, Oikawa, Kamiya et al., *Gastroenterology* 2009 など）および成体肝臓からの肝幹・前駆細胞の純化・培養法の確立（Kamiya et al., *Gastroenterology* 2009）といった肝幹・前駆細胞の性状解析を行ってきた。最近、生体内の肝臓系細胞と間葉系細胞の相互作用を模倣するために、純化した CD13 陽性肝幹・前駆細胞とマウス胎仔線維芽細胞（MEF）との共培養系を新たに開発した。その結果、肝発生の初期から中期の肝幹・前駆細胞の増殖が、MEF との相互作用により強く誘導することを見出した（Okada, Kamiya et al., *Stem Cell Dev.* 2012）。以上のマウスを用いた肝幹・前駆細胞の性状解析の成果を元に、ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞株の樹立・培養系の構築に成功している。

幹細胞では最終分化細胞と異なる miRNA が発現・機能し、幹細胞の機能（Stemness）の維持を行うと考えられている。そこで本研究では、ヒト肝幹・前駆細胞に発現する内在性 miRNA およびフィーダー細胞から細胞間接着やエキソソームを介して伝達される外来性 miRNA を同定する。それらの miRNA を用いてヒト肝幹・前駆細胞の未分化性維持機構の解明を行う。miRNA は、癌化・細胞分化・増殖などの様々な細胞の機能に関与することが知られているが、マウスとヒトではその数が異なり（現在マウスで 1281、ヒトで 2042 個が同定済、miRBase より）特に最近ではヒトに特異的な新規 miRNA が多数発見されている。将来の再生医療への応用を考えた際には、肝幹・前駆細胞における miRNA の制御機構をヒト細胞を用いて解析することが必須である。本研究計画では、申請者らが新規に樹立したこのヒト iPS 細胞分化誘導系を用いることで、細胞ソースの面で研究が困難であっ

たヒト肝幹・前駆細胞を用いた機能解析を可能にするもので、マウス等の実験では得られなかったヒト特異的 miRNA と肝幹・前駆細胞の未分化性維持に関する新しい知見を得られることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト肝幹・前駆細胞の未分化性維持を制御する重要な機構として miRNA に注目し研究を行う。ヒト肝幹・前駆細胞の *in vitro* 増幅には、サイトカインの添加に加えて間葉系フィーダー細胞との相互作用が重要なことを見出している。そこで、以下の内在性および外来性 miRNA に注目し研究を行う。

### (1) ヒト肝幹・前駆細胞特異的 miRNA の探索

肝幹・前駆細胞では終末分化した機能細胞と異なる miRNA が発現し幹細胞の機能（Stemness）の維持に重要なことが知られている。そこで、網羅的発現解析によってヒト肝幹・前駆細胞特異的 miRNA を明らかし、得られた特異的 miRNA の機能解析を行う。

### (2) ヒト肝幹・前駆細胞ニッチから供給される miRNA の同定

miRNA は細胞間接着やエキソソームを通じて細胞間の情報伝達に使用されることが知られている。そこで、ヒト肝幹・前駆細胞の効率的な増殖に必要なフィーダー細胞を解析し、ヒト肝前駆細胞の増殖等を制御する外来性 miRNA の探索を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト肝幹・前駆細胞の未分化性を維持する機構の解明のために、内在性・外来性それぞれの miRNA に注目した以下の研究を遂行する。

### (1) ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞の増殖・分化を制御する内在性 miRNA の網羅的探索

ヒト iPS 細胞から肝幹・前駆細胞を誘導・培養し、マイクロアレイを用いた miRNA 発現解析を行う。

### (2) ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞の増殖・分化を支持するフィーダー細胞特異的な miRNA 探索

様々なフィーダー細胞とヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞との共培養系を構築する。各フィーダー細胞で発現する miRNA プロファイルを比較し、ヒト肝幹・前駆細胞の未分化維持に重要な因子を特定する。

### (3) miRNA の強制発現・ノックダウンによるヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞の増殖・分化制御

1, 2 で得られた知見を元に、候補 miRNA の強制発現等を行い、肝幹・前駆細胞での機能を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の長期培養系における性状解析

ヒト iPS 細胞をサイトカイン連続的に添加し肝臓系細胞へと誘導した後にフローサイトメーターを用いてソーティングすることで、ヒト iPS 細胞(hiPS)より分化誘導した CD13(aminopeptidase N)と CD133(Prominin 1)両陽性細胞集団に、高増殖性と肝細胞・胆管系細胞への2方向分化能(bipotency)をもつ肝前駆細胞様細胞が濃縮されていることを以前報告している。しかし、CD13+CD133+画分の細胞の全てが一様に肝前駆細胞としての性質をもつのかは未だ不明である。そこで、hiPS 由来 CD13+CD133+細胞の分化・培養過程における細胞表面マーカーの変化の網羅的解析を行うことで、その性状を明らかにすることを目的とした。

hiPS 細胞をサイトカイン添加によって肝細胞系と分化誘導し、CD13+CD133+細胞画分を116種類の表面抗原抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、CD13+CD133+細胞画分の一部のみ(40-85%が陽性)に発現する細胞表面抗原として、18種類を認めた。しかし、これらの表面抗原の発現の有無による増殖性の差はほとんど観察されなかったことから、CD13+CD133+画分の細胞が一様に肝前駆細胞として同程度の増殖性を持つことが示唆された。

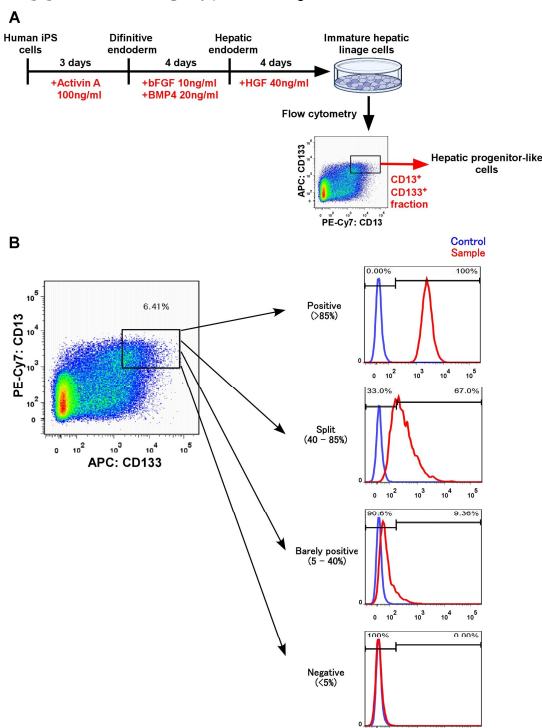


図1 ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の表面抗原の網羅的解析

また、CD13+CD133+細胞画分のほとんどに発現する細胞表面分子として、20種類を同定

した。興味深いことに、CD13+CD133+細胞の継代培養過程で、20種類の分子の中で CD221(IGF-1R)と CD325(N-CAM)の発現が低下することが分かった。継代後の CD13+CD133+細胞において、CD221陽性細胞は陰性細胞に比べ有意にコロニー形成能が高く、CD221の発現を維持できる細胞が前駆細胞としての性質をより保持している。さらに CD221 に対する中和抗体や特異的阻害剤の添加で増殖抑制がみられ、IGF-1Rを介したシグナルが肝前駆細胞の機能維持に重要であることが示唆された。また、CD221はヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞に強く発現する一方で、そのリグンドである IGF は肝前駆細胞の増殖を支持するフィーダー細胞に発現することを見出した。以上の結果から、フィーダー細胞とヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞との間にパラクライン的相互作用による増殖制御機構が存在することを明らかにした。

##### (2) 肝前駆細胞分化における miRNA の機能解析

肝前駆細胞は、生体内では発生中期から後期にかけて肝細胞および胆管細胞へと分化することが知られている。申請者らの研究によって、この過程にオンコスタチン M などのサイトカインが関係することが知られる一方で、肝機能を制御する miRNA については未だ不明な点も多い。

肝前駆細胞と成熟肝細胞間での網羅的発現解析の結果から、転写因子 Bcl6 が肝機能の誘導に関係することを見出している。近年、Bcl6 が miRNA の発現調節に関わることが免疫系細胞等の研究から明らかになっている。そこで、Bcl6 を強制発現した肝前駆細胞や Bcl6 ノックアウトマウス由来の肝臓から RNA を抽出し、miRNA の網羅的発現解析をマイクロアレイを用いて行った。その結果、Bcl6 によって制御される miRNA の候補を複数同定している。今後これらの miRNA が肝前駆細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるか検討する。

#### 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2件)

(1) Tsuruya K, Chikada H, Ida K, Anzai K, Kagawa Y, Inagaki Y, Mine T, and Kamiya A\*, A paracrine mechanism accelerating expansion of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells. *Stem Cell Dev.*, 2015, in press (\*Corresponding Author). 査読有

<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014>

.0479

(2) Ito K, Yamazaki S, Yamamoto R, Tajima Y, Yanagida A, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Kakuta S, Iwakura Y, Nakauchi H, Kamiya A\*, Gene Targeting Study Reveals Unexpected Expression of Brain expressed X-linked 2 in Endocrine and Tissue Stem/progenitor Cells in Mice **J Biol Chem.** 2289, 29892-911, 2014 (\*Corresponding Author) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.580084

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 近田裕美、伊藤慶一、柳田絢加、中内啓光、紙谷聡英  
「bHLH 型転写因子による胎生肝幹・前駆細胞の分化誘導」  
第 14 回日本再生医療学会  
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜) 2014 年 3 月 19-21 日

(2) 紙谷聡英

「Establishment of culture system for hepatic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells」  
第 87 回日本組織培養学会(シンポジウム講演)  
如月会館(東京都・千代田区) 2014 年 5 月 29-30 日

(3) 近田裕美、坂本明美、徳久剛史、紙谷聡英  
「肝臓における薬物代謝の性差を制御する分子メカニズム」  
第 13 回日本再生医療学会  
京都国際会館(京都府・京都) 2014 年 3 月 4-6 日

(4) 紙谷聡英、近田裕美、鶴谷康太、柳田絢加、中内啓光  
「ヒト多能性幹細胞からの in vitro 胆管組織誘導系の構築」  
第 13 回日本再生医療学会  
京都国際会館(京都府・京都) 2014 年 3 月 4-6 日

(5) 柳田 絢加、伊藤 慶一、近田裕美、中内啓光、紙谷聡英  
「In vitro generation and expansion of bi-potent hepatic progenitor-like cells from human iPS cells.」  
第 20 回 肝細胞研究会  
大阪国際会議場(大阪府・大阪) 2013 年 9 月 26-27 日

(6) 伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光、紙谷聡英  
「Mesenchymal progenitor cells in mouse fetal liver regulate differentiation and proliferation of

hepatoblasts.」  
第 20 回 肝細胞研究会  
大阪国際会議場(大阪府・大阪) 2013 年 9 月 26-27 日

(7) 紙谷聡英、中内啓光  
「ヒト多能性幹細胞からの二方向性分化能を有する肝前駆細胞の誘導」  
第 49 回日本肝臓学会総会  
京王プラザホテル(東京都・新宿区) 2013 年 6 月 6-7 日

〔図書〕(計 1 件)

(1) Yanagida A, Nakauchi H, Kamiya A. Generation and In Vitro Expansion of Hepatic Progenitor Cells from Human iPS Cells. In Methods Mol Biol. "iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation –Methods and Protocols" (edited by Andras Nagy) 2015 in press.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)  
東海大学・創造科学技術研究機構・准教授  
研究者番号: 30321904