

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893201

研究課題名(和文) 低分子化合物スクリーニングによるヒトiPS細胞由来肝細胞の成熟化機構の解明

研究課題名(英文) Identification of hepatic maturation mechanisms of human iPS cells by using chemical screening

研究代表者

山添 太士 (Yamazoe, Taiji)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：20736219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：二つの分化マーカーを指標にしたハイスループットスクリーニングによる本研究により、これまで不明であった肝細胞の成熟化メカニズムを解明する糸口となる候補化合物を特定した。候補化合物の作用点を今後解明することで、さらなる肝細胞成熟化メカニズムを解明することが可能であると考えられる。本化合物はすでに他の疾患で臨床応用されているため、毒性試験の点からは再生医療に利用できるヒトiPS由来肝細胞の創出に活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The chemical screening were carried out for the identification of candidate drug that potentiates hepatic maturation of human iPS derived cells. We obtained the candidate reagent that increases mature hepatocyte marker, Albumin positive cells and decreases immature hepatocyte marker, AFP positive cells. This candidate drug will give us the new aspects of hepatic maturation mechanisms, based on the knowledge of its molecular targets and their down stream molecules. This candidate drug is available in clinic, so that it might be possible to utilize this candidate drug for inducing a maturation of human iPS derived hepatocytes without toxic effects of drugs.

研究分野：多能性幹細胞学

キーワード：iPS細胞由来肝細胞 肝細胞成熟化 ケミカルスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

多くの先行研究により、ヒト ES および iPS 細胞から胚体内胚葉を経て初期の肝細胞マーカーであるアルファフェトプロテイン (alphafetoprotein, AFP) 陽性の肝芽細胞を誘導できることが示されている。加えて、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) やオンコスタチン M (Oncostatin M, OsM) により肝成熟化マーカーであるアルブミン (Albumin, ALB) 陽性細胞への分化を促進させることができる。しかしながら、これらの方法で得られた細胞は ALB 陽性である一方で AFP 陽性である。成熟化した肝細胞は AFP 単独陽性、ALB/AFP 両陽性、ALB 単陽性へと分化過程を経るため、AFP はより幼若な肝分化マーカーと考えられる。よって AFP 陽性の肝細胞はその成熟度としてはまだ不十分と言える。

2. 研究の目的

現在のところ、成熟化を進めるための分化メカニズムは不明のまま、培養期間を延長するという自然誘導的方法以外に肝分化誘導法はない。そこで、本研究では私が開発したヒト ES/iPS 細胞の肝細胞分化誘導系をモデルとして、ケミカルバイオロジーの手法を用いた、分化を制御する薬剤スクリーニングにより肝細胞成熟化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は、これまでにヒト ES/iPS 細胞を用いた内胚葉臓器、特に肝細胞および膵細胞分化誘導研究を行ってきた(白木ら PLoS One, 2011; 梅田ら Stem Cell Res., 2013; 山添ら J Cell Sci., 2013; 磯野ら Stem Cell Res., 2014)。また、膵細胞分化誘導にも利用し、

1000 を超える小分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング系を構築している(坂野ら Nature Chem Biol., 2013)。

(1) これらの方法を併せて、肝細胞成熟化を促す薬剤を同定するために、申請者はこのライブラリーを用いてスクリーニングを行った。評価基準として、幼若な分化ステージマーカーである AFP と成熟なマーカーである ALB を用いて共免疫染色を行い、AFP 陰性・ALB 単独陽性細胞を増やす低分子化合物を候補化合物とした。

(2) 得られた化合物を用いた誘導した肝細胞の機能評価を薬物取り込み能試験としてインドシアニンググリーン(ICG)テストならびに薬物代謝活性を測定した。

(3) 得られた化合物の作用を確認するために、肝成熟化に必要とされる細胞内シグナルの活性化を確認した。

(4) 得られた化合物の作用機序をもとに、成熟化機構に關与するシグナル経路を明らかにし、関連分子の機能阻害を薬物あるいは遺伝子ノックダウンにより責任分子を特定した。

4. 研究成果

(1) パイロットスクリーニングにより 10 μ g/ml の濃度でのケミカルライブラリーの使用では細胞毒性が強く出る傾向にあったため、1 μ g/ml の濃度にて1次スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、有意に ALB 単独陽性率が変化した化合物で、AFP 単独陽性細胞数を減少させる化合物に注目し、候補化合物として特定した。

(2) 次に、候補化合物の濃度依存性を調べる

ために 0 μM および 10nM, 100nM, 1mM, 10mM, 100mM を 48 時間作用させたところ 100mM の濃度では薬物毒性が生じた。100nM を最も効果が高く、ALB 単独陽性率が 1.73 倍上昇し、AFP 単独陽性率が 0.62 倍と減少した。この濃度を中心として、候補化合物の効果は釣り鐘型を呈した。

また、ICG テストとして、30 分間インドシアニングリーン色素を含む培地で培養し、細胞内に取り込んだ細胞の色素陽性面積率を比較したところ、候補化合物による誘導にて 1.8 倍細胞面積が増大した。シトクローム p450 (CYP) 3A4 活性についてルシフェラーゼ活性を利用した方法で測定した場合 1.4 倍ほど活性が上昇した。以上より、候補化合物は ALB および AFP 染色のみならず、肝機能を上昇させることがわかった。

(3) ヒト iPS 細胞株で候補化合物を探索したため、ヒト ES 細胞でも同様の効果があるか確認した。ヒト iPS 細胞株と同様に候補化合物の濃度依存性を調べるために 0M および 10nM, 100nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM を 48 時間作用させたところ 100 μM の濃度では薬物毒性が生じた。薬物毒性はヒト iPS 細胞および ES 細胞では同一濃度で出現したが、至適濃度は 10 μM と、ヒト iPS 細胞よりも高濃度であった。このため、候補化合物の効果は共通するものの、至適濃度は細胞株間で違う可能性があった。

また、ヒトと比較するためにマウス胎仔 14.5 日胚の肝臓を用いた初代肝細胞培養にて候補化合物の濃度依存性を調べたところ、ヒト ES/iPS 細胞と同様に 100 μM で細胞毒性が出現した。至適濃度は 10 μM と、ヒト ES 細胞と同じであった。このため、候補化合物に関連する肝細胞成熟化機構はヒトおよびマウスで共通している可能性が示唆された。

マウスにおいて、0sM による細胞成熟化は STAT3 および Erk のリン酸化によってなされ

ているとの報告があるため、ヒト ES 細胞を用いて STAT3 および Erk のリン酸化を候補化合物の添加の有無で比較するために Western blot を行った。候補化合物添加後 6 時間で STAT3 のリン酸化が認められ、この効果は 24 時間後でも持続していた。一方で Erk のリン酸化は 6 時間後でははっきりしないものの、24 時間後には候補化合物の添加の有無に関わらず上昇していた。最終培地には EGF が含まれているため、EGF を介した Erk のリン酸化により候補化合物単独の効果がマスクされている可能性がある。

(4) 候補化合物は生理活性物質を上昇させ、その受容体の結合を促進する。このため、責任受容体を調べるために肝細胞に発現する主要な受容体群に関する選択的受容体阻害剤をそれぞれ使用し、候補化合物の効果が減弱されるかを調べた。その結果、ある責任受容体阻害剤を用いた時のみ候補化合物の効果が減弱することから、候補化合物は生理活性物質を増加させ、その責任受容体への結合を介して肝細胞を成熟化していることが示唆された。

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 1 件)

Yamazoe T., Shiraki N., Kume S. Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, Methods Mol Biol. 2014 epub ahead 査読なし
DOI:10.1007/7651_2014_138

[学会発表] (計 1 件)

山添太士、佐々木裕、薬剤スクリーニングによるヒト誘導多能性幹細胞の肝成熟化メカ

ニズムの解明、第 51 回肝臓学会、2015 年 5 月 21 日～22 日、熊本

〔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:

出願年月日:

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

山添 太士 (YAMAZOE, Taiji)

熊本大学. 発生医学研究所. 特定事業研究員

研究者番号: 20736219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

桑 昭苑 (KUME, Shoen)

熊本大学. 発生医学研究所. 教授

研究者番号: 70347011

白木 伸明 (SHIRAKI, Nobuaki)

熊本大学. 発生医学研究所. 準教授

研究者番号: 70448520

佐々木 裕 (SASAKI, Yutaka)

熊本大学. 大学院生命科学研究部. 教授

研究者番号: 70235282