

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590748

研究課題名（和文） ES 細胞の肝不全への移植療法の開発を目指した肝細胞分化の研究

研究課題名（英文） Hepatocyte differentiation aiming at transplantation of ES cells for hepatic insufficiency

研究代表者

氏名（ローマ字）：富澤 稔（TOMIZAWA MINORU）

所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90334193

研究成果の概要：

肝不全への移植療法への応用を目指し、胚性幹(ES)細胞より肝細胞を分化・製造する方法を研究した。ブドウ糖は細胞の生存に必須である。ガラクトースは肝細胞のみがエネルギーに変換し、生存可能である。そこでブドウ糖を除き、ガラクトースを添加した培地で ES 細胞を培養したところ、肝芽細胞への分化が促進され、肝芽細胞が高率に収穫されることを明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：肝細胞分化、シグナル伝達、発生、再生医学

## 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。Embryonic stem (ES) 細胞は、無限の増殖能と、多彩な細胞に分化する能力を有するので、肝細胞を製造し、移植することが可能になれば、肝不全に対する根本的な治療法になりうる。

増殖因子を培地に ES 細胞から肝細胞を作る方法が試みられている。しかし、一部の細胞に肝細胞に特異的な遺伝子の発現が検出されるのみで、他の大多数の細胞は肝細胞ではない。

肝細胞を分離する方法は、肝細胞に特異的に発現するアルブミンのプロモーターに

green fluorescent protein (GFP) を連結し、フローサイトメーターにて分離する方法が報告されている。しかし、遺伝子が改変された細胞を移植することは倫理的に不可能である。

そこで、ES 細胞から分化した肝細胞を分離する方法の開発が急務である。

肝細胞は、アミノ酸代謝、糖新生等に関与する一連の遺伝子群を発現している。したがって、これらアミノ酸とブドウ糖を培地より除き、基質を添加すれば、肝細胞のみが生存し、他の細胞は死滅するので、肝細胞のみを分離することが可能と期待される。

我々は予備実験にて、L-アルギニンを除き、

オルニチンを添加した培地にて ES 細胞から分化した細胞を培養したが、対照と比して細胞数は三分の一に減少したが、対照と同様に腺管構造を有する細胞群が大多数を占め、形態学的に変化のないことが判明した。

肝細胞は、ガラクトキナーゼが発現し、ガラクトースより糖新生を介してエネルギーを産生することが可能である。

ES 細胞を多分化能を保持しつつ培養するには、ピルビン酸が必須である。ピルビン酸は糖新生より産生され、TCA サイクルの基質となるので、ピルビン酸を培地より除くと、細胞の生存に必要なエネルギーは糖新生を介して産生されるので、糖新生が生じない細胞は死滅することが期待される。

チロシンは必須アミノ酸で、フェニルアラニンを基質としてフェニルアラニン・ヒドロキシラーゼが産生する。フェニルアラニン・ヒドロキシラーゼは肝細胞に特異的に発現しているため、チロシンを除き、フェニルアラニン・ヒドロキシラーゼを添加した培地にて培養すると、ES 細胞より分化した肝細胞のみが生存可能と考えられた。

したがって、ブドウ糖、L-アルギニン、チロシン、ピルビン酸を除き、ガラクトース、オルニチン、フェニルアラニンを添加した培地で培養すると、ES 細胞から分化した肝細胞を分離することが可能になることが期待された。

肝芽腫は、胎生期の未分化な肝細胞である肝芽細胞の分化が停止して癌化する。ヒト肝芽細胞の使用は、採取も含めて倫理的に不可能なので、肝芽腫細胞株は、ヒト肝芽細胞の分化を解析する貴重な材料である。我々はこれまでの解析において、IGF-II は、肝芽腫細胞株の分化を促進することを明らかにした。したがって、IGF-II が肝芽腫細胞株の分化を促進する過程を解析すると、肝細胞が分化する分子生物学的メカニズムに迫ることができると考えられる。この知見は、ES 細胞より肝細胞を製造する方法の開発に有用である。

IGF-II は、IGF-I レセプター(IGF-IR)を介して、細胞増殖を亢進させる。我々はこれまで、IGF-II の肝細胞に対する作用を解析するとともに、細胞増殖における作用をも解析してきた。増殖因子の作用の阻害を原理とする肝臓に対する分子標的治療の開発を目指している。これまでの解析において、IGF-IR の特異的な阻害剤である picropodophyllin (PPP)を用いると、肝細胞癌(肝臓)の増殖を抑制可能なことを突きとめた。肝臓の転移過程では、膠原線維よりなる間質へ浸潤・増殖する。したがって、間質へ浸潤した肝細胞の増殖能および運動能を抑制することができれば、肝臓の転移を抑制することが可能になることが期待される。間質は膠原線維より

構成され、血管が少ないので、栄養の供給が不十分である。栄養供給の少ない環境のモデルとして無血清培地が簡潔で、現実的である。しかし従来の肝臓細胞株の研究では、血清を用いたものがほとんどで、無血清培地を用いた研究は皆無である。

## 2. 研究の目的

今回我々は、ES 細胞から分化した肝細胞を分離する方法の開発を目指した。具体的には、ブドウ糖、L-アルギニン、チロシン、ピルビン酸を除き、ガラクトース、オルニチン、フェニルアラニンを添加した培地を用いて、ES 細胞から分化した細胞を培養した。

肝芽腫細胞株を IGF-II で培養し、cDNA マイクロアレイにて、肝芽腫細胞株が分化すると同時に発現の変化する一連の遺伝子群の解析を試みた。

間質に浸潤したモデルとして無血清培地を用い、肝臓の間質浸潤を抑制する方法の開発を試みた。

## 3. 研究の方法

ブドウ糖、L-アルギニン、チロシン、ピルビン酸を除き、これらの基質であるガラクトース、オルニチン、フェニルアラニンを添加した培地を作成した(Hepatocyte selection medium, HSM)。血清にブドウ糖、L-アルギニン、チロシン、ピルビン酸が混入している可能性があるため、透析し、培地に10%添加した。

GMEM に 1000U/l の leukemia inhibitory factor (LIF)、10%仔牛血清を添加した培地にて、1%ゼラチンコーティングした培養皿に ES 細胞を培養した。0.25%トリプシン溶液にて細胞を回収し、GMEM に 10%仔牛血清を添加し、LIF を除いた培地にて、hanging drop 一個あたり 1000 個の ES 細胞を含有する hanging drop method にて培養した。4 日後、embryoid body を培養皿(1%ゼラチンでコーティング)に移すと同時に培地を HSM に変更した。

培養 14 日後、光学顕微鏡にて観察した。肝細胞に特異的に取り込まれる indocyanine green (ICG)を 1mg/ml の濃度にて培地に添加し、光学顕微鏡で観察した。RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、PCR 法にて、肝細胞に特異的な遺伝子の発現を解析した。対照として、LIF を除き、透析しない血清を 10%添加した培地(ESM)にて培養した細胞を用いた。

200ng/ml にて IGF-II を培地に添加し、肝芽腫細胞株を培養し、48 時間後、RNA を抽出した。逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、千葉県がんセンター研究所にてヒト肝芽腫より作成されたマイクロアレイを用いて、発現の変化する遺伝子群を解析した。

肝臓組織の間質は膠原線維より構成され、

血管は極度に少なく、栄養の供給が少ない。そこで我々は、無血清培地を間質の環境のモデルと考え、肝癌細胞株を、無血清培地で培養し、無血性でも増殖する細胞株、すなわち、栄養供給の少ない間質でも生存可能な細胞株を探索した。続いて、この細胞株を無血清培地で培養し、PPP を添加し、MTS アッセイにて細胞増殖能を、wound アッセイにて細胞の運動能を、それぞれ解析した。

#### 4. 研究成果

培地を HSM に変更 11 日後、細胞数は急激に減少し、28 日後にはほぼ全ての細胞が消滅した。HSM に変更 14 日後、コロニーは多角形の均一な細胞より構成され、一部には二核の細胞もみられた。培地に ICG を添加したところ、80%の細胞が ICG を取り込むことが明らかになった。ESM で培養した対照では、数%の細胞に ICG の取込みがみられるのみであった。

培地を HSM に変更 14 日後、RNA を抽出し、RT-PCR にて肝細胞に特異的な遺伝子の発現を解析した。Alpha-feto protein は、HSM、ESM にて培養した細胞に発現がみられた。アルブミンは、ESM にて培養した細胞では発現がみられなかったが、HSM で培養した細胞では発現がみられた。G-6PD、alpha-1 antitrypsin は、ESM で培養した細胞 HSM で培養した細胞、ともに発現がみられなかった。

以上より、我々の開発した HSM を用いると、ES 細胞から分化した肝芽細胞様の細胞を分離することが可能になることが判明した。興味深いことに、HSM で培養すると、ESM に比して、肝細胞への分化が促進されることも明らかになった。

今後、HSM を用いるとともに、肝細胞の分化に関与する増殖因子の添加、または転写因子導入、により、肝芽細胞より肝細胞へ高率に分化させる方法の開発を試みる方針である。

IGF-II を添加して培養した肝芽腫細胞株より抽出された RNA を用いた cDNA マイクロアレイは、現在解析中である。

肝癌細胞株 (HLE, HLF, PLC/PRF/5, Huh-7, Hep3B) では、HLF が無血清培地で増殖することを突きとめた。ウェスタン・ブロット法では、無血清培地で培養した HLF では IGF-IR が発現していることを突きとめた。無血清培地でも、IGF-IR は細胞増殖に関与している可能性が示唆された。そこで無血清培地で培養した HLF を、PPP を添加、72 時間後に MTS アッセイを行ったところ、用量依存性に細胞増殖能が抑制されることを突きとめた。

続いて細胞の移動能を解析するため、4 well chamber に HLF を播種し、滅菌したカミソリ刃で細胞のシートをカットし、培地に PPP を添加した。48 時間後、カットした線よ

り 50  $\mu$ m を超えて移動した細胞数を計測したところ、PPP を添加しない対照と比して用量依存性に 50  $\mu$ m を超えて移動した細胞数は現象することが判明した。

4 well chamber に播種した細胞を HE 染色にて染色し、光学顕微鏡にて観察したところ、PPP を添加した細胞では、細胞の核が pyknotic であり、apoptosis による細胞数の減少が示唆された。PPP を添加しない対照では、核が pyknotic な細胞はみられなかった。

以上の結果より、無血清培地では IGF-IR が細胞の増殖、運動に関与している可能性が示された。今後は、IGF-IR のリン酸化を解析して、無血清培養における IGF-IR の活性の変化を明らかにする予定である。また、phosphatidyl inositol-3 kinase, mitogen activated protein kinase 等、IGF-IR の下流の細胞内刺激伝達系の変化、も解析する予定である。

#### 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. Tomizawa M., (7 名). Hepatoblast-like cells enriched from mouse embryonic stem cells in a medium without glucose, pyruvate, arginine and tyrosine. *Cell Tissue Res.* 2008, 333, 17-27., 有
2. Tomizawa M., (1 名). Picropodophyllin suppresses proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma under serum starvation. *Mol. Med. Rep.* 2008, 1, 685-688., 有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特許権、発明者:富澤稔、権利者:千葉大学、特願 2007-277285、出願年月日:2007 年 10 月 25 日、国内・国外の別:国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 稔 (TOMIZAWA MINORU)、千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号:90334193

(2) 研究分担者

大平 美紀(OHIRA MIKI)、千葉県がんセンター(研究所)・臨床ゲノムセンター・研究員  
研究者番号:20311384

(3)連携研究者

無