

平成 30 年 4 月 29 日現在

機関番号：82515

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09032

研究課題名(和文) iPS細胞から肝細胞の製造を目指した肝細胞分化の解明

研究課題名(英文) Differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatocyte lineage

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)・臨床研究部・その他

研究者番号：90334193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト induced pluripotent stem(iPS)細胞から肝細胞への分化する方法の開発を試みた。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に oncostatin M, アポトーシス阻害剤(M50054)等を添加した培地(hepatocyte differentiation inducer, HDI)を開発した。HDIで培養するとiPS細胞では未分化な肝細胞のマーカーであるalpha-feto protein(AFP)の発現が亢進した。HDIはiPS細胞から肝細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To promote differentiation of human induced pluripotens stem (iPS) cells to hepatocytes, oncostati M, and M50054 were added to a medium without glucose or arginine, and added with galactose and ornithine (hepatocyte differentiation inducer). The expression levels of alpha-feto protein were up-regulated in iPS cells cultured in HDI for 2 days. It was suggested that HDI promoted differentiation of iPS cells to hepatocyte lineage.

研究分野：消化器内科学

キーワード：iPS細胞 肝細胞 ブドウ糖 アルギニン

1. 研究開始当初の背景

肝不全は機能する肝細胞の数が極度に減少する致命的な病態である。薬剤による治療は無効であり、肝移植が行われている。しかし肝移植ではドナー数が絶対的に不足している。機能する肝細胞を移植する治療が実現すれば根本的な治療になりうる。そこで機能する肝細胞を製造する方法の開発が急務である。

ヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞は多彩な細胞に分化する能力と強い増殖能力を有するので iPS 細胞から肝細胞を製造することが可能になれば肝不全に対する肝細胞移植の臨床応用が期待される。しかし iPS 細胞から肝細胞を製造する方法は未だ確立されていない。

iPS 細胞から肝細胞の製造が可能になった場合、iPS 細胞が残存する可能性がある。iPS 細胞から製造した肝細胞と iPS 細胞が混在した状態で移植すると、iPS 細胞から癌が発生する可能性がある。そこで肝細胞と iPS 細胞を分離する必要がある。

ブドウ糖とアルギニンは細胞の生存に必須である。ブドウ糖はガラクトースから糖新生、アルギニンはオルニチンから尿素サイクル、を介して産生される。糖新生と尿素サイクルを有するのは肝細胞のみである。したがって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で培養すると肝細胞は生存するが iPS 細胞は死滅すると考えられる。そこで我々は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) を開発した。初代培養肝細胞と iPS 細胞の共培養を確立し、培地を HSM に変更したところ、3 日で iPS 細胞は死滅し、肝細胞のみが生存することが明らかになった。

HSM で 2 日間培養した iPS 細胞から RNA を抽出してリアルタイム定量 PCR にて alpha-feto protein (AFP、未分化な肝細胞のマーカー) を定量したところ、その発現量が 10 倍に増加していることを見いだした。HSM で iPS 細胞を培養すると肝細胞への分化が促進される可能性が示唆された。しかし HSM で培養すると iPS 細胞は 3 日で死滅するので長期間生存する方法を開発することが必要であった。

2. 研究の目的

今回我々は iPS 細胞から肝細胞へ分化する方法の開発を試みた。そのために HSM で iPS 細胞を培養し長期間生存する方法を検討した。

3. 研究の方法

HSM に oncostain M 等の増殖因子、アポトーシス阻害剤 (M50054) 等の small molecule を添加して iPS 細胞 (201B7) を培養した。細胞の生存を観察し、RNA を抽出してリアルタイム定量 PCR にて AFP 等の肝細胞のマーカー等を定量した。AFP の

4. 研究成果

Oncostain M, hepatocyte functional proliferation inducer, M50054, non-essential amino acid, sodium pyruvate, nicotinamide, prolin, glutamine を HSM に添加した培地 (hepatocyte differentiation inducer, HDI) で培養すると iPS 細胞は 7 日後まで生存する細胞がみられた。HDI で培養 2 日後 RNA を抽出してリアルタイム定量 PCR を行った。AFP、CYP3A4E (薬剤代謝)、ALDH2 (アルコール代謝) の発現は iPS 細胞に比して亢進していた。免疫染色を施行したところ、HDI で培養した iPS 細胞は AFP 陽性であった。

以上より HDI で培養すると iPS 細胞は肝細胞への分化を開始することが明らかになった。しかし 7 日でほとんどの細胞が死滅するのでさらに長期間 iPS 細胞が生存する条件を明らかにする必要がある。また HDI で培養すると iPS 細胞が肝細胞への分化を開始するメカニズムの解明は今後の課題である。

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 7 件)

1. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. (2015) An optimal medium supplementation regimen for initiation of hepatocyte differentiation in human induced pluripotent stem cells. J Cell Biochem. 116, 1479-1489.
2. Tomizawa M, Shinozaki, F, Motoyoshi, Y, Sugiyama, T, Shigenori Yamamoto, S,

- Ishige, N. (2015) Involvement of Wnt pathway in feeder-free culture of human induced pluripotent stem cells. *Mol Med Rep.* 12, 6797-6800.
3. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. (2016) Transcription factors and medium suitable for initiating the differentiation of human induced pluripotent stem cells to the hepatocyte lineage. *J Cell Biochem.* 117, 2001-2009.
 4. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. (2016) Improved survival and initiation of differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatocyte-like cells upon culture in William's E medium followed by hepatocyte differentiation inducer treatment. *PLoS One* 11, e0153435.
 5. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. (2017) Oncostatin M in William's E medium is suitable for initiation of hepatocyte differentiation in human induced pluripotent stem cells. *Mol Med Rep.* 15, 3088-3092.
 6. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. (2017) 2-Deoxy-D-glucose potentially initiates hepatocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Mol Med Rep.* 15, 3083-3087.
 7. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. (2017) Differentiation of human induced pluripotent stem cells in Williams' E initiation medium supplemented with 3-bromopyruvate and 2-deoxy-D-glucose. *Mol Med Rep.* 15, 3719-3723.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. An optimal medium supplementation regimen for initiation of hepatocyte differentiation in human induced pluripotent stem cells. (2015) 13th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research (ISSCR) (Stockholm, Sweden)
2. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. Human induced pluripotent stem cells survived and initiated hepatocyte differentiation in William's E medium followed by hepatocyte differentiation inducer (2016) 14th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research (ISSCR) (San Francisco, United States)
3. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. Transcription factors and medium suitable for initiating the differentiation of human induced pluripotent stem cells to the hepatocyte lineage. (2017) 15th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research (ISSCR) (Boston, CA, USA)
4. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2015) iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する培地の開発 第 101 回日本消化器病学会総会(日本消化器病学会雑誌 Suppl March, 112, A458, 2015)
5. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2015) iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する培地の開発 第 19 回日本肝臓学会大会(肝臓 Suppl (2), 56, A760, 2015)
6. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2016) iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する培地の開発 第 15 回日本再生医療学会総会(再生医療 Suppl 2016, 235, 2016)
7. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2016) iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する転写因子群の解明 第 20 回日本肝臓学会大会
8. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2017) iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する転写因子の解明 第 16 回日本再生医療学会総会
9. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2017) iPS 細胞から肝細胞への分化を誘導する転写因子 103 回日本消化器病学会総会 (日本消化器病学会雑誌 Suppl March, 117, A321, 2017)
10. 富澤稔、篠崎文信、本吉慶史、杉山隆夫、山本重則、石毛尚起 (2018) iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する転写因子 第 17 回日本再生医療学会

〔図書〕(計 1 件)

1. Tomizawa M. Pluripotent stem cells-from bench to clinics, ed. Tomizawa M,

Croatia: InTech, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: Culture medium and method for inducing differentiation of pluripotent stem cells to hepatoblasts

発明者: 富澤稔

権利者: 千葉大学

種類: 特許出願

番号: US patent 14/749715

出願年月日: 平成 27 年 6 月 25 日

国内外の別: 国外(アメリカ合衆国)

名称: Methods and materials for obtaining hepatocytes lineage cells

発明者: 富澤稔

権利者: 千葉大学

種類: 特許出願

番号: US patent 62/288516

出願年月日: 平成 28 年 1 月 29 日

国内外の別: 国外(アメリカ合衆国)

名称: 肝細胞系譜細胞の製造方法、該製造方法で得られた肝細胞系譜細胞又は培養物、並びに肝細胞分化誘導培地

発明者: 富澤稔

権利者: 千葉大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2017-211334

出願年月日: 平成 29 年 10 月 31 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

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: 特許登録

番号: 特許第 6150108

取得年月日: 平成 29 年 6 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

(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)・がんゲノム研究室・室長

研究者番号: 20311384

(4)研究協力者 ()