

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19329

研究課題名(和文)糖鎖修飾に着目した肝分化指向性ヒトiPS細胞株の早期同定システムの開発

研究課題名(英文)Development of an early identification system for human hepatic differentiation tropic iPS cells focusing on glycosylation

研究代表者

板場 則子 (Itaba, Noriko)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457167

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): iPS細胞は、株間で分化指向性が異なることが報告されており、分化指向性を規定する因子の同定は重要であると考えられる。本研究は、ヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導中の糖鎖修飾の解析を通して、肝細胞分化指向性iPS細胞の早期同定技術を開発することを目的とする。肝細胞分化指向性株、抵抗性株の肝細胞分化誘導時の糖鎖修飾を解析した結果、高マンノース型糖鎖構造が分化誘導開始前の分化指向性株で多く認められた。肝細胞分化誘導中には、シアル酸、ガラクトース修飾が増加し、両修飾は分化指向性株での増加が顕著であった。これらの糖鎖修飾が肝細胞分化指向性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): iPS (induced pluripotent stem) cells have been reported to show difference in differentiation tropism among iPS cell lines, and it is considered that identification of factors that regulate differentiation tropism is important. This study aims to develop early identification system of hepatic differentiation tropic iPS cells through analysis of glycosylation during hepatic differentiation of human iPS cells.

As a result of analyzing glycosylation during hepatic differentiation of hepatic differentiation tropic iPSCs and hepatic differentiation defective iPSCs, more high-mannose glycans were contained in the differentiation tropic cells before inducing differentiation. During hepatic differentiation of hiPSCs, sialic acid and galactose were increased, and differentiation tropic cells showed prominent increment of both modifications. These glycosylation may be involved in hepatic differentiation tropism.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS 肝細胞分化 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は再生医療の細胞源として期待されるが、由来細胞のエピジェネティックメモリーによる分化抵抗性を示す株の存在が報告されている他(Nat Biotechnol, 28: 848-855, 2010, Nature 467: 285-290, 2010)、肝臓領域においては、同一の由来細胞より樹立した iPS 細胞株間においても肝細胞分化指向性が異なることが報告されている (Proc Natl Acad Sci USA 109: 12538-12543, 2012)。

肝細胞分化抵抗性細胞の混入は、分化誘導により得られる肝細胞数の絶対的不足や、発癌の危険性を増大させる可能性があり、肝細胞分化指向性 iPS 細胞株の同定は、iPS 細胞を用いた肝再生医療の実現には必須であると考えられる。

しかし、肝細胞分化指向性を規定する因子は不明であり、山中らは cDNA マイクロアレイ、メチル化解析で顕著な差を認めないと報告している (Proc Natl Acad Sci USA 109:12538-12543,2012)。そこで本研究では、「通常のマイクロアレイ解析やメチル化アレイ解析では検出が困難」であり、「サイトカインなどの分化誘導刺激に反応し細胞内シグナル伝達に影響する」因子として、糖鎖修飾に着目した。事実、activin、FGF、HGF などの肝細胞分化誘導性サイトカインは、グリコサミノグリカンやヘパラン硫酸などの糖鎖修飾を変え、受容体への結合や親和性に決定的に影響することが報告されている (Cell, 114: 727-737, 2003, Stem Cells, 28: 191-200, 2010)。

2. 研究の目的

これまでに、肝細胞分化指向性を示す iPS 細胞株のスクリーニングにより同定した肝細胞分化指向性ヒト iPS 細胞株、肝細胞分化抵抗性ヒト iPS 細胞株 (Hepatol Res. 18: 2014) の肝細胞分化誘導中の糖鎖修飾変化に

着目し、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化指向性を決定する糖鎖修飾の相違を明確にし、肝細胞分化指向性 iPS 細胞の早期同定技術の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

肝細胞分化指向性を示す iPS 細胞株のスクリーニングにより同定した肝細胞分化指向性ヒト iPS 細胞株、肝細胞分化抵抗性ヒト iPS 細胞株 (Hepatol Res. 18: 2014) を使用し、未分化状態ならびに肝細胞分化誘導時に、糖鎖アレイ (レクチンアレイ) 解析ならびに糖鎖修飾に関わる糖転移酵素遺伝子のリアルタイム PCR を実施する。糖鎖アレイ (レクチンアレイ) 解析の結果と、糖転移酵素の遺伝子発現解析の結果を対応させることで、肝細胞分化誘導に促進的に作用する糖鎖修飾および抵抗的に作用する糖鎖修飾を推定する。

ドナーが同一の iPS 細胞株を推定した糖鎖修飾に対する標識レクチンにより染色し、肝細胞分化指向性・抵抗性の予測と、肝細胞分化誘導により肝細胞分化指向性・抵抗性を評価する。標識レクチンによる予測と、肝細胞分化評価の結果が合致するレクチンに対応する糖鎖修飾を明らかにする。

4. 研究成果

下図の肝細胞分化誘導プロトコールに従い、Hepatol Res. 18: 2014 にて肝細胞分化指向性 hiPS 細胞株として報告している RIKEN-2F 細胞、抵抗性株として報告されている 201B7 細胞を使用し、肝細胞分化誘導を行い、hiPS 細胞株の肝細胞分化指向性を確認した。

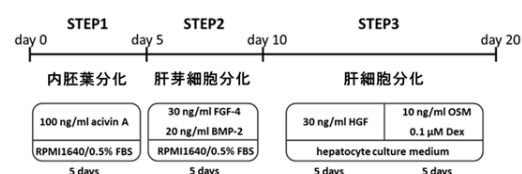


図 1. 本研究に使用した肝細胞分化誘導プロトコール

リアルタイム PCR 法により、肝細胞分化マーカーの遺伝子発現量を検討した所、肝細胞分化抵抗性 201B7 細胞と比較し、肝細胞分化指向性 RIKEN-2F 細胞株で肝細胞分化マーカーの有意に高い発現を認めた (図 2)。

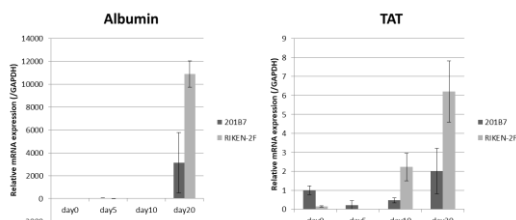


図 2. 使用細胞株の肝細胞分化指向性の確認

引き続き、肝細胞分化誘導中の糖鎖修飾の解析を実施した。肝細胞分化指向性株ならびに抵抗性株の肝細胞分化誘導前、内胚葉分化終了時点、肝芽細胞分化終了時点、肝細胞分化終了時点のサンプルをレクチンアレイに供し、各タイムポイントにおける糖鎖修飾を解析した。

分化指向性株、分化抵抗性株ともに、シアル酸の糖鎖修飾、ガラクトース修飾が増加したが、何れの糖鎖も肝細胞分化指向性株で顕著な増加が認められた (図 3)。

一方、高マンノース型糖鎖構造は、分化誘導期間中での顕著な減少や増加と言った変動は何れの株でも認められなかったが、分化誘導前となる未分化状態では、抵抗性株と比較し肝細胞分化指向性株で高マンノース型糖鎖構造が多い傾向が認められた。

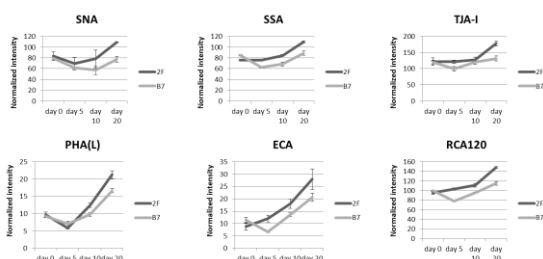


図 3. hiPS 細胞の肝細胞分化誘導中のレクチンアレイ解析の結果

上段はシアル酸に対応するレクチンの変動、下段はガラクトースに対応するレクチンの変動を示す。

今回の糖鎖アレイ解析の結果から、未分化

状態での高マンノース型糖鎖構造、分化誘導に伴うシアル酸、ガラクトースの糖鎖修飾の変動が肝細胞分化に關与する可能性が示唆された。現在、各糖鎖修飾に影響を与える糖転移酵素の遺伝子発現解析を行っている。今後は、肝細胞分化誘導中の各糖転移酵素のノックダウンを行うことで、糖鎖修飾と肝細胞分化の直接的な関係性を明らかにできるよう、引き続き研究を進めていく予定である。

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 5 件)

1. Seto K, Sakabe T, Itaba N, Azumi J, Oka H, Morimoto M, Umekita Y, Shiota G. A Novel Small-molecule WNT Inhibitor, IC-2, Has the Potential to Suppress Liver Cancer Stem Cells. *Anticancer Res.* 2017 Jul;37(7):3569-3579. 査読有
2. Shiota G, Itaba N. Progress in stem cell-based therapy for liver disease. *Hepatol Res.* 2017 Feb;47(2):127-141. doi: 10.1111/hepr.12747. 査読有
3. Yokogi S, Tsubota T, Kanki K, Azumi J, Itaba N, Oka H, Morimoto M, Ryoke K, Shiota G. Wnt/Beta-Catenin Signal Inhibitor HC-1 Sensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil through Reduction of CD44-Positive Population. *Yonago Acta Med.* 2016 Jun 29;59(2):93-9. eCollection 2016 Jun. 査読有
4. Itaba N, Matsumi Y, Okinaka K, Ashla AA, Kono Y, Osaki M, Morimoto M, Sugiyama N, Ohashi K, Okano T, Shiota G. Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice. *Sci Rep.* 2015 Nov 10;5:16169. doi: 10.1038/srep16169. 査読有

5. Itaba N, Sakabe T, Kanki K, Azumi J, Shimizu H, et al., Identification of the small molecule compound which induces hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy* 2015 2:32-41. 査読有

〔学会発表〕（計 31 件）

1. 板場則子、汐田剛史、肝疾患治療用細胞シートによる肝硬変治療を目指した取り組み、第 18 回日本再生医療学会総会、シンポジウム、2018 年 3 月 21 日—23 日、横浜
2. 板場則子、野田育治、河野洋平、横畑毅、岡崎静麻、汐田剛史、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤 IC-2 誘導間葉系幹細胞由来肝細胞化シート移植の急性肝障害抑制機序の解析、2018 年 3 月 21 日—23 日、横浜
3. 横畑毅、岡崎静麻、板場則子、河野洋平、汐田剛史、肝線維化抑制に有効な骨髄由来間葉系幹細胞の選択、2018 年 3 月 21 日—23 日、横浜
4. 板場則子、河野洋平、汐田剛史、肝線維化治療に向けた肝疾患治療用細胞シートの開発、第 21 回日本肝臓学会大会、ワークショップ、2017 年 10 月 12 日—13 日、博多
5. 河野洋平、板場則子、阿部健一郎、清水寛基、汐田剛史、Wnt/ β -catenin 経路を標的とした肝線維化治療、第 24 回肝細胞研究会、ポスター、2017 年 6 月 30 日—7 月 1 日、旭川
6. 河野洋平、板場則子、汐田剛史、肝疾患治療用細胞シートの肝線維化病態に対する組織修復効果、第 24 回肝細胞研究会、2017 年 6 月 30 日—7 月 1 日、旭川
7. 板場則子、清水寛基、河野洋平、汐田剛史、新規化合物 IC-2 による肝線維化抑制効果の検討、第 53 回日本肝臓学会総会、2017 年 6 月 8-9 日、広島
8. 河野洋平、板場則子、汐田剛史、ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化を誘導する新規低分子化合物のスクリーニング、第 53 回日本

肝臓学会総会、2017 年 6 月 8-9 日、広島

9. 板場則子、河野洋平、汐田剛史、間葉系幹細胞由来肝細胞化シートの急性肝障害抑制効果：新規化合物 IC-2 有効性検討、第 53 回日本肝臓学会総会、2017 年 6 月 8-9 日、広島

10. 板場則子、河野洋平、沖中香織、汐田剛史、間葉系幹細胞由来肝細胞化シートの肝線維化抑制効果、第 53 回日本肝臓学会総会、2017 年 6 月 8-9 日、広島

他 21 件

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 11 件）

1. 名称：線維化抑制作用を有する細胞シート
発明者：汐田剛史、板場則子、河野洋平
権利者：カノンキュア株式会社、鳥取大学
種類：特許権
番号：特願 2017-168118
出願年月日：2017 年 9 月 1 日
国内外の別：国内
2. 名称：ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する新規化合物の合成と解析
発明者：汐田剛史、星川淑子、松本則子、松見吉朗、森本稔、齋本博之、大橋一夫、岡野光夫
権利者：カノンキュア株式会社、鳥取大学、東京女子医科大学
種類：特許権
番号：特願 2017-117768
出願年月日：2017 年 6 月 15 日
国内外の別：国内
3. 名称：低分子化合物による癌と線維化の抑制と再生促進の効果
発明者：汐田剛史、板場則子、森本稔、岡

博之、阿部健一郎、清水寛基、河野洋平、横木智

権利者：カノンキュア株式会社、鳥取大学
種類：特許権

番号：PCT/JP2016/077475

出願年月日：2016年9月16日

国内外の別：国外

4. 名称：低分子化合物による癌と線維化の抑制と再生促進の効果

発明者：汐田剛史、板場則子、森本稔、岡博之、阿部健一郎、清水寛基、河野洋平、横木智

権利者：カノンキュア株式会社、鳥取大学
種類：特許権

番号：TW105130147

出願年月日：2016年9月16日

国内外の別：国内

他7件

○取得状況（計 4件）

1. 名称：ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する新規化合物の合成と解析

発明者：汐田剛史、星川淑子、松本則子、松見吉朗、森本稔、齋本博之、大橋一夫、岡野光夫

権利者：カノンキュア株式会社、鳥取大学、東京女子医科大学

種類：特許権

番号：特許第6008297号

取得年月日：2016年9月23日

国内外の別：国内

2. 名称：ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する新規化合物の合成と解析

発明者：汐田剛史、星川淑子、松本則子、松見吉朗、森本稔、齋本博之、大橋一夫、岡野光夫

権利者：鳥取大学、東京女子医科大学

種類：特許権

番号：9,555,061

取得年月日：2017年1月31日

国内外の別：国外（米国）

3. 名称：ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する新規化合物の合成と解析

発明者：汐田剛史、星川淑子、松本則子、松見吉朗、森本稔、齋本博之、大橋一夫、岡野光夫

権利者：鳥取大学、東京女子医科大学、カノンキュア株式会社（伊、西のみ）

種類：特許権

番号：E P 2698365

取得年月日：2017年6月27日

国内外の別：国外（英、独、仏、伊、西）

4. 名称：ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する新規化合物の合成と解析

発明者：汐田剛史、星川淑子、松本則子、松見吉朗、森本稔、齋本博之、大橋一夫、岡野光夫

権利者：鳥取大学、東京女子医科大学

種類：特許権

番号：特許第6201008号

取得年月日：2017年9月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

平成27年11月11日 山陰中央新報掲載「肝機能改善する細胞シート」

平成27年12月2日 日本海新聞掲載「肝機能を改善へ 細胞シート開発」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板場 則子 (Itaba, Noriko)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457167

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

汐田 剛史 (Shiota, Goshi)

河野 洋平 (Kono, Yohei)

茅原 侑生 (Kayahara, Yuki)