

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16643

研究課題名(和文)低分子化合物によるヒト成体肝細胞からの肝前駆細胞の作製

研究課題名(英文)Generation of hepatic progenitor cells from human hepatocytes using small molecules

研究代表者

勝田 毅 (KATSUDA, Takeshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40732326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット・マウスの成熟肝細胞を前駆細胞へとリプログラミングできることを確かめている低分子化合物を用いて、ヒト肝細胞も同様にリプログラミングできるかどうか、またそのようにして得られた肝前駆細胞(ヒトCLiP)が、肝臓再生に寄与しうるかどうかを検討することを目的とした。主な成果は以下の通りとなる。(1)乳幼児肝細胞からヒトCLiPを誘導できた。(2)ヒトCLiPから分化誘導した肝細胞はCYP活性を示した。(3)ヒトCLiPは慢性肝疾患モデルマウスの肝臓を高効率に置換し、移植後のキメラ肝臓から取り出したヒト肝細胞は初代成熟肝細胞と同等レベルの代謝能を示した。

研究成果の概要(英文)：Using small molecule inhibitors, we recently reported that rodent mature hepatocytes can be reprogrammed into progenitor-like phenotype with repopulative capacity. In this study, using the same strategy, we demonstrated that hepatic progenitor cells can be induced from human infant hepatocytes. These cells, named human chemically induced progenitors (hCLiPs), exhibited significant repopulative capacity in injured mouse livers following transplantation, and contributed to reconstruction of the normal liver architecture. We also found that hCLiPs can be redifferentiated into mature hepatocytes in vitro with hepatic inducible factors. These redifferentiated cells can be induced to exhibit cytochrome P450 (CYP) enzymatic activities in response to the CYP inducing molecules with the efficiency comparable with that of primary hepatocytes. Thus, this study contributes to progress in the field of liver cell transplantation therapy and pharmacological research field.

研究分野：再生医療、細胞生物学

キーワード：肝細胞移植 肝前駆細胞 リプログラミング 低分子化合物 肝細胞 シトクロームP450

1. 研究開始当初の背景

肝細胞移植は、肝移植に次いで臨床的効果が認められている治療法であるが、絶対的なドナー不足問題を抱えているため、肝細胞の代替となる新規細胞ソースの開発が求められている。現在 iPS 細胞からの肝細胞作製技術に期待が寄せられているが、肝細胞への分化誘導の困難性、テラトーマ形成の危険性、さらに遺伝子導入に伴う予測できない危険性が問題視されている。これらの問題の解決を目的として、ダイレクト・リプログラミングと呼ばれる新技術が注目を集めている。すなわち、iPS 細胞を介さずに、終末分化を遂げた体細胞に転写因子等の遺伝子を直接導入して目的の細胞を作製しようとする技術である (Sekiya & Suzuki, Nature (2011); Huang et al. Nature (2011))。しかし、この技術においても、遺伝子導入に伴う予測不能な危険性は残っており、臨床応用までの道りは遠い。一方、成体内に存在する肝前駆細胞 (liver progenitor cell, LPC) は肝細胞と胆管上皮細胞 (biliary epithelial cell: BEC) への 2 方向分化が運命づけられた細胞であり、万能細胞の抱える問題点を解決できる可能性がある (Miyajima et al. Cell Stem Cell (2014))。しかし、成体肝臓に潜む肝前駆細胞の存在率は極めて低く、また採取時に煩雑な精製操作が必要となり、安定供給は困難である。そのため現時点では、成体由来の LPC の臨床応用を目指す動きは活発ではない。

このような中、申請者は、低分子化合物を用いた in vitro 培養系においてラット成熟肝細胞を二分化能を有する LPC (Chemically induced Liver Progenitor (CLiP) と命名) へとリプログラミングできることを明らかにしていた。重要なことに、ラット CLiP を慢性肝炎モデルである cDNA-uPA/SCID マウスに移植したところ、高い効率でラット由来の細胞に置換されることが明らかとなった。このことから、CLiP 細胞が極めて有望な細胞ソースとなりうる事が強く示唆された。そこで、本研究ではヒト CLiP 細胞の誘導および、その再生能力の評価を目的とした。

2. 研究の目的

ラット CLiP と同様に、低分子化合物を用いてヒト CLiP を作製できるかどうかを検討すること。

3. 研究の方法

乳幼児の凍結ヒト肝細胞を用い、ラットでも用いた低分子化合物を含む複数の化合物の組み合わせについて細胞の増殖能を評価した。

増殖が確認できた化合物の組み合わせに絞り込んで、増殖した細胞の遺伝子発現解析および、肝分化誘導の評価を行った。

さらにこれらの増殖細胞を肝障害マウスへと移植し、その再生能を評価した。

4. 研究成果

ラット CLiP 作製時の低分子化合物の組み合

わせを少し改変することで (特許出願中につき、詳細の記載は控える)、ヒト肝細胞を増殖させることに成功した (図 1)。

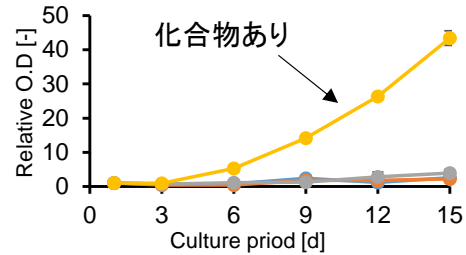


図1. 化合物あり, なしでの増殖能の比較

この細胞は増殖時には成熟肝細胞様の形態を示さないのに対し、細胞密度が濃くなると、成熟肝細胞様の形態へと変化することが確認できたことから (図 2)、肝前駆細胞によく似た性質をもつことが示唆された。

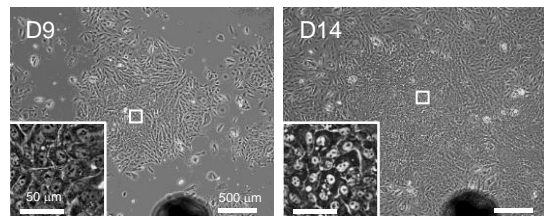


図2. 増殖細胞の形態変化

そこでさらに、この細胞に対して肝分化誘導能をもつことが知られている oncostatin M と dexamethasone および matrigel を加えた結果、さらに成熟度が増すことが明らかとなった (図 3, 4)。

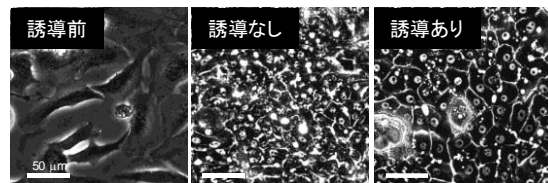


図3. 肝分化誘導による形態変化

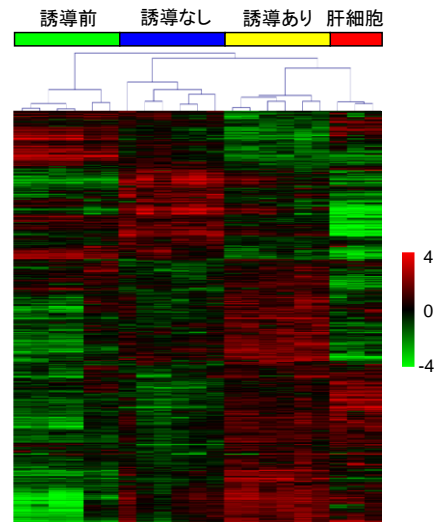


図4. 肝分化誘導前後でのTranscriptome解析

以上のことから、低分子化合物で誘導した細胞が増殖能をもつ肝前駆細胞であることが確認できたため、この細胞を改めてヒト CLiP (hCLiP) と名付けることとした。

続いてこの細胞を障害肝臓をもつ免疫不全マウスへと移植し、その再生能力を評価した。まずラット CLiP の移植で高置換を確認した cDNA-uPA/SCID マウスへの hCLiP の移植実験を行った結果、すべての個体ではないものの、一部の個体でマウス血中ヒトアルブミン濃度が 10 mg/ml を超える個体が確認された (図 5)。これは初代肝細胞移植に匹敵する結果である。

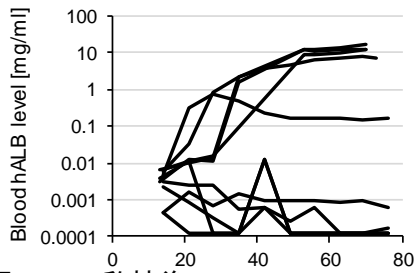


図5. hCLiP移植後のcDNA-uPA/SCIDマウスの血中アルブミン濃度

実際に高いアルブミン濃度が確認された個体では 90%以上の置換率が認められ(図 6), hCLiP に高い再生能力があることが確かめられた。

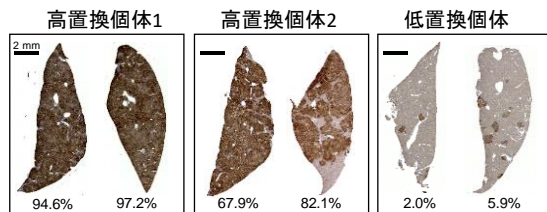


図6. hCLiP移植後、11週時点でのcDNA-uPA/SCIDマウス肝臓を、ヒト特異的CYP2C抗体で免疫染色した組織片

また、cDNA-uPA/SCID マウスのみでなく、TK-NOG マウスへの移植実験においても、最高置換率は cDNA-uPA/SCID マウスへの移植時に比べて劣るものの、概ね同様の結果が得られた (図 7, 8)。

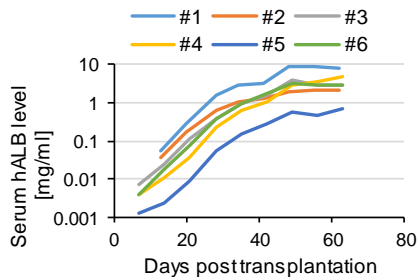


図7. hCLiP移植後のTK-NOGマウスの血清中アルブミン濃度

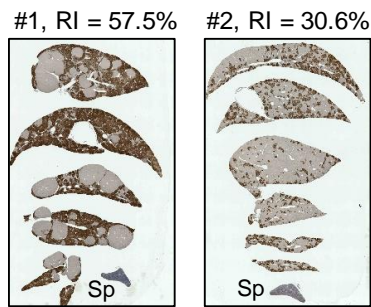


図7. hCLiP移植後、10週時点でのTK-NOGマウス肝臓を、ヒト特異的CYP2C抗体で免疫染色した組織片

hCLiP で置換された領域は CYP1A2 および CYP3A4 を発現しており、十分に成熟していることがうかがえた (図 8)。さらに、CYP1A2 および CYP3A4 は門脈域では発現が低く、中心静脈域で高発現となる、hepatic zonation を形成しており、正常な構造を持つことも確かめられた (図 8)。

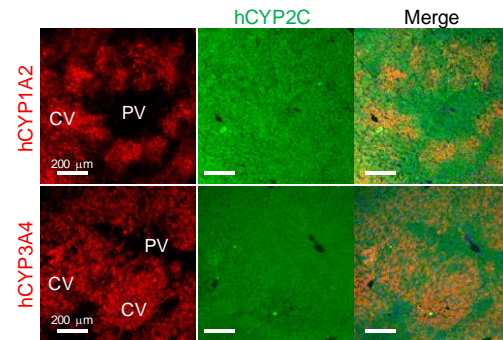


図8. hCLiP移植後、11週時点でのcDNA-uPA/SCIDマウス肝臓を、ヒト特異的CYP2Cおよび、CYP1A2, CYP3A4抗体で二重染色免疫染色した組織片

実際に、これらのキメラ肝臓から採取したヒト肝細胞は、正常初代ヒト肝細胞と同程度の CYP 活性を示すことが確かめられた。

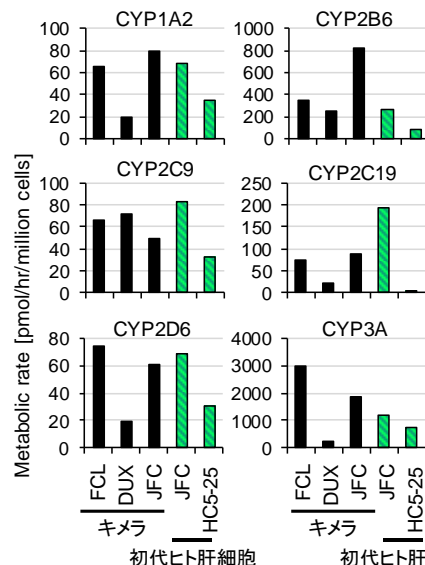


図9. hCLiPを移植して得られたキメラマウスの肝臓から肝細胞を採取してCYP活性を測定した結果

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. Katsuda T & Ochiya T. Chemically induced liver progenitors (CLiPs): a novel cell source for hepatocytes and biliary epithelial cells. *Methods Mol Biol.* (in press)
2. Katsuda T, Ochiya T, Sakai Y. Generation of hepatic organoids with biliary structures. *Methods Mol Biol.* (in press)
3. Hosaka K, Katsuda T, Terai S, Ochiya T. Exploration for Cell Sources for Liver Regenerative Medicine: "CLiP" as a Dawn of Cell Transplantation Therapy. *Stem Cells and Cancer in Hepatology* (in press)
4. Katsuda T, Hosaka K, Ochiya T. Generation of Chemically Induced Liver Progenitors (CLiPs) from Rat Adult Hepatocytes. *Bio-protocol.* 8, 2, 2018
5. Katsuda T & Ochiya T. Biological and clinical insights offered by chemically induced liver progenitors (CLiPs). *Stem Cell Investig.* 4, 68, 2017
6. Kawamata M, Katsuda T, Yamada Y, Ochiya T. In vitro reconstitution of breast cancer heterogeneity with multipotent cancer stem cells using small molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 482, 750-757, 2017.
7. Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi RU, Yamamoto Y, Camargo FD, Ochiya T. Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell.* 20, 41-55, 2017

[学会発表] (計 5 件)

1. 勝田毅、川又理樹、萩原啓太郎、高橋陵宇、山本雄介、保坂和徳、落谷孝広「成熟肝細胞からの肝前駆細胞誘導とその再生医療への応用可能性」第 136 回日本薬理学会関東部会, 2017 年 7 月 8 日 (招待講演)
2. Takeshi Katsuda, Masaki Kawamata, Keitaro Hagiwara, Ryou-u Takahashi, Yusuke Yamamoto, Kazunori Hosaka, Takahiro Ochiya. "In vitro reprogramming of mature hepatocytes to culturable liver progenitor cells using small molecules" 第 15 回幹細胞シンポジウム, 2017 年 5 月 26 日-5 月 27 日 (招待講演)
3. 勝田毅「成熟肝細胞からの、高い再生能を有しかつ培養可能な肝前駆細胞へのリプログラミング」第 16 回日本再生医療学会総会, 日本再生医療学会奨励賞 (基礎

部門) 受賞者講演, 2017 年 3 月 8 日

4. 勝田毅「低分子化合物による成熟肝細胞から肝前駆細胞への in vitro リプログラミング」第 16 回日本再生医療学会総会, ランチョンセミナー, LS-27 3 月 9 日(木)
5. 勝田毅, 川又理樹, 萩原啓太郎, 高橋陵宇, 山本雄介, 中釜斉, 落谷孝広. 「低分子化合物による成熟肝細胞から肝前駆細胞への in vitro リプログラミング」第 31 回発癌病理研究会. 2016 年 8 月 23 日-25 日信州松代ロイヤルホテル (招待講演) [図書] (計 2 件)
1. 勝田毅, 落谷孝広. 「成熟肝細胞からの、高い再生能を有しかつ培養可能な肝前駆細胞へのリプログラミング」メディカルレビュー社, 再生医療, 2018
2. 勝田毅, 落谷孝広. 「低分子化合物による成熟肝細胞から肝前駆細胞への in vitro リプログラミング」科学評論社, 臨床免疫・アレルギー科, 2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ヒト肝前駆細胞の調製方法

発明者: 山田哲正、落谷孝広、勝田毅

権利者: 株式会社インターステム、国立開発研究法人国立がん研究センター

種類: 特許

番号: 特許願 2016-212285

出願年月日: 2016 年 10 月 28 日

国内外の別: 国際

名称: 低分子化合物を用いたリプログラミングによる、成熟幹細胞からの肝幹細胞の作製方法

発明者: 落谷孝広、勝田毅

権利者: 国立研究開発法人国立がん研究センター, DSファーマバイオメディカル株式会社

種類: 特許

番号: 特許願 2016-3088

出願年月日: 2016 年 1 月 8 日

国内外の別: 国内

○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

勝田 毅 (KATSUDA, Takeshi)

国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・研究員

研究者番号: 40732326

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

落谷 孝広 (OCHIYA Takahiro)
国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・主任分野長
研究者番号： 60192530

松崎潤太郎 (MATSUZAKI Juntaro)
国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・特任研究員
研究者番号： 60464864

齋藤 義正 (SAITO Yoshimasa)
慶応大学・薬学部・薬学研究科・准教授
研究者番号： 90360114

竹内敦子 (TAKEUCHI Atsuko)
神戸薬科大学, 薬学部, 准教授
研究者番号： 80154970

(4) 研究協力者

山田泰弘 (日本薬科大学・教授), 山口智子 (慶応大学大学院生), 保坂和徳 (新潟大学大学院生)