

平成 23 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390356

研究課題名(和文)

ヒトES細胞由来肝細胞の分化誘導法確立と細胞移植における有用性の検討

研究課題名(英文)

Establishment of a new method of inducing differentiation from human embryonic stem cells to hepatocytes *in vitro* and investigation of the clinical utility for cell transplantation.

研究代表者

猪飼 伊和夫 (IKAI IWAO)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60263084

研究成果の概要(和文)：

マウス ES 細胞と同様に、肝細胞成長因子(HGF)や ActivinA などの投与に加えて、マウス胎仔肝由来間葉系細胞との共培養を組み合わせることで、ヒト ES 細胞においても高度な肝機能を有する肝細胞様細胞へ分化誘導が可能であることを示した。さらに、ヒト iPS 細胞においても肝細胞様細胞への分化誘導が可能であることを示した。また、肝障害に対する細胞移植において分化段階がより高度であるほうが治療効果が高いことも示した。

研究成果の概要(英文)：

We demonstrated that human embryonic stem cells (hESCs) matured into hepatocyte-like cells with higher hepatocyte function *in vitro* via co-culturing with the fetal murine hepatic cells after administration of hepatocyte growth factor (HGF) and ActivinA. Furthermore, we also demonstrated that human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) could be differentiated into hepatocyte-like cells. Moreover, we suggested that transplantation of mature hepatocytes for acute liver failure significantly improved the survival rate in comparison to that of transplantation of immature cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：ヒトES細胞、分化誘導、肝細胞、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患に対する新しい治療法の開発が望まれる中、各臓器・組織内において新しく機能細胞を作り出す細胞の存在に注目が集まり、こうした細胞を利用した人工臓器の開発や細胞治療が“再生医療”として期待されている。各臓器・組織において新しく機能細胞を作り出している細胞は組織性幹細胞と呼ばれ、既に臨床応用されている造血幹細胞

のほかに皮膚や神経、筋肉、消化管、肝臓、膵臓などの各臓器・組織の幹細胞の単離とその特性解析、および臨床応用へ向けての研究が多く、研究グループにより進められている。一方、我々の生体は多種多様な臓器・組織により構成されているとはいえ、もともとは一つの受精卵から発生してきたものであり、受精卵が発生を始めた初期にはすべての臓器・組織の細胞をつくる能力を持った細胞

が存在する。この細胞は株化され、胚性幹細胞 (ES 細胞) と呼ばれており、個体を構成するすべての細胞に分化可能である。1998 年にヒト ES 細胞株が樹立された¹ことを踏まえ、このヒト ES 細胞を培養器の中で目的の機能細胞へ分化させた後、人工臓器や移植治療に用いる可能性が現実のものとなってきている。近年ヒト ES 細胞を用いた研究が全世界で精力的に行われており、既に血液細胞や神経細胞へ分化誘導することが可能となりつつある。一方、難治性肝疾患治療や創薬研究への応用が期待される肝細胞は個体発生の初期に分化してくる外胚葉 (神経系) や中胚葉 (血管、血液、筋肉など) の細胞とは異なり、複雑な組織間相互作用の結果発生してくるために、その発生過程に関わる分子メカニズムの全貌が未だ解明されていない。従って、ヒト ES 細胞から肝細胞を分化誘導したとする報告はいくつかある²ものの、そのほとんどは限られた細胞外シグナルによる分化誘導であり、外胚葉や中胚葉系細胞も同時に分化してくるため、肝細胞の誘導効率は低い。こうした現状を踏まえて、ES 細胞から肝細胞を確実にかつ効率よく分化誘導するためには、肝臓の正常発生過程を踏襲して分化誘導する必要があると考えられることから胎仔 (児) 肝前駆細胞がその重要な道標になる。我々はマウス胎仔肝前駆細胞に対する新しい分離精製法を確立すると共に³、正常成体肝臓からも同様の肝前駆細胞を分離した⁴。一方、肝前駆細胞の成熟化過程には間葉系細胞との相互作用が重要であることが既に報告されている⁵。我々はフローサイトメーターを用いて胎仔肝に含まれる細胞を分離採取した上で、各細胞分画の特性解析を行い、胎仔肝に含まれる Thy-1 陽性の間葉系細胞が *in vitro* で胎仔肝前駆細胞を成熟化させることを見いだした⁶。一方、初期内胚葉マーカーであるアルファフェトプロテイン (AFP) のプロモーター制御下に green fluorescent protein (GFP) を発現するようにさせたトランスジェニック ES 細胞を作製し、各種分化誘導条件を検討することにより至適分化誘導条件を決定した上で、GFP 発現を指標にマウス ES 細胞由来内胚葉細胞を分離採取することに成功した。さらに、分離採取したマウス ES 細胞由来内胚葉細胞を胎仔肝由来 Thy-1 陽性間葉系細胞と接触共培養することにより、*in vitro* において成熟肝細胞に分化誘導することに成功した⁷。以上のようにして確立した ES 細胞由来肝細胞分化誘導法を昨年度までにヒト ES 細胞に応用し、現在ヒト ES 細胞由来肝細胞を *in vitro* において獲得しつつある。一方、我々はジフテリア毒素投与により肝臓特異的に致死障害を惹起できるモデルマウスにマウス胎仔肝前駆細胞を細胞移植することにより致死率の改善を確

認した⁸だけでなく、マウス ES 細胞由来肝細胞の移植においても同様に治療効果が認められることを確認した⁹。本研究では、昨年度までに得られるヒト ES 細胞由来肝細胞を免疫拒絶が惹起されない肝疾患モデルマウスに細胞移植することによりヒト ES 細胞由来肝細胞を用いた細胞移植医療実現の可能性を検証する。

2. 研究の目的

これまで報告されたヒト ES 細胞由来肝細胞分化誘導法では、外胚葉細胞や中胚葉細胞も同じ培養系の中に混在しており誘導効率は低い。ヒト ES 細胞由来肝細胞の細胞移植における効果を正確に検証するためには、こうした種々の細胞種の中から肝細胞のみを選別したうえで移植する必要がある。我々は昨年度までに初期肝細胞マーカーである AFP プロモーター下に GFP およびハイグロマイシン耐性遺伝子を発現するように構築されたプラスミドを利用して遺伝子改変ヒト ES 細胞を作製済みである。この遺伝子改変ヒト ES 細胞を分化誘導することにより得られる初期肝細胞 (AFP 産生細胞) は GFP 発現による緑色蛍光発現細胞として認識できる。従って本研究では、この遺伝子改変ヒト ES 細胞から分化誘導されるヒト初期肝細胞をフローサイトメーターにより選別した上で細胞移植に用いることが可能であり、ヒト ES 細胞由来肝細胞移植の効果を正確に検証できると考えられる。一方、現在までに世界で樹立されたヒト ES 細胞の特性として、single cell にするとその viability が著明に低下してしまうことが判明している。そこで、フローサイトメーターによる細胞分離が不可能であることも考慮されるが、本研究で使用するヒト ES 細胞由来初期肝細胞はハイグロマイシン耐性となることで薬剤選別により初期肝細胞のみを選別できるよう配慮している。また、我々は胎仔肝前駆細胞を *in vitro* において成熟化させる能力を持つ胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞を安定的に分離獲得する技術を確立しているだけでなく、この細胞を SV40 largeT antigen を遺伝子導入することにより株化させ、安定供給できる体制を整えつつある。マウス ES 細胞由来初期肝細胞 (AFP 産生細胞) も胎仔肝臓由来 Thy1 陽性間葉系細胞との接触により *in vitro* において成熟肝細胞へと分化することを既に確認しており、本研究においてもこの胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞との接触共培養によりヒト ES 細胞由来初期肝細胞を *in vitro* において成熟化させることが期待される。肝細胞の成熟化に関わる因子およびその分子的メカニズムの全貌が未だ明らかとなっていない現在、この胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞はヒト ES 細胞由来初期肝細胞を成熟肝細胞

胞へと分化誘導させる feeder 細胞として強力なツールになると考えられる。本研究では、こうして *in vitro* において獲得される種々の分化段階のヒト ES 細胞由来肝細胞を細胞移植実験に用いることが可能である。一般的に分化段階の幼若な細胞は増殖力に富むと共に低酸素抵抗性を有しているものの、蛋白合成など細胞機能は低い。一方、最終分化細胞は十分な細胞機能を持つが、増殖力や低酸素状態には弱い傾向がある。こうした性質を鑑みると、治療対象となる難治性肝疾患の特性により、移植細胞源である ES 細胞由来肝細胞の至適分化段階が異なる可能性もあり、本研究における移植細胞源としての至適分化段階の検証は今後のヒト ES 細胞由来肝細胞移植の臨床応用へ向けて重要な知見を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞由来未分化内胚葉細胞の安定的分化誘導法の確立

増殖因子や細胞外基質の使用条件（至適濃度、使用時期および期間、組み合わせなど）をさらに詳細に検証することによりヒト ES 細胞から未分化内胚葉細胞（AFP 産生細胞）への至適分化誘導法の改善・確立を目指す。

(2) ヒト ES 細胞由来初期肝細胞の分離

分化してくるヒト ES 細胞由来未分化内胚葉肝細胞（AFP 産生細胞）を GFP 陽性細胞として蛍光励起セルソーター（FACS Vantage SE）を用いて分離する。

(3) ヒト ES 細胞由来初期肝細胞の成熟化

①非共培養系成熟化法

ヒト ES 細胞由来初期肝細胞を種々の増殖因子（HGF, FGF2, EGF, insulin, transferrin, selenite, sodium butyrate, dimethyl sulfoxide など）添加培地により培養すると共に、種々の細胞外基質コーティング培養皿（collagen type I, IV, laminin, MatriGel, など）で培養する。こうして分化してくる細胞に対して上記のように各種肝細胞分化マーカーに対する RT-PCR, 多重免疫染色を行うと共に、アンモニア除去能、アルブミン合成能などの機能解析を行う。

②共培養系成熟化法

我々の共同研究先である再生医学研究所ではこのマウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞に SV40 large T antigen を遺伝子導入することにより不死化した細胞株を既に 30 株以上獲得している。マウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞集団の中には大きく分けて 2 種類の細胞が存在することが確認されており、それぞれ肝前駆細胞に対しては特徴的な働きをもっている。すなわち、一方は接触共培養により肝前駆細胞が成熟化する細胞分画であり、他方は未分化状態を維持するように働くことが確認されている。従っ

て、上記のようにして樹立されたマウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞株をそれぞれマウス ES 細胞由来初期肝細胞と接触共培養することにより、*in vitro* における成熟化に有効な株の選別を行うと共に、分化誘導される細胞の分化度判定を上記の如く RT-PCR や多重免疫染色により施行する。

(4) ヒト ES 細胞由来肝細胞の分化度判定

①ヒト ES 細胞由来分化細胞における発現遺伝子の網羅的解析

分化誘導する様々な分化段階に相当すると考えられるヒト ES 細胞由来初期肝細胞および成熟肝細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を行うことで、それぞれの分化段階に対するマーカー遺伝子およびその組み合わせの同定が可能となるかどうか検証する。

②ヒト ES 細胞由来肝細胞の機能解析

分化誘導するヒト ES 細胞由来肝細胞に対して、アンモニア除去能、アルブミン合成能、CYP 活性などを評価し、分化誘導された肝細胞の機能解析を行う。

(5) ヒト ES 細胞由来肝細胞の細胞移植

①疾患モデルマウスの確立

我々がこれまでに行ってきたマウス胎仔肝前駆細胞³やマウス ES 細胞由来肝細胞⁴を用いた移植実験においては、同系マウスに対して細胞移植実験を行うことで、免疫拒絶の問題を回避していたが、本研究では異種間の移植になるためレシピエントマウスに免疫拒絶反応が起きないトランスジェニックマウス（NOD-SCID マウス）を使用する。SCID マウスに対して CCL4 や 2-AAF 投与による肝硬変モデルの確立を検討する。一方、大量肝切除モデル（90%肝切除）との合併による急性肝不全モデルなども確立可能かどうか検討する。また、その他の遺伝子改変マウス（Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}mice⁵ など）の導入も検討する。

②ヒト ES 細胞由来肝細胞移植における有用性の検討

上記のようにして種々の分化段階の肝細胞をヒト ES 細胞から獲得するプロトコルを確立した上でヒト ES 細胞由来肝細胞を上記 1) で確立する免疫拒絶が起きない肝疾患モデルマウスに細胞移植する。細胞移植群と非細胞移植群との間で致死率の改善や疾患からの回復期間の長さなどを統計学的に比較解析し、ヒト ES 細胞由来肝細胞が細胞移植医療に有効かどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞由来未分化内胚葉細胞の安定的分化誘導法の確立

今までの我々の研究により、ヒト ES 細胞に AFP enhancer/promoter 下に EGFP を発現させることにより、内胚葉系の細胞に分化し

AFPを発現するようになった細胞をGFPにて確認することが可能となっていた。このヒトES細胞を利用し、さまざまな増殖因子(Hepatocyte growth factor, bone morphogenetic protein 4, fibroblast growth factor 4, all-trans-retinoic acid, Activin A)や細胞外マトリックス(collagen type I, laminin, Matrigel)などの条件を変え、効率的に内胚葉系の細胞へと分化する細胞の培養条件を検索した。誘導効率をFlow cytometryにてGFP陽性細胞の割合を検索し評価した。これらの実験により、Matrigel上で、まず100ng/ml Activin Aを加え、その後HGF 20ng/mlを加えるプロトコルが最も効率的にヒトES細胞の内胚葉系細胞への分化を促すことが分かった。(論文③)

(2) 共培養により肝細胞への成熟化を促すマウス胎仔肝細胞の確立

胎仔肝に含まれる間質の細胞の一分画にマウスのES細胞や肝幹細胞の肝細胞への成熟化を促す細胞があることが我々のグループの研究でわかってきた。その細胞群は、CD49f(+/-)CD45(-)Thy1(+)gp38(+)(+)の分画に含まれることが分かった。今回の研究で、この細胞群をcell line化して、さらにその中から、より効果的に肝細胞の成熟化を促すラインを得ることに成功した。具体的には、温度感受性SV40 large T antigenを含むtransgeneをCD45(-)Thy1(+)gp38(+)(+)分画の胎仔肝間質細胞に導入し、33度CO2 5%の培養条件で不死化させることにより、cell line化できた。これを我々が、the gp38-positive, Thy1-positive murine liver stromal cells (MLSgt)と名付けた。この細胞群はクローン化された細胞群ではないため、より効果的に肝細胞への成熟化を誘導するクローンをより分けたところ、そのうちのMLSgt20の細胞がより成熟化を促すラインとして選択された。このMLSgt20とマウスのES細胞から内胚葉系へと分化させた細胞との共培養を行い、これらの内胚葉系まで分化した細胞が、肝成熟マーカーであるglucose-6-phosphataseやtyrosine amino transferase、tryptophan 2,3-dioxgenase、cytochrome P450などの発現をRT-PCRで認め、PAS染色にてグリコーゲンの蓄積を認めるようになり、アンモニア除去能も認めるようになったことが分かった。さらに、電子顕微鏡にてこれらの細胞が形態学的にも成熟肝細胞と同様の特徴を持つことがわかり、肝細胞への十分な成熟化を促すことが分かった。すなわち、このMLSgt20のラインとの共培養を行うことで、マウスのES細胞由来内胚葉系細胞の肝細胞への成熟化を誘導し、37度の環境ではMLSgt20は増殖しない性質を利用することで、成熟した肝細胞のみを細胞移植の材料として抽出することが可能となった。(論文

②)

(3) ヒトES細胞由来内胚葉系細胞の肝細胞への分化誘導

この研究では、(1)で効率的に内胚葉系細胞へと分化させたヒトES細胞を(2)で得られた肝成熟を促すMLSgt20のラインとの共培養を用いて、肝細胞へと成熟化させることができることを明らかにした。具体的には、(2)のプロトコルに沿って、Matrigel上で当初4日間100ng/mlのActivin Aを添加した培地にて培養し、その後5日間20ng/mlのHGFを添加した培地にて培養し、ヒトES細胞を内胚葉系細胞に分化させたのち、GFPをラベルとして内胚葉系細胞に分化した細胞のみをsortingし、その後14日間MLSgt20細胞と共培養を行った。これらの細胞は、肝成熟マーカーであるglucose-6-phosphataseやtyrosine amino transferase、tryptophan 2,3-dioxgenase、cytochrome P450などの発現をRT-PCRで認め、PAS染色にてグリコーゲンの蓄積を認めるようになり、Cytochrome P450 3A4/7の活性やアンモニア除去能も認めるようになることが分かった。ただ、内胚葉系細胞に分化していないヒトES細胞では、肝細胞への成熟は促さなかった。これにより、MLSgt20細胞はヒトES細胞由来内胚葉系細胞においても共培養することで、肝細胞への成熟化を促すことが分かった。(論文①)

(4) ヒトiPS細胞における肝細胞への分化誘導

ES細胞はその倫理的側面や、作成数の問題さらに、移植した場合の拒絶等の問題があり、その欠点を補うものとして、iPS細胞が近年細胞移植のみならず、再生医療の細胞源として注目されてきている。このため、我々のグループでも、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導に関する研究を行い、共培養を行わない条件で、Activin AやOncostatin Mなどの増殖因子投与にて肝細胞様細胞への分化誘導が可能であることを示し、さらに同じ個体から作成されたiPS細胞においても、肝細胞への分化のしやすさにコロニー間の違いがあることを示した。(学会発表①)

(5) 分化段階による細胞移植の治療効果の比較

ES/iPS細胞を肝細胞に分化誘導し、その細胞移植により肝疾患に対する治療を行う際に、増殖能力の高い比較的未分化な段階で移植するのが良いか、または高度な肝機能を有するだけ成熟化した細胞が良いかという問題がある。今までは、投与後の生着や増殖においても、未分化なhepatoblastの段階のほうが優れているとの見解が世界的にも支配的であったが、我々は急性肝障害マウスに同系マウスのES細胞由来内胚葉系細胞、hepatoblastを含む胎仔肝細胞および成熟肝細胞を同じ条件で細胞移植し、その生存率を

比較する実験を行い、成熟肝細胞のみが有意に生存率を改善させることから、急性肝障害にたいする細胞移植においては、より成熟した肝細胞を移植することが効果的であることをしめした。(学会発表②)

今後の課題としては、ヒト iPS 細胞より肝細胞に分化誘導した細胞を急性肝障害モデルマウス/ラットに細胞移植し、細胞の生着と細胞移植による治療効果の検討を行い、将来のヒトでの治療につなげていくことが必要とされる。さらに、ヒト iPS 細胞の成熟化に関して、その成熟化過程のメカニズムの解析と効果的な分化誘導法を開発していくことが細胞移植の治療効果をより高めていくためにも、必要であると考えられる。

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 石井隆道、安近健太郎、福光剣、猪飼伊和夫 以下 7 名、In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers、Cell Tissue Research、査読有、Vol. 339、No. 3、2010、pp505-512
- ② 福光剣、石井隆道、安近健太郎、猪飼伊和夫 以下 7 名、Establishment of a cell line derived from a mouse fetal liver that has the characteristic to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells by a coculture method、Tissue Engineering. Part A、査読有、Vol. 15、No. 12、2009、pp3847-3856
- ③ 石井隆道、福光剣、安近健太郎、猪飼伊和夫 以下 5 名、Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells、American Journal of Physiology. Gastrointestine and Liver Physiology、査読有、Vol. 295、No. 2、2008、pp313-321

[学会発表] (計 11 件)

- ① 梶原正俊、石井隆道、猪飼伊和夫、上本伸二、山中伸弥、Variation in hepatic differentiation propensity among human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines、The 8th International Society for Stem Cell Research (ISSCR)、2010 年 6 月 16-19 日、San Francisco、U. S. A.
- ② 上村良、石井隆道、安近健太郎、猪飼伊和夫、Comparative study of transplantation of cells at various

differentiation stages into mice with induced lethal liver damage、第 45 回欧州肝臓学会議 (EASL)、2010 年 4 月 14-18 日、ウィーン、オーストリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪飼 伊和夫 (IKAI IWAO)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：60263084

(2) 研究分担者

安近 健太郎 (YASUCHIKA KENTARO)
京都大学・医学研究科・病院特定助教
研究者番号：00378895

石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：70456789