

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 28日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659039

研究課題名（和文） 肝星細胞利用によるヒト iPS 細胞からの肝実質細胞誘導法の開発

研究課題名（英文） Differentiation of human iPS cells into hepatocytes by using hepatic stellate cells

研究代表者

池田 一雄 (IKEDA KAZUO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80275247

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させることを目指し、ヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化誘導に、肝非実質細胞をフィーダー細胞として利用することを検討した。Duncan らの方法を base に、iPS 細胞、endoderm から hepatoblasts への誘導に、MEF、ヒト肝星細胞細胞株 LX2、ラット初代培養肝星細胞をフィーダー細胞として実験を行ったところ、コントロールと比較してフィーダー細胞を利用すると肝細胞への分化誘導を促進させる傾向が認められたが、有意差を持って星細胞が特に有用であるという結果には現在至っていない。今後のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem (iPS) cells have remarkable potential of differentiating into various cell lineages, including hepatocytes. Hepatocytes induced from iPS cells are expected to have medical applications such as biomedical research, drug study and regenerative medicine. In this study, we tried to induce hepatocyte-like cells from human iPS cells by using hepatic stellate cells as feeder cells, and analyze expression level of Oct3/4, GATA4, alpha-fetoprotein and albumin to compare their properties of differentiation into hepatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：iPS 細胞，肝星細胞，肝細胞，

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで肝非実質細胞（肝星細胞，類洞内皮細胞，クッパー細胞）分離法を確立し，この分離培養細胞を用いて特に肝星細胞に関連しての肝臓の再生，組織修復に関連する各種分子動態の解析をおこなってきた。（*Am J pathol*, 1998, 153:1695-1700, *J Clin Invest*, 2001, 108:1369-1378, *J Biol Chem*, 2002, 277:19206-19212）また，星細胞の活性化の制御による肝線維化，肝硬変の治療を開発することを目標に，実験的に，血管内皮細胞増殖抑制剤，TNP-470 が肝星細胞の活性化を抑制すること（*Hepatology*. 2000, 32:980-989）や膵炎の治療薬として使用されているセリンプロテアーゼインヒビターが TGF- β の発現および活性を抑制することで，肝線維化を抑制すること（*Gastroenterology*. 2001, 120:1784-1800），さらに，組み換えアデノウイルスベクターを用いてコラーゲンプロモーターによる細胞特異的遺伝子制御により肝線維化を抑制すること（*Gastroenterology* 2005, 129:259-268, *GUT* 2007, 56:396-404, *GUT* 2007, 56:706-714）を明らかにしてきた。これら肝星細胞研究を背景として，本研究では，肝臓の臓器形成過程で肝非実質細胞との細胞間相互作用により肝実質細胞の分化誘導が促進されるという仮定のもとに，胎生期以降のマウス肝より星細胞を分離し，ヒト iPS 細胞からの肝実質細胞への誘導に利用し，新たな肝実質細胞誘導法を開発することを目標に研究を進める。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞は，多分化能を有した細胞であり，再生医療や臨床試験に応用可能な細胞である。この iPS 細胞を神経細胞や心筋細胞へ分化させる研究は進んでいるが，内胚葉系の細胞に分化させることはいまだ困難であるため，効率的な分化誘導方法の確立が望まれている。本研究では，ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させることを目指す。肝細胞は薬物代謝において重要な役割を果たすため，ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させることが可能になれば，薬物応答実験などに利用可能となる。現在，ヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化させることに成功した例がいくつか

報告されているが，これらの報告されている方法で分化誘導したとしても，必ずしも良い結果が得られるわけではなく，さらなる分化誘導方法の改善が望まれている。本研究では，ヒト iPS 細胞を肝細胞へと効率よく分化させるために，サイトカイン等刺激に加え，肝臓の非実質細胞，その中でも特に肝星細胞を利用して，新たな肝実質細胞誘導法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

MitomycinC 処理を施した MEF を gelatin でコートした 12-well plate, 24-well plate, 8-well plate に播種した。翌日，その MEF 上に適切な数のヒト iPS 細胞を播種し，ヒト ES 細胞用培地（1% non-essential amino acid, 200mM L-glutamine, 20% KSR, 0.1M 2-mercaptoethanol, bFGF (5ng/ml) を含む DMEM-F12 培地）で 7 日間培養した。その後，B27 supplement を含む RPMI に 100ng/ml の activin A を添加し 5 日間培養を行い，ヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行った。次に，低酸素条件下（4%O₂）で BMP-4 (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) を添加して 5 日間培養を行った後，HGF (20ng/ml) を添加してさらに 5 日間培養を行い，肝芽細胞への分化誘導を促した。そして，成熟肝細胞への分化誘導として酸素条件を元に戻し（20% O₂），培地を Hepatocyte Culture Medium (EGF を除き, ascorbic acid, BSA-FAF, hydrocortisone, transferrin, insulin, GA-1000 を含む HBM 培地）に交換して OncostatinM (20ng/ml) を添加し 5 日間培養を行った。RT-PCR 法及び Western blot 法による様々な肝細胞マーカー遺伝子の発現やタンパク質発現を指標に肝細胞系譜への分化誘導を検討した。上記の培養法を基準として，endoderm から hepatoblasts への誘導において hematopoietically expressed homeobox (HHEX) を温度感受性センダイウイルスベクターを用いて endoderm に強制発現させ，肝細胞への分化誘導効率を検討した。さらに，肝非実質細胞に着目し，それらをフィーダー細胞として利用することを検討し，iPS 細胞，endoderm から hepatoblasts への誘導に，MEF，ヒト肝星細胞細胞株 LX2，ラット初代培養肝星細胞をフィーダー細胞として実験を行った。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞 (未分化状態)、分化誘導を開始して 15 日目 (HGF (20ng/ml) を添加した 5 日後) の細胞及び分化誘導を開始して 20 日目 (OncoostatinM (20ng/ml) を添加した 5 日後) の細胞を用いた RT-PCR 法により肝細胞マーカー遺伝子の発現を比較することで、ヒト iPS 細胞から肝細胞系譜への分化段階の評価を行った。その結果、内胚葉系細胞マーカー遺伝子の Sox17、Pdx1、肝芽細胞マーカー遺伝子の Afp は、分化誘導開始 15 日目、20 日目に発現し、Afp では分化誘導に伴い遺伝子発現量が増加していた。また、成熟肝細胞マーカー遺伝子の Alb は、分化誘導開始 20 日目で強い発現が確認された。未分化マーカー遺伝子である Nanog は、分化誘導を開始してからも発現が確認され、薬物代謝系マーカー Cyp7a1、Cyp3a1 の遺伝子発現は確認されなかった。Western blot 法により、内胚葉系細胞マーカー FOXA2、肝芽細胞マーカー AFP、HNF4 α タンパク質は、分化誘導開始 15 日目に発現が確認され、分化誘導開始 20 日目には成熟肝細胞マーカー ALB、胆管上皮細胞マーカー CK18 タンパク質の発現が確認された。また、肝芽細胞マーカー AFP や成熟肝細胞マーカー ALB は分化誘導に伴いタンパク質発現量が増加していた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞が内胚葉、肝芽細胞を経て肝実質細胞へと分化誘導していることが明らかになった。また、HHEX を温度感受性センダイウイルスベクターを用いて endoderm に強制発現させた実験では、35 度の細胞培養で endoderm に HHEX は、強制発現され、37 度の細胞培養では、HHEX が強制発現されないことを確認した。また、hepatoblasts 誘導後には、温度感受性により 37 度の細胞培養で HHEX の発現を停止させることも確認できた。この手法により、hepatoblasts への細胞分化誘導において、hepatoblasts の分化マーカーである HNF3beta の発現を有意に増強させることが可能となった。最終的な Albumin の産生能が有意に上昇する結果には至らなかった。

iPS 細胞、endoderm から hepatoblasts への誘導に、MEF、ヒト肝星細胞細胞株 LX2、ラット初代培養肝星細胞をフィーダー細胞として実験を行ったところ、コントロールと比較してフィーダー細胞を利用すると肝

細胞への分化誘導を促進させる傾向が認められたが、その中で星細胞が特に有用であるという結果には現在至っていない。

SV40Tg マウス胎児肝からの細胞分離は、マウスの自然交配が困難なため、SV40Tg ラット胎児肝からの非実質細胞分離を試みている。

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 Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. Gut. 2012 Jan 20. [Epub ahead of print]

② Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Aug;412(1):74-9.

③ Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-beta-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. J Cell Physiol. 2011 Oct;226(10):2535-42.

④ Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. Am J Pathol. 2011 Aug;179(2):1050-60.

⑤ Miyaki T, Nojiri S, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Iio E, Takahashi S, Yan G, Ikeda K, Joh T. Pitavastatin inhibits hepatic steatosis and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats. Hepatol Res. 2011 Apr;41(4):375-85.

⑥ Imanishi H, Tsuruta D, Tateishi C, Sugawara K, Paus R, Tsuji T, Ishii M, Ikeda K, Kunimoto H, Nakajima K, Jones JC, Kobayashi H. Laminin-511, inducer of hair growth, is down-regulated and its suppressor in hair growth, laminin-332

up-regulated in chemotherapy-induced alopecia. J Dermatol Sci. 2010 Apr;58(1):43-54.

⑦ Ozawa T, Tsuruta D, Jones JC, Ishii M, Ikeda K, Harada T, Aoyama Y, Kawada A, Kobayashi H. Dynamic relationship of focal contacts and hemidesmosome protein complexes in live cells. J Invest Dermatol. 2010 Jun;130(6):1624-35.

[学会発表] (計 8 件)

1: 杉山良典 立野知世 河田則文 池田一雄 ヒトiPS細胞の肝細胞への分化誘導とiPS細胞由来肝細胞のマウス胎児肝臓への移植方法の検討 第39回日本肝臓学会西部会 平成23年12月9日岡山コンベンションセンター

2: 飯塚昌司 小川智弘 榎本大 関谷由美子 吉里勝利 池田一雄 河田則文 慢性肝疾患における肝線維化マーカーとしてのマイクロRNAの有用性 第25回肝臓洞壁細胞研究会 平成23年12月17日東京ガーデンパレス

3: Enomoto M, Ogawa T, Iizuka M, Fujii H, Tamori A, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Induction of the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis by microRNA-222 Hepatology, 54 743A-744A Nov. 6. 2011

4: 杉山良典 立野知世 吉里勝利 池田一雄 マウス胎児肝臓へのヒトiPS細胞由来肝細胞の移植方法の検討 第18回肝細胞研究会 平成23年6月24日 東京ガーデンパレス

5: 関谷由美子 小川智弘 飯塚昌司 吉里勝利 池田一雄 河田則文 miR-195の肝星細胞増殖における役割についての検討 第47回日本肝臓学会総会 平成23年6月3日東京 ホテルグランパシフィック

6: 杉山良典、富谷智明、池田一雄、小池亨、塩尻信義マウス肝臓発生過程におけるsyntaxin2の発現と肝芽細胞の増殖・分化に対する影響 第17回肝細胞研究会 平成22年6月19日 秋田アトリオン

7: 関谷由美子 小川智弘 飯塚昌司 吉里勝利 池田一雄 河田則文 I型インターフェロンのマイクロRNA発現調節を介した肝星細胞増殖抑制作用 第46回日本肝臓学会総会 平成22年5月27日山形

8: 飯塚昌司 小川智弘 関谷由美子 吉里勝利 池田一雄 河田則文 マイクロRNAによる肝星細胞のI型コラーゲン発現制御 第46回日本肝臓学会総会 平成22年5月27日山形

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/anatomy1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田一雄 (Ikeda Kazuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80275247

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

陳輝 (Chen Hui)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：70569003