

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659650

 研究課題名（和文）大規模スクリーニングシステムによる肝再生医療を実現化する  
低分子化合物の同定

 研究課題名（英文）Large-scale screening system of low molecular compounds for  
realization of regenerative medicine for liver diseases

研究代表者

汐田 剛史（SHIOTA GOSHI）

鳥取大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70263457

研究成果の概要（和文）：本研究は、間葉系幹細胞から肝細胞への分化誘導を促進する低分子化合物を抽出するために、濃度依存性に Wnt/beta-catenin シグナルに反応する細胞株#7-1-2 を得た。本細胞は、TCF モチーフを持ち、ルシフェラーゼ活性が高く、ばらつきが少なく、Wnt/beta-catenin 経路抑制性低分子化合物を選択するための細胞ベースの大規模スクリーニングシステムとして利用できる。

研究成果の概要（英文）：In order to pick up low molecular compounds which stimulate hepatic differentiate of human mesenchymal stem cells, we have developed a cell-based screening system using the #7-1-2 cells, which have TCF motif and have high luciferase activity in a dose-dependent manner, constantly and stably respond to Wnt/beta-catenin signals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：肝臓学

キーワード：間葉系幹細胞、肝細胞分化誘導、Wnt/beta-catenin 経路、細胞ベース測定系、ルシフェラーゼアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌による年間死亡者数は約32,000名に上り、わが国では肺癌、胃癌に次いで3番目に多い悪性腫瘍である。肝細胞癌、肝硬変、劇症肝炎などの致死性の重症肝疾患の年間発生数は年間42,000名に達し、うち肝移植適応患者数は2,300名と推定されているが、実際には約500名が肝移植を受けているに過ぎない。肝移植後の5年生存率は70%を超え、好成績を収めているが、慢性的なドナー不足により肝移植を行えないというのが実情である。肝移植治療の優れた点を継承する治療法として、再生医療が期待されている。

しかし、肝細胞移植に必要な大量のヒト肝細胞を安定して供給するのは困難であり、肝臓以外の細胞源より肝臓機能を有する細胞を

効果的な方法で投与することが必要である。間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪細胞に分化する細胞であるが、胚葉を越えて分化できる分化可塑性を利用し、肝細胞へ分化し再生医療へ使用されることが期待される。

重症肝疾患の治療には、肝移植の優れた点を継承し、ドナー不足の欠点を補う治療法として、幹細胞を利用した再生医療の開発が期待される。ヒト間葉系幹細胞を肝細胞分化させる報告は存在し、数種類のサイトカインの投与により達成されると報告されている。

我々は以前ヒト間葉系幹細胞の細胞内 Wnt/beta-cateninシグナルの抑制により肝細

胞分化が誘導されると報告した (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293, G1089-98, 2007)。そこで、Wnt/beta-catenin シグナル抑制性の低分子化合物の中から、間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する 3 種類の低分子化合物を同定した。うち、2 化合物は我々が新規に合成した化合物である (特願 2012-092948, 特願 2011-091599)。ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化を誘導する 3 種類 Wnt/beta-catenin 経路抑制性低分子化合物は、ヘキサクロロフェンと HC-1、IC-2 である。HC-1 はヘキサクロロフェンの側鎖を改変した誘導体であり、IC-2 は ICG-001 の側鎖を改変した誘導体である。ヘキサクロロフェン、ICG-001 は、ヒト大腸癌細胞の Wnt/beta-catenin 経路抑制性を有している。

われわれは、ヒト間葉系幹細胞を Wnt/beta-catenin シグナル抑制性の低分子化合物により分化誘導した細胞を細胞シートとして肝表面に移植する方法を考案した。申請者は、Wnt/beta-catenin 経路抑制性の低分子化合物がヒト間葉系細胞を肝細胞分化誘導能を有することを見出したことから、ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する低分子化合物をスクリーニングするためのシステム開発のため、ハイスループットの細胞ベースのスクリーニングを可能とする細胞を樹立する必要性を認識し、今回の研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

重症肝疾患の治療には、肝移植の優れた点を継承し、ドナー不足の欠点を補う治療法として、幹細胞を利用した再生医療の開発が期待される。ヒト間葉系幹細胞は分化可塑性を有し、肝細胞への分化が可能である。事実、間葉系幹細胞は肝細胞へ分化誘導するため、数種類のサイトカインの投与により達成されると報告されている。我々は以前にヒト間葉系幹細胞の細胞内 Wnt/beta-catenin シグナルの抑制により肝細胞分化が誘導されると報告した。そこで、Wnt/beta-catenin シグナル抑制性を指標として、肝細胞分化誘導能をもつ低分子化合物を見出すことが可能であることを認めた。事実、Wnt/beta-catenin シグナル抑制性の低分子化合物の中から、間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する 3 種類の低分子化合物を同定した。ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化を誘導する 3 種類の Wnt/beta-catenin 経路抑制性低分子化合物は、ヘキサクロロフェンと HC-1、IC-2 である。HC-1 はヘキサクロロフェンの側鎖を改変した誘導体であり、IC-2 は ICG-001 の側鎖を改変した誘導体である。

そこで、多数の低分子化合物から肝細胞分化誘導能をもつ化合物をスクリーニングするためのシステムを構築するために、鋭敏なスクリーニング用の細胞株を樹立することを目的とする。これにより、肝再生医療の推進のため、ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化誘導を促進する Wnt/beta-catenin 経路抑制性化合物の大規模スクリーニングが可能となる。

## 3. 研究の方法

① Wnt/beta-catenin 経路抑制性化合物のスクリーニングは間葉系幹細胞に Wnt/beta-catenin に鋭敏に反応する細胞ベースのスクリーニング法が適当であると考えた。

② 細胞ベースの鋭敏なスクリーニング法の開発のため、ヒト間葉系幹細胞として、ヒト骨髄間葉系幹細胞に、hTERT 遺伝子などが安定導入され、不死化細胞株である UE7T-13 細胞を使用した。本細胞は、間葉系幹細胞の性質を保ちながら、安定に増殖できる細胞である。

③ Wnt/beta-catenin シグナルに反応するシステムととして、beta-catenin が核内移行したのち、結合する DNA 上で必要な TCF モチーフに着目した。すなわち、CMV プロモーター上流に 3 回繰り返しの TCF モチーフを有し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のプラスミドを構築した。

④ 上記③のプラスミドを、ヒト間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞へ安定導入した細胞株の樹立を行った。

⑤ 得られたクローンのルシフェラーゼレポーター活性を測定し、最も活性が高く、かつ Wnt/beta-catenin シグナル抑制性化合物であるヘキサクロロフェンを用い、ヘキサクロロフェンの濃度依存性にルシフェラーゼレポーター活性の減少するクローンの選択を意図した。活性の測定は、細胞播種後 24 時間後に行った。

## 4. 研究成果

①2011 年に、ヒト間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞に CMV プロモーター上流に TCF モチーフの 3 回繰り返し配列をもつプラスミドを安定導入し、多数の細胞株を得た。しかし、幾つかの問題点があった。一つには、レポーター活性のバラツキである。そこで以下の改善を行った。

(1) 1 ウエル当たりの細胞数を 2,000 個に増加

させる。

(2) マルチドロップを使用し、播種細胞数のバラツキを軽減する。

(3) 細胞周期を同調させるため、ハイドロキシウレアやコルヒチンを使用した。また、無血清培地を使用する試みを行った。

以上の工夫により、バラツキを軽減することは可能となったが、Wnt/beta-catenin シグナルの抑制に鋭敏に反応する細胞を樹立しなくては、Wnt/beta-catenin シグナル抑制性の低分子化合物はスクリーニングできないと考えられた。

②2012年に、申請者はヒト間葉系幹細胞 UE 7T-13 細胞に TCF モチーフを持つルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定導入した細胞株を多数作製し、感度よく反応し、かつ用量依存性に反応する細胞株の樹立を目的として、さらに検討を行った。

#### ③導入条件の検討

まず、導入条件から検討した。遺伝子導入は、エレクトロポレーションにより行った。1x10<sup>6</sup> の 6 乗細胞を 400 マイクロ l のキュベット内で、20 マイクロ g のプラスミド DNA を、240V、1500 マイクロ F のシングルパルスにより導入した。導入後、細胞は 2ml 培養液に混入し、10ml 培養皿で培養した。

薬剤選択はピューロマイシンにより、0.25 マイクロ g/ml の濃度で培養し、ピューロマイシン耐性細胞を選択した。この操作により、193 クローンを得た。

#### ④クローンを選択

これらのクローンについて、ルシフェラーゼアッセイを行った。そのうち、特に代表的な 20 クローンを選択し、1%血清中でルシフェラーゼレポーター活性を検討した。陽性対照として、Wnt/beta-catenin シグナル抑制性化合物であるヘキサクロロフェンを用いた。活性の測定は、細胞播種後 24 時間後に行った。

ヘキサクロロフェンの濃度を 0、2.5、5.0、10.0 マイクロ M で変動させ、各濃度を n=3 でルシフェラーゼレポーター活性を測定した。その結果、ヘキサクロロフェンの濃度依存性にルシフェラーゼレポーター活性が低下する細胞株として、#6-1-2、#7-2-1、#7-1-8、#7-1-2、#6-2-9、#5-2-1、#2-18 の 7 種類の細胞を選択した。

#### ⑤最良クローンを選択

ヘキサクロロフェンの濃度依存性にルシ

フェラーゼレポーター活性が低下する細胞株として、#6-1-2、#7-2-1、#7-1-8、#7-1-2、#6-2-9、#5-2-1、#2-18 の 7 種類の細胞を選択したが、その中で、最も活性と高く、かつヘキサクロロフェンの濃度依存性にルシフェラーゼレポーター活性が低下する細胞株として、#7-1-2 細胞株が得られた。#7-1-2 細胞株は、ヘキサクロロフェンの濃度 0、2.5、5.0、10.0 マイクロ M でほぼ直線的にルシフェラーゼレポーター活性が低下した。これにより、大規模スクリーニングに用いる細胞株が得られ、スクリーニングシステムが完成した。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

汐田 剛史 (SHIOTA GOSHI)

鳥取大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70263457

(2)研究分担者

1. 星川 淑子 (Hoshikawa Yoshiko)

鳥取大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10181489

2. 神吉 けい太 (Kanki Keita)

鳥取大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10516876

(3)連携研究者

なし

研究者番号：