

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670585

研究課題名(和文)ヒトiPS細胞由来肝臓の成熟過程の解析を目指したライブイメージング系の構築

研究課題名(英文)Visualization of functional hepatic cells derived from human iPS cells.

## 研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

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)：本研究ではノックインiPS細胞を作製するためのiPS細胞培養のフィーダーフリー化、トランスフェクション条件の検討を実施し、最適な条件を決定した。次にヒトiPS細胞で恒常的に蛍光タンパク質を発現するiPS細胞を複数樹立し、分化誘導後も発現が維持されることを確認した。さらに、分化マーカーに対するノックイン細胞を樹立し、当初予定していた肝分化状態を可視化可能なノックインiPS細胞の樹立に成功した。今後作製した細胞を用いてiPSC肝芽のより最適な作製時期の評価などに使用出来ると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated feeder-free iPS cell culture condition for producing a knock-in iPS cells, and evaluated optimal transfection conditions. Next, we established the knock-in iPS cells constitutively express a fluorescent protein. It was confirmed that the knock-in iPS cell clone expressed fluorescent protein even after differentiation induction. Furthermore, we succeeded to establish a knock-in iPS cells targeted for the hepatic differentiation marker gene. The established iPS cell could be useful to determine the optimal timing of hepatic cells for producing iPSC-liver bud toward clinical applications.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：再生医療 細胞・組織

### 1. 研究開始当初の背景

世界に衝撃をもたらした iPS 細胞の誕生以来、再生医療応用へ向けた期待が高まっている。こうした背景から、iPS 細胞から機能的な細胞へ分化誘導するための研究は世界的に競争が激化している。我々は世界で初めて、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝内胚葉細胞と、内皮細胞、間葉系細胞を最適な比率で混ぜ合わせることで、肝臓の基となる 3 次元組織(ヒト iPSC 肝芽)を in vitro 培養条件下で創出することに成功した(*Nature* 2013)。このことから立体臓器創出に最適なヒト iPS 由来細胞の機能検証を実施できるのは応募者のみであり、ノックイン iPS 細胞を用いて立体臓器創出に最適なヒト iPS 由来細胞を明らかにすることは再生医療実現化へ向けた次のブレイクスルーのために必須の研究課題である。しかしながら、ノックイン iPS 細胞を作製するために必要なヒト細胞でのゲノム編集は、チャレンジングな試みである。

### 2. 研究の目的

本研究では効率よいヒト iPSC 肝芽製造を目指し、ノックイン ヒト iPS 細胞の樹立による肝内胚葉細胞マーカーの特定を試みる。

ヒト細胞、特にヒト iPS 細胞でのノックインは極めて効率が悪いことが知られている。ヒト iPS 細胞に恒常的に蛍光タンパク質を発現するノックインヒト iPS 細胞や肝内胚葉細胞特異的なマーカー遺伝子に蛍光レポータータンパク質を発現する、蛍光遺伝子ノックインヒト iPS 細胞の樹立は、ヒト肝内胚葉細胞をより分けるための強力なツールとなり得る独創性が高く挑戦的な研究課題である。

### 3. 研究の方法

複数のヒト iPS 細胞株を対象に TALEN 法による蛍光タンパク質発現遺伝子のノックインを実施した。また、CRISPR/CAS9 法を用いた組み換え効率と TALEN 法での組み換え効率の比較も行った。組み換えの対象遺伝子は iPS 細胞から分化誘導した細胞まで恒常的に遺伝子発現が可能な AAVS-1 遺伝子座への組み換えの他、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析などによって抽出した分化マーカー遺伝子を対象とした。組み換え体の選別はピューロマイシン耐性遺伝子をベクターに導入し、ピューロマイシン耐性の獲得によって濃縮を行い、PCR およびザンガー法によるシーケンス解析により組み換えを確認した。得られた組み換え体については肝細胞への分化誘導能の有無を確認した。

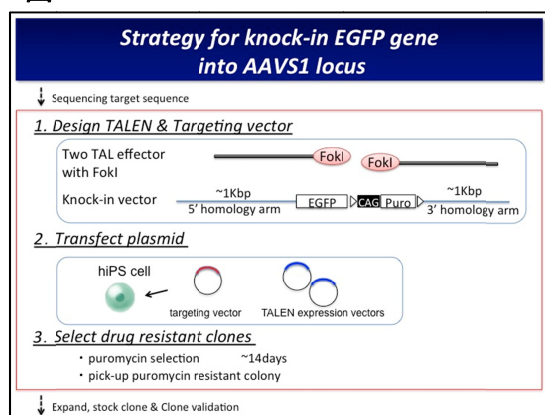
### 4. 研究成果

まず、ヒト iPS 細胞において遺伝子組み換えを実施する上で、各種手法を文献等の検索により検討した。文献により対象とする細胞や対象遺伝子等に違いがあるため効率は異なるが、TALEN 法あるいは Zincフィンガー法では従来方と比べ、高率に組み換えが可能であること、Zincフィンガー法では 3塩基を認識するジンクフィンガーモチーフを数個つないで標的配列への特異性を発揮させるのに対し、TALEN 法では 1塩基単位で認識することが可能であるため、目的とする配列を適確に切断することが可能である。このことから TALEN 法を用いたノックインを試みた。

具体的な作業手順としては標的遺伝子と蛍光タンパク質発現遺伝子(この場合 EGFP)のアミノ酸のフレームが合うようにターゲティングベクターを構築し、組み換え部位が切断されるように 1 対の TALEN を設計する。それぞれ発現ベクターに導入し、iPS 細胞にトランスフェクションし薬剤選別後、増殖するコロニーを取得、解析し相同組み換え体を得る(図 1)。

まず、iPS 細胞を薬剤選別するためにフィーダー細胞としてマウス線維芽細胞(MEF)上で培養していた従来法からフィーダーフリーの方法での培養法を検討し、全ての培養をフィーダーフリーで実施した。また、トランスフェクションの方法と条件を検討し、高率に遺伝子導入出来る方法を決定した。

図 1



検討した条件を用いて AAVS1 遺伝子座への EGFP 遺伝子の導入結果、複数の組み換え体を得られた。EGFP の他、mCherry および EBFP も同様にターゲティングベクターを構築し、組み換え体を取得した(図 2)。また、CRISPR/CAS 法でも同じ標的配列に対して同じターゲティングベクターを用いて組み換えを試みたところ、相同組み換え体は得られ

たものその効率は約 1/10 程度であった(図 3)。

図 2

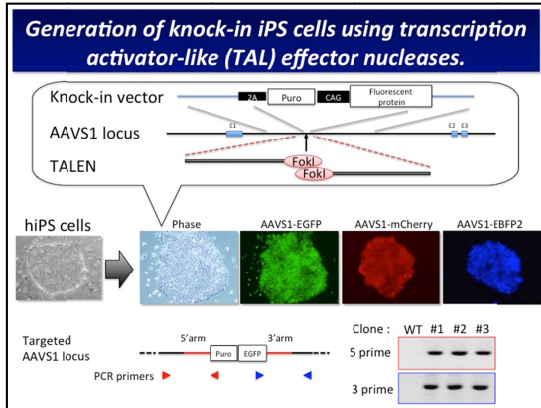
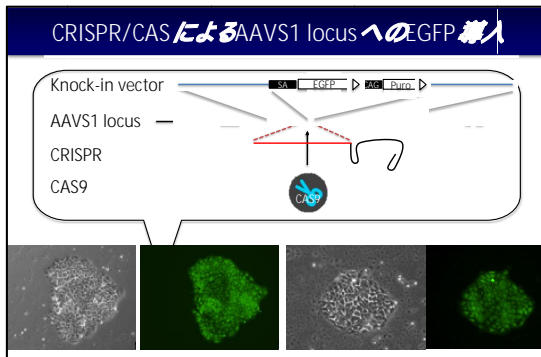
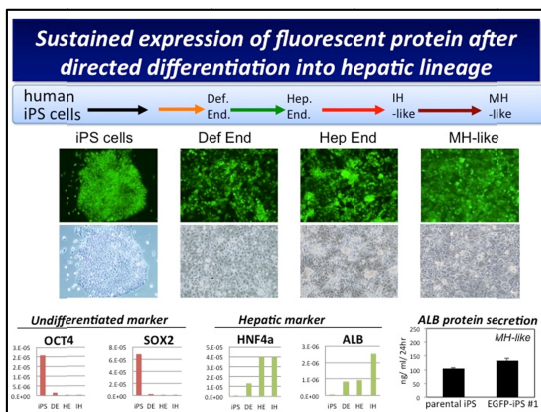


図 3



次に、樹立した組み換え iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導したところ、分化誘導しても EGFP の恒常的な発現が確認出来た(図 4)。

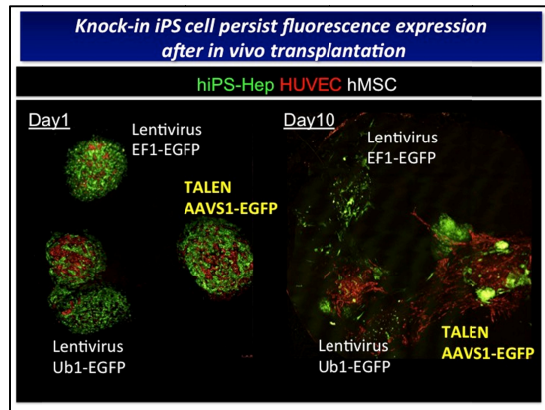
図 4



そこで、次にノックイン細胞から作製した iPS 肝芽と複数のレンチウイルスプロモーターを用いて蛍光タンパク質を発現させた iPS 細胞から作製した iPS 肝芽を免疫不全マウスをに対して in vivo での経時観察が可能なクラニアルウィンドウを作製し移植した。その結果、レンチウイルスで蛍光タンパク質を発現させた iPS 肝芽は移植当初はノックイン細胞と同程度の蛍光を発現していたが、移植 10 日目の時点で蛍光強度の低下が見られ

た。一方で、ノックイン細胞では蛍光の発現が維持されていた。このことから、ノックイン細胞を作製する重要性/有効性が示唆される。

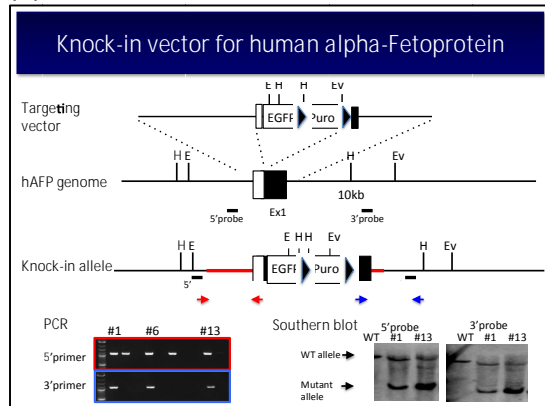
図 5



次にマイクロアレイ解析により分化マーカーの選別を行い、特にヒト iPSC 肝芽作製に適切なタイミングと考えられる肝内胚葉細胞 (HE) から未成熟肝細胞 (IH) の時期に発現が上昇する AFP 遺伝子および HNF4 遺伝子に対して組み換えを試みた。

その結果、AFP に対しては複数の組み換えクローンを取得した。組み換え体は PCR およびサザンブロット法により確認した(図 6)。一部のクローンでは 5' 側の正確な組み換えが行われ、3' 側の 5' 側の組み換えが組み換えが確認出来ないクローンも存在した。一方で、HNF4 に対しては標的領域の 3' 側のみが適確に組み換えが行われ 5' 側の組み換えが適切に行われず、5' 側の配列が削られていると考えられるクローンのみが取得された。HNF4 遺伝子については配列の GC 比率が高い領域が多いため、遺伝子が高次構造を取り、目的とする組み換えが起こらなかった可能性が考えられ、組み換え領域を変えるなど今後の検討が必要である(図 7)。

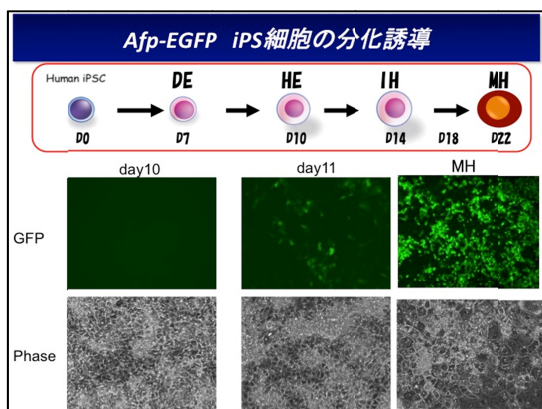
図 6





取得した AFP 組み換え iPS 細胞を分化誘導し、蛍光タンパク質の発現を確認したところ、HE の前後より発現が見られ、成熟肝細胞(MH)に分化するにつれ発現強度が増すと共に、発現細胞が増加した。この結果は AFP 遺伝子の遺伝子発現を適確に反映している。

図 7



以上、本研究では当初予定していた肝分化状態を可視化可能なノックイン iPS 細胞の樹立に成功した。今後作製した細胞を用いて iPS 肝芽のより最適な作製時期の評価などに使用出来ると期待される。また、CRISPR/CAS 法については世界的に様々な改良が施されており、今後ノックイン iPS 細胞を作製する際には今一度 CRISPR/CAS 法の有効性について検討することが望ましいと考えられる。

#### 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 12 件)

Efficient hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells in a three-dimensional microscale culture.

Zhang RR, Takebe T, Miyazaki L, Takayama M, Koike H, Kimura M, Enomura M, Zheng YW, Sekine K, Taniguchi H.

*Methods Mol Biol.* 1210:131-41. (2014)

doi: 10.1007/978-1-4939-1435-7\_10. 査読有り

Polycomb group protein Ezh2 regulates hepatic progenitor cell proliferation and differentiation in murine embryonic liver.

Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Nakata S, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H.

*PLoS One.* 9(8):e104776. (2014)

doi: 10.1371/journal.pone.0104776. 査読有り

Okuda R, Sekine K, Hisamatsu D, Ueno Y, Takebe T, Zheng YW, Taniguchi H.

Tropism of cancer stem cells to a specific distant organ

*In Vivo* 28(3):361-5. (2014)

http://iv.iiarjournals.org/content/28/3/361.abstract 査読有り

Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, Li B, Takebe T, Zhang RR, Sakurai Y, Ueno Y, Sekine K, Ishibashi N, Imajima M, Tanaka T, Taniguchi H.

The CD133+CD44+ Precancerous Subpopulation of Oval Cells is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma

*Stem Cells De.* 23:2237-49. (2014)

doi: 10.1089/scd.2013.0577 査読有り

Sekine K, Takebe T, Taniguchi H.

Fluorescent labeling and visualization of human induced pluripotent stem cells with the use of transcription activator like effector nucleases

*Transplant Proc.* 46(4):1205-7. (2014)

doi: 10.1016/j.transproceed.2014.02.003 査読有り

Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S, Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono KI, Koseki H, Taniguchi H.

Ring1B promotes hepatic stem/progenitor cell expansion via simultaneous suppression of Cdkn1a and Cdkn2a.

*Hepatology.* 60(1):323-33(2014)

doi: 10.1002/hep.27046. 査読有り

Takebe T, Koike N, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW, Taniguchi H.

Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks.

*Organogenesis.* 10(2):260-7. (2014)

doi: 10.4161/org.27590. 査読有り

Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Koike N, Sekine K, Taniguchi H

Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.

*Nature Protocols* 9, 396-409 (2014)

doi: 10.1038/nprot.2014.020. 査読有り

Zheng YW, Nie YZ, Tsuchida T, Zhang RR, Aoki K, Sekine K, Ogawa M, Takebe T, Ueno Y, Sakakibara H, Hirahara F, Taniguchi H. Evidence of a sophisticatedly heterogeneous population of human umbilical vein endothelial cells.

*Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1251-3

doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.077.

査読有り

Zhang R, Takebe T, Sekine K, Koike H, Zheng Y, Taniguchi H.  
Identification of proliferating human hepatic cells from human induced pluripotent stem cells.  
*Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1201-4.  
doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.021.  
査読有り

Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H.  
The development of humanized liver with Rag1 knockout rats.  
*Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1191-3  
doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.026.  
査読有り

Takahashi Y, Takebe T, Enomura M, Koike N, Lee S, Nemeno JG, Sekine K, Lee JI, Taniguchi H.  
High-resolution intravital imaging for monitoring the transplanted islets in mice.  
*Transplant Proc.* 2014 May;46(4):1166-8.  
doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.089.  
査読有り

〔学会発表〕(計 17 件)

関根圭輔, J. Gray Camp, Barbara Treutlein, 武部 貴則, 谷口 英樹  
シングルセル RNA シークエンスによる iPS 細胞由来肝細胞のポピュレーション解析  
第 15 回日本再生医療学会総会  
2016 年 3 月 17-19 日  
大阪国際会議場(大阪府)

高橋 禎暢, 武部 貴則, 小池 直人, 関根 圭輔, 谷口 英樹  
血管化膵島移植による革新的糖尿病治療法の確立  
第 15 回日本再生医療学会総会  
2016 年 3 月 17-19 日  
大阪国際会議場(大阪府)

佐藤準也, 奥田諒, 濱中香織, 高橋正希, 関根圭輔, 上野康晴, 谷口英樹  
膵癌の微小環境を有する膵癌オルガノイドの創出  
第 15 回日本再生医療学会総会  
2016 年 3 月 17-19 日  
大阪国際会議場(大阪府)

Sekine K, Takebe T, Taniguchi H  
Generation of functional human liver from pluripotent stem cell  
German Association for the Study of the Liver (GASL) workshop  
2016 年 1 月 21-22 日

Düsseldorf, Germany

関根圭輔  
iPS 細胞を用いた代謝性臓器の再生医療  
第 30 回日本整形外科学会基礎学術総会 シンポジウム  
2015 年 10 月 22 日-23 日  
富山市民プラザ(富山県)

Okuda R, Sekine K, Hamanaka K, Taniguchi H.  
Metastatic tropism of pancreatic cancer stem cells to a specific distant organ.  
The Biology of Cancer: Microenvironment, Metastasis & Therapeutics. May.12-16, 2015 USA.

Okuda R, Sekine K, Sun L, Hamanaka K, Taniguchi H.  
Pdx1+ cells behave as pancreatic cancer stem cells with high tumorigenicity and metastatic potential  
第 74 回日本癌学会学術総会  
2015 年 10 月 8-10 日  
名古屋国際会議場(愛知県)

奥田諒, 関根圭輔, 孫略, 濱中香織, 谷口英樹  
膵癌モデルマウスを用いた膵癌幹細胞の細胞系譜的解析  
第 38 回日本分子生物学会  
2015 年 12 月 2 日  
神戸ポートアイランド(兵庫県)

濱中香織, 奥田諒, 関根圭輔, 谷口英樹  
膵癌転移における微小環境と癌幹細胞の相互作用の解析  
第 14 回日本再生医療学会総会  
2015 年 3 月 19-21 日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

関根圭輔, 奥田諒, 久松大介, 濱中香織, 谷口英樹  
遺伝子改変モデル動物を用いた膵癌幹細胞の機能解析  
第 41 回日本臓器保存生物医学学会学術集会  
シンポジウム(4)「Cancer Biology」  
2014 年 11 月 28 日-29 日  
千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

泉陽彦, 竹歳卓人, 関根圭輔, 奥田諒, 濱中香織, 谷口英樹  
膵癌幹細胞の転移における特定臓器への指向性  
第 14 回日本再生医療学会総会  
2015 年 3 月 19-21 日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

武部貴則, 関根圭輔, 谷口英樹  
iPS 細胞を用いた代謝性臓器の再生医療

第 14 回日本再生医療学会総会  
2015 年 3 月 19-21 日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

Nie YZ, Zheng YW, Zhang RR, Tsuchida T,  
Ueno Y, Sekine K, Takebe T, Taniguchi H  
A novel system with human liver features  
for screening anti-hepatitis B virus  
therapeutics

第 14 回日本再生医療学会総会  
2015 年 3 月 19-21 日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

関根圭輔、奥田諒、久松大介、濱中香織、  
谷口英樹  
遺伝子改変モデル動物を用いた膵癌幹細胞  
の機能解析

第 41 回日本臓器保存生物医学会学術集会  
(招待講演) 2014 年 11 月 28-29 日  
千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

関根圭輔、奥田諒、久松大介、谷口英樹  
Identification and characterization of  
Pdx1+ pancreatic cancer stem cell during  
pancreatic tumorigenesis

第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25-  
27 日 パシフィコ横浜(神奈川県)

奥田諒、関根圭輔、久松大介、孫略、濱中  
香織、谷口英樹

Identification of pancreatic cancer stem  
cell lineage during pancreatic  
tumorigenesis

第 73 回日本癌学会学術総会  
2014 年 9 月 25- 27 日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

久松大介、奥田諒、関根圭輔、濱中香織、  
上野康晴、谷口英樹

スフィア形成能を有する膵癌幹細胞の解析

第 73 回日本癌学会学術総会  
2014 年 9 月 25- 27 日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：血液細胞を用いた組織・臓器の作製方  
法

発明者：谷口英樹、武部貴則、関根圭輔、鄭  
允文、轟運中

権利者：同上

種類：特許

番号：2015-251140

出願年月日：2015 年 12 月 24 日

国内外の別：国内

名称：癌微小環境を再現できる癌組織の再構  
築法

発明者：谷口英樹、関根圭輔、上野康晴、奥  
田諒、武部貴則

権利者：同上

種類：特許

番号：2016-53074

出願年月日：2016 年 03 月 16 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

### (2) 研究分担者

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20612625

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：