

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860529

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝・前駆細胞の増殖分化の分子メカニズム

研究課題名(英文) Characterization and expansion mechanisms of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells

研究代表者

鶴谷 康太 (TSURUYA, Kota)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00725377

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)：肝前駆細胞は高い増殖能と肝細胞・胆管細胞への分化能を有している。本研究は細胞表面分子に注目し、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の性状の解析と増殖機構の解明を目的とした。肝前駆細胞のマーカーであるCD13、CD133に対する抗体と、様々な細胞表面分子に対する抗体を共染色し、その発現を解析した。

本研究ではヒトiPS細胞由来CD13+CD133+細胞の表面分子の発現プロファイルを明らかとし、IGF-1R、EGFR、erbB2、Fn14が強発現する新規肝前駆細胞マーカーであることを見出した。さらに、IGFやTWEAKがヒトiPS細胞由来CD13+CD133+細胞の増殖を制御していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Hepatic stem/progenitor cells in liver development have a high proliferative potential and the ability to differentiate into both hepatocytes and cholangiocytes. In this study, we focused on the cell surface molecules of human induced pluripotent stem(iPS) cell-derived hepatic progenitor-like cells and analyzed how these molecules modulate expansion of these cells. Human iPS cells were differentiated into immature hepatic lineage cells by cytokines. In addition to hepatic progenitor markers (CD13 and CD133), the cells were co-immunostained for various cell surface markers and analyzed. This study revealed the expression profiles of cell surface molecules in CD13+CD133+ cells derived from human iPS cells. Moreover, IGF-1R, EGFR, erbB2, and Fn14 were highly expressed, and IGF and TWEAK were important for proliferation in CD13+CD133+ cells derived from human iPS cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：iPS細胞 肝前駆細胞 細胞表面分子

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は体内最大の臓器であり、代謝・合成・排出・解毒などを司り、恒常性の維持において重要な役割を担っている。また、肝臓は特徴的な高い再生能力を有しており、通常の再生時には機能細胞である成熟肝細胞が一時的に肥大・増殖し、元の臓器の機能・大きさを回復する。しかしながら、劇症肝炎や慢性肝疾患の終末像である肝硬変により肝臓の構造と機能を修復できないほどに損傷すると肝不全を呈する。肝不全の根治療法として肝移植が有効であるが、脳死ドナーがいまだ少ない本邦は慢性的なドナー不足の状態であり、高度な手技・合併症の点もあり、普及が困難となっている。

そこで、肝不全に対する細胞移植療法や創薬における肝毒性評価などに、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS) より誘導した肝臓系細胞を利用することが期待されている。成熟肝細胞は生体外では増殖能力に乏しいが、肝前駆細胞は高い増殖能と、肝細胞への分化能を持つため、肝前駆細胞を試験管内で効率的に増殖する技術が開発されれば、肝前駆細胞から肝細胞への分化誘導技術と組み合わせることによって、大量の機能的肝細胞の供給が可能になる。これまでに hiPS 細胞より分化誘導した CD13 (aminopeptidase N) と CD133 (Prominin 1) 両陽性分画に、高増殖性で肝細胞・胆管系細胞への 2 方向分化能をもつ肝前駆細胞が濃縮されていることが明らかになっている。(Yanagida A, Kamiya A, et al. *PLoS One*, 2013)

## 2. 研究の目的

次世代の hiPS を用いた細胞移植や肝毒性評価の実現に向けて、hiPS 由来肝臓系細胞を生体外で効率的に増殖させる培養系が必要である。CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>画分の細胞の全てが一様に肝前駆細胞としての性質をもつ

のかは未だ不明である。また、得られた CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞を in vitro で増殖させる過程で様々な細胞表面マーカーの発現の変化が見られ、培養系の中で細胞集団の性質やポピュレーションの変動が生じることを見出した。そこで、分化・培養過程における細胞表面マーカーの変化の網羅的解析を行うことで、hiPS 由来肝前駆細胞をより効率的に増幅するための特異的分子の探索を行うとともに、未分化性を維持しつつ増殖するために必要なシグナルの解析を行った。

## 3. 研究の方法

hiPS 細胞を、液性因子の連続添加 (Activin A, FGF, BMP および HGF) によって肝臓系細胞へと誘導した後に、CD13、CD133 に対する抗体と、様々な細胞表面分子に対する抗体をそれぞれ共染色し、フローサイトメトリーを用いて網羅的に解析した。CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>分画において不均一な発現を示す表面分子を用いて陽性分画と陰性分画へと分離し、フィーダー細胞 (mouse embryonic fibroblasts; MEF) 上に播種した後、EGF、HGF 存在下でコロニー形成アッセイを行った。また、CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞で強く発現する細胞表面分子については、CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞の継代培養での発現変動を解析した。さらに、増殖に関与すると考えられる受容体に対するリガンドや特異的阻害剤・ブロッキング抗体を添加し、コロニー形成アッセイを行い増殖性の評価を行った。

## 4. 研究成果

前駆細胞のマーカーである CD13、CD133 に対する抗体と、様々な細胞表面分子 (116 種) に対する抗体をそれぞれ共染色し、hiPS 細胞由来 CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>肝前駆細胞の細胞表面分子の発現プロファイルを明らかとした。CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>分画において不均一に発

現する細胞表面分子の有無を比較しコロニー形成能を検討したが、明らかな増殖能の変化はみられなかった。

スクリーニングの結果、20種の細胞表面分子が、ヒト iPS 細胞由来 CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞において強く発現していた。この中にはいくつかのシグナル伝達受容体が含まれていた。これらの細胞表面分子の中で、CD221 (インスリン様増殖因子-1 受容体) は *in vitro* における長期培養にてその発現が低下した。一方、CD221 を強制発現すると、コロニー形成細胞数の増加を認めた。そこで、CD221 に対するブロッキング抗体や特異的阻害剤を添加するとコロニー形成能は低下した。また、強く発現する細胞表面分子の中で、CD340(erbB2)や CD266(fibroblast growth factor inducible 14; Fn14)を介するシグナルを阻害するとコロニー形成能が低下した。そして、インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor; IGF) や Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) が MEF との共培養系にて供給され、増殖に寄与していることを示した。

#### 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1件)

1. Kota Tsuruya, Hiromi Chikada, Kinuyo Ida, Kazuya Anzai, Tatehiro Kagawa, Yutaka Inagaki, Tetsuya Mine, Akihide Kamiya. A paracrine mechanism accelerating expansion of human induced pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor-like cells. **Stem cells and Development**, 24, 1691-1702, 2015. doi: 10.1089/scd.2014.0479. 査読有り

[学会発表](計7件)

1. Kazuya Anzai, Kota Tsuruya, Kinuyo Ida, Hiromi Chikada, Tatehiro Kagawa, Akihide Kamiya, Tetsuya Mine. Identification of

mechanism regulating characters of stem/progenitor cells during liver development. APASL 2016, 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (平成 28 年 2 月 22 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都港区)

2. Kazuya Anzai, Kota Tsuruya, Kinuyo Ida, Hiromi Chikada, Tatehiro Kagawa, Tetsuya Mine, Akihide Kamiya. Identification of mechanism regulating characteristics of stem/progenitor cells during liver development. The Liver Meeting 2015 - AASLD (14 November, 2015. San Francisco, USA)

3. 安齋和也、鶴谷康太、紙谷聡英、荒瀬吉孝、広瀬俊治、加川建弘、白石光一、峯徹哉 「マウス胎児由来肝前駆細胞の成体型肝前駆細胞への形質変化」 第 19 回日本肝臓学会大会 (平成 27 年 10 月 9 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都港区)

4. 紙谷聡英、鶴谷康太、近田裕美 「ヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞の誘導と性状解析」 第 22 回肝細胞研究会 (平成 27 年 6 月 4 日、米子コンベンションセンター、鳥取県米子市)

5. Kota Tsuruya, Hiromi Chikada, Kinuyo Ida, Kazuya Anzai, Yoshitaka Arase, Shunji Hirose, Koichi Shiraishi, Tatehiro Kagawa, Tetsuya Mine, Akihide Kamiya. Characterization and expansion mechanisms of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells. The Liver Meeting 2014 - AASLD (11 November, 2014. Boston, USA)

6. 紙谷聡英、柳田絢加、近田裕美、鶴谷康太、中内啓光 「ヒト多能性幹細胞からの

肝前駆細胞の誘導法の確立」組織培養学会  
第87回大会（平成26年5月29日、星稜会館、  
東京都千代田区）

7. 鶴谷康太、安斎和也、荒瀬吉孝、広瀬俊  
治、加川建弘、峯徹哉 「ヒトiPS細胞由来  
肝幹・前駆細胞における特異的分子と増殖  
メカニズムの解明」第50回肝臓学会総会  
（平成26年5月29日、ホテルニューオータニ、  
東京都千代田区）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○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

鶴谷 康太 (TSURUYA, Kota)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00725377

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし