

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

間葉系幹細胞に由来する  
ヒト肝細胞の移植に関する基盤開発研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 落谷 孝広

平成18（2006）年4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
間葉系幹細胞に由来するヒト肝細胞の移植に関する基盤開発研究		
落谷 孝広	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 肝細胞の遺伝子発現解析		
畑田 出穂	-----	5
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	7

## 間葉系幹細胞に由来するヒト肝細胞の移植に関する基盤開発研究

主任研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室 室長

研究要旨：初年度の成果として、すでに間葉系幹細胞から分化させたヒト肝細胞の形態観察、主要な肝臓特異的遺伝子の発現、アルブミン産生や糖代謝などの基礎的な解析を終了した。さらに初年度の重要な研究成果として、このヒト肝細胞をSCIDマウスに移植した結果、細胞は宿主の肝臓に無事生着し、周囲の肝組織に順化することが確認できた。短期間での毒性等の問題は、移植マウスには生じなかった。これらの結果より、本研究で用いるステム細胞から分化誘導した肝細胞は、ヒトの本来の肝細胞の形態や機能を良く保持していることが示唆された。

分担研究者：畑田出穂

群馬大学遺伝子解析施設 助教授

### A. 研究目的

生物が元々有していると考えられている自己再生能力を最大限に引き出し、難病治療に対する新しい手法の確立として、再生医学の分野が注目されている。特に近年では受精卵から樹立された胚性幹細胞(ES細胞)よりも、倫理面や安全性などの理由から、生体内に存在している体細胞由来の幹細胞が脚光を浴びており、多くの研究機関で幹細胞の分離や同定、そして多分化能について明らかにされつつある。体細胞由来の代表的な幹細胞として、骨髄細胞が挙げられ、実際に医療の現場で白血病や血管新生の治療材料として既に使用されている経緯がある。また一方で、この骨髄細胞由来幹細胞には血球系のみでは無く、生体を構成している様々な組織や細胞へと分化する能力を有している細胞群の存在が示唆されている。その中心的な細胞の一つとして、全骨髄細胞中に約 0.001 から 0.01%含まれている間葉系幹細胞(CD105(+), CD166(+), CD31(-), CD34(-))が同定され、国内外で速戦的な再生医療への応用化を目指して研究が勢力的に進められている。この骨髄細胞由来間葉系幹細胞は同じ中胚葉由来である脂肪細胞や軟骨細胞、そして骨芽細胞へと分化誘導が可能であり、さらには、外胚葉系列である神経細胞や内胚葉系列である肝細胞へと分化誘導される事が論文などで示唆され、胚葉を超えて分化誘導が可能である事から、ES細胞に代わる幹細胞として期待されている。

我が国において、ヒトの劇症肝炎・肝硬変・肝がん等による肝不全に対する唯一有効な根治的治療法としては、肝臓移植治療法があるが、深刻なドナー不足のため大多数の方が臓器移植を受けられない現

状が慢性化している。そこで、臓器移植治療法に変わる新しい治療法の開発が求められている。その速戦的なアプローチの一つとして正常肝細胞を移植する方法、つまり細胞移植治療法の開発に期待が寄せられている。一方で、医薬品の開発には多大な時間と費用が必要であり、そのコストの多くはヒトの組織から分離された肝細胞を用いた毒性試験や安全性の評価に費やされる。候補となる医薬品は実際にヒトへの投与試験の前段階に、ヒト肝細胞を用いてクリアランスを予測し、未変化体または代謝物の蓄積の可能性、また生体利用効率(Bioavailability)や半減期などを予測し、*in vitro*において十分な評価試験を行なう必要がある。このように細胞移植治療や薬物評価試験に利用するには、大量のヒト正常肝細胞が常に準備されている事が望ましいと言える。

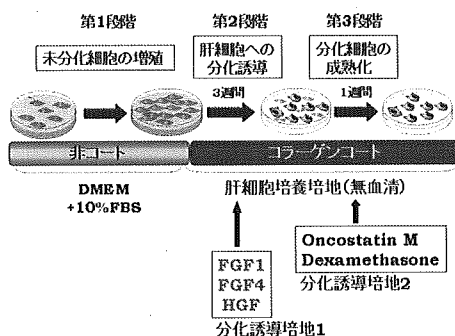
そこで我々は幹細胞の自己増殖能や多分化能に注目し、肝細胞へと分化誘導する新しいシステムの開発に着手した。最初に、マウスES細胞を用いて肝細胞への分化誘導に関する基礎実験を行なった結果、他細胞との共培養や動物個体を介することなく、工業的に生産可能である既知物質の添加、および細胞外基質を変化させる事により、無菌的培養条件下だけで効率良く成熟肝細胞へと分化誘導できるシステム(HIFC分化誘導システム)の開発に成功した。この独自に開発したサイトカインの組み合わせによる刺激から、骨髄組織由来の間葉系幹細胞からヒト肝細胞を誘導する系を開発した。本研究ではこのヒト肝細胞に関して、1) 肝特異的遺伝子群の網羅的発現解析、2) 肝不全動物への移植による肝機能回復能力の検証、3) 発がん性の有無やメチル化の状態などの安全性に関する検討、に重点を置き、間葉系幹細胞由来ヒト肝細胞による新たな移植治療開発の基盤研究を行う。

### B. 研究方法

## 1) HIFC 分化誘導システムを用いた肝細胞への分化誘導

CD34(-)分画骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、肝細胞へと分化誘導を行った。60mm collagen coated dish (IWAKI)に  $4.3 \times 10^4$  細胞を分化誘導培地 1 (肝細胞培地 (HCM: Cambrex), FGF1 (VERITAS), FGF4 (VERITAS), HGF (VERITAS))を用いて 21 日間分化誘導を行った。続いて分化誘導培地 2 (HCM (Cambrex), OsM (VERITAS), Dexamethasone (Sigma))を用いて、分化細胞の成熟化を行なった。

図 1. HIFC 分化誘導システム。骨髄細胞由来間葉系幹細胞を用いた分化誘導条件を適用した。



## 2) RT-PCR 法による肝細胞マーカー遺伝子の発現解析

ISOGEN (Nippon Gene)を用いて、分化誘導の各段階(分化誘導開始 0 日・6 日・21 日・27 日・41 日)において Total RNA を抽出し、SuperScript2 System (Invitrogen)を用いて cDNA に変換した。GenBank より未成熟な肝細胞のマーカー遺伝子としてヒト Alpha-fetoprotein (AFP), 典型的な肝細胞のマーカー遺伝子としてヒト Albumin (ALB)、そして成熟肝細胞のマーカー遺伝子としてヒト Tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO2)の塩基配列を入手し、各遺伝子の特異的増幅できるプライマーを構築、および TaKaRa Ex-Taq System (TaKaRa)を用いて遺伝子発現の有無を確認した。

## 3) 免疫染色による解析

4%パラフォルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、一次抗体として Anti-human Albumin (Sigma), Anti-human Transthyretin (Santa cruz), Anti-human Cytochrome P450 3A4 (Affiniti)を用い (4°C にて一晚静置)、二次抗体として Fluorescein-conjugated IgG (ICN Pharmaceuticals), Rhodamine-conjugated IgG (ICN Pharmaceuticals)を用いて(37°C にて 1 時間静置) 染色を行なった。染色結果の検出は蛍光顕微鏡(Nikon)を用いた。

## 3) *in vitro* における肝機能の解析

HIFC 分化誘導を行った骨髄由来間葉系幹細胞の肝機能の獲得について評価した。アンモニア分解能

は 1ml の培養液(HCM; Cambrex)に 2.5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を添加し、残存する  $\text{NH}_4\text{Cl}$  をアンモニアテスト(Wako)にて 22 時間まで測定した。次に糖産生能について Periodic Acid Stain (PAS) 染色法を用いて評価した。また肝細胞で産生されているコリンエステラーゼについては Karnovsky 法にて、さらに Low Density Lipoprotein (LDL) の測定は 1, 1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate (Dil-Ac)を用いて染色を行ない評価した。最後に、薬物に対する応答性について、Rifampin (Sigma)を培養液に添加し、P450-Glo™ Assays kit (Promega)を用いて CYP3A4 の誘導活性について評価した。

## 4) 分化誘導した肝細胞の動物への移植実験

分化誘導して得られた肝細胞の性状と毒性の有無を検討するため、SCID マウスの肝臓に移植し、その生着率、宿主肝臓組織への順化、急性の毒性反応の有無を検討した。

### (倫理面への配慮)

本報告に関わるヒト骨髄組織由来間葉系幹細胞は、米国内の倫理審査を得て採取され、販売されているものである。また分化実験は、国立がんセンター生命倫理委員会に提出し、承認を得た実験計画に従っている。

## C. 研究結果

### 1) HIFC 分化誘導システムによる肝細胞への分化

無血清培地に FGF1, FGF4, HGF, OsM, DEX を添加し、またコラーゲンコート培養皿上で、骨髄由来間葉系幹細胞を肝細胞へと分化誘導した。分化誘導開始 40 日目には、形態学的にも成熟肝細胞に近い細胞集団の出現が確認された。一方、HIFC 分化誘導処理を施していない細胞では、このような形態を示す細胞が確認されなかった。

この細胞から Total RNA を抽出し、肝細胞マーカー遺伝子の発現を確認した結果、分化誘導開始 2 1 日目に ALB, TTR, TDO2 遺伝子の発現が確認された。ALB および TDO2 に関してはその後継続的に遺伝子発現が持続している事が明らかとなった。さらに蛍光標識を用いた二重免疫染色の結果、HIFC 分化誘導を行った細胞で ALB や TTR、そして CYP3A4 などが同一細胞内で発現している事が示された。

### 2) *in vitro* における肝機能の検討

代表的な肝機能であるアンモニア分解能(藤井・奥田法変法)、糖産生能(PAS 染色)、コリンエステラーゼ活性(Karnovsky 法)、LDL 活性(Dil-Ac-LDL 法)、そして薬剤応答性について検討した結果、いずれも陽性である事が明らかとなった。アンモニア分解能に関して、測定開始 12 時間目には既に培養液中に添加した  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の大部分が分解されていた。糖産生能について PAS 染色を、またコリンエステラーゼ活性について Karnovsky 法を、そして LDL 産生能について Dil-Ac-LDL を用いて染色した結果、何れも HIFC 分化誘導細胞で陽性となる細胞が多く確認された。

薬物代謝に関わる CYP3A4 の活性をミクロソームを抽出せずに、直接生細胞にて測定した結果、薬剤に対する応答性が確認された。

### 3) SCID マウスへの移植実験

得られた肝細胞  $2 \times 10^6$  個を、SCID マウスの尾静脈から移植する実験を行ったところ、ヒト特異的アルブミン抗体による組織染色から、およそ7%の肝細胞が宿主肝臓へと生着していることがわかった。また特に急性の毒性等の症状はマウスに生じなかった。

### D. 考察

初年度の成果として、すでに間葉系幹細胞から分化させたヒト肝細胞の形態観察、主要な肝臓特異的遺伝子の発現、アルブミン産生や糖代謝などの基礎的な解析を終了した。さらに初年度の重要な研究成果として、このヒト肝細胞をSCIDマウスに移植した結果、細胞は宿主の肝臓に無事生着し、周囲の肝組織に順化することが確認できた。短期間での毒性等の問題は、移植マウスには生じなかった。従って、本研究によるヒト肝細胞は、その性状の多くは、本来の肝細胞と類似しており、今後の移植医療に用いる細胞として有望であることが示唆された。

### E. 結論

本研究では骨髄組織由来の間葉系幹細胞を単層培養の系で、血清もフィーダー細胞も必要とすることなく、数週間で成熟したヒト肝細胞を誘導することが可能なため、ヒトへの移植応用に適した系である。初年度の研究で、このヒト肝細胞の形態観察、主要な肝臓特異的遺伝子の発現、アルブミン産生や糖代謝などの基礎的な情報の収集に成功し、ヒト肝細胞としての条件の多くを満たしている細胞であることが判断できた。さらに本研究の最重要課題である、移植細胞としての適合性の問題に関して、まずSCIDマウスへの細胞移植により、この細胞は宿主の肝臓組織へ問題なく組み込まれることが判明し、移植細胞として有用であることが推測できた。これらは当初の計画を十分に達成した成果である。さらに四塩化炭素による肝障害の回復能力に関しては現在、解析を計画中である。またこの分化細胞の安全性を検討する一つの方法として、遺伝子のメチル化の状態を網羅的に検討する方法の整備も研究分担者の努力によって完了した。

### F. 健康危惧情報

本研究では健康を害するようなウイルスや、薬物の使用は無いことから、健康危惧に関する問題は生じないと考える。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H,

Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from embryonic stem cells. *Hepatology* 41: 836-846, 2005

2. Yamamoto Y, Teratani T, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Hepatology* 42: 558-567, 2005
3. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cells into liver-basic research and potential clinical applications. *Adv. Exp. Biol. Med.* in press.
4. Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, Ochiya T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant.* 14: 629-635, 2005

#### 2. 学会等発表

1. 寺谷 工、玉谷卓也、落谷孝広. ヒト間葉系幹細胞由来成熟肝細胞の肝疾患研究への応用. 第64回日本癌学会学術総会.(札幌)、平成17年9月14-16日
2. Banas Agnieszka, 寺谷 工、徳原 真、Quinn Gary、落谷孝広. ヒト肝細胞のソースとしての間葉系幹細胞の有用性. 第64回日本癌学会学術総会.(札幌)、平成17年9月14-16日
3. 山本雄介、寺谷 工、Quinn Gary、加藤尚志、落谷孝広. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from mouse embryonic stem cells. *Society for Developmental Biology 64th Annual Meeting. (U.S.A.)*、平成17年8月
4. 寺谷 工、山本雄介、玉谷卓也、落谷孝広. ヒト骨髄細胞由来間葉系幹細胞の加齢に伴う肝細胞分化への影響. 第28回日本分子生物学会年会.(福岡)、平成17年12月7-10日
5. 山本雄介、寺谷 工、野川菜美、石田貴子、加藤尚志、落谷孝広. ES細胞の肝細胞分化誘導系における肝幹細胞の探索. 第18回日本分子生物学会年会.(福岡)、平成17年12月7-10日
6. 寺谷 工、山本雄介、Quinn Gary、Banas Agnieszka、落谷孝広. 移植医療としての間葉系幹細胞由来ヒト肝細胞の評価. 第5回日本再生医療学会総会.(岡山)、平成18年3月8-9日
7. Banas Agnieszka、徳原 真、寺谷 工、Quinn Gary、山本雄介、大河内仁、落谷孝広. Human adipose stem cells as a source of functional hepatocytes. 第5回日本再生医療学会総会.(岡山)、平成18年3月8-9日
8. 落谷孝広. バイオ人工肝臓の細胞ソースとしてのステム細胞の評価. 第5回日本再生医療学会総会(岡山)シンポジウム. 平成18年3月8日

9. 落谷孝広 FGF4 plays a key role for induction of  
hepatocytes from stem cells GRC: FGFs and  
Disease.  
Ventura, CA, USA March 12-17, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## 肝細胞の遺伝子発現解析

分担研究者 畑田出穂 群馬大学遺伝子解析施設 助教授

研究要旨：臓器移植に頼らず欠損した臓器の機能を再生する方法を開発するため、主任研究者らはすでにヒトES細胞から形態的、機能的にヒトの成熟肝細胞と判断できる細胞を誘導することに成功している。一方、DNAのメチル化などのエピジェネティックな情報は細胞の分化において重要な役割をはたしており、エピジェネティックな情報の異常は癌化につながるということが知られている。そこで分担研究者らは誘導分化された肝細胞のメチル化が正常なものであるかの検討をおこなうための方法として今年度はマイクロアレイを用いたメチル化を網羅的解析法を開発した。

### A. 研究目的

エピジェネティックな情報は分化において重要な役割を担うが、培養細胞などのin vitro状態においてはこの情報は不安定であることが知られている。そこでin vitroで分化誘導した肝細胞のエピジェネティックな情報を網羅的に解析することにより、肝細胞としての性質を満たしているかを確認するだけでなく、癌抑制遺伝子のメチル化など癌化につながるような変化を起こしていないかどうかを確認する。分担研究者らは分化誘導した肝細胞の分化度の評価をおこなうとともに、癌化につながるリスクの評価もおこなうための方法としてマイクロアレイを用いたDNAのメチル化を網羅的に解析する方法を開発する。

### B. 研究方法

マイクロアレイを用いたゲノム DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI(Microarray-based Integrated Analysis of DNA Methylation by Isoschizomers)法を開発をおこなった。この方法ではおのおのの遺伝子について2サンプル間でメチル化感受性の制限酵素である Hpa II で切れる DNA 量と、同じ認識部位を持つメチル化非感受性の制限酵素の Msp I で切れる DNA 量を比較する。そして Hpa II で差があるときに、Msp I で差がなければメチル化の差があると判断する。また両方に差があるときはメチル化によらない多型などの差であるというように判断する。

(倫理面への配慮)

本報告に関わる内容は、倫理に関する動物、細胞等の実験を含まない。

### C. 研究結果

今年度は網羅的ゲノム DNA の解析法である上記の MIAMI 法を開発をおこなった。また遺伝子の発現制御においてメチル化が重要であるプロモーター領域のみを固定したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを設計するツールを開発した。そしてそれを用いてオリゴヌクレオチドを設計し8千遺伝子のプロモーターアレイを作製した。このアレイを用いて MIAMI 法を癌細胞と正常細胞とのメチル化の比較に適用し、この方法の精度と信頼性を検討した。その結果この方法の精度は94%と大変高いことがわかった。また癌で高メチル化している遺伝子を5.7%も検出することができ、これは従来癌で高メチル化されている遺伝子が1%といわれていた値よりかなり大きいものであることがわかり、この方法の有効性を証明した。また癌で高メチル化しているものに MLH3, CIDEB といった癌抑制遺伝子の候補になりうるものがあることをみいだした。また神経分化モデルである P19 細胞や、脂肪分化モデルである 3T3-L1 細胞にも適用し分化において変化するメチル化を網羅的に解析できることがわかった。

### D. 考察

MIAMI 法では単にメチル化感受性の酵素による比較だけでなく、同じ認識部位をメチル化非感受性の酵素を用いることにより正確にメチル化を比較できるところが、他の方法と比べてこの方法の独創的なところである。また最近メチル化 CpG 抗体による DNA の免疫沈降による解析法も考案されているが、この方法と比較して感度、精度も高いことがわかった。これは制限酵素の特異性が抗体より高いことによると考えられる。

癌への適用例から従来報告されていたより多くの遺伝子でメチル化が変化していることをみだしこの方法の感度の高さと有効性を示した。

## G. 結論

MIAMI 法は大変感度の高いマイクロアレイを用いたゲノム DNA メチル化の網羅的解析法であり、in vitro で分化誘導した肝細胞のエピジェネティックな情報を網羅的に解析に用いることができる。

## H. 健康危惧情報

本研究では健康を害するようなウイルスや、薬物の使用は無いことから、健康危惧に関する問題は生じないと考える。

## G. 研究発表

### 2. 論文発表

1) Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita

S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H

Genome-wide profiling of promoter methylation in human.

*Oncogene (in press).*

2) Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, & Hatada I

Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mouse.

*Cytogenetic & Genome Res. (in press).*

3) Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H, & Hatada I

Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers

*J Hum Genet (in press)*

### 2. 学会等発表

1) Hatada I Microarray-based detection of DNA methylation. International Symposium on Genome-Wide Epigenetics, . 2005. 11. 7.

2) 畑田出穂、深澤正幸、木村美香、森田純代、山田和男、吉川武男、山中澄隆、桜田晃、佐藤雅美、遠藤知顕、近藤丘、堀井明、牛島俊和、佐々木裕之、ゲノムワイドなプロモーター領域のメチル化のプロファイリング、第28回分子生物学会、福岡、2005. 12. 7-10

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, <u>Ochiya T.</u>	Direct hepatic fate specification from embryonic stem cells.	Hepatology	41	836-846	2005
Yamamoto Y, Teratani T, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, <u>Ochiya T.</u>	Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells.	Hepatology	42	558-567	2005
Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, <u>Ochiya T.</u>	Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge.	Cell Transplant	14	629-635	2005
3. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, <u>Ochiya T.</u>	Stem cells into liver-basic research and potential clinical applications	Adv. Exp. Biol. Med			in press
<u>Hatada I</u> , Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H	Genome-wide profiling of promoter methylation in human.	Oncogene			in press
Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, & <u>Hatada I</u>	Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mouse.	Cytogenetic & Genome Res.			in press
Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H, & <u>Hatada I</u>	Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers	J Hum Genet			in press