

201320026A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスによる
慢性肝炎モデル作出

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 紙谷 聡英

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスによる慢性肝炎モデル作出 -----1

東海大学 創造科学技術研究機構・准教授 紙谷聡英

II. 研究に関するの刊行物の一覧表 ----- 15

III. 研究に関するの刊行物の別刷 ----- 17

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

総括研究報告書

免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスによる慢性肝炎モデル作出

研究代表者 紙谷 聡英 (東海大学・創造科学技術研究機構・准教授)

研究要旨

B型、C型肝炎ウイルス(HBV, HCV)の感染は免疫・炎症反応を介して慢性肝炎を発症し、肝硬変・肝癌の原因となる。HBV, HCVは種特異性から、マウス等の実験動物を用いた感染実験が困難である。近年開発された免疫不全ヒト肝キメラマウスでは、HBV, HCVの*in vivo*での感染・増殖が可能だが、免疫細胞が欠損しており感染後に生じる慢性肝炎が再現されない。そこで本研究では、免疫系の完成していない胎生期や新生児期のマウス肝臓にヒト肝幹・前駆細胞を移植し、ヒト細胞をレシピエントの免疫系に自己と認識させることで免疫寛容を促す。これにより、免疫不全動物を使用せず異種移植に対する免疫拒絶反応を抑制することで、免疫系を保持した状態でのヒト細胞の生着を可能としたキメラマウスを作成し、*in vivo*における肝炎ウイルスの感染・増殖に伴う炎症反応の再現系を構築する。

ヒト肝細胞モデルマウス等の作成では、脳死ドナー肝臓から分離した初代培養肝細胞等が一般的に用いられている。しかし、得られる細胞数や種類(海外からの輸入品が多く日本人の遺伝的背景を持つものが少ない)に問題がある。近年、最終分化した体細胞に様々な遺伝子群を発現させ、神経細胞や心筋細胞、血液細胞にDirect Reprogrammingできることが報告されている。そこで、患者由来のヒト繊維芽細胞を用いて、肝細胞誘導因子の遺伝子導入によりヒト肝前駆細胞を誘導しキメラマウス作成に使用することを目的として本研究を行っている。平成25年度では、ヒト繊維芽細胞を肝細胞系へと分化誘導する系の構築、ヒト多能性幹細胞由来の肝前駆細胞の培養系の解析、肝前駆細胞移植のための新規モデル系の構築などを行った。

A. 研究目的

ウイルスの種特異性(ヒト選択性)によりマウス、ラットといった簡便な実験動物による研究が困難なことから、B型、C型肝炎ウイルス(HBV, HCV)の持続感染に起因する慢性肝炎を研究するモデル系が不足していることが、新規薬剤開発の障害となっている。近年、免疫不全マウスに肝障害を誘導する遺伝子を組み込むことで、ヒト肝細胞を高効率に移植可能な系が構築され(Tateno et al., 2004)、作成したヒト肝細胞キメラマウスにHBV、HCVが感染可能なことが示されている(Tsuge et al., 2005等)。しかし、このマウスモデルでは免疫細胞が存在しないために、慢性肝炎の原因となる肝臓へのウイルス肝炎に伴う免疫・炎症反応が生じない問題点がある。そこで、免疫機能を保持した状態でヒト肝細胞を移植したキメラマウスが作成できれば、肝炎ウイルスによる慢性肝炎の動物モデルとして新規治療法開発に有用と考えられた。ヒト細胞をマウスに生着させるには異種移植に対する免疫拒絶を抑制する必要がある。本研究では、これまでの免疫不全動物モデルではなく、免疫系の完成していない胎生期や新生児期のマウス肝臓にヒト肝幹・前駆細胞を移植して自己免疫寛容を誘導する。生体内では自己抗原を認識する免疫細胞を排除する選択システムが存在する。胎生・新生仔期にヒト細胞を移植し、ヒト細胞をレシピエントの免疫系に自己と認識させ免

疫寛容を促すことで生着を可能にする系を構築する。

ヒト肝幹・前駆細胞のソースとして、線維芽細胞に複数の遺伝子を導入することで肝細胞系へとDirect reprogrammingしたものをを用いる。これによって患者個々の遺伝背景を反映した肝細胞を持つ動物モデルによるウイルスの増殖や肝炎の進行の研究が可能になり、薬物感受性の差異等を考慮した新薬開発など幅広い応用が考えられる。

平成25年度では、ヒト線維芽細胞を肝細胞系へと分化誘導する因子の探索や、ヒト多能性幹細胞由来の肝前駆細胞の培養系の解析、さらに肝細胞移植のための新規モデル系の検討などを行った。

B. 研究方法

HBV, HCV由来の慢性肝炎モデル作成に必要な免疫系を保持したヒト肝細胞キメラマウスの作出技術の確立を目的として、次の研究を遂行する。

1. ヒト線維芽細胞からの肝前駆細胞の分化誘導・純化系の構築

最終分化した体細胞に遺伝子導入して、神経細胞や心筋細胞、血液細胞にDirect Reprogrammingできることが近年報告されている。そこで、本研究では、ヒト線維芽細胞に遺伝子を導入し、肝前駆細胞を誘導できるか検討する。分化誘導後に細胞表面抗原

の網羅的なスクリーニングを行い作成したヒト肝前駆細胞の特異的細胞表面マーカーを同定し純化する。

HNF4 α 、FoxA2、FoxA3 などの肝細胞転写因子を強制発現することで、線維芽細胞を肝臓系細胞へと分化誘導できることが報告されている。しかし、その効率は未だ十分でないと考えられた。そこで、肝細胞系への Direct Differentiation を誘導できる新規因子の探索を行う。マウス胎仔および成体肝臓における網羅的発現解析を行い、肝発生過程において変化する因子を候補遺伝子として同定した。候補遺伝子をレトロウイルスベクター (pGCDNSam) にクローニングし、強制発現用ウイルスを作成した。マウス胎仔線維芽細胞を、胎生 13 日マウス胎仔を酵素処理することで分離・培養し、候補遺伝子をレトロウイルスを用いて強制発現させた後に、サイトカイン (Hepatocyte Growth Factor [HGF] および Epidermal Growth Factor) 存在下で培養した。この結果、平成 24 年までの成果として複数の転写因子を肝分化誘導の候補因子として同定した。そこで平成 25 年度では、得られた候補因子をヒト線維芽細胞に導入し、肝細胞系への分化誘導をリアルタイム PCR で肝機能遺伝子の発現を調べることで評価した。

また我々は、マウス胎仔線維芽細胞との共培養でマウス胎生肝前駆細胞の *in vitro* 増殖が誘導可能なことを見出しており、ヒト肝

前駆細胞をこの系を用いて増幅することを目的とした。そこで、ヒト iPS 細胞由来の肝幹・前駆細胞がこの系を用いて増殖が可能かをまず検討した。既報に従って、ヒト皮膚細胞由来 iPS 細胞を、アクチビン、Fibroblast growth factor, Bone morphogenetic protein, HGF とサイトカインを連続的に添加し、フローサイトメーターを用いて肝前駆細胞分画の分離を行う。得られた細胞を、サイトカイン・シグナル伝達阻害剤添加の条件で培養することで、*in vitro* での長期増殖能が得られる。そこで、培養過程での肝細胞マーカーの変化等を解析することで、この培養系におけるヒト肝前駆細胞の性状解析を行った。

2. 肝障害誘導マウス胎仔を用いた、生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築

FAH 欠損マウスは、チロシン分解の最終段階を制御する酵素である FAH の欠損により、毒性代謝産物蓄積による肝障害を発症する。FAH 欠損マウスは

2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC) の添加によりほぼ正常の状態を保つが、NTBC 添加を止めると速やかな肝障害を誘導できる。また、別の肝障害誘導モデルマウスとして、ジフテリアトキシン受容体を肝細胞特異的に発現するマウスを作成している。ジフテリアトキシン受容体を Cre 依存的に発現するトランスジェニックマウスおよび AlbAFP プロモーター影響下で

Cre を発現するトランスジェニックマウスを導入し交配させた。このダブルトランスジェニックマウスにジフテリアトキシンを添加することで肝細胞死を誘導できることを確認している。そこでこれらの遺伝子改変マウス胎仔肝臓に、同じ発生時期の正常肝幹・前駆細胞を移植した後に肝障害を誘導して、移植細胞の生着が可能か検討を行う。発生過程において肝臓形成が進行する各段階(マウス胎生 11 日から出生前後まで)の FAH 欠損胎仔肝臓に、GFP マウス胎児より分離した肝前駆細胞を実体顕微鏡下で経子宮的に移植する。手術後、親マウスへの NTBC 投与を停止し胎仔マウス肝臓における肝障害を誘導する。肝幹・前駆細胞の移植時期や NTBC 投与停止による肝障害誘導の時期を条件検討することで、最も適切な移植条件を設定することを目的とした。

平成 25 年度は、ジフテリアトキシン受容体トランスジェニックマウス(iDTR マウス)および AlbAFP プロモーターCre-トランスジェニックマウス(AlbAFPCre マウス)の交配・作製による新たな肝障害・肝細胞移植モデルの構築を行った。

3. ヒト繊維芽細胞由来肝前駆細胞を用いた、免疫機能を持つヒト肝細胞キメラマウスの作成

上記1,2 の研究成果を元に、ヒト繊維芽細胞から肝前駆細胞を誘導し、FAH 欠損マウ

ス胎仔肝臓へと移植を行う。NTBC の投与停止により肝障害を誘導し、FAH 欠損マウス胎児の肝臓内で移植したヒト細胞が肝細胞の障害を補完することで、マウス個体が成体まで成長できるか観察する。または、iDTR-AlbAFPCre マウスを用いて、ジフテリアトキシン投与によって肝障害を誘導した後に細胞を移植することで、効率的な生着が可能か検討する。ヒト細胞由来肝前駆細胞を移植した場合、マウス体内ではサイトカインの種差等の問題から十分な増殖効率が得られない可能性がある。その場合には、一過的な遺伝子導入・発現による移植・生着効率の改善を試行する。

4. 作成したキメラマウスにおける免疫系の評価および肝炎ウイルスの感染実験

これまでの研究で作成したヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝機能・免疫機能の解析を行なう。キメラマウス体内のヒト血清アルブミンや薬物代謝酵素の発現レベルの解析、末梢血中の免疫細胞(B 細胞や T 細胞)の細胞数や機能が正常か解析する。肝臓切片の染色によりドナー細胞の生着率を測定する。HBV または HCV をマウスに接種し、キメラ肝臓内でウイルスの感染・増殖を観察する。さらに、肝炎ウイルスの持続的な感染を起こすマウスが得られた場合には長期の飼育を行い、免疫細胞の活性化や炎症反応が生じるか観察する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験に関しては、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。

動物実験に関しては、当大学の定める指針に従って実験を遂行する。

ヒト細胞の使用に関しては倫理審査委員会の規定に従い、説明・同意を得られたサンプルを使用する。またヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に従って研究を遂行する。

C. 研究結果

1. ヒト繊維芽細胞からの肝前駆細胞の分化誘導・純化系の構築

(1) ヒト繊維芽細胞から肝細胞への Direct Reprogramming 系

肝細胞の機能は、HNF4 α や FoxA2, 3 といった Liver-enriched transcription factor のネットワークにより制御されている。これらの転写因子群、またはマイクロアレイによる網羅的解析によって肝分化過程で発現が変化した核内因子を肝細胞系へのリプログラミング

候補遺伝子として選別した。成熟肝細胞および胎生 13 日由来肝幹・前駆細胞を純化、RNA を回収しマイクロアレイによる比較を行なうことで、いくつかの候補核内因子を同定した(図 1)。

前年までの研究として候補遺伝子群を、既知の肝分化誘導因子 HNF4 α および FoxA2 と同時にマウス線維芽細胞に強制発現させ、より肝分化を促進できる因子の探索を行った。HLH 型核内因子の一つである Mist1 を強制発現した際にアルブミンや、チトクローム P450 (CYP)3A11 等の成熟肝細胞のマーカー遺伝子の発現誘導も観察された。また、Bcl-6 および Hepatic leukemia factor (HLF) を HNF4 α および FoxA2 と同時にマウス線維芽細胞に発現することで、やはりアルブミンやチロシンアミノトランスフェラーゼ等の肝細胞マーカー遺伝子の発現が強く誘導されることを見出した。以上の結果から、既知因子 (HNF4 α および FoxA2) に加えて、Mist1, Bcl6, HLF がマウス線維芽細胞を肝細胞系へと分化促進できる因子であることを明らかにした。

平成 25 年度では、以上のマウスでの研究成果をもとに、ヒト線維芽細胞を用いて検討を行った。ヒト胎児線維芽細胞に、レトロウイルスベクターを用いて、HNF4 α および FoxA2 に加えて、Mist1, Bcl6, HLF の強制発現を行った。肝細胞増殖培地で培養したのちに肝細胞マーカーであるアルブミンの発現をリアルタイム PCR にて解析することで

網羅的なスクリーニングを行った(図 2)。その結果、Bcl6 を発現させたときのみ、HNF4 α および FoxA2 との相加効果を示し、肝分化を促進できることがわかった。一方、マウス線維芽細胞の時と異なり、Mist1, HLF では肝機能遺伝子の発現誘導などは見られなかった。以上の結果から、ヒト細胞の新規肝分化誘導因子として Bcl6 を同定した。

(2) ヒト iPS 細胞を用いた肝幹・前駆細胞の純化・長期培養系の構築の試み

ヒト肝幹・前駆細胞の *in vitro* での増幅系を構築する目的で、ヒト iPS 細胞由来細胞をモデルとして研究を行っている。

前年までの研究では、ヒト iPS 細胞を既報に従って肝臓系細胞へと分化誘導を行い、表面抗原抗体を用いて細胞分画した。FACSを用いて分画した各細胞をマウス線維芽細胞をフィーダーとして低密度培養を行った結果、AFP、HNF4 α 陽性のコロニー形成能をもつ前駆細胞の存在を確認した。この細胞は継代培養を繰り返した結果、1 カ月にわたり増殖しつづけることが分かった。次に得られた肝幹・前駆細胞様細胞の成熟肝細胞・胆管細胞への分化能を検討した。幼弱な肝細胞は浮遊培養によるスフェロイド形成などによって 3 次元構造を取らせることで成熟化し、肝機能遺伝子の発現が上昇することが知られている。そこで、継代培養によって得られた iPS 由来肝幹・前駆細胞を浮遊

培養(ハンギングドロップ法)によってスフェロイド形成させた結果、高次構造の形成により CYP 系遺伝子の発現上昇がみられることが分かった。また、同様の細胞をラミニン・コラーゲン等の細胞外マトリクスゲルに包埋培養し、Wnt 等のサイトカインを添加することで上皮系の Cyst 構造を形成することを見出した。この Cyst は胆管のマーカー遺伝子である Cytokeratin 7 の発現が見られ、iPS 由来肝幹・前駆細胞から胆管系細胞構造への分化誘導が確認できた。

そこで平成 25 年度では、ヒト多能性幹細胞由来の肝前駆細胞の *in vitro* 培養における性状変化について検討を行った。我々はヒト肝前駆細胞の表面抗原マーカーとして CD13 および CD133 を同定している。そこで、培養過程におけるこれらのマーカーの発現変化を解析した結果、一部の細胞で CD13 の発現が低下することを見出した。さらに CD13 陽性細胞からは CD13 陽性細胞が、CD13 陰性細胞からは CD13 陰性細胞が自己複製することを見出した(図 3)。CD13 陰性細胞からは多数の胆管様 Cyst 構造が得られることから(図 4)、CD13 陽性細胞が肝前駆細胞であり、そこから CD13 陰性の胆管前駆細胞が分化すると考えられる。

以上の結果によって、ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の長期培養系で、ヒト肝芽細胞が自己複製能を持ち維持されていることが示唆された。

2. 肝障害誘導マウス胎仔を用いた、生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築

前年までの成果として、マウス胎仔・新生仔への移植系構築の目的で、まず胎仔肝臓由来の肝幹・前駆細胞のマウス新生仔への移植を行った。マウス胎生 13 日肝臓より分離した Dlk^+ 肝幹・前駆細胞を新生仔マウスの肝臓に直接、または眼底静脈を通じた経静脈的な移植した。肝幹・前駆細胞を新生仔マウスの眼底静脈より移植し、各臓器における生着を観察した結果では、移植直後ある程度の期間で肝臓への生着を検出する一方で肺等への異所性の細胞の沈着や増殖が見られることが分かった。一方、肝臓に直接移植を行った場合には、移植したマウス個体の一部で肝臓に移植細胞が検出されるものの、個体間のばらつきが観察された。

そこで本年度では移植後に肝障害の誘導できるマウスモデルとして、ジフテリアトキシン受容体を肝細胞特異的に発現するマウスの開発を行った。Cre 依存的にジフテリアトキシン受容体を発現する iDTR マウスは JAX マウスより購入した。また、肝細胞特異的に Cre を発現する AlbAFPCre マウスは Dr. Kaestner より供与されたものを使用している。両トランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスでは、ジフテリアトキシン刺激による肝障害を発症する(図 5)。そこで、まずさまざまな濃度でジフテリアトキシンを

注射し肝障害の程度を観察することで、適切な濃度を設定した。次に、GFP トランスジェニックマウス由来の肝前駆細胞を分離し、脾臓経路で移植したのちにジフテリアトキシン添加により肝障害を誘導した(図 6)。その結果、ジフテリアトキシン添加によりレシピエント肝細胞の細胞死が誘導されることで、ドナーの肝前駆細胞の増殖・生着が促進されることを見出した。

3. ヒト繊維芽細胞由来肝前駆細胞を用いた、免疫機能を持つヒト肝細胞キメラマウスの作成

4. 作成したキメラマウスにおける免疫系の評価および肝炎ウイルスの感染実験

両研究に関しては、今後の研究課題である。

D. 考察

本年度の研究成果として、ヒト繊維芽細胞から Direct に肝細胞を作り出す系として、我々は HNF4 α および FoxA2, 3 に加えて、抑制性転写因子 Bcl6 を同定した。しかし、これらの転写因子がどのような分子メカニズムによって繊維芽細胞の運命決定機構を制御し、肝分化を誘導しているのかは未だ不明である。そこで、繊維芽細胞にこれらの転写因子を発現させた際の網羅的な遺伝子

発現変化の解析を、マイクロアレイを用いて現在行っている。今後詳細な解析を行うことで、肝分化における運命決定のメカニズムの同定、さらには本研究の目的である、ヒト線維芽細胞での **Direct reprogramming** につながる知見が得られることを期待している。

ヒト肝前駆細胞の *in vitro* 培養条件を検討するソースとして、本研究ではヒト多能性幹細胞由来の肝前駆細胞を用いている。今までの研究で、ヒト肝前駆細胞の特異的表面マーカーとして **CD13** および **CD133** を同定している。本研究によって、*in vitro* での培養過程で **CD13** の発現が低下する細胞が出現すること、それらの細胞が胆管系へコミットした細胞である可能性が示唆された。つまり、**CD13** 発現細胞をより維持できるような培養条件が、ヒト肝前駆細胞の機能維持に適していると考えられる。今後、このような表面抗原マーカーの発現を維持する培養条件の探索等が重要と考えられる。

マウス胎仔および新生仔への移植系の構築では、どのような移植系が有用かの検討を行っている。マウス新生仔の眼底静脈を経由した移植では、細胞の一部が肝臓へ効率的に移行する一方で、肺への細胞の侵入・吸着も多く見られた。今後、このような条件下でマウス肝幹・前駆細胞がどのような挙動を示すのか解析するとともに、本年度より作製している新規肝障害マウスモデル等を

用いて検討を行う予定である。

E. 結論

(1) ヒト線維芽細胞から肝前駆細胞を分化誘導するために必要な遺伝子群の探索を行い、既知の分化誘導因子である **HNF4α** および **FoxA2**、**3** に加えて、新規の肝分化誘導因子として **Bcl-6** を同定した。

(2) ヒト **iPS** 細胞由来肝前駆細胞をモデルとして、2方向の分化能を維持したまま長期間培養できる条件を決定した。

(3) 新規肝障害モデルマウスとして **iDTR・AlbAfpCre** マウスを作製した。得られたマウスに肝前駆細胞を移植し、ジフテリアトキシン添加による肝障害誘導を行うことで、移植細胞の生着が可能なことを見出した。

今後の研究課題として、

(1) 本研究によって同定した新規肝分化誘導因子による、肝分化の分子メカニズムを同定し、ヒト体細胞からの肝分化誘導系を構築する。

(2) 新規肝障害マウスモデルなどを用いて、マウス胎仔・新生仔への肝前駆細胞の移植系を構築する。

(3) ヒト線維芽細胞から誘導した肝前駆細胞の *in vitro* および *in vivo* での肝炎ウイルス

感染実験を行う。

を予定している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

・原著論文

Yanagida A, Ito K, Chikada H, Nakauchi H, Kamiya A*. An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. **PLoS One**, 8, e67541, 2013 (*Corresponding Author)

Ito K, Yanagida A, Okada K, Yamazaki Y, Nakauchi H, Kamiya A*. Mesenchymal progenitor cells in mouse fetal liver regulate differentiation and proliferation of hepatoblasts. **Liver Int.** in press 2013. (*Corresponding Author)

・総説

近田裕美、紙谷聡英 「肝細胞移植を用いた肝疾患の治療」**細胞** **2013**, 45, 314-317

及川恒一、紙谷聡英 「幹細胞マーカー SALL4 の肝癌治療法における可能性」**肝胆膵**, **2014**, 68, 437-444

主な刊行物等は II 章に記載した。

・国内学会発表

紙谷聡英、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの二方向性分化能を有する肝前駆細胞の誘導」

第 49 回日本肝臓学会総会

京王プラザホテル 2013 年 6 月 6-7 日

伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光、紙谷聡英

「Mesenchymal progenitor cells in mouse fetal liver regulate differentiation and proliferation of hepatoblasts.」

第 20 回 肝細胞研究会

大阪国際会議場 2013 年 9 月 26-27 日

柳田 絢加、伊藤 慶一、近田裕美、中内啓光、紙谷 聡英

「In vitro generation and expansion of bi-potent hepatic progenitor-like cells from human iPS cells.」

第 20 回 肝細胞研究会

大阪国際会議場 2013 年 9 月 26-27 日

紙谷聡英、近田裕美、鶴谷康太、柳田絢加、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの in vitro 胆管組織誘導系の構築」

第 13 回日本再生医療学会

京都国際会館 2014 年 3 月 4-6 日

近田裕美、坂本明美、徳久剛史、紙谷聡英
「肝臓における薬物代謝の性差を制御する
分子メカニズム」

第 13 回日本再生医療学会
京都国際会館 2014 年 3 月 4-6 日

・国際学会発表

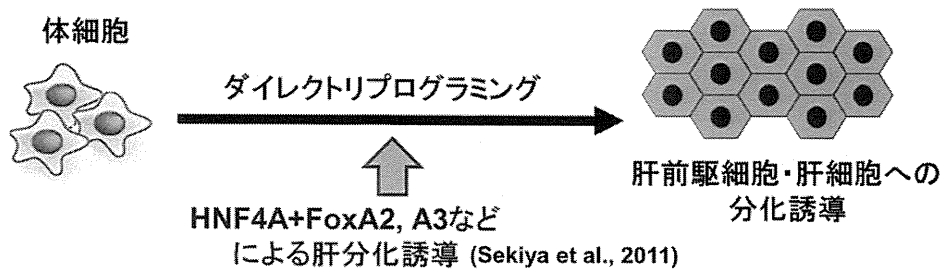
Hiromi Chikada, Keiichi Ito, Ayaka
Yanagida, Hiromitsu Nakauchi, Akihide
Kamiya

「REGULATION OF CYTOCHROME p450
3A11 EXPRESSION IN MOUSE HEPATIC
PROGENITOR CELLS BY BCL-6」

The 11th Annual Meeting of International
Society for Stem Cell Research
Boston Convention and Exhibition Center,
USA, June 12-15, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



より高効率に肝分化・肝機能を誘導するFactor(核内因子群)
候補の遺伝子導入スクリーニング

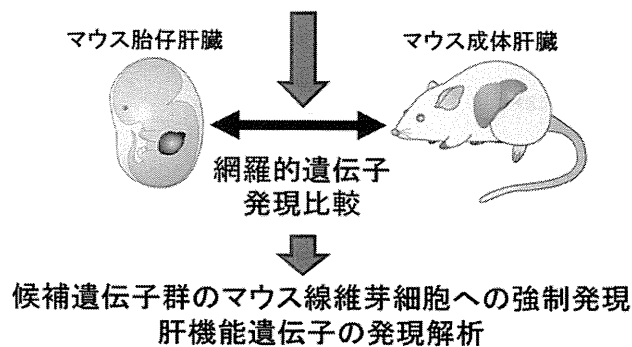
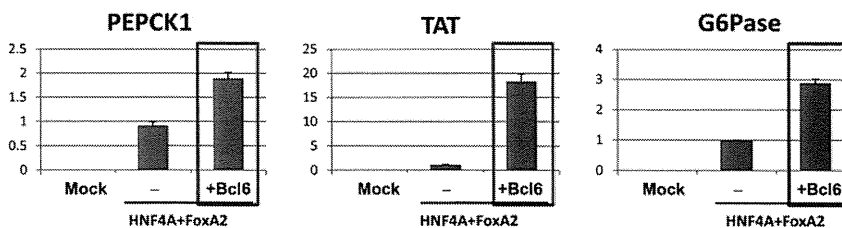
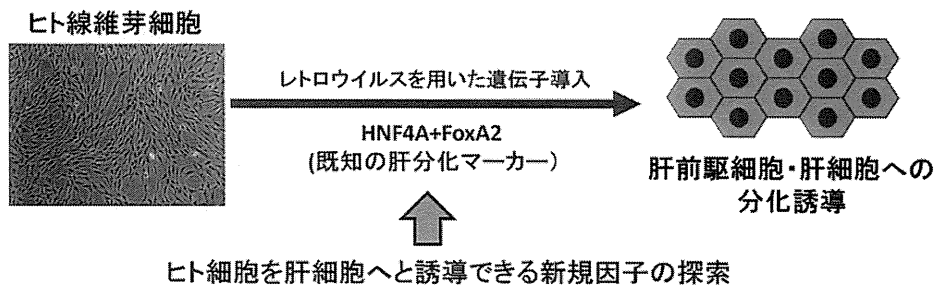


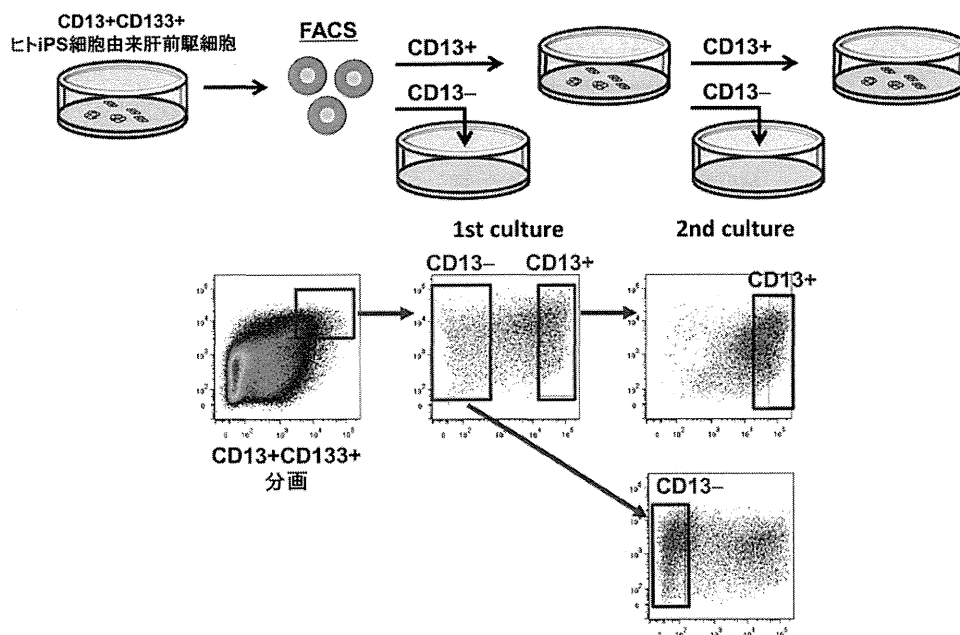
図1 マウス線維芽細胞での肝分化誘導因子の網羅的探索



既知因子に加えてBcl6の強制発現により
ヒト線維芽細胞で肝機能遺伝子を効率的に誘導できる

ヒト体細胞の新規肝分化誘導因子としてBcl6を同定

図2 Direct Reprogramming によるヒト線維芽細胞の機能肝細胞への分化誘導



CD13+細胞: Self-renewal-likeな活性を持つ高増殖性細胞
ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞のin vitro expansionのターゲット細胞

図3 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の長期培養における CD13 抗原の発現変化

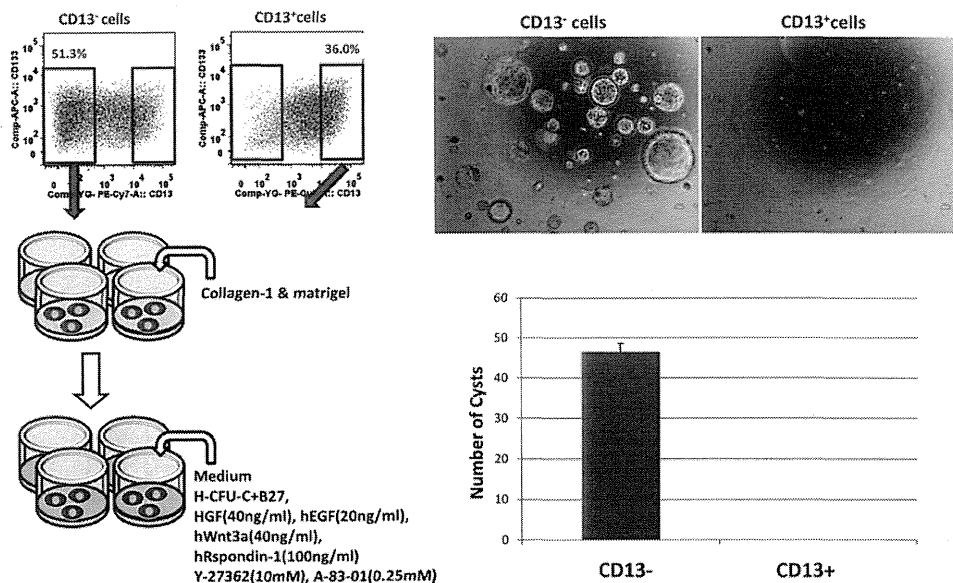


図4 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の胆管様 Cyst 形成能

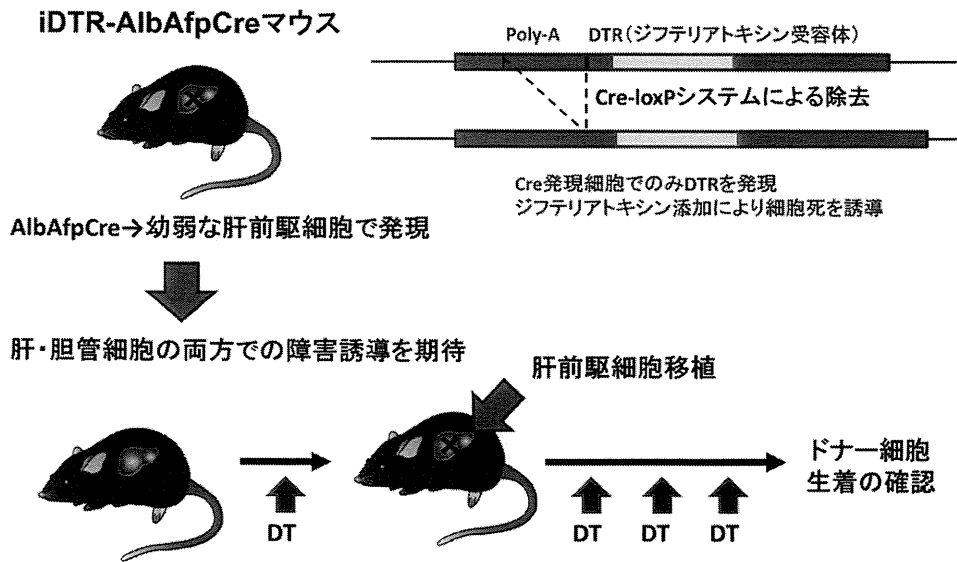


図5 ジフテリアトキシン誘導型肝障害マウスモデルの作出

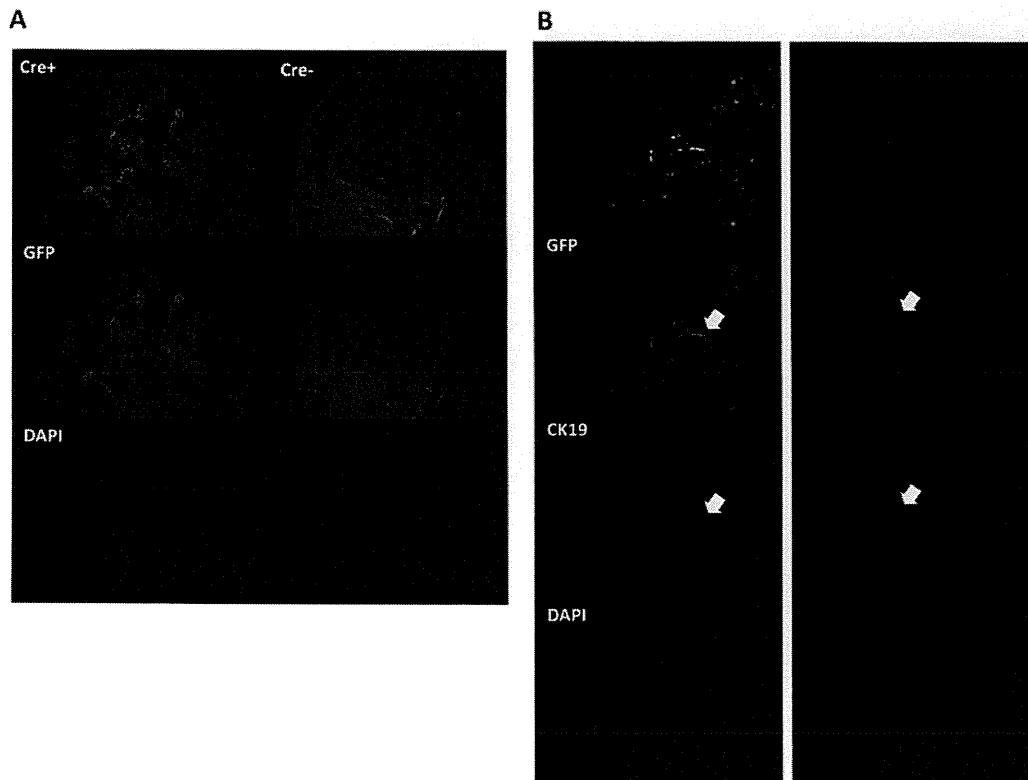


図6 肝幹・前駆細胞のマウス胎仔・新生仔への移植系

(A) Cre^{+/+}-マウスでの移植細胞の増殖 (B) 移植細胞での胆管マーカー (CK19) の発現

II. 研究に関する主な刊行物の一覧表

研究に関する主な刊行物の一覧

雑誌

原著論文

(1) Yanagida A, Ito K, Chikada H, Nakauchi H, Kamiya A*. An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. PLoS One, 8, e67541, 2013 (*Corresponding Author)

総説

(1) 近田裕美、紙谷聡英「肝細胞移植を用いた肝疾患の治療」細胞 2013, 45, 314-317

(2) 及川恒一、紙谷聡英「幹細胞マーカーSALL4の肝癌治療法における可能性」肝胆膵, 2014, 68, 437-444

III. 研究に関する主な刊行物の別刷

An *In Vitro* Expansion System for Generation of Human iPS Cell-Derived Hepatic Progenitor-Like Cells Exhibiting a Bipotent Differentiation Potential

Ayaka Yanagida¹, Keiichi Ito¹, Hiromi Chikada³, Hiromitsu Nakauchi^{1,2}, Akihide Kamiya^{1,3*}

1 Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan, **2** Japan Science and Technology Agency, ERATO, Nakauchi Stem Cell and Organ Regeneration Project, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, **3** Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, Isehara, Kanagawa, Japan

Abstract

Hepatoblasts, hepatic stem/progenitor cells in liver development, have a high proliferative potential and the ability to differentiate into both hepatocytes and cholangiocytes. In regenerative medicine and drug screening for the treatment of severe liver diseases, human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived mature functional hepatocytes are considered to be a potentially good cell source. However, induction of proliferation of these cells is difficult *ex vivo*. To circumvent this problem, we generated hepatic progenitor-like cells from human iPS cells using serial cytokine treatments *in vitro*. Highly proliferative hepatic progenitor-like cells were purified by fluorescence-activated cell sorting using antibodies against CD13 and CD133 that are known cell surface markers of hepatic stem/progenitor cells in fetal and adult mouse livers. When the purified CD13^{high}CD133⁺ cells were cultured at a low density with feeder cells in the presence of suitable growth factors and signaling inhibitors (ALK inhibitor A-83-01 and ROCK inhibitor Y-27632), individual cells gave rise to relatively large colonies. These colonies consisted of two types of cells expressing hepatocytic marker genes (hepatocyte nuclear factor 4 α and α -fetoprotein) and a cholangiocytic marker gene (cytokeratin 7), and continued to proliferate over long periods of time. In a spheroid formation assay, these cells were found to express genes required for mature liver function, such as cytochrome P450 enzymes, and secrete albumin. When these cells were cultured in a suitable extracellular matrix gel, they eventually formed a cholangiocytic cyst-like structure with epithelial polarity, suggesting that human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells have a bipotent differentiation ability. Collectively these data indicate that this novel procedure using an *in vitro* expansion system is useful for not only liver regeneration but also for the determination of molecular mechanisms that regulate liver development.

Citation: Yanagida A, Ito K, Chikada H, Nakauchi H, Kamiya A (2013) An *In Vitro* Expansion System for Generation of Human iPS Cell-Derived Hepatic Progenitor-Like Cells Exhibiting a Bipotent Differentiation Potential. PLoS ONE 8(7): e67541. doi:10.1371/journal.pone.0067541

Editor: Katriina Aalto-Setälä, University of Tampere, Finland

Received: January 25, 2013; **Accepted:** May 20, 2013; **Published:** July 25, 2013

Copyright: © 2013 Yanagida et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by the Global COE Program and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan (23689040 and 24249056) and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan. This work was also supported by a research grant from the Nakatomi Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: kamiyaa@tokai-u.jp

Introduction

The liver is the largest internal organ in mammals and plays an important role in metabolism. It also performs various functions including glycogen storage, decomposition of red blood cells, plasma protein synthesis, and detoxification. Because of these many functions, it is difficult to construct an artificial liver replacement. Liver transplantation is considered the only effective treatment for end-stage liver diseases. However, it is limited by the shortage of suitable donor organs, the risk of rejection, infections, and lifelong immunosuppression. Although human embryonic stem (ES) cells derived from the inner cell mass of blastocysts maintain self-renewal and pluripotency [1], their use in clinical trials is limited because of the ethical concerns associated with human ES cell research. Human induced pluripotent stem (iPS) cells generated by reprogramming of somatic cells with four transcription factors (Oct3/4, Klf4, Sox2, and c-Myc) have similar properties to those of human ES cells [2]. Therefore, generation of

hepatic cells using iPS technology may be beneficial for the treatment of severe liver diseases, screening of drug toxicities, and basic research of several hepatocytic disorders.

Liver organogenesis begins at early embryonic stages from the foregut endoderm. Endodermal cells are known to receive inductive signals from the septum transversum mesenchyme and adjacent cardiac region, namely bone morphogenetic protein (BMP) and fibroblast growth factor (FGF) [3,4,5,6]. Subsequently, these cells commit to hepatoblasts that proliferate and migrate into the septum transversum to form the liver bud. Hepatoblasts are considered to be somatic stem/progenitor cells in fetal livers because they have a high proliferative potential and the ability to differentiate into both hepatocytes and cholangiocytes during the middle to late embryonic stages. Proliferation and differentiation of hepatoblast are regulated by several soluble factors. For example, hepatocyte growth factor (HGF), a mitogen of both hepatoblasts and mature hepatocytes, is important for expansion of the liver bud [7]. Likewise, oncostatin M (OSM) is a maturation