

201320026B

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23年度~平成25年度
総合研究報告書

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 ----- 21

III. 研究に関するの刊行物の別刷 ----- 23

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)

総合研究報告書

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考えた。本研究では、(1)ヒト繊維芽細胞を肝細胞系へと分化誘導する新規因子の同定、(2)ヒト肝前駆細胞の長期培養系の構築、(3)マウス新生児への肝前駆細胞の移植系の構築、の3点に関して解析を行った。

A. 研究目的

本邦において、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は、肝硬変・肝癌の最大の原因となっている。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、HBV および HCV ゲノムの複製に必要な部分で構成されたレプリコン RNA や JFH-1 等の特定のウイルス株とヒト肝癌細胞株等を組み合わせることで、ウイルスの複製機構の解析・インターフェロン等への反応性の研究が行われている(Wakita, et al., 2005 など)。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・炎症反応が再現できない。免疫機能を保持したまま肝細胞をヒト化できる系の確立が、肝炎ウイルスによる慢性肝炎の動物モデル作成を通じた新規治療法開発のために必須である。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。

移植に必要なヒト肝幹・前駆細胞を生体から得ることは、倫理的な面も含め様々な問題がある。そこで本研究では、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。

本研究では、(1)ヒト線維芽細胞を肝細胞系へと分化誘導する新規因子の同定、(2)ヒト肝前駆細胞の長期培養系の構築、(3)マウス新生児への肝前駆細胞の移植系の構築、の3点に関して解析を行った。

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。本研究では、マウス・ヒト繊維芽細胞に候補遺伝子群を導入し、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。

まず肝分化を促進する候補遺伝子の探索を行う。胎仔肝臓から肝幹・前駆細胞をフローサイトメーター (FACS) を用いて純化し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。HNF4 α 、FoxA2、FoxA3 などの既知の肝細胞機能遺伝子に加えて、肝分化過程で遺伝子発現が変化する核内因子群を候補遺伝子とした。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。マウス胎仔繊維芽細胞を、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。RNA を抽出し、肝細胞マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR を用いて同定した。さらに得られた候補遺伝子を、ヒト繊維芽細胞を用いて検討を行った。ヒト繊維芽細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、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。

我々は、マウス胎仔繊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。まず、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することで肝臓系細胞へと分化誘導した。得られた細胞から肝幹・前駆細胞を FACS を用いて純化した。純化細胞を、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* での長期増殖が可能である。長期培養した細胞の分化能 (成熟肝細胞および胆管細胞) を同定するために、適切な文化条件での培養を行った。肝前駆細胞は、3 次元培養による高次構造 (スフェロイド) を形成することで、肝機能遺伝子を発現する成熟肝細胞への分化傾向を示すことが報告されている。そこで、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞をハンギングドロップ法によりスフェロイド形成させたのちに RNA を回収し、成熟肝臓の機能遺伝子の発現を解析した。また、コラーゲン・ラミニンといった細胞外マトリクスに包埋培養することで、胆管系細胞への分化誘導実験を行った。さらに、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 マウス胎仔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。

この目的のため、マウス胎生 13 日肝臓より肝幹・前駆細胞を分離し、新生仔マウスの肝臓に直接的に細胞移植を行った。また、新生仔マウスの眼底静脈を經由して静脈血流を通じた細胞移植を検討した。また、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) 線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。平成 23 年度の成果として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い、いくつかの候補核内因子を同定した。マウス胎仔 13 日肝臓をコラゲナーゼによって分散し、肝幹・前駆細胞マーカーである CD133 および Dlk の両陽性画分を FACS を用いて純化し RNA を回収し、成体マウス肝臓由来の成熟肝細胞

胞との発現比較を行った(図1)。その結果、複数の転写因子や核内因子が肝発生過程で発現が変化することを見出し、これらを肝分化誘導の候補遺伝子とした。

平成24年度では、得られた候補遺伝子群をマウス線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、約2週間培養した後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。HNF4 α および FoxA2 の強制発現によってアルブミンの誘導が見られるが、その発現レベルはコントロールとして用いたマウス胎仔肝臓由来細胞と比べて低いものである。そこで、HNF4 α および FoxA2 に加えて発現させることで、肝分化をより促進できる因子の探索を行った結果、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が強く誘導されることを見出した(PCR および免疫染色)。さらに、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) といった転写因子に関しても、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、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(図2)。以上の結果から、既知因子(HNF4 α および FoxA2)に加えて Mist1, Bcl6, HLF を新規肝分化誘導因子として同定した。さらにリア

ルタイムPCR および FACS による細胞表面抗原の発現解析を行った。その結果、特に Mist1 を強制発現させた際に、誘導される線維芽細胞由来肝臓系細胞中で肝幹細胞マーカーである CD133 陽性細胞の比率が増加することを明らかとした。現在、この細胞画分に高増殖性と多分化能をもつ肝前駆細胞が含まれるか検討を行っている。

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、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等の発現をリアルタイムPCRにて解析することでスクリーニングを行った(図3)。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。

平成23年度の研究成果としてヒト iPS 細胞

を既報に従って肝臓系細胞へと分化誘導を行い、肝幹・前駆細胞マーカーCD13 および CD133 の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い、AFP、HNF4 α 陽性のコロニー形成能を同定した。その結果、CD13⁺CD133⁺ 分画に高いコロニー形成能が見られ、この分画に高増殖性の肝幹・前駆細胞様の細胞が濃縮されていることが分かった(図 4)。形成されたコロニーをトリプシンにより酵素的に分散し新たなフィーダー細胞上に播種することで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(図 5)。数代の継代培養後に形成されたコロニーでも、初代のコロニーと同様に AFP、FoxA2、HNF4 α 陽性を示すことから、継代培養後も肝幹・前駆細胞様細胞としての形質を維持していると考えられる。

平成 24 年度は、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後に、肝機能遺伝子(CYP など)の発現をリアルタイム PCR を用いて解析した(図 6)。その結果、継代培養を重ねた iPS 由来肝幹・前駆細胞で

あっても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 Apical 側、Basolateral 側それぞれに特異的なタンパク質を発現する極性を持つ上皮細胞シートから形成されており、胆管のマーカー遺伝子である Cytokeratin7 の発現が見られた。つまり、この培養系により 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と考えている。

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 7)。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 8)、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

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ている。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によって移植を行い結果を比較した。

Dlk^+ 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(図 9 左)。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(図 9 右)。今後、移植後の時間経過に従って肝臓やその他の異所性の移植細胞の生着・増殖の過程を解析する予定である。

また移植後に肝障害の誘導できる別の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。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、脾臓経由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 10)。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

マウス線維芽細胞から Direct に肝細胞を作り出す系として、我々は $HNF4\alpha$ および $FoxA2, 3$ に加えて、HLH 型転写因子 $Mist1$ や $Bcl6$ 、 HLF を発現させることで誘導効率

が上昇することを見出した。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線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、線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行っている。現在までの検討結果では、肝幹細胞マーカーである CD133 等の発現が Mist1 によって強く誘導されることなどが明らかとなっており、今後詳細な解析を行う予定である。

また、マウス線維芽細胞で同定した Mist1 や Bcl6、HLF の肝分化促進能を、ヒト線維芽細胞で評価した結果、Bcl6 に関しては、マウス細胞と同様に肝機能遺伝子の誘導が見られたのに対して、Mist1 や HLF では肝分化促進能が観察されなかった。つまり、マウス細胞とヒト細胞では肝分化に関する機構が異なる可能性があり、今後検討する必要がある。

ヒト線維芽細胞への遺伝子導入、肝細胞（肝幹・前駆細胞）への分化誘導を進める上で細胞周期関連遺伝子の影響が考えられる。マウス線維芽細胞を用いた上記因子での Direct reprogramming の系においても正常マウス線維芽細胞よりも cdk インヒビターである p16/19 cdkn2a のノックアウトマウス由来の線維芽細胞を用いた際に、効率のよい肝分化誘導、その後の細胞の増殖が見られることがわかった。我々は既に、マウス胎仔肝臓

から分離した肝幹・前駆細胞の長期培養を行う中で、培養が進むにつれて cdk インヒビターである cdkn2a の発現が上昇し細胞増殖が停止することを見出している。ヒト線維芽細胞からの肝幹・前駆細胞の分化系でも、試験管内での分化誘導・増殖の過程で cdkn2a の発現上昇が誘導され、効率的な肝分化誘導が阻害される可能性が指摘される。そこで human cdkn2a のノックダウン shRNA ベクター等を同時に導入することで、肝分化効率を上昇できるか検討する予定である。

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 陽性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 HNF4 α 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ることを見出した。

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

Ito H, Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Okada K, Nakauchi H*. In vitro expansion and functional recovery of mature hepatocytes from mouse adult livers. *Liver Int.* 32(4):592-601. 2012 (*Corresponding Authors)

Okada K, Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Ito H, Kondou H, Nishina H, Nakauchi H*. Prospective Isolation and Characterization of Bipotent Progenitor Cells in Early Mouse Liver Development. *Stem Cells Dev.* 21(7):1124-33. 2012 (*Corresponding Authors)

Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H. Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of

Reprogramming. *PLoS One*. 7, e41007, 2012

Sekine K, Takebe T, Suzuki Y, Kamiya A, Nakauchi H, Taniguchi H. Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent stem cells. *Transplant Proc.* 244, 1127-9, 2012.

Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology*, 57, 2502-2513, 2013.

Oikawa T, Kamiya A*, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, Wauthier E, Tajiri H, Miller LD, Wang XW, Reid LM*, Nakauchi H*. SALL4, a stem cell biomarker in liver cancers. *Hepatology* 57, 1469-83, 2013.
(*Corresponding Authors)

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

Kamiya A, Miyajima A. Mice with artificial human liver. *Hepatology*. 55(3):974-976. 2012

紙谷聡英 「発生過程・生体における肝幹・前駆細胞の分化誘導の分子メカニズム」 *肝胆膵*, 2012, 65, 29-35

紙谷聡英 「ヒト多能性幹細胞からの肝幹・前駆細胞分化誘導系の構築」 *消化器内科*, 2013, 56, 316-323

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、柳田絢加、岡田 健、伊藤 慶一、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの長期増殖可能な肝前駆細胞の分化誘導」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

ホテル日航金沢 2012 年 6 月 7 日

柳田 絢加, 紙谷 聡英, 岡田 健, 伊藤 慶一, 伊東 秀典, 中内 啓光

「発生過程における cdk 抑制因子 p57 による肝増殖制御機構」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

伊藤 慶一, 紙谷 聡英, 岡田 健, 柳田 絢加, 伊東 秀典, 中内 啓光

「胎仔肝幹細胞の自己複製を制御する新規分子の探索とその機能解明」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

紙谷聡英、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの肝幹・前駆細胞分化誘導系の構築」

第 15 回肝臓学会大会 (JDDW2011)

福岡国際会議場 2011 年 10 月 20-23 日

紙谷聡英

「肝幹・前駆細胞の長期増殖を制御する細胞内シグナル伝達機構」

第 46 回 幹細胞治療研究フォーラム

東大医科学研究所 2012 年 3 月 22 日

紙谷聡英、中内啓光

「MEK-ERK シグナル伝達系による胎生肝幹・前駆細胞の増殖制御機構」

第 48 回日本肝臓学会総会

紙谷 聡英

「肝幹・前駆細胞の長期増殖を制御する細胞内シグナル伝達機構」

第 11 回日本再生医療学会

ランチョンセミナー・招待講演

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日

紙谷聡英、伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光

「MEK-ERK シグナル経路による肝幹・前駆細胞の増殖制御機構」

第 19 回肝細胞研究会

札幌医科大学 2012 年 6 月 29 日

紙谷聡英、伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光

「An in vitro expansion system in generating purified hepatic stem/progenitor-like cells derived from human iPS cells.」

第 35 回日本分子生物学会

福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日

近田裕美、紙谷聡英

「HLH型転写因子による胎生肝幹・前駆細胞の分化誘導」

第 12 回日本再生医療学会

パシフィコ横浜 2013 年 3 月 23 日

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

Okada Ken, Kamiya Akihide, Ito Keiichi, Yanagida Ayaka, Ito Hidenori, Kondou Hiroki, Nishina Hiroshi and Nakauchi Hiromitsu

「Prospective isolation and expansion of hepatoblast during early-fetal liver development in mice」

The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research

Toronto, June 15-18, 2011

Yanagida Ayaka, Kamiya Akihide, Ito keiichi, Okada Ken and Nakauchi Hiromitsu,

「Induction of constitutive proliferation of hepatic stem/progenitor-like cells derived from human iPS cells

EXCITING BIOLOGIES Cellular development : Biology at the interface
Kobe, Japan, Sep 29-Oct 1, 2011

Ito keiichi, Kamiya Akihide, Yanagida Ayaka, Okada Ken and Nakauchi Hiromitsu

「Proliferation of hepatic stem/progenitor cells by spatio-temporally expressed genes during development」

EXCITING BIOLOGIES Cellular development : Biology at the interface
Kobe, Japan, Sep 29-Oct 1, 2011

紙谷聡英、伊藤 慶一、柳田 絢加、中内
啓光

「MEK activity regulates stem/progenitor
potential of fetal hepatoblasts through
induction of cell cycle arrest」

The 10th International Society of Stem Cell
Research

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日

柳田 絢加、紙谷聡英、伊藤 慶一、中内
啓光

「The Application of Human iPS cells as an in
vitro expansion system in generating purified
Hepatic stem/progenitor-like cells to
determine the molecular mechanisms
regulating human liver organogenesis」

The 10th International Society of Stem Cell
Research

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日

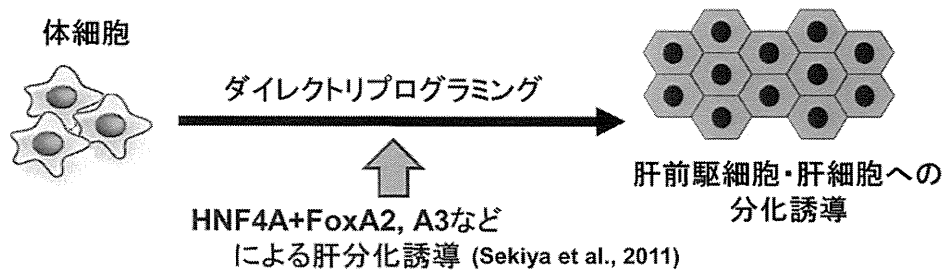
Hiromi Chikada, Keiichi Ito, Ayaka
Yanagida, Hiromitsu Nakauchi, Akihide
Kamiya

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

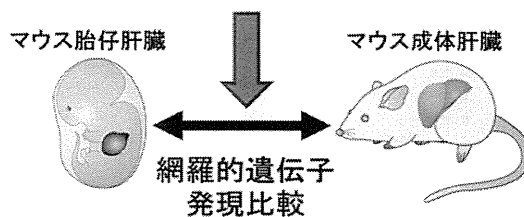
The 11th Annual Meeting of International
Society for Stem Cell Research
Boston Convention and Exhibition Center,
USA, June 12-15, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

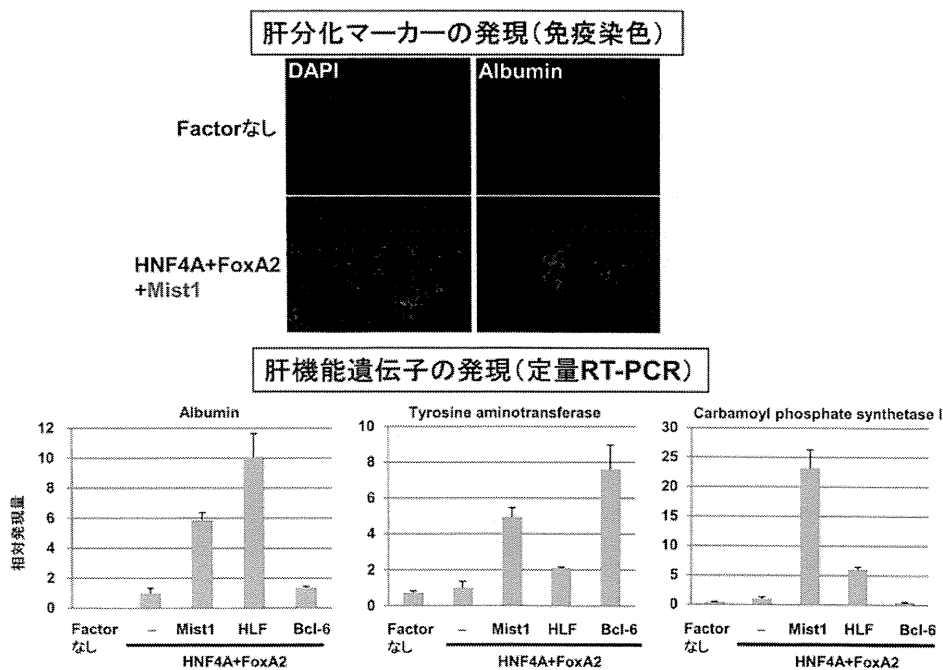


より高効率に肝分化・肝機能を誘導するFactor(核内因子群)
候補の遺伝子導入スクリーニング



候補遺伝子群のマウス線維芽細胞への強制発現
肝機能遺伝子の発現解析

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



マウス線維芽細胞を分化誘導可能な新規肝分化誘導因子としてMist1, HLF, Bcl-6を同定

図2 Direct Reprogramming によるマウス線維芽細胞の機能肝細胞への分化誘導

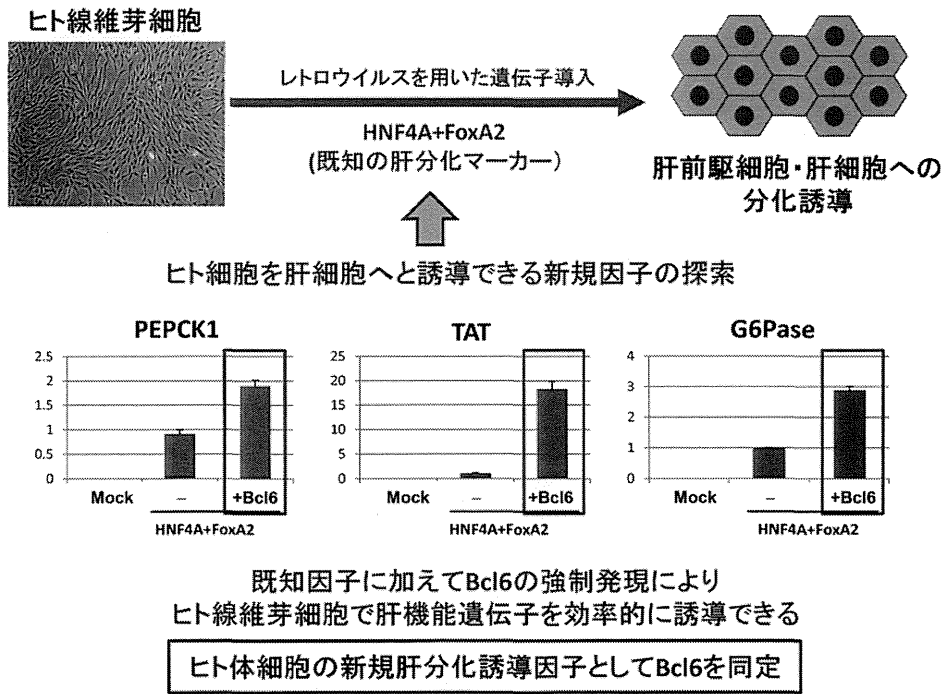


図3 Direct Reprogramming によるヒト線維芽細胞の機能肝細胞への分化誘導

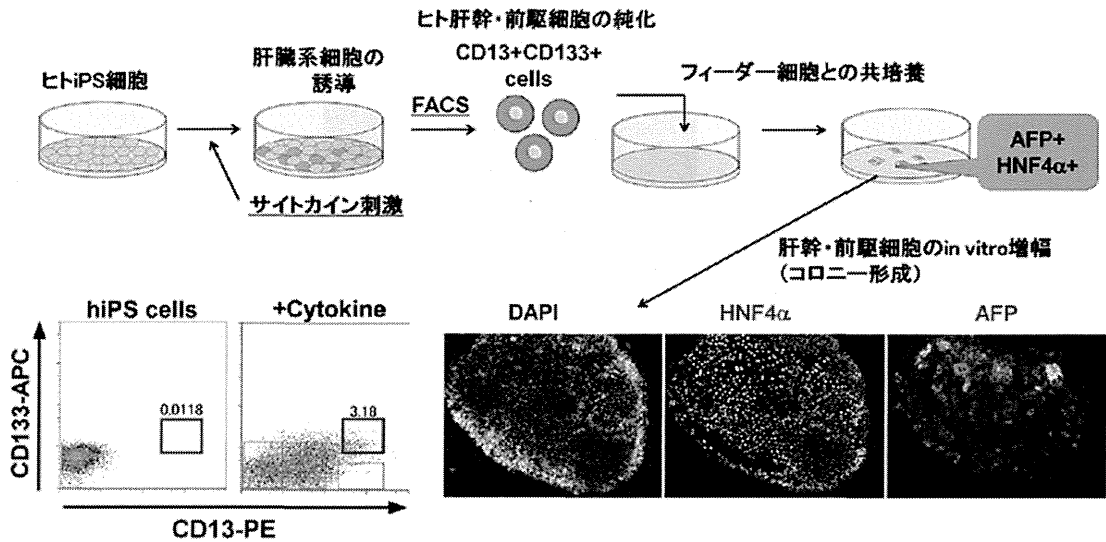


図4 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の分離・培養系の構築

ヒト肝幹・前駆細胞の移植：移植に必要な細胞のin vitro expansion系を構築

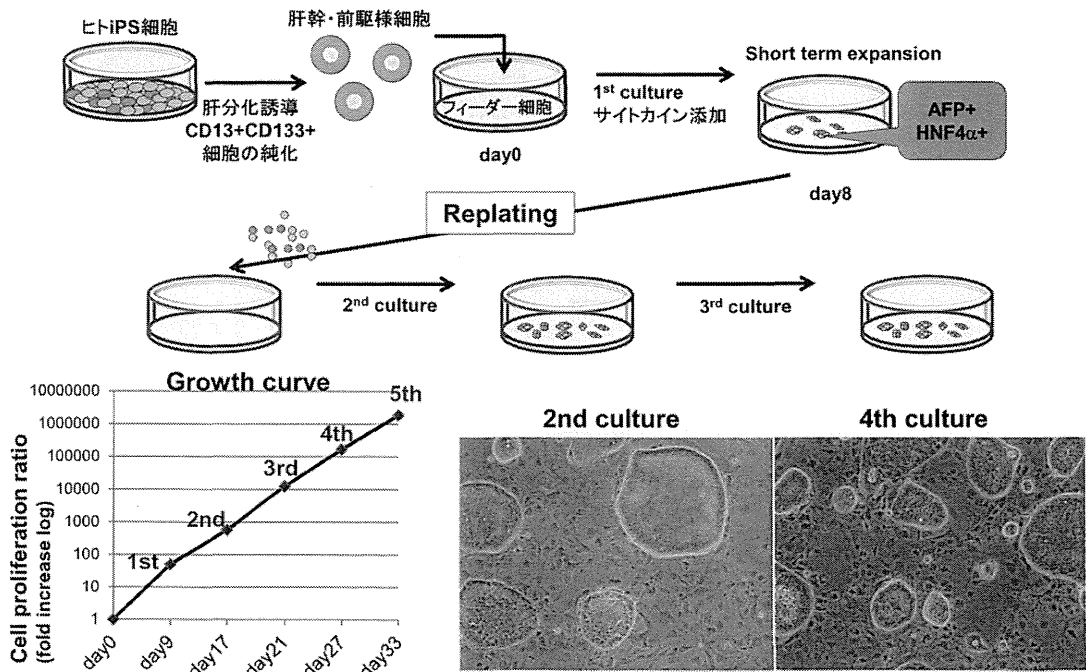


図5 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の長期増殖能

ヒトiPS細胞由来肝幹・前駆細胞の機能肝細胞への分化誘導

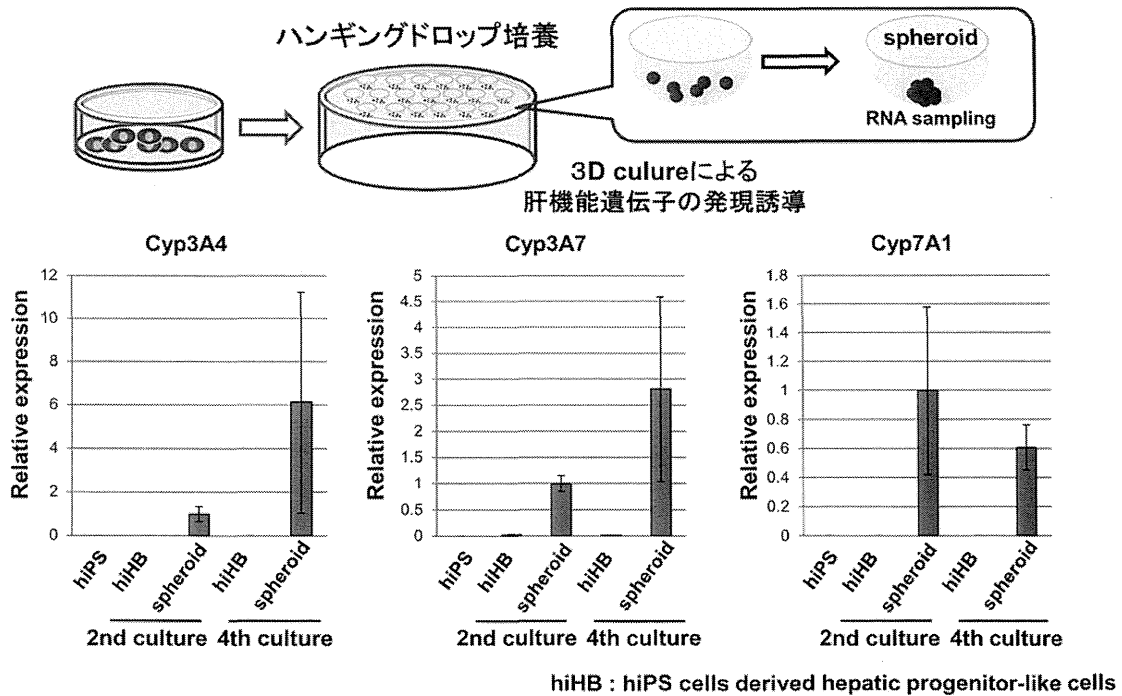


図6 ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の成熟肝細胞様細胞への分化