

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16341

研究課題名(和文) 羊膜上皮細胞を用いた新規肝不全治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for liver failure, using amniotic epithelial cells

研究代表者

高橋 一広 (Takahashi, Kazuhiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80794528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：外胚葉由来の羊膜上皮細胞は細胞実験において、IPS細胞を使用した内胚葉分化プロトコールおよび肝細胞分化プロトコールや既報のマウス羊膜上皮細胞分化プロトコールでは、目的とする羊膜上皮細胞内胚葉化および肝細胞への分化が難しいことが示唆された。一方で、natural productである Isoharmentinによる羊膜上皮細胞の分化誘導で、肝芽細胞への分化を示唆する結果が得られ、今後引き続き検討する余地があると考えられた。一方、動物実験でのヒト羊膜上皮細胞分化誘導は再現性に乏しく、今回行った検証ではヒト肝細胞化の確定的な結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

廃棄処分される胎盤から分離される羊膜上皮細胞を用いて、細胞実験や動物実験で肝細胞に分化させることができるかどうかを検証した。Natural productである Isoharmentinによる分化誘導により羊膜上皮細胞が肝細胞の前駆細胞である肝芽細胞への分化を示唆する結果を得られた。今後、条件設定を見直すことで、分化できる肝芽細胞を増やすことができ、さらに肝細胞に分化させることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In vitro study, we assessed if human amnion epithelial cells (hAEC) derived from ectoderm could differentiate into human hepatocyte, using IPS protocol or previous AEC protocols used for mice AEC. But, we could not find any evidence of hAEC to differentiate into human hepatocytes or definite endoderm-AEC. On the other hand, using natural product, Isoharmentin, there was some evidence that hAEC could differentiate into human hepatoblasts. We consider Isoharmentin as a key element of hAEC for hepatocyte differentiation. On the other hand, in vivo study, we could not find any evidence of hAEC for human hepatocyte differentiation.

研究分野：肝再生

キーワード：羊膜上皮細胞 肝再生 肝細胞 肝芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肝不全は肝臓に備わっている生理機能としての合成能や代謝機能が病的に低下している状態であり、大量肝切除後、肝硬変終末期、劇症肝炎などで発現することが知られている。肝不全は進行すると、多臓器不全を引き起こし、致死率は80%に及ぶ。現在までに人工肝臓の開発や異種肝移植などが試みられたが、現時点で肝不全に対する根治的治療は同種肝移植以外にない。

近年の人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) の発見以来、iPS 細胞や胎盤由来幹細胞 (Embryonic stem cells, ESC) などの多機能幹細胞が新たな肝細胞供給源として注目されている。多機能上皮芽細胞の一つであるヒト羊膜上皮細胞 (human amniotic epithelial cells, hAEC) は外胚葉系の細胞であり、特定の条件下で、三胚葉のどの細胞への分化も可能である。さらに、hAEC の細胞移植で腫瘍に分化する可能性は少ないと考えられており、再生医学において強い可能性に秘めた細胞として期待されている。過去に、メープルシロップ尿症候群、Niemann-Pick 病、フェニルケトン尿症の動物モデルで、hAEC を用いた細胞移植の有効性が報告されている。一方で、肝疾患に対する hAEC を用いた細胞移植の有効性に関する報告は過去になかった。

## 2. 研究の目的

単一施設からの報告で、重症免疫不全マウスに hAEC 細胞移植を行うことで、hAEC がヒト肝細胞に分化したとされているが、他施設での再現に至っていない。また、ラットにおいて hAEC がヒト肝細胞に分化した報告はなく、ラットで分化して得られる肝細胞量を考慮すると、ラットでの成功意義はマウスよりも大きい。本研究は、通常廃棄処分される胎盤から当研究室で毎週分離されている hAEC を免疫不全ラットに細胞移植し、ラット体内で hAEC をヒト肝細胞に分化させることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 実験 1. hAEC の *in vitro* での内胚葉化 (DE-hAEC) と肝細胞化

破棄処分する胎盤より hAEC を分離する。既報 iPS プロトコールおよび肝細胞分化プロトコールを用いて、hAEC を *in vitro* で DE-hAEC または肝細胞に分化させる。

### 実験 2. hAEC と DE-hAEC もしくは human hepatocyte の X-SCID での分化・増殖

5 週齢の雄性重症免疫不全ラット (X-SCID) ラットに 70% 肝切除を施行後、hAEC または DE-hAEC を投与する。ラットに Restorsine 60mg/kg を腹腔内投与し、dipeptidyl peptidase IV 欠損ラットを作成する。Restorsine 投与 4 週後に 70% 肝切除を行い、門脈から hAEC もしくは DE-hAEC を投与する。細胞移植後、血清ヒト由来アルブミンの発現を ELISA で定量する。ラットを細胞移植後、犠死し、摘出した肝臓を用いてヒト由来 AFP、アルブミンおよび CYP3A1 の RT-PCR による評価を行い、DE-hAEC とヒト肝細胞分化を評価する。

## 4. 研究成果

### 実験 1. hAEC の *in vitro* での DE-hAEC もしくは肝細胞への分化誘導

#### 1. iPS 細胞内胚葉分化プロトコールを用いた分化誘導

iPS 細胞内胚葉分化プロトコール {day 1 (RIMP 1640, B27 0.5X(1%), Activin A 100ng/ml, wnt3a 50ng/ml, Rock Inhibitor 10uM), day 2-4 (RIMP 1640, B27 0.5X(1%), Activin A 100ng/ml, wnt3a 50ng/ml, Sodium Butyrate 0.5UM), day 5-7 (RIMP 1640, B27 0.5X(1%), Activin A 100ng/ml, wnt3a

50ng/ml)}を用いて検討した。その結果、内胚葉特異マーカーである SOX17 と FOXA2 の有意な上昇は認めず、内胚葉分化誘導はできなかった。

図 1. AEC 分化細胞の mRNA 発現 (RT-PCR)

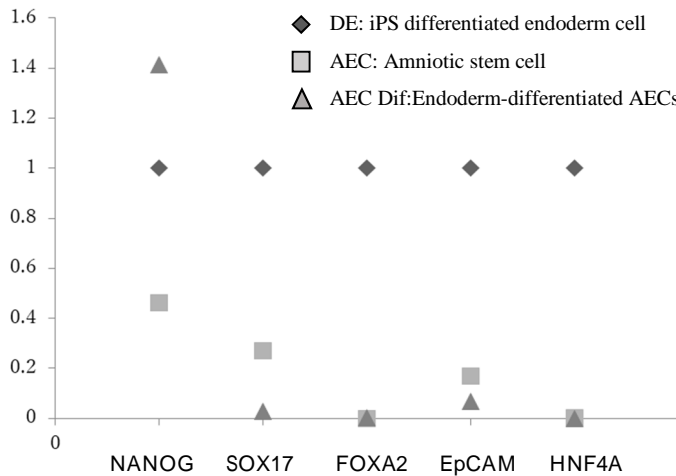
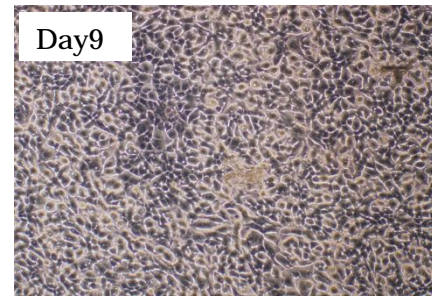


図 2 . hAEC の形態変化



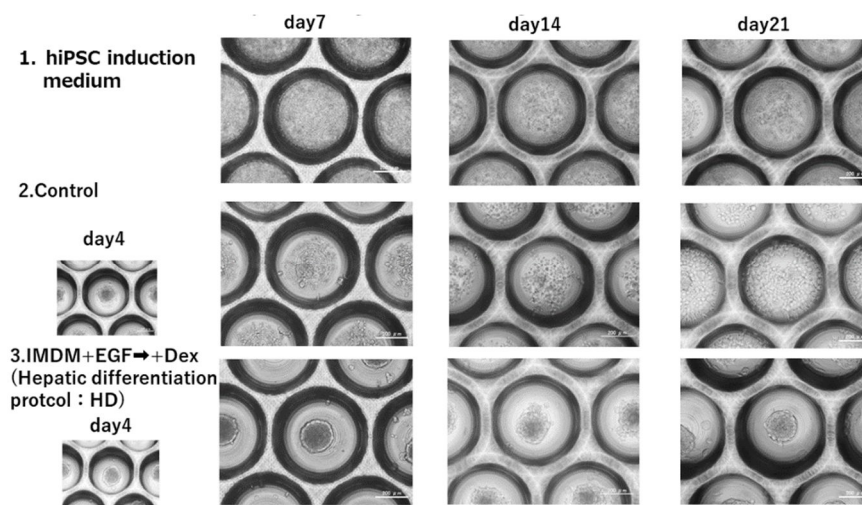
## 2 . AEC の肝細胞分化プロトコルを用いた肝細胞分化誘導

既報のマウス AEC の肝細胞分化プロトコル{ day 8 (SDF-IMDM, Rock inhibitor, 10uM, Dex 100nM, OSM 10ng/ml, bFGF 10ng/ml, HGF 20ng/ul), day 9-21 (SDF-IMDM, Nicotinamide 10mM, Dex 100nM, OSM 10ng/ml, bFGF 10ng/ml, HGF 20ng/ul )}を用いて検討した。hAEC の形態変化および遺伝子発現について調べた。その結果、Day9 には形態的には肝細胞様変化を来した(図 2)。肝細胞マーカーである Albumin, CY3A4 の軽度な上昇を認めるが、ポジティブコントロール(PC)の HepG2 と比較して極めて低値であった。同様に、肝細胞マーカーである AFP も軽度上昇していたが、PC に比べると低値であった。

## 3 . 3D 培養による AEC の肝細胞分化誘導

hAEC を肝細胞分化プロトコルで 3D 培養を行った。ポジティブコントロールとして IPS を IPS プロトコルで肝細胞への 3D 培養で分化誘導した。コントロールでは spheroid 形成を認めなかったが、肝細胞分化プロトコルにより hAEC は day 7, 14, 21 それぞれで spheroid 形成を認めた(図 3)。次に上清中の、肝細胞マーカーおよび肝芽細胞マーカーの発現について調べた。

図 3. 3D 培養による spheroid 形成



肝細胞分化プロトコルにおいて、Day 14, 21 に肝細胞マーカーである Albumin は低値で

あるが上昇を認めたが、CYP3A4 と A1AT の上昇は認めなかった。また、肝芽細胞マーカーの AFP の上昇は認められなかった。

#### 4 . Natural product の isorhamnetin を用いた分化誘導

Natural product の isorhamnetin を用いた分化誘導を検討した。Isorhamnetin の適正濃度を検討するために hAEC の MTT assay を行った。hAEC の viability は isorhamnetin 5 $\mu$ M -20 $\mu$ M でピークとなることが明らかになった。今回、20 $\mu$ M で hAEC の spheroid での分化誘導を行う方針とした。さらに、HGF を用いてさらなる分化誘導が可能か Isorhamnetin と HGF の組み合わせにより、hAEC の形態変化と肝細胞マーカー、肝芽細胞マーカーおよび胆管細胞マーカーの発現について調べた。

Isorhamnetin および Isorhamnetin + HGF で spheroid 形成を認めたが、HGF とコントロールでは spheroid 形成を認めなかった。Isorhamnetin および Isorhamnetin + HGF で Day 10 に肝細胞マーカーである Albumin と CYP3A4 の上昇を認めた。Isorhamnetin 20 $\mu$ M で肝芽細胞マーカーの AFP の上昇は認められなかったものの、DLK-1 と EPCAM が高値に発現していた。一方で、胆管細胞マーカーの発現は認められなかった。

#### 実験 2. hAEC と ED-hAEC もしくは human hepatocyte の X-SCID での分化・増殖

##### 1 . hAEC 単独での直接的な *in vivo* での誘導

XSCID ラット (N =3) を 70% 肝切除後、hAEC を 3 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/rat を門脈注射し、2、4、8 週間後にヒト由来 Album を測定したが、いずれも発現は認められなかった。

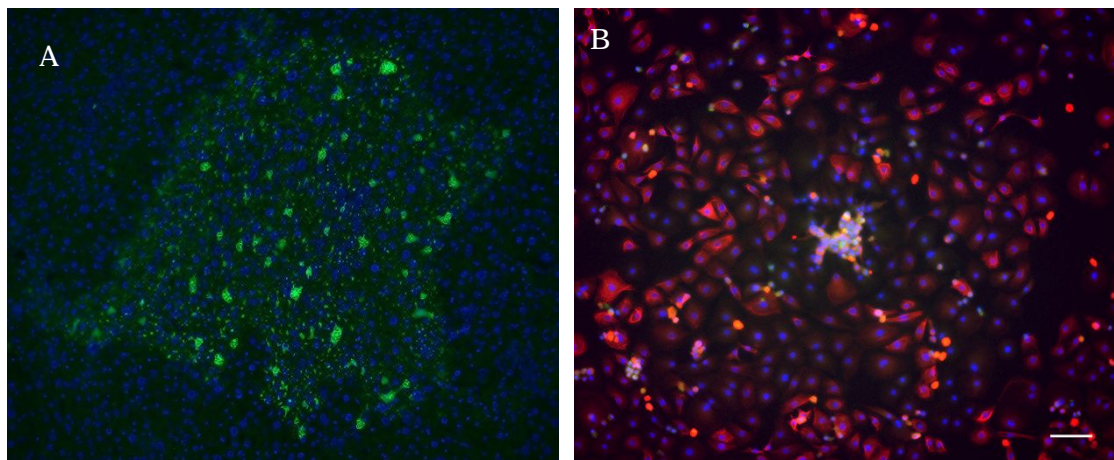
##### 2 . Human endothelial progenitor cells (EPC) human Mesenchymal stem cells (hMSC) および hAEC の共培養による spheroid による *in vivo* での誘導

XSCID ラット (N =3) を 70% 肝切除後、spheroid を 3 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/rat を門脈注射し、2、4、8 週間後にラットを犠牲させ、肝臓をヒト AFP (AFP)、ヒト Albumin およびヒト Nuclei の免疫染色を行った。8 週後に肝内でヒト AFP のみ陽性となる領域を複数の切片の中で 1 つだけ検出した(図 4A)。ヒト ALB とヒト肝細胞については検出できなかった(図 4B)。

図 4. 分化細胞の免疫染色

ヒト AFP (緑) ラット DAPI (青) 染色

ヒト AFP, ラット CK8 (赤), DAPI (青) 染色



血清中のヒト Album を測定したが、いずれも発現は認められなかった。

以上の結果、hAEC は *in vitro* において、既報の内胚葉分化プロトコールおよび肝細胞分

化プロトコールでは、目的とする ED-hAEC および肝細胞への分化は難しいことが示唆された。一方で Isoharmnetin による hAEC の分化誘導で肝芽細胞への分化を示唆する結果があり、今後引き続き検討する余地があると考えられた。

*In vivo* での分化誘導は再現性に乏しく、今回行った検証ではヒト肝細胞化の確定的な結果は得られなかった。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Farhana Ferdousi, Kazunori Sasaki, Yoshiaki Uchida, Nobuhiro Ohkohchi, Yun-Wen Zheng, Hiroko Isoda	4. 巻 24
2. 論文標題 Exploring the Potential Role of Rosmarinic Acid in Neuronal Differentiation of Human Amnion Epithelial Cells by Microarray Gene Expression Profiling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.00779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Munkhzul Ganbold, Yohei Owada, Yusuke Ozawa, Yasuhiro Shimamoto Farhana Ferdousi, Kenichi Tominaga, Yun-Wen Zheng, Nobuhiro Ohkohchi, Hiroko Isoda	4. 巻 9
2. 論文標題 Isorhamnetin Alleviates Steatosis and Fibrosis in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SCIENTIFIC REPORTS	6. 最初と最後の頁 16210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52736-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	磯田 博子  (Isoda Hiroko)	筑波大学・生命環境系・教授  (12102)	
研究協力者	梁 宸  (Liang Chen)	筑波大学・人間総合科学研究科  (12102)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 義夫  (Shimizu Yoshio)	筑波大学・人間総合科学研究科  (12102)	
研究協力者	古田 智彰  (Furuta Tomoaki)	筑波大学・人間総合科学研究科  (12102)	
連携研究者	鄭 允文  (Zheng Yunwen)  (80404995)	筑波大学・消化器外科・准教授  (12102)	