

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08988

研究課題名(和文)新規細胞移植モデルの確立を目指した肝幹細胞の分化・増殖機構の解明

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanisms underlying differentiation and proliferation of hepatic stem/progenitor cells for development of novel cell transplantation models

研究代表者

柿沼 晴 (KAKINUMA, Sei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30372444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、細胞表面抗原によって濃縮したマウス肝幹・前駆細胞を用いて、その分化と増殖の分子機構を解析し、目的分子の発現を調節した移植系を用いて、肝幹・前駆細胞による細胞移植効率の向上を図る研究を行った。その結果、MT1-MMPを介したシグナル伝達により、肝幹・前駆細胞由来の胆管の管腔形成が促進されること、EGFシグナル制御との相関によって、肝細胞への分化が抑制されることが示された。また、BMP-4は肝幹・前駆細胞の増殖を負に制御することが示された。本研究の成果は、将来の自己由来幹細胞を用いた肝再生医学の進歩に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Investigators of this research project have studied on the molecular mechanisms underlying differentiation and proliferation of primary hepatic stem/progenitor cells purified by cell surface molecules and therapeutic efficacy of transplantation using hepatic stem/progenitor cells. Our data demonstrated that MT1-MMP and MT1-MMP-related signaling promote luminal formation of bile ducts derived from fetal hepatic stem/progenitor cells, and that they negatively regulate differentiation of such cells into mature hepatocytes in association with modulation of EGF-signaling pathway. Our data also showed that BMP-4 signaling negatively regulates proliferation of primary hepatic stem/progenitor cells. These studies contribute to the progress of regenerative medical science and development of autologous stem cell therapy against chronic liver diseases.

研究分野：消化器病学

キーワード：再生医学 発生・分化 細胞移植 肝疾患治療 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦では、肝癌を含めた慢性肝疾患によって、年間約 40,000 人以上が死亡し、その死因は終末像としての肝不全が大半を占めている。現在のところ、致死性肝不全に対する根治的治療は肝移植のみであるが、脳死ドナーの絶対的不足・生体ドナーに対する精神的・社会的負担が依然として大きな社会問題となっており、代替治療の確立が強く求められている。

近年、より増殖能の高い幹細胞・前駆細胞を体外で増やしてから移植治療に利用する試みが注目を集めてきた。肝幹細胞は、自己複製能及び肝細胞・胆管細胞への 2 方向性分化能を有する細胞であり、分離・同定する手法が研究代表者及び連携研究者らによって開発・確立された。さらにヒト iPS 細胞樹立成功に伴って、自己由来肝幹・前駆細胞(以後高い増殖能と 2 方向性分化能を有する細胞を肝幹・前駆細胞と総称する)を誘導して用いる移植治療の実現化が期待され、肝幹細胞の分化と細胞移植のメカニズムを解析する研究の必要性は非常に高い。ところが肝幹細胞は生体内ではごく少数の細胞群であり、その形質を含めて分化・増殖を制御する分子メカニズムは不明の点も多く、さらにこれを移植医療に効率的に利用する方法も現在のところ確立されていない。さらに、肝幹細胞は通常の肝細胞に比べて移植効率が低く、生体内に生着させることが難しい事が報告されている。なぜ幹細胞は移植効率が悪いのか、その機構は未だ不明であり、そもそも疾患治療に応用可能なほどのドナー置換率を、ヒトに於いてどのようにしたら達成できるのか、消化器領域の細胞移植では未だ手懸かりすら乏しい。

これまで、研究代表者は連携研究者、分担研究者らの支援のもとに、肝幹細胞の増殖・分化を制御する分子機構の解析に取り組んできた。さらにマウス健常肝臓内の肝幹・前駆細胞の表面抗原と培養法を胎仔由来(Kakinuma et al. *J Hepatol*, 2009)、成体由来(Kamiya & Kakinuma et al. *Gastroenterology*, 2009)の双方で解析し、増殖能の高い肝幹・前駆細胞を既報以上に濃縮しうることを示した。

加えて、研究代表者はマウスにおける新規の細胞移植系として、Apolipoprotein E(Apo E)欠損マウスをレシピエントとし、薬剤・部分肝切除で前処理したマウスに細胞移植を行うことで、最終的に 70% 以上の高いドナーキメリズムを達成しつつ、移植後のドナーキメ

リズムを定量的に評価・追跡できる移植系の構築に成功した。

2. 研究の目的

前記のような背景、及び我々が確立してきた学術・研究基盤に基づいて、研究代表者らは、今回申請する研究計画において、以下の目的を設定した。すなわち、(1) 細胞表面抗原によって高度に濃縮したマウス肝幹細胞画分を用いて、その分化・増殖に関わる新たな分子機構を解析する。(2) この結果に基づき、特定の標的分子の発現を調節することにより移植ドナー細胞の「至適成熟度」を決定し、肝幹細胞の移植効率を高める条件をマウスにおいて明らかにする。(3) これらの結果を基盤に、ヒト iPS 細胞を用いた新規ヒト肝臓キメラマウスモデルの構築を試みる。これらの研究によって、将来の自己 iPS 細胞由来幹細胞を用いた肝再生医療の学術・技術的な基盤形成に貢献することを、本計画の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、次のステップにより順次進行することとした。

(1) マウス肝幹・前駆細胞の分離、培養、形質解析を進める。研究グループはマウス胎仔肝臓から高速セルソーターを用いて、初代肝幹・前駆細胞として、CD13⁺CD45⁺Ter119⁻画分に増殖性の高い細胞が濃縮されていること、また、CD13⁺CD133⁺c-kit⁺Sca-1⁺CD45⁺Ter119⁻画分に、成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞が濃縮されていることを報告してきた。これらの初代細胞を用いて、成熟肝細胞系譜への分化誘導を行う培養系、胆管細胞系譜への分化誘導を行う培養系を確立している(*Hepatology*, 2013、*Gastroenterology*, 2009)。これらの確立した技術によって、肝幹・前駆細胞分離、培養し、分化誘導するとともにその形質を解析する。

(2) 肝幹・前駆細胞における MT1-MMP の機能解析を行い、その機能を解明する。Matrix Metalloproteinase(MMP)は細胞外基質の分解を主たる役割とする酵素であるが、炎症・再生の過程にも深く関与することが知られている。一方で、MMP の幹細胞における機能に関しては、多くの点が不明である。MT1-MMP は膜に結合した非遊離型 MMP であり、癌細胞の浸潤過程に重要な役割を果たす。幹細胞での機能としては、造血幹細胞や間葉系幹細胞の運動性を制御することが報

告されている一方で、肝幹/前駆細胞に対する機能はこれまで不明であった。我々はこれまでの研究過程において、MT1-MMP が肝幹/前駆細胞から胆管を形成する過程において、促進的に機能する可能性を見いだした。そこで、MMP14 の肝幹/前駆細胞における機能を、Tet 誘導性 lentiviral vector を用いた強制発現系と、MMP14 欠損マウス (生後 1 週間で死亡する) から分離した初代肝幹/前駆細胞を用いて、前記の培養系などを駆使して、細胞生物学的な解析を行うことで、その機能を明らかにすることとした。

(3)MT1-MMP 欠損マウス由来細胞を用いた transcriptome 解析により MT1-MMP 標的分子を絞り込み、その分子機能を解明する。胆管形成に関与する因子は、MT1-MMP により調節されている可能性が考えられる。しかしながら、MT1-MMP の発現亢進は癌化プロセスとの強い相関があり、細胞移植後の発癌に関して問題が生じる可能性がある。そこで癌化プロセスと相関しない MT1-MMP 標的分子を探索し、これを調節することが必要となる。従って、MT1-MMP 欠損マウス由来の肝幹/前駆細胞、及び MMP14 欠損マウス由来の新生仔期肝臓を用いて、Whole Transcriptome 解析を行う。得られた結果をもとに、pathway 解析、GO 解析を主体とした *in silico* 解析を行い、関連分子のスクリーニングを行う。標的分子の絞り込みがなされた後に、これらの標的分子を選択的に knock down もしくは強制発現することによって、MT1-MMP の形質・機能が再現できるか否かを検証してゆく。

(4)ApoE 欠損マウスをレシピエントとしたマウス肝幹・前駆細胞移植系により、標的分子が移植効率を決定する因子であることを証明する。我々は移植した初代肝細胞・初代肝幹細胞によって、高度のドナーキメリズムが得られる細胞移植系を独自に開発した。本移植系においては、細胞移植後 24 週以上にわたって、ドナー細胞がレシピエント肝臓に生着・増殖することが可能である。さらに ApoE 欠損マウスをレシピエントとして移植を行うと、ドナー細胞が産生する ApoE 蛋白によって高コレステロール血症が長期改善し、細胞移植の治療効果が得られることを確認した。本法では血清中の総コレステロールと ApoE 蛋白を定量することによって、ドナーキメリズムのモニタリングと定量化が可能である。

この移植解析系を用いて、前述の(1)-(3)によ

って抽出された MT1-MMP 標的分子を強制発現もしくは knockdown した細胞を用いて、移植を行い、移植効率に与える影響を解析する。

(5)標的分子の調節により、移植効率を亢進させるドナー細胞を用いて、ヒト iPS 細胞由来細胞によるヒト肝臓キメラマウスモデルを構築する。

4. 研究成果

(1)マウス肝幹・前駆細胞の分離、培養、*in vitro* での形質解析と肝幹・前駆細胞における MT1-MMP の機能解析: マウス肝幹・前駆細胞の分離、培養技術の最適化を進め、さらに安定した分化誘導培養が可能となった。また、初代肝幹/前駆細胞から胆管細胞系譜へ分化誘導する手法に改良を加え、効率的な胆管様構造体<Cholangiocytic cysts>の形成法を確立した。これらを基盤として、肝幹/前駆細胞に対する MT1-MMP の強制発現、MT1-MMP 欠損マウスを用いたマウス肝幹・前駆細胞における機能解析を行った。その結果、MT1-MMP を強制発現すると肝細胞成熟化に抑制的に、胆管形成に促進的に機能することを見いだした。一方で、MT1-MMP 欠損マウスでは、胎仔から新生児期における、胆管原器の形成遅延を認め、MT1-MMP 欠損マウス由来の肝幹・前駆細胞を培養すると、Cholangiocytic cysts の形成不全がみられ、相対的に肝細胞分化が亢進していることが認められた。Whole Transcriptome 解析を行った結果、MT1-MMP 欠損マウス由来肝幹・前駆細胞及び MT1-MMP 欠損マウス肝臓では、EGF シグナルの活性化が野生型に比して亢進していることが示された。確認のために、MT1-MMP 欠損マウス由来肝幹・前駆細胞を用いて Immunoblot 解析を行うと、p38MAPK、ERK などの MAP kinase 群のリン酸化が亢進していることから、MT1-MMP 欠損マウス由来肝幹・前駆細胞においては EGF シグナルが亢進していることが示された。これらの結果をまとめると、肝幹・前駆細胞において MT1-MMP は EGF シグナルを調節しつつ、肝細胞分化を抑制的に、胆管形成を促進的に支持することが示された。これらの研究成果は国内外の学術集会及び原著論文として報告した (*Biochem Biophys Res Commun*, 2016)。

さらに、これらの成果を基盤として解析を行った結果、肝幹・前駆細胞においては、BMP-4 シグナルが、細胞増殖を抑制し、胆管形成に対して抑制的に、肝細胞分化に対して促進的に機能することを見いだした。これらの研究成

果は国内外の学術集会及び原著論文として報告した (*Hepatol Res*, 2016)。

(2) ApoE 欠損マウスをレシピエントとしたマウス肝幹・前駆細胞移植後の細胞動態の解析：我々の開発した移植法に基づいて、ApoE 欠損マウスをレシピエントとして野生型肝細胞をドナーとして細胞移植を行うと、ドナー細胞が産生する ApoE 蛋白によって高コレステロール血症が長期改善し、細胞移植の治療効果が得られることを確認した。血清中の総コレステロールと ApoE 蛋白を定量することによって、ドナーキメラリズムのモニタリングと定量化したところ、MT1-MMP を強制発現した肝幹・前駆細胞を移植すると、ApoE 欠損マウスでのコレステロール値がコントロール群と比較して有意に低く、移植効率が高くなることが示された。同様に、MT1-MMP が活性化を制御している MMP-2 を強制発現した肝幹・前駆細胞を移植すると、移植効率が高くなることが示された。

(3) ヒト iPS 細胞由来細胞によるヒト肝臓キメラマウスモデルの構築：構築に向けてヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞の誘導培養技術の最適化を進め、新規細胞株の樹立に成功した (*Sci Rep*, 2016)。これらのヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞を利用することで、B 型肝炎ウイルスなどの肝細胞にしか感染しないウイルスの感染、複製を確認することができた。

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 12 件)

Nagata H, Nakagawa M, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Effect of interferon-based and -free therapy on early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 67(5), 933-939, 2017. doi:

10.1016/j.jhep.2017.05.028. 査読有
Murakawa M, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. ITPA gene variation and ribavirin-induced anemia in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated with sofosbuvir plus ribavirin. *Hepatol Res* 47(11): 1212-1218, 2017. doi:

10.1111/hepr.12867. 査読有
Murakawa M, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Hepatic IFNL4

expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol*. 89(7):1241-1247, 2017. doi: 10.1002/jmv.24763. 査読有
Goto F, Kakinuma S, Kamiya A, Asahina Y, Watanabe M, et al. Bone morphogenetic protein-4 modulates proliferation and terminal differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatol Res* 47(9): 941-952, 2017. doi: 10.1111/hepr.12823. 査読有

Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Watanabe M, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci Rep* 6: 29358, 2016. doi: 10.1038/srep29358. 査読有
Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Asahina Y, Watanabe M, et al. Matrix

metalloproteinase-14 mediates formation of bile ducts and hepatic maturation of fetal hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 469(4): 1062-1068, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.105 査読有
Nagata H, Nakagawa M, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Serial measurement of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein is useful for predicting liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with IFN-based and IFN-free therapy. *Hepatol Int*. 10(6):956-964. 2016. doi:

10.1007/s12072-016-9754-1 査読有
Miyoshi M, Kakinuma S, Asahina Y, Watanabe M, et al. A Case of Chronic Hepatitis E infection in a persistently immunosuppressed patient unable to be eliminated after ribavirin therapy. *Intern Med* 55 (19): 2811-2817, 2016. doi: 10.2169/internalmedicine.55.7025 査読有
Taniguchi M, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Evaluation of IFN resistance in newly established genotype 1b HCV cell culture system. *J Clin Transl Hepatol* 4 (1): 5-11, 2016. doi: 10.14218/JCTH.2015.00047 査読有
Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus

integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features. *J*

Gastroenterol 51(5): 473-86, 2016. doi:10.1007/s00535-015-1126-4 査読有

Azuma S, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Efficacy of additional radiofrequency ablation after transcatheter arterial chemoembolization for intermediate hepatocellular carcinoma. *Heptol Res* 46 (4): 312-9, 2016. doi: 10.1111/hepr.12566. 査読有

Murakawa M, Asahina Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Impaired induction of IL28B and expression of IFN λ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 30(6):1075-84, 2015 doi: 10.1111/jgh.12902. 査読有

[学会発表](計18件)

Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Watanabe M, et al. A novel culture model for coinfection of hepatitis B and hepatitis C viruses using human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cells for analyses of changes in host-innate immune responses. AASLD The Liver Meeting 2017

2017.10.22 Washington D.C., USA
三好正人、柿沼 晴、渡辺 守. ヒトiPS細胞由来間葉系譜細胞とヒトiPS細胞由来肝前駆様細胞との細胞間相互作用の解析. JDDW 2017 2017.10.12 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

金子 俊、柿沼 晴、朝比奈靖浩. HBV-HCV 共感染時における抗HCV-DAA 治療に伴うHBV 再活性化機構の解析. JDDW2017 2017.10.12 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

柿沼 晴、角田知之、紙谷聡英、三好正人、金子 俊、佐藤綾子、井津井康浩、東 正新、朝比奈靖浩、渡辺 守. ゲノム編集ヒトiPS細胞由来胆管様細胞を利用した先天性肝線維症の病態解明. 第24回肝細胞研究会2017.06.30 旭川市民文化会館(北海道旭川市)

柿沼 晴、朝比奈靖浩、渡辺 守、他. 食餌誘導性NASH モデルマウスにおけるMatrix Metalloproteinase-2 の機能的解析. 第53回日本肝臓学会総会2017.06.09 広島国際会議場(広島県広島市)

金子 俊、柿沼 晴、朝比奈靖浩. ヒトiPS細胞由来肝細胞系譜細胞を用いたB型

肝炎ウイルス感染への宿主自然免疫応答の解析. 第53回日本肝臓学会総会 2017.06.08 広島国際会議場(広島県広島市)

Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Watanabe M, et al. Genetically modified human induced pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor-like cell lines as a model for interaction between hepatitis B virus and host cells. AASLD The Liver meeting 2016 2016.11.11 Boston, MA, USA

柿沼 晴、後藤文男、大谷賢志、角田知之、三好正人、東 正新、金子 俊、浅野 侑、永田紘子、北畑富貴子、村川美也子、新田沙由梨、井津井康浩、中川美奈、朝比奈靖浩、渡辺 守. BMP-4による肝幹/前駆細胞の増殖と終末分化の制御機構. JDDW2016 2016.11.03 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

柿沼 晴、後藤文男、角田知之、三好正人、大谷賢志、浅野 侑、金子 俊、東 正新、渡辺 守. Bone Morphogenetic Protein-4による肝幹/前駆細胞の増殖と終末分化の調節機構. 第23回肝細胞研究会 2016.07.07 大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)

金子 俊、柿沼 晴、朝比奈靖浩. ヒトiPS細胞由来肝細胞系譜細胞を用いた新たなHBV感染培養系モデル. 第52回日本肝臓学会総会2016.05.19 ホテルニューオータニ幕張(千葉県千葉市)

大谷賢志、柿沼 晴、渡辺 守. Matrix Metalloproteinase-14の肝前駆細胞分化における機能解析. 第102回日本消化器病学会総会 2016.04.22 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Watanabe M, et al. A new model for studying interaction between hepatitis B virus and host cells derived from human induced pluripotent stem cells. EASL The International Liver Congress 2016 2016.04.14 Barcelona, Spain

Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Watanabe M, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor-like cells and hepatocyte-like cells as a model for interaction between hepatitis B virus and host cells. AASLD The Liver Meeting 2015 2015.11.16 San Francisco, CA, USA

柿沼 晴、大谷賢志、渡辺 守. Matrix Metalloproteinase-14 を介した肝幹/前駆細胞の分化調節機構. JDDW2015 2015.10.08 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)

柿沼 晴、大谷賢志、紙谷聡英、後藤文男、金子 俊、東 正新、朝比奈靖浩、渡辺 守. Matrix Metalloproteinase-14 による肝幹/前駆細胞の分化・成熟化の調節. 第22回肝細胞研究会 2015.06.04 米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)

大谷賢志、柿沼 晴、後藤文男、紙谷聡英、櫻井 幸、井津井康浩、東 正新、中川美奈、朝比奈靖浩、坂本直哉、中内啓光、渡辺 守. 肝幹/前駆細胞における Matrix Metalloproteinase-14 による分化調節機構の解析. 第51回日本肝臓学会総会 2015.05.21 同仁堂 (熊本県熊本市)

Otani S, Kakinuma S, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase(MMP)-14 regulates the differentiation of hepatic stem/progenitor cells. The 3rd JSGE International Topic Conference 2015.04.24 Sendai, Japan

〔図書〕(計1件)

金子 俊、柿沼 晴、朝比奈靖浩. 【特集II: 進化するB 型肝炎治療】ヒトiPS 細胞由来肝細胞系譜細胞を用いたB 型肝炎ウイルス感染培養系の構築 **消化器肝臓内科**. 2017.04; 1(4); 441-448

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿沼 晴 (KAKINUMA, Sei)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授
研究者番号： 30372444

(2)研究分担者

朝比奈 靖浩 (ASAHINA, Yasuhiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授
研究者番号： 00422692

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号： 10175127

(3)連携研究者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号： 30321904