

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08765

研究課題名(和文)細胞移植における免疫制御機構と肝再生促進機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of immunoregulation and mechanism of liver regeneration in cell transplantation

研究代表者

市戸 義久 (Ichinohe, Norihisa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80452978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ガラクトサミン障害肝由来Thy1陽性細胞をレトロルシン/部分肝切除(Ret/PH)モデルラットに移植すると、ドナー細胞は細胞外小胞(EVs)を分泌し、レシピエント肝臓の内在性肝前駆細胞(SHPCs)の増殖を促進する。骨髄間葉系細胞(BM-MCs)はThy1を発現することから、同様にSHPCs増殖促進作用があるか検討した。

ラットBM-MCsの培養上清からEVsを抽出し、Ret/PHモデルラット肝臓に投与するとSHPCsが増大した。EVsに含まれる増殖促進因子としてmiRNA146aを同定した。BM-MCsはEVsを介してmiR146aを作用させ、前駆細胞の増殖を直接促進することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、骨髄間葉系幹細胞を用いた脳疾患や脊髄疾患、肝硬変に対する臨床治験が行われている。その治療効果への期待は大きいですが、その再生メカニズムはまだよくわかっていない。本研究は骨髄間葉系細胞移植の有効性を基礎的に裏付ける研究であり、細胞移植治療の再生メカニズムの検討から液性因子を同定し、内科的肝再生誘導治療へ繋げることが出来れば、ドナー細胞の確保を必要とせず薬剤投与による治療が可能になる。また今回の再生誘導因子の同定は、新治療薬の開発のほか、より効率的に肝前駆細胞を体外増幅することが期待でき、肝細胞のドナー細胞不足の解消にも繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Small hepatocyte-like progenitor cells (SHPCs) transiently appear in rat livers treated with retrorsine (Ret)/70% partial hepatectomy (PH). We reported that transplantation of Thy1+ cells derived from galactosamine-treated liver accelerated the growth of SHPCs in Ret/PH-treated rat livers. Extracellular vesicles (EVs) produced by Thy1+ donor cells activated SHPCs. As bone marrow-derived mesenchymal cells (BM-MCs) also express Thy1, we investigated whether BM-MCs could promote the growth of SHPCs as well as hepatic Thy1+ cells. EVs isolated from conditioned medium of cultured BM-MCs were administered into Ret/PH-treated rat livers, resulting in the growth of SHPCs. Soluble factors contained in EVs were examined and we identified that miRNA146a is the most important factor for enhancing the proliferation of cultured small hepatocytes (SHs). EVs derived from BM-MCs carry miR146a into SHPCs for activating their growth capacity.

研究分野：医師薬学

キーワード：細胞・組織 再生医学 肝幹・前駆細胞 細胞移植 生体組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

致死性肝疾患患者に対する肝移植の代替医療として、細胞移植に期待が寄せられている。細胞移植治療の再生メカニズムには主に2つあり、移植したドナー細胞がレシピエント肝細胞と置換する場合と、ドナー細胞がレシピエント臓器に存在する細胞に働きかける場合がある。申請者はこれまでの研究で、ラット障害肝由来 Thy1(CD90)陽性肝幹細胞を Retrorsine/部分肝切除(Ret/PH)モデルラット肝臓に移植すると、移植したドナー細胞が液性因子の1つである細胞外小胞(Extracellular vesicles; EVs)を分泌することで内在性細胞を活性化させ、レシピエント肝臓の類洞内皮細胞(Sinusoid endothelial cells; SECs)で IL17B を、Kupffer 細胞で IL25 を誘導することで、IL17rb 陽性の内在性肝前駆細胞(Small hepatocyte-like progenitor cells; SHPCs)を顕著に誘導し、肝再生に寄与することを見出した(Ichinohe N et al, STEM CELLS, 2017)。現在、臨床応用が進んでいる骨髄間葉系細胞(Bone-marrow mesenchymal cells; BM-MCs)も Thy1 を発現することが知られている。そこで BM-MCs にも同様に内在性肝前駆細胞を増大するか、検討したところ、内在性 SHPCs を増大することをこれまでに確認してきた。

2. 研究の目的

本申請はこの研究成果をさらに発展させ、Thy1 及び BM-MCs 由来 EVs から肝再生促進因子を同定することで、細胞移植における内在性肝前駆細胞増殖促進機構のメカニズムを解明し、自己幹細胞再生誘導による重度肝疾患への新治療法の開発へ繋げることである。

3. 研究の方法

(1) **BM-MCs 移植による SHPCs 誘導** : ラット大腿骨髄から BM-MCs を単離し、2週間培養したものを実験に用いた。また Galactosamin(GalN)を腹腔内投与2日後の急性肝炎モデルラット肝臓から Thy1 陽性細胞(Thy1)を単離したものを実験に用いた。これらの細胞を Ret/PH モデルラット肝臓に脾臓経路で移植し、内在性 SHPCs の挙動を解析した。また SHPCs を Laser microdissection(LMD)法で回収し、IL17rb の遺伝子発現を検討した。

(2) **Kupffer 細胞の影響** : Ret/PH モデルにマクロファージの貪食活性を抑制する塩化ガドリニウム(Gd)を腹腔内投与することで、内在性 Kupffer 細胞抑制による Thy1 と BM-MCs 移植における SHPCs の挙動を検討した。

(3) **液性因子の検討** : BM-MCs の培養上清を超遠心法によって沈殿した EVs の分画と上澄みの Conditioned medium(CM)に分け、Ret/PH モデルラット肝臓に脾臓経路で投与し、内在性 SHPCs の挙動を解析した。

(4) **増殖促進因子の同定** : BM-MCs 由来 EVs に含まれる増殖促進因子について miRNA とサイトカインを中心に同定を試みた。抽出した因子については肝前駆細胞の1つである小型肝細胞(Small hepatocytes; SHs)の培養に投与することで増殖能を検討した。

(5) **変動遺伝子の探索** : 移植していない Control 群と BM-MCs 移植群で誘導された SHPCs とその周囲にある成熟肝細胞(Mature hepatocytes; MHs)を LMD 法で回収し DNA マイクロアレイにより変動遺伝子を解析した。

4. 研究成果

(1) BM-MCs 移植による SHPCs 誘導(図1)

BM-MCs を移植したところ、移植していない Control に比べて、Thy1 陽性細胞と同様に内在性 SHPCs の数及び面積が有意に増大した。また誘導された SHPCs を LMD 法で抽出し、IL17rb の発現を検討したところ、Control と比べて有意に発現が上昇したが、Thy1 と比べると低かった。以上のことから BM-MCs 移植による内在性 SHPCs 増大のメカニズムには IL17rb シグナルが関与しているが、それ以外の他の誘導シグナルが関与していることが示唆された。

(2) Kupffer 細胞の影響(図2)

IL17rb シグナルの影響を検討するため、Kupffer 細胞の貪食活性を抑制する Gd を腹腔内投与した上で、BM-MCs 及び Thy1 を移植し、SHPCs の挙動を検討した。Thy1 移植群では Gd 投与により、SHPCs cluster 数及び大きさが有意に縮小したのに対し、BM-MCs 移植群では Gd 投与により、逆に SHPCs の面積が有意に増大した。この結果から、BM-MCs 移植では内在性 SHPCs の増大には Kupffer 細胞は直接関与しておらず、むしろ Gd 投与により、移植した BM-MCs が貪食されないことで液性因子を分泌し続けた結果、SHPCs が増大した、という直接的効果が示唆された。

図1

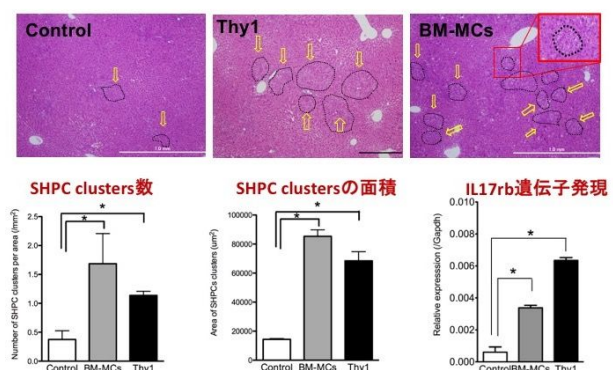
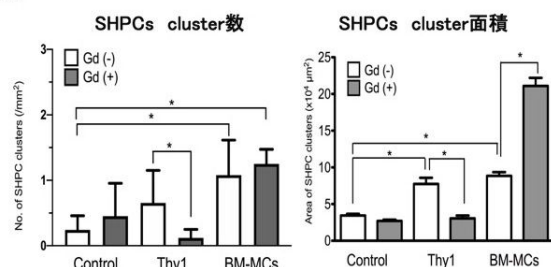


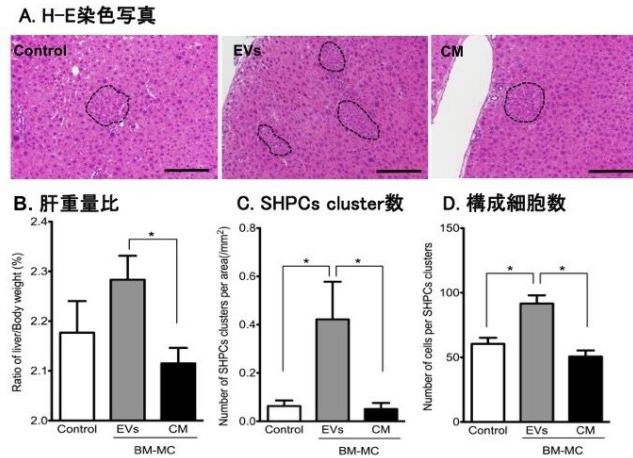
図2



(3) 液性因子の検討(図3) :

BM-MCs の培養上清を超速心法によって EVs と CM に分け、Ret/PH モデルに投与したところ、EVs を投与した場合にのみ内在性 SHPCs が増大した(図 3-A)。また、肝重量比(図 3-B)、SHPCs cluster 数(図 3-C) 及び構成細胞数(図 3-D) 共に Control 及び CM 投与群に比べ、有意に増大した。以上の結果から、SHPCs 増殖促進因子は EVs 中に含まれていることが示唆されたため、次に EVs 中の増殖促進因子の同定を試みた。

図3



(4) 増殖促進因子の同定

1) miRNA からの検討

Thy1, BM-MCs, SH, MHs の培養上清から EVs を抽出し、内包 miRNA の発現を miRNA マイクロアレイにて網羅的に解析し、BM-MCs で発現が高い因子として 6 因子を抽出した(図 4-A)。そして Realtime PCR で有意に発現が高い因子として、miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-222-3p の 4 因子を抽出した(図 4-B)。これらの因子について市販の mimic を SHs 培養に最初の 2 日間投与し、1 週間後の SH コロニー形成能をコロニー数、構成細胞数、BrdU 取り込みによる Labeling index(LI)で検討した。結果、miR-146a-5p の mimic を投与した場合のみ、SHs のコロニー数(図 5-B)、構成細胞数(図 5-C)、LI (図 5-D) が有意に増大した。

図4

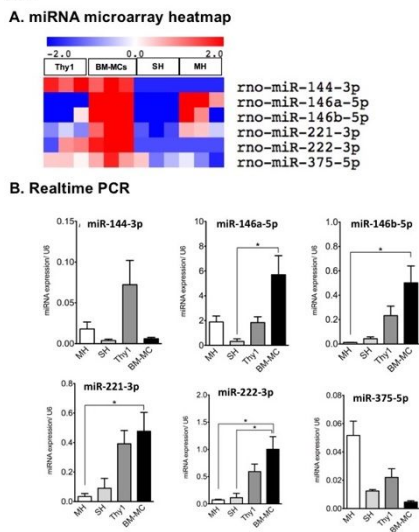


図5

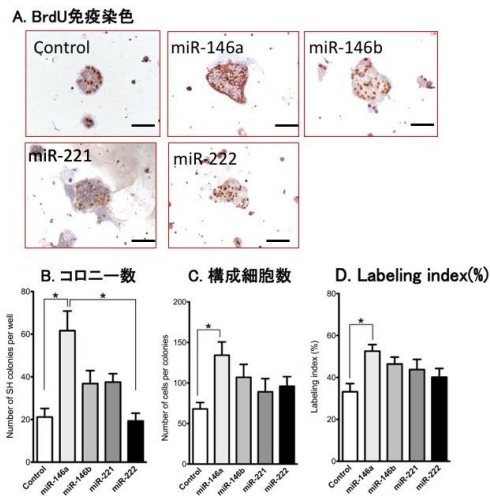
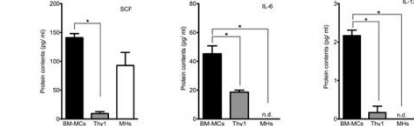


図6

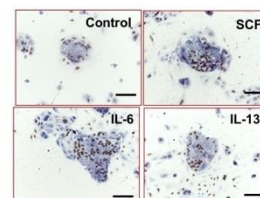
2) サイトカインの検討

Thy1, BM-MCs, SH, MHs の培養上清から EVs を抽出し、内包サイトカインの発現量をサイトカインアレイにて網羅的に解析した。結果、BM-MCs で発現が高い因子として Stem cell factor (SCF), Interleukin(IL)-6 及び 13 を候補として抽出した(図 6-A)。この 3 因子を 20 ng/ml の濃度で SHs 培養に 1 週間投与し続け、SH コロニー形成能を検討した。結果、SCF と IL-6 を投与した場合において SH コロニーの増殖能は増大した(図 6B-E)。

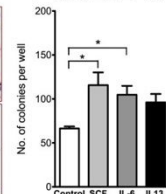
A. サイトカインアレイ



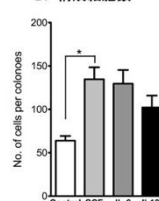
B. BrdU免疫染色



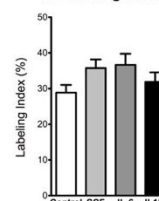
C. SHs コロニー数



D. 構成細胞数



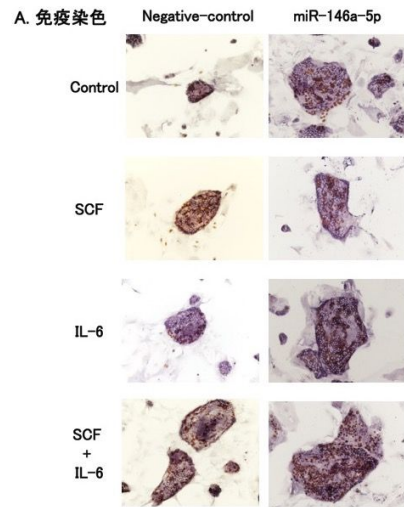
E. Labeling index(%)



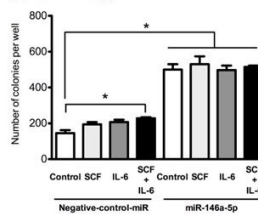
3) miRNA とサイトカインとの組み合わせによる影響

同定した miR-146a-5p と SCF, IL-6 のうちどれが重要な Key factor か、また相加相乗的な増殖促進効果があるか検討するため、これら 3 因子を組み合わせさせて SHs に投与し、コロニー形成能を検討した(図 7)。miR-146a-5p と SCF, IL-6 は培養最初の 2 日間のみ投与した。結果、miR-146a-5p 非存在下では SCF と IL-6 とともに 2 日間の単独投与では増殖促進効果が見られなかったが、SCF+IL-6 混合投与でコロニー数及び構成細胞数が有意に増大した。一方、miR-146a-5p 存在下では miR-146a-5p 非存在下に比べどれも有意に SHs コロニー数及び構成細胞数が増大した。また SCF と IL-6 の相加効果は miR-146a-5p 存在下では認められなかった。以上の結果から、BM-MCs 移植による肝前駆細胞誘導機構には miR-146a-5p が重要であることが示唆された。

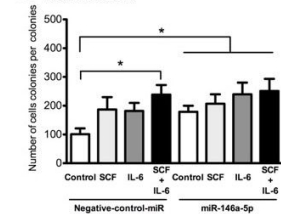
図7



B. コロニー数



C. 構成細胞数

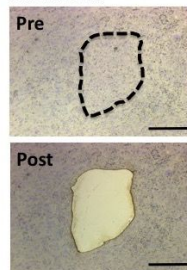


(5) 変動遺伝子の探索:

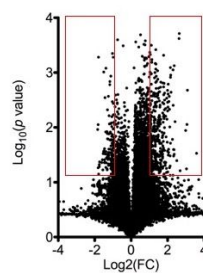
移植していない Control 群と BM-MCs 移植群で誘導された SHPCs とその周囲にある成熟肝細胞 (Mature hepatocytes; MHs) を LMD 法で回収し(図 8-A)、DNA マイクロアレイにより変動遺伝子を解析した。BM-MCs 移植群で発現量が 2 倍以上で有意に高い遺伝子として 325 遺伝子、低い遺伝子として 75 遺伝子抽出した(図 8-B)。これらの遺伝子リストを、DAVID を用いて KEGG pathway 解析したところ、発現の高い遺伝子で MAPK シグナルが(図 8-C)、発現の低い遺伝子では p53 シグナルに関わる遺伝子(図 8-D)が多く含まれていることがわかった。またこれらの遺伝子をクラスタリング解析(図 8-E)したところ、BM-MCs 移植群の SHPCs は移植していない Control の SHPCs よりも MHs に発現パターンが近かった。

図8

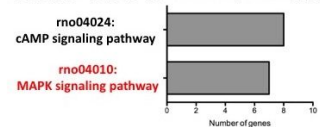
A. LMD画像



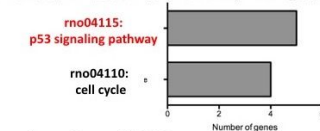
B. Volcano plot



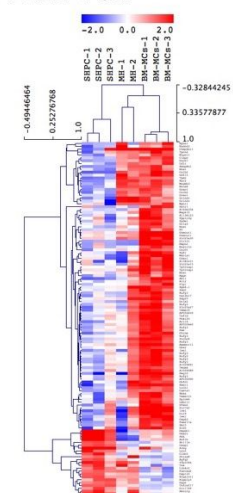
C. 発現高い遺伝子群のKEGG pathway解析



D. 発現低い遺伝子群のKEGG pathway解析

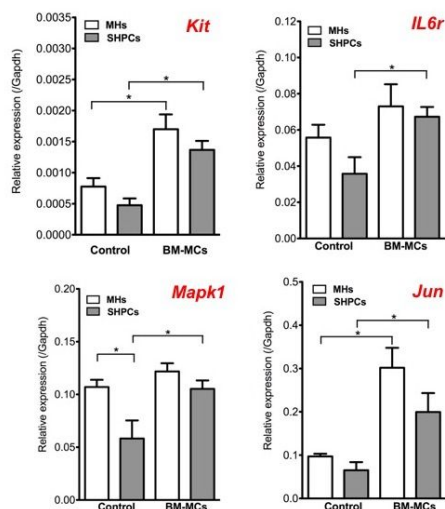


E. クラスタリング解析



次に Control 群と BM-MCs 移植群で SHPCs と MH を回収し、Realtime PCR 法で遺伝子発現解析を行った。まずサイトカインアレイの検討で増殖促進因子として同定された SCF と IL-6 のレセプターである *Kit* と *IL-6r* の発現を解析したところ、BM-MCs 移植群の SHPCs で有意に上昇していた(図 9)。Kit に関しては BM-MCs 移植群の MH でも発現が有意に上昇していた。この結果は EVs が SHPCs と MH 両方に反応していることを示唆している。また、KEGG pathway 解析にて発現が上がっている MAPK シグナルについて、*Mapk1* 遺伝子と *Jun* 遺伝子の発現を検討したところ、BM-MCs 移植群の SHPCs で有意に上昇していた。

図9



以上の結果から、BM-MCs 移植による肝再生メカニズムを考察すると、移植された BM-MCs は EVs を分泌し、SHPCs 起源細胞と MHs 両方に反応するが、MHs は Retrorsin の作用によって増殖できない。しかしながら、SHPCs は Retrorsine 耐性のため、EVs に含まれる miR-146a-5p, SCF, IL-6 の作用によって、主に MAPK シグナルが活性化され、SHPCs が増大することが示唆された。つまり BM-MCs 移植は EVs を分泌することによって、Kupffer 細胞などの免疫細胞は関与せず、直接的に SHPCs の増殖を促進させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kino J, Ichinohe N, Ishii M, Suzuki H, Mizuguchi T, Tanimizu N, Mitaka T	4. 巻 2;4(1)
2. 論文標題 Self renewal capability of hepatocytic parental progenitor cells derived from Adult rat liver Is maintained long term when cultured on laminin 111 in serum free medium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 1002/hep4.1442.	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 Kino J, Ichinohe N, Ishii M, Mitaka T	4. 巻 1905
2. 論文標題 Isolation and expansion of rat hepatocytic progenitor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 29-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8961-4_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanimizu N, Ichinohe N, Mitaka T.	4. 巻 25; 145(9).
2. 論文標題 Intrahepatic bile ducts guide establishment of the intrahepatic nerve network in developing and regenerating mouse liver.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.159095.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広.
2. 発表標題 障害肝と骨髄から単離したThy1陽性間葉系細胞による肝再生メカニズムの比較検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広.
2. 発表標題 障害肝由来Thy1陽性間葉系細胞と骨髄間葉系細胞のエクソソームによる肝前駆細胞誘導機序
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三高 俊広, 谷水 直樹, 市戸 義久
2. 発表標題 肝細胞の前駆細胞: 増殖と活性化
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広.
2. 発表標題 成熟ラット肝細胞由来肝前駆細胞のself-renewal 能の維持機構
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広.
2. 発表標題 肝前駆細胞と細胞移植
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広.
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞移植により誘導されたSHPCsの遺伝子発現解析
3. 学会等名 第31回日本肝臓医生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広.
2. 発表標題 障害肝と骨髄から単離したThy1陽性間葉系細胞による肝前駆細胞増幅機構の比較検討
3. 学会等名 第52回北海道病理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihisa Ichinohe, Naoki Tanimizu, Toshihiro Mitaka
2. 発表標題 Transplantation of bone marrow mesenchymal cells enhance liver regeneration by secreted extracellular vesicles directly activating of hepatic progenitor cells.
3. 学会等名 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES. LIVER, BIOLOGY, DISEASES & CANCER (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市戸義久, 石井雅之, 谷水直樹, 三高俊広
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞由来液性因子による内在性肝前駆細胞増殖促進機構の解析
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市戸義久, 石井雅之, 谷水直樹, 三高俊広
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞移植による肝再生促進機構の解析
3. 学会等名 第107回日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広
2. 発表標題 障害肝由来Thy1陽性間葉系細胞による肝再生メカニズムの解析
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広
2. 発表標題 障害肝由来Thy1陽性細胞と骨髄間葉系細胞によるSHPCs増殖促進機構の比較検討
3. 学会等名 第29回 日本肝臓医生物学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広
2. 発表標題 障害肝由来Thy1陽性細胞と骨髄間葉系細胞移植による肝再生メカニズムの比較検討
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市戸義久、石井雅之、木野潤一、谷水直樹、三高俊広.
2. 発表標題 継代培養可能な肝前駆細胞の分離と細胞移植ソースの可能性
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、水口徹、三高俊広.
2. 発表標題 継代培養可能な肝前駆細胞の創製と特性解析
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木野潤一、石井雅之、市戸義久、谷水直樹、水口徹、三高俊広
2. 発表標題 細胞外マトリクス上における成体ラット小型肝細胞由来CD44陽性細胞の機能解析
3. 学会等名 第24回肝細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 市戸義久、石井雅之、木野潤一、谷水直樹、三高俊広.
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞由来液性因子による肝再生機構の解析
3. 学会等名 第24回肝細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三高俊広、市戸義久、谷水直樹.
2. 発表標題 肝細胞増幅方法の確立と肝細胞移植による肝再生
3. 学会等名 第21回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、三高俊広.
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞による肝再生促進機構の解析
3. 学会等名 第50回北海道病理談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、三高俊広.
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞移植による内在性肝前駆細胞増殖促進機構の解析
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷水直樹、市戸義久、三高俊広.
2. 発表標題 肝機能向上を目指した肝前駆細胞の培養条件の検討
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

札幌医科大学フロンティア医学研究所組織再生学部門
<https://www.smu-tisdevreg.jp>
札幌医科大学フロンティア医学研究所組織再生学部門
http://web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue_Development_%26_Regeneration/Tissue_Devel%26Regen.html

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
連携研究者	三高 俊広 (Mitaka Toshihiro) (50231618)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
連携研究者	谷水 直樹 (Tanimizu Naoki) (00333386)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	