

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16263

研究課題名（和文）肝再生置換療法の臨床応用の為のIn vivoプラント確立の橋渡し研究

研究課題名（英文）Research to establish an in vivo plant for clinical application of liver regeneration and replacement therapy.

研究代表者

石井 雅之（ISHII, MASAYUKI）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50643201

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、ラット小型肝細胞の親細胞に相当する前駆細胞が、Laminin(LN)111 上で自己複製能と肝細胞としての基本機能を維持しながら継代培養可能であることを解明し報告した。今回の検討から、より肝細胞の機能が低い細胞を選択的に培養できる可能性が示された。また、骨髄間葉系細胞が分泌する細胞外小胞(Extracellular vesicles;EVs)に含まれる miR-146a-5p がレシピエントに元々存在する肝前駆細胞を活性化させ、肝再生を促進するという肝再生メカニズムを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝再生医療は国内外において開始されているものの、実臨床においては満足いく成果が出ていないのが現状である。ドナー細胞のハンドリングが非常に困難で、増殖能と高次機能の双方を兼ね備える細胞は、研究協力者の研究室で取り扱っている小型肝細胞のみである。今後はより濃密に増殖能の高い肝前駆細胞を選択的に増殖させ、効率よく細胞を供給し、薬剤スクリーニングや再生治療に使用可能なドナー細胞の純化法に応用し、安定した肝細胞供給法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：We reported that progenitor cells corresponding to parental cells of small rat hepatocytes can be passively cultured on Laminin(LN)111 while maintaining self-renewal ability and basic functions as hepatocytes. This study demonstrated the possibility of selectively culturing cells with higher hepatocyte function. We also reported that miR-146a-5p, which is contained in extracellular vesicles (EVs) secreted by bone marrow mesenchymal cells, activates hepatic progenitor cells originally existing in the recipient and promotes liver regeneration.

研究分野：医歯薬学 消化器外科学

キーワード：小型肝細胞 Laminin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞は生体の維持に係るタンパク産生のみならず、解毒機能や代謝機能を兼ね備えた多機能細胞である。しかしながら、肝細胞が持つ高次機能と増殖能の双方を *in vitro* で維持することは困難とされる。一方、三高(札幌医科大学医学部)らの発見した小型肝細胞は高い増殖能を培養条件下で保持し(Mitaka T et al, *Hepatology*, 1991; 1992)、かつ類肝臓組織を自己形成し肝細胞としての高次分化機能を発現しうる(Mitaka T et al, *Hepatology*, 1999)。小型肝細胞は凍結保存が可能で (Ikeda S et al, *J. Hepatol*, 2002)、ヒト肝臓組織片からも単離・培養することに成功している(Sasaki K et al, *Cell Transplant*, 2008)。更に小型肝細胞は PDX-1 の遺伝子導入により膵島細胞化し、血糖反応性にインスリンを分泌する細胞の可塑化能も有する(Kawasaki H et al, *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2008 : 学会賞)。NASH 動物モデルにおける細胞再生置換移植では、TNF の産生抑制による線維化抑制効果や炎症に起因した細胞死からのエスケープ現象による生存率の改善効果を確認している(Nakamura Y et al, *Cell Transplant*, 2014)。小型肝細胞は増殖能と分化機能維持の双方を兼ね備えるスーパー肝細胞と考えられるが、再生治療への応用化に向けて解決すべき課題がある。とくにヒト小型肝細胞は分離条件が安定せず、培養・継代条件も不安定である。小型肝細胞の同定のためには、表面抗原 (CD44) を介して標識する必要があり、大きさ以外の相違を見出すには至っていない。さらに小型肝細胞は一定の条件下では自己成熟化するため増殖し続けることは出来ない。したがって、治療に必要な小型肝細胞は分離段階で純化し細胞集団として回収する必要がある。

2. 研究の目的

iPS 細胞/ES 細胞等の多能性幹細胞は有効な機能発現に課題が多い。本研究では成熟肝細胞と同等な分化機能を有するヒト肝細胞を多数創出することができ、再生医療又は創薬研究に有用な細胞を供給する事が可能になる。実臨床に即応用可能な分化細胞供給システムを構築することは、再生医学の発展の上で重要である。本研究が達成されると、iPS 細胞/ES 細胞などの多能性幹細胞から分化誘導すること無しに、既に分化機能を有する肝細胞の中から小型肝細胞を分離培養することが可能になり、増殖後に凍結保存も可能である。必要時に解凍し、短期間に成熟肝細胞を再生治療に必要な細胞数の確保が可能になる。小型肝細胞は未熟な細胞を含まないことから細胞移植しても腫瘍化の懸念はなく、その臨床価値は極めて高いことが予想される。とくに *In vivo* プラント法の開発は、移植細胞を生体内で増殖させることが可能なオリジナル方法で、成功すれば運搬にも特殊な装置を要しない事から、世界レベルでの細胞供給が可能となる画期的な方法と考えている。これに加えて、ドミノ肝細胞移植による再生置換が確認できれば、臨床治療にむけて大きな人類の前進とも言える。インドシアニングリーン (ICG) 蛍光法による肝幹・前駆細胞の純化法もオリジナルで、知財権の確保を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ICG 蛍光法による小型肝細胞の同定と分離継代培養条件 (増殖促進因子の探索、ニッチマトリックスの開発、成熟化誘導) を単年度内に決定し、ICG 蛍光法によって肝幹細胞の可視化をマイクロレベルおよびマクロレベルで行う。具体的には ICG の λ_{ex} は 774nm で λ_{em} は 805 nm である。培養細胞を使用し、至適濃度・暴露時間を決定する。細胞は PDE-NEO™ 赤外観察カメラシステム (浜松フォトニクス、浜松) を改良して使用。条件が決まれば、BD FACSAria™ III セルソーターによって選択的に細胞を回収し、細胞バンクに登録する。並行し、スケールアップに向けた条件を設定する。具体的には Percol™ を使用した従【1 研究目的、研究方法など(つづき)】来の密度勾配遠心分離法を行う。加えて大量精製を目指し、COBE™ Spectra を使用した遠心分離を行う。いずれの方法もターゲット細胞は励起条件下で可視化される。

小型肝細胞の増殖と分化に影響を与えるシグナルを明らかにし、各種インヒビター等の低分子化合物中から幹 (前駆) 細胞機能を維持しつつ増殖能促進作用のある物質を同定する。

(2) 継代培養による肝幹細胞の純化

肝幹・前駆細胞の分化状態によって ICG 蛍光に対する閾値が異なる。詳細は記載できないが、の差を利用して幹細胞を純化する方法を開発する。小型肝細胞はコロニーを形成するが、コロニー単位で単離できれば、移植再生効率と機能発現効率の双方が改善する。これまでは偶然の産物だったが、小型肝細胞を蛍光下に可視化することで、コロニー状態の小型肝細胞塊の純化が可能である。単離した小型肝細胞による再生置換には約 3 か月かかるが、コロニーからであれば従来の 4 倍から 16 倍程度は短期間に治療を完結できる可能性があり、これを知財確保とともに検証する。

(3) ドミノ移植によるハイブリットキメラファームの構築

ヒト小型肝細胞を Retrorsine/肝部分切除(PH)モデルラット,放射線照射モデルラット,免疫不全 NOD/Shi-scid, IL-2R null (NOG)マウスと FAH -/- マウスに脾内移植し、小型肝細胞の生着率と肝再生置換能について解析を行う(Shibata C, Mizuguchi T, et al. Liver Transpl, 2006)。ドミノ移植を行う際に ICG 蛍光法により幹細胞の純度を高めて、継代数とハブリット効率を明らかにする。

(4) キメラ由来細胞による肝再生線維化溶解療法

ヒト肝細胞によって再生置換されたハイブリット動物より、ヒト肝幹細胞を分離し、継代ハイブリットファームの構築を行う。置換効率では、ヒト幹細胞及び宿主の幹細胞由来の細胞集塊の特徴を明らかにし、分離・継代・再生置換のいずれにも最適な条件の検討を行う。

4. 研究成果

肝前駆細胞を培養していくと形態の異なるコロニーが形成されてくることが見られ、コロニーを構成する細胞の形態が異なることに注目した。継代培養に用いた基質は複数の基質を合成したものからなっているため、どの因子が継代培養に関連しているのかを検討した。継代培養を確立した際の実験では、細胞の大きさには違いがあり、より小型の細胞の方が肝細胞としての機能が高いことを示し、より増殖能が高いことを示した。我々は、ラット小型肝細胞の親細胞に相当する前駆細胞が、Laminin(LN)111 上で自己複製能と肝細胞としての基本機能を維持しながら継代培養可能であることを解明し報告した。

今回の検討から、より肝細胞の機能が高い細胞を選択的に培養できる可能性が示された。また、骨髄間葉系細胞が分泌する細胞外小胞(Extracellular vesicles; EVs)に含まれる miR-146a-5p がレシピエントに元々存在する肝前駆細胞を活性化させ、肝再生を促進するという肝再生メカニズムを報告した。

今後はより濃密に増殖能の高い肝前駆細胞を選択的に増殖させ、効率よく細胞を供給し、薬剤スクリーニングや再生治療に使用可能なドナー細胞の純化法 に応用し、安定した肝細胞供給法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, Ochiya T, Suzuki H, Mitaka T	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 312、332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-021-02387-6	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〕

特になし

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------