

平成22年 4月 12日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19599021

研究課題名（和文） 小型肝細胞と骨髄間葉系幹細胞との共培養によるミニ肝組織構築及びその形成機序の解明

研究課題名（英文） Hepatic organoid formation by coculture with small hepatocytes and bone marrow stromal cells

研究代表者

市戸 義久 (ICHINOHE NORIHISA)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80452978

研究成果の概要： 肝臓を生体外で再構築するためには、増殖・分化ポテンシャルの高い細胞を用い、3次元構造を形成させることで肝機能を発揮させる必要がある。そこで本研究では、(1)増殖・分化ポテンシャルの高い細胞として、小型肝細胞と骨髄間葉系幹細胞との共培養、(2)3次元構造を形成させるための細胞外環境の付与、を組み合わせることで、立体的なミニ肝組織の構築及びその形成機序の解明を目的とした。本研究により、患者の肝組織より小型肝細胞を分離培養し、同患者から採取した骨髄間葉系幹細胞を共培養、増殖させることで細胞数の確保とその増幅に限界があった小型肝細胞の臨床応用の可能性が高まると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 480,000 | 3,780,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：小型肝細胞 骨髄間葉系幹細胞 肝幹細胞 生体組織工学

1. 研究開始当初の背景

肝障害時に出現する肝幹・前駆細胞として、オーバル細胞と小型肝細胞がある。オーバル細胞とは肝化学発癌過程で出現する楕円形の核をもつ細胞で、障害肝においてはその出現は一時的で、その後肝細胞に置き換わる。代表的なマーカーとして骨髄由来細胞マーカーである Thy1, c-kit, CD34, などが知られており、その由来として骨髄もしくは胆管が考えられている。一方、小型肝細胞とは成熟ラット肝臓に存在する形態学的にやや小さな肝細胞で、強い増殖能を持ち、培養するとクローナルに増殖しコロニーを形成する。培養経過に伴い、一部の細胞は成熟化する。ヒト肝組織内にも同様な細胞があることがわ

かっている。代表的なマーカーとして CD44, D6.1A, BRI3 などが知られており、その由来として肝細胞と考えられている。一方、障害肝ではオーバル細胞が一時的に出現し、その後肝細胞に置き換わることから、障害肝では胆管又は骨髄からオーバル細胞が誘導され、その後小型肝細胞を介して肝細胞に分化するという仮説が立てられる。その仮説を証明するために小型肝細胞と骨髄由来細胞を共培養する *in vitro* 実験系を用いることで、肝再生過程における肝幹細胞の増殖・分化機構を解析することとした。またコラーゲンゲルなどの足場材料を組み合わせることでミニ肝組織構築へと繋げることを目標とした。

2. 研究の目的

- (1) 骨髄間葉系幹細胞を共培養することで、小型肝細胞の増殖能にどのような影響を与えるか、またその間にどのような相互作用があるのか解析する。
- (2) 骨髄由来細胞が小型肝細胞を介して肝細胞に分化するか、また胆管上皮細胞に分化するかどうか解析する。
- (3) 障害肝において、骨髄から誘導された肝幹細胞が肝再生過程においてどのような役割をしているか解析する。
- (4) 足場材料を組み合わせることで胆管構造を誘導し、ミニ肝組織を構築出来るかどうか検討する。

3. 研究の方法

- (1) 細胞の単離
 - ① 骨髄間葉系幹細胞(MSC)の単離：骨髄間葉系幹細胞としては TERT 導入ヒト不死化骨髄間葉系幹細胞とラット大腿骨から単離した2種類の MSC を用いた。F344 ラット(DPPIV陽性)雄の大腿骨を採取し、骨端部を切断、培養液で骨髄内部組織を取り出し、細胞を十分に分散させた後、培養皿に播種し、10%ウシ胎児血清(FCS)入り DMEM 培地で1週間培養。接着した細胞をトリプシン処理で剥がし、共培養実験に用いた。
 - ② 小型肝細胞(Small Hepatocyte; SH)の単離：F344 ラット(DPPIV陰性)雌の肝臓にコラゲナーゼ灌流を行い、細胞懸濁液をヒアルロン酸コート培養皿状に播種、DMEM/F12無血清培地を用いて10日間培養し、小型肝細胞コロニーを回収、共培養実験に用いた。
 - ③ 肝障害モデルラット作製及び骨髄由来マーカーThy1 陽性細胞の単離：ガラクトサミン(GalN)を75 mg/100g 体重でF344 ラット(DPPIV陽性)雄に腹腔内投与することで肝障害モデルとした。GalN 投与後2~4日目にコラゲナーゼ肝灌流法を用い細胞を単離、ラット Thy1 に対する一次抗体と磁気ビーズのついた2次抗体を反応させ、MACS system を用いて、Thy1 陽性細胞を単離した。

(2) 共培養

小型肝細胞を培養した 35 mm 培養皿に 1×10^5 の MSC を播種し、DMEM/F12 無血清培地で共培養実験を行った。

- ① BrdU 取り込みによる増殖能評価：培養液に 10 mM の 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加し、24 時間後に固定した。BrdU に対する免疫染色を行い、Labeling Index (BrdU positive 細胞数 / 小型肝細胞コロニーの全細胞数 もしくは 単位面積当たりの MSC の細胞数 $\times 100$; %) を計測し評価した。
- ② 免疫染色による分化能評価：共培養することで、MSC もしくは小型肝細胞が胆管

上皮細胞に分化したかどうか解析するため、胆管上皮細胞マーカーである CK19 による免疫染色を行った。

- (3) Thy1 陽性細胞の SH 分化能解析：GalN 投与肝障害モデルラットから単離した Thy1 陽性肝幹細胞が小型肝細胞に分化するか検討するため、35 mm 培養皿に 1×10^5 の Thy1 陽性細胞を播種し、10% FCS 入り DMEM を用いて 10 日間静置培養を行った。分化能の解析として小型肝細胞マーカーである CD44 による免疫染色を行い、コロニー形成能を評価した。

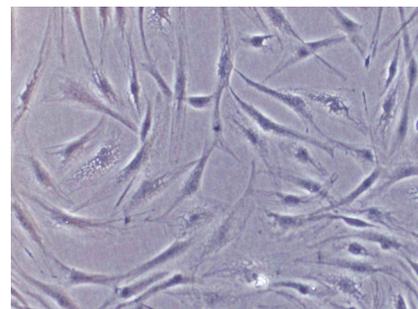
- (4) コラーゲンゲルサンドウィッチ培養による胆管誘導能解析：Thy1 陽性細胞が胆管に分化するかどうか検討を行うため、10 ng/ml HGF 含有 10% FCS 入り DMEM を用いて、30 日間コラーゲンゲルサンドウィッチ培養を行った。評価方法として、位相差顕微鏡による観察、及び組織切片による形態学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞の単離

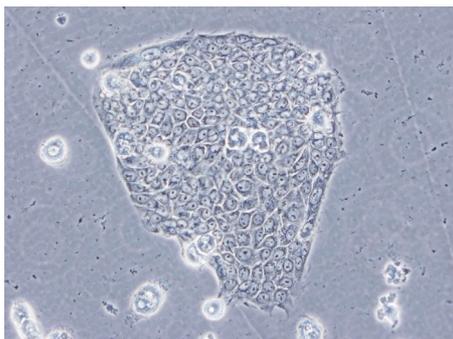
- ① MSC の単離：骨髄組織から採取した細胞を1週間培養したところ、**図1**のような紡錘形を示す線維芽細胞様の細胞の増殖を認めた。共培養では、10日間培養したのを用いた(単離した MSC が骨分化能を有していることを確認している)。

図1 MSC の位相差顕微鏡写真



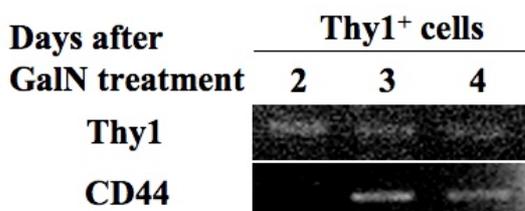
- ② SH の単離：肝臓から分離した細胞を無血清培地を用いて10日間培養したところ、**図2**のようなSHコロニーを形成した。共培養では10日間培養したものを、Cell Dissociation Buffer で小型肝細胞コロニーのみを剥がし、回収したのを用いた。コロニーあたりの平均細胞数は 42.8 ± 35.8 個、35 mm dish あたり 26.5 ± 6.1 個のコロニーを回収できた。

図2 SH コロニーの位相差顕微鏡写真



③ 肝障害モデルラット作製及び骨髄由来マーカーThy1 陽性細胞の単離:GalN 投与後2~4日目から分離した Thy1 陽性細胞の遺伝子発現を、RT-PCR法を用いて解析したところ、GalN 投与3日目以降から単離したThy1 陽性細胞は小型肝細胞マーカーであるCD44を共発現していた。

図3 Thy1 陽性細胞の遺伝子発現解析



また免疫染色を用いて単離した Thy1 陽性細胞の表面マーカーを検討したところ、胆管上皮細胞マーカーであるCK19陽性細胞が16.2 ± 4.7%, CD44 陽性細胞が38.3 ± 17.1%, 筋線維芽細胞マーカーであるDesmin 陽性細胞が44.2 ± 25.1%含まれていることがわかった。

(2) 共培養

① BrdU 取り込みによる増殖能評価: 図4で示すように、Labeling indexの解析の結果、SHは単培養においては34.4 ± 23.9%に対し、共培養では54.5 ± 17.0%と有意に高い値を示し、増殖が促進されることがわかった。またラットMSCにおいても無血清DM/F12培地による単培養ではほとんど増殖しなかったのに対し、共培養では24.8 ± 22.0%と有意に高く、増殖が促進されていることがわかった。

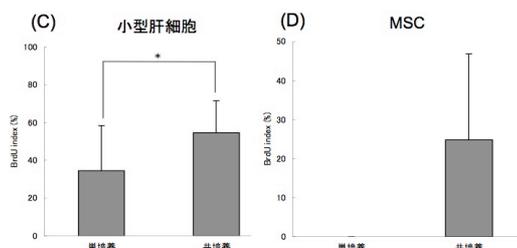
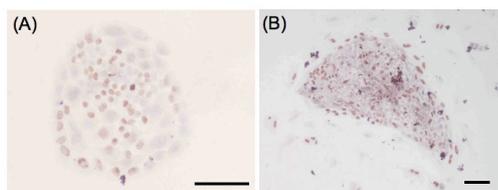
図4 共培養におけるBrdU取り込みによる増殖能評価

- (A) 単培養におけるSHコロニー
- (B) 共培養におけるSHコロニー
- (C) SHにおけるBrdU index.

*p<0.05 で有意差有り。

(D) MSCにおけるBrdU Index.

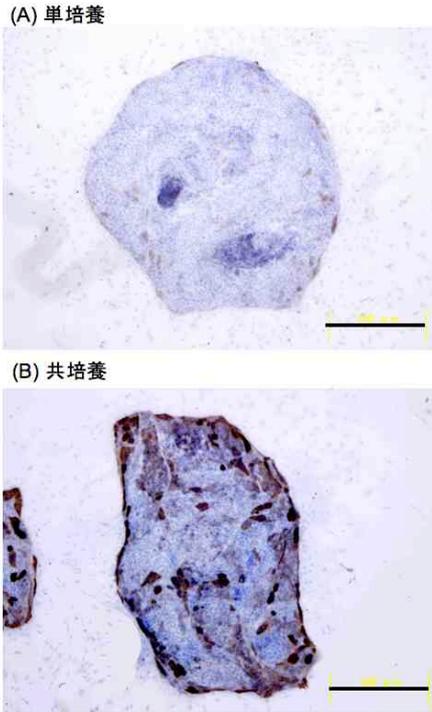
Bar: 100 μm



この他に、trans-membraneを用いた共培養実験を行い、液性因子のみの評価を行ったが、単培養と比較し、SHコロニーは大きかったが、増殖能に関して差は認められなかった。従って、増殖能に影響を与える因子としては、細胞からの液性因子のみだけではなく、SHとMSCとの接着によるシグナルも関わっていると考えられ、その因子に関しては未解明であり、今後も検討を行っていく。

② 免疫染色による分化能評価: 共培養することで、SHもしくはMSCが胆管に分化誘導するか検討するため、胆管上皮細胞マーカーであるCK19による免疫染色を行った。SHの単培養ではCK19がほとんど染まらなかったのに対し(図5-A)、共培養ではSHコロニーの外周に存在し、MSCと接する細胞の大部分はCK19陽性を示した(図5-B)。そこでこのCK19陽性細胞がSH、もしくはMSCどちらの由来か、について検討を行うため、DPPIV活性染色を行い、MSC由来細胞の同定を試みた。DPPIV陽性率は0.01%以下と極めて低く、またDPPIV陽性細胞はCK19陰性であった。他方、MSC由来細胞を同定する方法としてGFP陽性ラットから単離したMSCを用いて、同様の共培養実験を行ったが、GFP陽性ラットから単離したMSCではGFP発現量が低く、MSCの同定は困難であり、またコロニーの外周細胞にもGFPの発現は認められなかった。以上より、CK19陽性細胞はDPPIV陰性ラットから単離したSH由来と示唆され、SHはMSCと接着することにより胆管上皮細胞に分化すると考えられた。今後、細胞融合の可能性も含め、更なる解析を行っていく。

図 5 CK19 による免疫染色

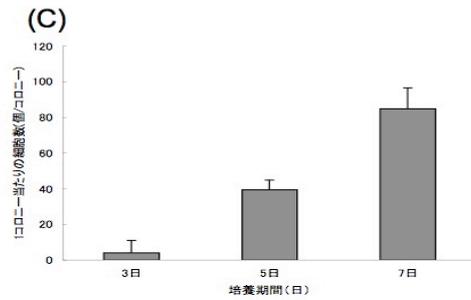
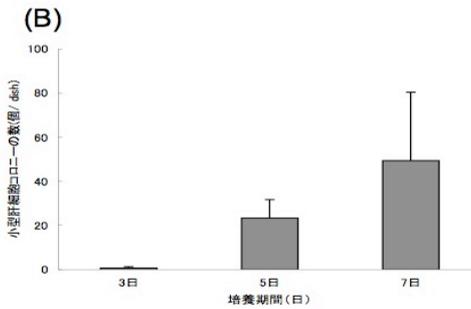
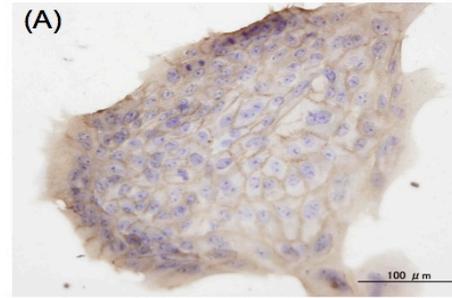


Bar: 200 μm

(3) Thy1 陽性細胞の SH 分化能解析:

GalN 投与 2 日後から単離した Thy1 陽性細胞は SH コロニーを形成しなかったが, GalN 投与 3 日後から単離した Thy1 陽性細胞は CD44 陽性の SH コロニーを形成した。(図 6-A)。培養経過に伴い, CD44 陽性 SH コロニーの数及び大きさは増大していた(図 6-B,C)。また SH コロニーの免疫染色及び遺伝子発現解析の結果, Thy1 陽性細胞が形成した SH コロニーは Thy1/CD44 両陽性であった。以上より, Thy1 陽性細胞は GalN 投与後の時間経過により分化程度に差があり, Thy1 陽性オーバル細胞の一部が CD44 陽性の SH に分化することがわかった。従って, 障害肝では骨髄もしくは胆管から Thy1 陽性オーバル細胞が誘導され, SH を介して肝細胞に分化し, 肝再生に至ると考えられる。しかしながら, 今回単離した Thy1 陽性細胞が骨髄から誘導されたものかどうか十分に検討出来ていない。今後, ラベル化した骨髄細胞を骨髄移植したモデルラットを用いて同様の実験を行い, Thy1 陽性細胞の中にどれだけ骨髄から誘導された細胞が含まれているのか, 骨髄から誘導された細胞は SH を介して肝細胞に分化するか検討していく。

図 6 Thy1 陽性細胞の SH コロニー形成能
(A) CD44 による免疫染色
(B) SH コロニーの数
(C) 1 コロニー当たりの細胞数

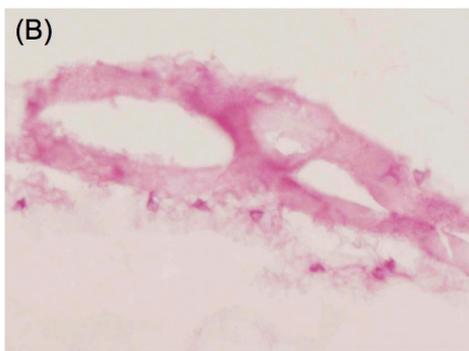
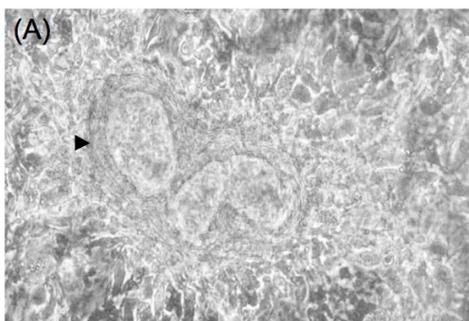


(4) コラーゲンゲルサンドウィッチ培養による胆管誘導能解析: GalN 投与 3 日後から単離した Thy1 陽性細胞を HGF 添加培地で 30 日間コラーゲンゲルサンドウィッチ培養すると, 図 7 で示すような Cyst 状構造を形成した。この組織切片を作製し, H-E 染色を行ったところ, 管腔構造を認めた。管腔を形成する細胞は免疫染色の結果, CK19 陽性の胆管上皮細胞であった。

以上より, Thy1 陽性細胞を用いた場合には, 胆管構造を有したミニ肝組織を形成したが, SH と MSC との共培養では, 胆管構造を持った肝組織の形成できなかった。今後, MSC を Thy1 陽性細胞に分化させた上で共培養を行い, より成熟した肝組織形成の検討を行う予定である。

図 7 Thy1 陽性細胞の胆管形成能

- (A) 30 日間培養後の位相差顕微鏡写真。
▲ シスト状構造を形成。
(B) 組織切片による H-E 染色写真。



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4件)

① Norihisa ICHINOHE, Takayoshi NAKANO, Toshihiro MITAKA, Yukichi UMAKOSHI, and Yasuhiko Tabata: Proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow stromal cells on bio-apatite with different crystalline facets. *J Biomed Mater Res, Part A*, volume 93A, Number2,646-655, 2010. 査読有り

② Junko KON, Norihisa ICHINOHE*, Hidekazu OOE, Qijie CHEN, Kazunori SASAKI, and Toshihiro MITAKA.: Thy1-positive cells have bipotential ability to differentiate into mature hepatocytes and biliary epithelial cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. *Am J Pathol*, Volume 175, Number 6, 2362-2371, 2009 査読有り

*共筆頭著者

③ Norihisa ICHINOHE, Yoshinori KUBOKI, and Yasuhiko TABATA: Bone regeneration using titanium nonwoven fabrics combined with FGF-2 release from gelatin hydrogel microspheres in rabbit skull defects. *TISSUE ENGINEERING: Part A*. Volume 14, Number 10, 1663-1671, 2008 査読有り

④ Norihisa ICHINOHE, Tomoaki TAKAMOTO, and Yasuhiko TABATA: Proliferation, osteogenic differentiation, and distribution of rat bone marrow stromal cells in nonwoven fabrics by different culture methods. *TISSUE ENGINEERING: Part A*. Volume 14,

Number 1, 107-116, 2008 査読有り

〔学会発表〕(計11件)

① 市戸義久, 今 純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 三高俊広: Thy1/CD44 両陽性肝前駆細胞の分化機構の解析 第8回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)

② Toshihiro Mitaka, Hidekazu Ooe, Norihisa Ichinohe: Isolation and culture of rat and human small hepatocytes. 第35回日本低温医学会総会(2008.11.22-23 東京)

③ 市戸義久, 今 純子, 大栄秀和, 三高俊広: Thy1及びCD44陽性肝前駆細胞の単離と分化機構の解析 第8回プロメテウスの会(2008.10.4 東京)

④ 市戸義久, 今 純子, 大栄秀和, 三高俊広: 肝障害モデルラットにおけるOval細胞の分化機構の解析 第41回北海道病理談話会(2008.9.20 札幌)

⑤ 大栄秀和, 陳 其潔, 今 純子, 市戸義久, 三高俊広: ラット小型肝細胞の成熟化による肝細胞機能遺伝子および増殖関連遺伝子の発現変動解析 第95回北海道癌談話会(2008.9.6 旭川)

⑥ 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 三高俊広: Thy1陽性oval細胞の分化機構の解析 第15回肝細胞研究会(2008.6.27-28 静岡)

⑦ 大栄秀和, 陳 其潔, 今 純子, 市戸義久, 三高俊広: ラット小型肝細胞の成熟化による遺伝子発現変動の解析 第15回肝細胞研究会(2008.6.27-28 静岡)

⑧ 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 三高俊広: 肝障害モデルラットにおける肝前駆細胞の分化機構の解析 第44回日本肝臓学会総会(2008.6.5-6 松山)

⑨ 市戸義久, 今 純子, 大栄秀和, 三高俊広: Thy1陽性oval細胞の分化機序の解析 第97回日本病理学会総会(2008.5.15-17 金沢)

⑩ 市戸義久, 今 純子, 大栄秀和, 陳 其潔, 三高俊広: 肝前駆細胞の分化機構の解析 第7回日本再生医療学会総会(2008.3.13-14 名古屋)

⑪ 今 純子, 大栄秀和, 陳 其潔, 市戸義久, 三高俊広 肝前駆細胞の分化機構の解析 第14回肝細胞研究会(2007.6.22-23. 鹿児島)

〔図書〕(計3件)

① Ichinohe N, Kon J, Mitaka T. Selective proliferation of hepatocyte progenitor cells. Humana Press, USA, Liver Stem Cells: Methods and Protocols. Ed. Ochiya T, *in press*.

② 市戸義久, 今 純子, 大栄秀和, 三高俊広. 肝臓における幹細胞. *アークメディア* 肝胆膵, 59(4), 573-580. 2009.

③三高俊広, 今 純子, 大栄秀和, 市戸義久. 肝再生過程における小型肝細胞の役割. 日本移植学会雑誌 移植, 43(1), 2-9, 2008.

[その他]

ホームページ:

<http://web.sapmed.ac.jp/canpath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市戸 義久 (ICHINOHE NORIHISA)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 80452978