

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390375

研究課題名（和文） 肝臓門脈結紮（塞栓）後代償性肝再生を応用した組織特異的幹細胞の単離とその機能解析

研究課題名（英文） Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated liver-specific stem cells

研究代表者

宮川 眞一（MIYAGAWA SHINICHI）

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80229806

研究成果の概要（和文）：門脈塞栓術後の代償性肝再生に着目し、同状態に動員される肝特異的幹細胞の単離とその機能解析を行った。得られた細胞（Portal Branch Ligation-stimulated Hepatic Cells: PBLHCs）は幹細胞の形質を有し、肝及び胆管細胞へ分化する可塑性を有することを確認した。本知見は、門脈塞栓術によって惹起される肝組織特異的幹細胞を再生医学的手法により臨床応用に供しうることを示唆する所見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the possibility of isolating hepatic progenitor cells in a portal branch-ligated liver model without administration of any chemical agents. A non-parenchymal cell fraction was prepared from the portal branch-ligated or non-ligated lobe, and seeded onto plates coated with laminin. Most of the cells died, but a small number were able to proliferate. These proliferating cells were cloned as portal branch ligation-stimulated hepatic cells (PBLHCs) by the limiting dilution method. The PBLHCs had a property of stem cells, and differentiated into both hepatocytes and cholangiocytes. In conclusion, successful isolation of bipotent hepatic progenitor cell clones, PBLHCs, from the portal branch-ligated liver lobes of mice provides the possibility of future clinical application of portal vein ligation to induce hepatic progenitor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学，再生医学

1. 研究開始当初の背景

肝臓はその増殖能力の高さから、臓器特異的幹細胞が存在すると考えられ、これらを識別、選別する目的で FACS による各種細胞表面マーカーを用いた試みが報告されているが、このような手法における共通の前提は、目的とする細胞を分離・同定することができなければ、その詳細な解析を行うことができないという点にある。現在までに報告されている肝組織特異的幹細胞の誘導法は発癌物質投与などのモデルが主体であり、このような肝障害性薬剤投与モデルを臨床的に応用することは困難である。

このような障壁を排除しうる肝再生モデルの一つとして、我々は数年前より肝門脈結紮モデルに着目した。門脈結紮によりその結紮葉には組織特異的幹細胞様の未分化細胞が出現することは既に報告されていたが、その特性や機能は十分に解析されていない。しかし、門脈塞栓術自体は既に拡大肝葉切除に際した肝予備能向上を目的に、塞栓葉の門脈血流を低下させることにより対側葉の代償性の肥大を惹起させ、安全に肝切除が行える方法として臨床的に確立されている。このため門脈結紮モデルを用いてその肝再生過程に関与する組織特異的幹細胞を同定・分離し詳細な機能解析を行い得れば、実地臨床へのフィードバックに直結すると思われる。

過去に当科においてはマウス ES 細胞を用いた *in vitro* での肝細胞分化誘導系において、実際の胚発生段階と同様に、中胚葉由来の血管内皮細胞や心筋細胞が重要な役割を果たすことを明らかにしている。この検討において蓄積された *evidence* を生かし、ES 細胞を胚葉ならびに臓器発生を *in vitro* で模倣する解析ツールの一つとして位置付け、実際に分離し得た肝組織特異的幹細胞の機能解析を行うことで、その細胞の分化度をより詳細に把握することが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

マウス門脈結紮モデルを用い、門脈結紮後に出現する肝組織特異的幹細胞に対して、①同細胞を分離・同定し、②分離された細胞の *in vitro* における増殖性・分化能力の検討、③肝細胞以外の内胚葉由来細胞への分化可塑性の検討（特に膵内分泌細胞への分化の可能性の検討）を行うことを、本研究の趣旨とし計画した。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウス (8-12 週齢, 雄) の門脈一次分枝 (左枝) を結紮し、術後肝非実質細胞分画を分離する。これらをラミネンコートディッシュ上で培養し、増殖性を有する (コロニーを形成する) 細胞集団を同定する。得られ

たコロニーから限界希釈法による single cell cloning を行い、長期に維持可能な上皮様細胞集団 (Portal branch-ligation-stimulated hepatic cells : PBLHCs) を分離した。

得られた PBLHCs に対して、①その発現形質の確認による分化度の推定、②細胞増殖基質、液性因子の添加及び異所性遺伝子導入による可塑性の確認、を行なった。

更にマウス生体肝において得られた組織特異的幹細胞の局在を確認した。

4. 研究成果

C57BL/6J マウス (8-12 週齢, 雄) の門脈一次分枝 (左枝) を結紮し、術後肝非実質分画を分離した。これらをラミネンコートプレート上で培養したところ、門脈結紮術後 7 日及び 14 日の肝非実質細胞分画より上皮様細胞のコロニーが形成されることを確認した (Fig.1 及び 2)。

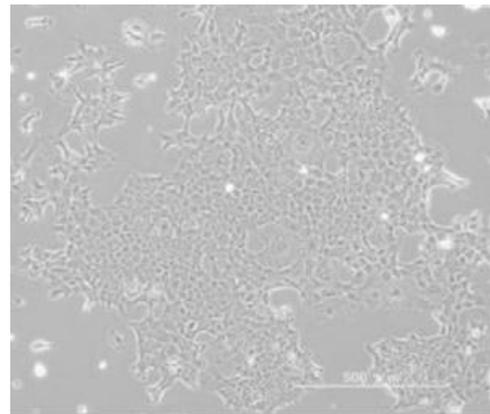


Fig.1 上皮細胞様コロニー

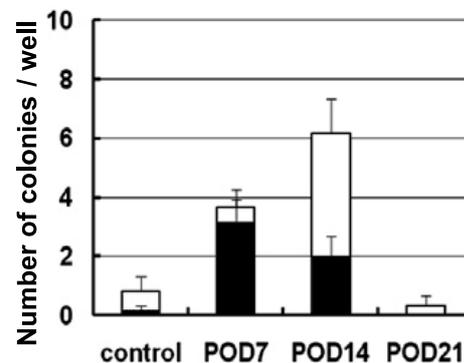


Fig.2 コロニー出現数の推移 (white bar: 上皮細胞様コロニー, black bar: 非上皮細胞様コロニー)

得られたコロニーに対し、限界希釈法による single cell cloning を行なった。これによ

り6か月以上維持可能な上皮様細胞集団 (Portal branch-ligation-stimulated hepatic cells : PBLHCs)を分離し得た。

PBLHCsの発現遺伝子をRT-PCRにより解析し、肝細胞マーカー、胆管上皮細胞マーカーで免疫細胞染色を行った。結果、RT-PCRによる遺伝子発現解析により、PBLHCsはCK19(胆管上皮細胞マーカー)、albumin(肝細胞マーカー)、sca-1、CD44、Hmga2(前駆細胞マーカー)を発現することを確認した。免疫細胞染色でもCK19、HNF4a(肝細胞マーカー)、HMGA2の発現があり、これらはこれまで報告されている肝前駆細胞の性質に矛盾しない結果であると考えられた。(Fig. 3)

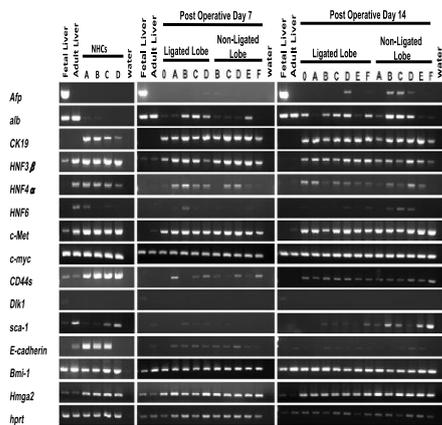


Fig. 3 PBLHCsにおける、遺伝子発現プロファイル

またPBLHCsは内胚葉特異的のマーカーであるSox17の発現を欠くことが同時に示された。これらの所見は、PBLHCsが内胚葉から肝への分化にcommitされた細胞である可能性を示唆するものであると考えられた。

次いでPBLHCsの可塑性について検討した。PBLHCsをoncostatin M添加のもと、matrigel上で培養するとRT-PCRでglucose-6-phosphataseをはじめとする成熟肝細胞マーカーの発現が増加することが確認された。また、尿素合成活性及びアンモニア代謝能が培養後1週間まで徐々に増加、その後少なくとも培養2週間後まで同様の活性が持続することがわかった。したがって、PBLHCsは肝細胞様の細胞に分化していることが確認された (Fig. 4, 5及び6)。

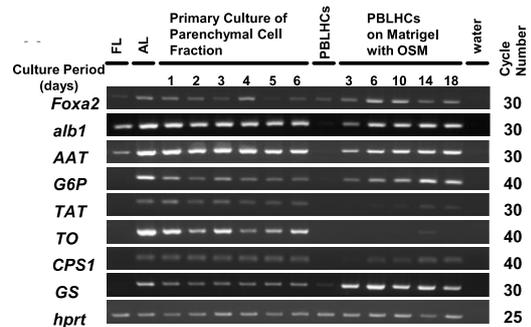


Fig. 4 肝細胞分化誘導下での遺伝子発現プロファイル

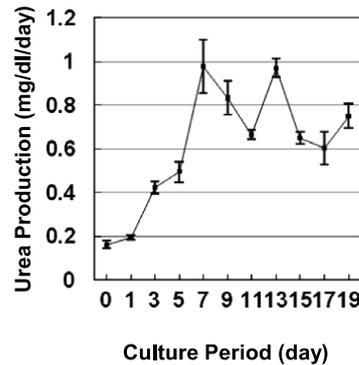


Fig. 5 尿素合成能の経時的変化

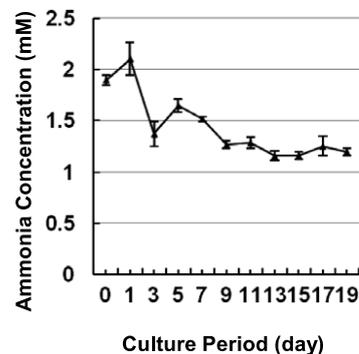


Fig. 6 アンモニア代謝能の経時的変化

更にPBLHCsをマトリゲルを含むコラーゲンゲル内で3次元培養を行うと、cyst様の構造を形成した。免疫染色によりactinのcyst内腔側への集積が確認され、管腔構造として極性を持っていることが示された (Fig. 7)。さらに培養を継続すると枝分かれ様の形態を示し、胆管上皮細胞への分化が示唆された。

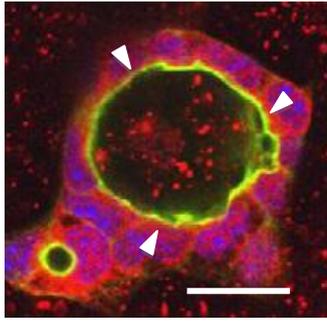


Fig. 7 Cyst 様構造を形成する PBLHCs
(矢頭: F-actin)

肝再生時には肝小葉の数が増殖するのではなく、小葉構造が保たれたまま大きくなると言われている。成体肝での HMGA2 の発現を免疫組織染色で確認したところ、正常肝では門脈域の胆管上皮にその発現が認められた。門脈結紮を行うと、門脈域で増殖し小葉間胆管から細胆管、Hering 管方向へと肝内に向かって増殖するが、門脈結紮後 14 日目ではこの反応が見られなくなることが明らかとなった (Fig. 8)。このことは、門脈結紮における肝細胞増殖による肝小葉の増大に伴う胆管構造の構築に HMGA2 陽性細胞が関与している可能性を示している。

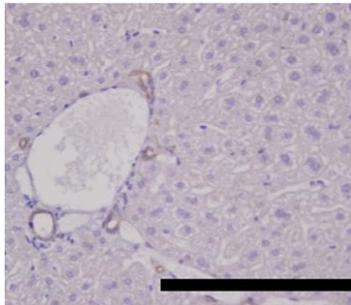


Fig. 8 肝実質内に進展増殖する
HMGA2 陽性細胞 (矢頭)

これらの結果は、マウスの門脈一次分枝を結紮することにより肝内出現する肝前駆細胞を分離し得たことを示唆する。成人肝でも HMGA2 陽性細胞が存在することから、同様の形質を有する細胞は、分離効率が低率であるものの正常肝からも分離しうる。このことは PBLHCs が組織特異的幹細胞であることを逆説的に示唆する結果であると考えられる。現在 signal sequence trap 法を用い、PBLHCs に特異的な細胞表面マーカーの同定を進めている。

今回得られた PBLHCs が、肝及び胆管細胞へ分化する bi-potentiality を有することは既に示した通りであるが、本細胞が更なる可塑性、即ち同じ内胚葉系細胞である膵臓細胞へ

分化しうるかを平行して解析中である。我々は過去に初代培養肝細胞に対して膵臓発生特異的転写因子 Pdx1 及び Ngn3 を異所性発現させることによりインスリン産生細胞を誘導することに成功しているが、この 2 因子に転写因子 MafA を加え 3 因子共発現系とすることで内因性インスリン遺伝子の転写が更に増強することを見いだしている。この基礎的検討を踏まえ、PBLHCs に対してこの 3 転写因子を共発現させ、その可塑性 (reprogramming 能) を検討する実験を進めている (Fig. 9)。

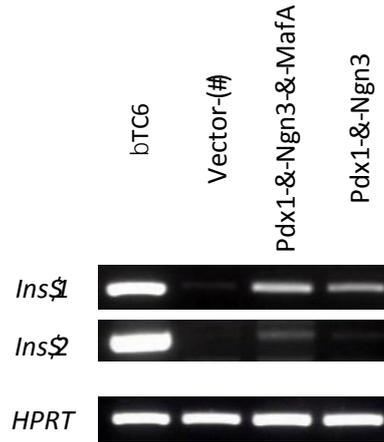


Fig. 9 異所性遺伝子発現によるインスリン
遺伝子の活性化

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 9 件)

- ① Akita S, Kubota K, Kobayashi A, Misawa R, Shimizu A, Nakata T, Yokoyama T, Takahashi M, Miyagawa S. Role of bone marrow cells in the development of pancreatic fibrosis in a rat model of pancreatitis induced by a choline-deficient/ethionine-supplemented diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Apr 20;420(4):743-9. 査読有
- ② Karasawa F, Shiota A, Goso Y, Kobayashi M, Sato Y, Masumoto J, Fujiwara M, Yokosawa S, Muraki T, Miyagawa S, Ueda M, Fukuda MN, Fukuda M, Ishihara K, Nakayama J. Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice. *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):923-34. 査読有
- ③ Arai T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, Iesato Y,

- Koyama T, Yoshizawa T, Uetake R, Yamauchi A, Yang L, Kawate H, Ogawa S, Kobayashi A, Miyagawa S, Shindo T. Induction of LYVE-1/stabilin-2-positive liver sinusoidal endothelial-like cells from embryoid bodies by modulation of adrenomedullin-RAMP2 signaling. *Peptides*. 2011 Sep;32(9):1855-65. 査読有
- ④ Kitahara H, Masumoto J, Parker AL, Maruta F, Kubo N, Shimizu A, Akita N, Miwa S, Kobayashi N, Nakayama J, Miyagawa S. COP35, a cholangiocarcinoma-binding oligopeptide, interacts with the clathrin heavy chain accompanied by GRP78. *Mol Cancer Res*. 2011 Jun;9(6):688-701. 査読有
- ⑤ Masuda Y, Nakazawa Y, Matsuda K, Sano K, Mita A, Ohno Y, Urata K, Ikegami T, Miwa S, Miyagawa S. Clinicopathological features of hepatitis C virus disease after living donor liver transplantation: relationship with in situ hybridisation data. *Pathology*. 2011 Feb;43(2):156-60. 査読有
- ⑥ Sakai H, Tagawa Y, Tamai M, Motoyama H, Ogawa S, Soeda J, Nakata T, Miyagawa S. Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Dec 17;403(3-4):298-304. 査読有
- ⑦ Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T. Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. *Peptides*. 2010 May;31(5):865-71. 査読有
- ⑧ Motoyama H, Ogawa S, Kubo A, Miwa S, Nakayama J, Tagawa Y, Miyagawa S. In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jul 17;385(1):123-8. 査読有
- ⑨ Misawa R, Soeda J, Ise H, Takahashi M, Kubota K, Mita A, Nakata T, Miyagawa S. Potential feasibility of early bone marrow cell injection into the spleen for creating functional

hepatocytes. *Transplantation*. 2009 Apr 27;87(8):1147-54. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 本山博章, A Useful Non-viral Procedure to Induce Liver-to-pancreas Reprogramming to Complement Post-operative Pancreatic Endocrine Dysfunction, 第17回日本遺伝子治療学会, 2011年7月17日, 福岡
- ② 本山博章, Liver-to-pancreas reprogramming 膵切除後内分泌機能不全への応用, 第66回日本消化器外科学会, 2011年7月15日, 名古屋
- ③ 本山博章, An excellent non-viral procedure to induce liver-to-pancreas reprogramming to complement post-operative pancreatic endocrine dysfunction. 8th Catholic International Stem Cell Symposium, 2010年10月2日, Seoul, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHINICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 80229806

(2) 研究分担者

三輪 史郎 (MIWA SIROH)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 20293516

本山 博章 (MOTOYAMA HIROAKI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20569587