

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790389

研究課題名(和文)組織幹細胞移植による肝再生機構の解析

研究課題名(英文) Tissue stem cells transplantation activates the growth of hepatic progenitor cells in recipient rat livers.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：オーバル細胞マーカーとしてThy1，小型肝細胞(SH)としてCD44を用いた。オーバル細胞の分化・再生機構を解析した結果，(1)Thy1+細胞はThy1+/CD44+細胞を介してSHに分化し，またcollagen gel培養で胆管に分化した。(2) Thy1+細胞をRetrorsine/部分肝切除モデルに移植してもほとんど移植細胞巣を形成しないが，レシピエント由来肝前駆細胞の増殖を活性化した。(3) SHとThy1+細胞を間接共培養するとSHの増殖が高まった。以上の結果は，Thy1+細胞は何らかの液性因子を分泌することで他の肝前駆細胞の増殖を促進させ、肝再生に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oval cells and small hepatocytes (SHs) are known to be hepatic stem and progenitor cells, respectively. We have used Thy1 and CD44 as markers of stem and progenitor cells, respectively. In the present study we examined the differentiation capacity of Thy1+ cells and their contribution to liver regeneration. (1) Thy1+ cells could differentiate to the CD44+ SHs through Thy1+/CD44+ cells. Thy1+/CD44+ cells could also differentiate into bile duct cells in collagen sandwich culture. (2) Although transplanted Thy1+ cells could form only a small number of foci, they could increase the number and the size of resident small hepatocyte-like progenitor cells (SHPCs). (3) The proliferation of SHs isolated was enhanced when the cells were indirectly co-cultured with Thy1+ cells. These results suggest that growth of hepatic progenitor cells may be enhanced by factors secreted by Thy1+ cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学：実験病理学

キーワード：細胞・組織 再生医学 肝幹・前駆細胞 生体組織工学 細胞移植 分化

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に出現する楕円形の核を持つ細胞で、障害肝においては、オーバル細胞の出現は一時的で、その後、成熟肝細胞(Mature hepatocyte)に置き換わる。代表的なマーカーとして、Thy1, c-kit, Dlk1, OV-6 等が知られている。一方、小型肝細胞とは、申請者が所属する研究室の三高が世界で初めて発見し(Mitaka T et al, Hepatology,1992)、以後三高研究室で精力的に研究が行われてきた。小型肝細胞は、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。肝非実質細胞と混合培養すると成熟化し、成熟肝細胞とほぼ同様の特徴を持つ。また、培養経過に伴い一部の細胞は3次元構造をつくり、組織化する(Mitaka T et al, Hepatology,1999)。正常ヒト肝組織内においても同様の細胞が存在することがわかっている(Sasaki K et al, Cell Transplant, 2008)。代表的なマーカーとして、CD44, BRI3, D6.1A(Kon J et al, J. Hepatol.2006)が同定されている。オーバル細胞についてはこれまでに多くの研究が行われているが、オーバル細胞から小型肝細胞への分化機序はまだ明らかになっていない。我々はガラクトサミン(GalN)投与肝障害モデルラットを用いて以下のことを明らかにしてきた。

GalN 投与 3 日目から単離した Thy1 陽性細胞は CD44 陽性の小型肝細胞に分化する。(Kon J, **Ichinohe N** et al, Am J Pathol, 2009)

GalN 投与 2 日目から単離した Thy1 陽性細胞を Retrorsine/部分肝切除 (Partial Hepatectomy: PH) モデルラット肝臓に脾臓経由で移植しても、生着率は低い。(Ichinohe N et al, Cell Transplant, 2012)

これらの研究過程で以下の 2 点の疑問が生じた。

(1) Thy1 陽性細胞が CD44 陽性の小型肝細胞を介して肝細胞に分化するのなら、その中間体として、Thy1⁺/CD44⁺細胞が存在するはずである。

(2) GalN 投与 2 日目から単離した Thy1 陽性細胞は Ret/PH モデルの移植実験では生着率が低いにも関わらず、肝臓が大きくなることを見いだした(data not shown)。これはドナー細胞の解析だけでは説明が出来ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Thy1 陽性オーバル細胞の活性化・分化誘導機序について解析することにより、肝疾患における肝細胞再生誘導治療へ繋げることである。そのために、以下の 3 点に焦点を絞り、解析を行った。

(1) 中間体として存在する Thy1⁺/CD44⁺細胞を単離し、肝細胞、胆管上皮細胞への分

化能を検討する。

(2) Ret/PH モデルについて、手術 5 日後から Small Hepatocyte-like Progenitor cells: SHPCs)と名付けられた肝前駆細胞が出現することを Gordon らが報告した(Gordon GJ et al. Am J Pathol, 2000)。Thy1 陽性細胞移植で肝臓が大きくなる理由を、レシピエント由来 SHPCs の挙動を中心に解析した。

(3) 移植実験を *in vitro* で再現するため、Thy1 陽性細胞と小型肝細胞との共培養実験を行い、小型肝細胞の増殖機構を解析した。

3. 研究の方法

(1) 肝障害モデルラット作製

8-10 週令 Dipeptidylpeptidase IV(DPPIV) 陽性ラット腹腔内に D-galactosamine (GalN: 75 mg/100g 体重)を投与し、急性肝障害を惹起する。

(2) 細胞単離・培養

投与後、2 日目、3 日目にコラゲナーゼ肝灌流方法を用いて細胞を分離する。抗 Thy1, 抗 CD44 抗体及び磁気ビーズ(MACS システム)を用いて Thy1⁺細胞, Thy1⁺/CD44⁺細胞, CD44⁺細胞ソートし、培養又は移植実験に用いた。培養実験では 1x10⁵ 個の細胞を 35-mm dish に播種し、DMEM +10% FBS+10 mM Nicotinamide + 10 ng/ml EGF + Ascorbic acid 2 phosphate (Asc2P) + Insulin + dexamethasone + antibiotics などを添加した培地で培養した。胆管分化誘導では、DMEM に 10% FBS +10mM Nicotinamide + 10 ng/ml EGF + Asc2P + Insulin + antibiotics + 1 % DMSO などを添加した培地でコラーゲンゲルサンドウィッチ培養を行った。

小型肝細胞の単離・培養については、8-10 週令 DPPIV 陽性ラットに対し、コラゲナーゼ肝灌流方法を用いて細胞を分離する。非実質細胞分画をヒアルロン酸コートディッシュに播種し、DMEM/F12 に 10 mM Nicotinamide + 10 ng/ml EGF + Asc2P + ITS + dexamethasone + 1% BSA + antibiotics を添加した無血清培地で培養を行った。小型肝細胞と Thy1 陽性細胞との共培養は、Thy1 陽性細胞由来の液性因子の影響を検討するため、Cell Strainer を介した間接共培養を行った。

(3) 細胞移植

移植は、7 週令 DPPIV 陰性雌ラットに Retrorsine を投与し、2/3 部分肝切除処理(Ret/PH モデルラット)した後、5x10⁵細胞を脾臓経由で移植した。control として非細胞移植群を用いた。移植後 30 日後に肝臓を摘出し、凍結標本作製し、DPPIV 活性染色及び、抗 C/EBP の抗体を用いて免疫染色を行った。

レシピエント由来 SHPCs の解析については、SHPCs は手術 14 日後にもっとも明瞭に出現することから、移植 14 日後の SHPCs cluster の数及び大きさを検討した。

(4) Thy1⁺細胞培養上清から Exosome の抽出単離した Thy1⁺細胞を 10-cm culture dish に播種し、2 日間培養した培養上清から SBI 社

製 ExoQuick-TC™ Exosome Isolation Reagent を用いて Exosome を抽出。小型肝細胞の無血清培養に投与し、増殖能を解析した。

4. 研究成果

(1) Thy1 陽性細胞の分化機構

Thy1⁺細胞を5日間培養すると,Thy1⁺/CD44⁺両陽性の小型肝細胞コロニーが出現する(図1)。また,GaIN投与3日目肝臓から単離したThy1⁺細胞,Thy1⁺/CD44⁺細胞,CD44⁺細胞を5日間培養し,SHコロニー形成能を検討したところ,コロニー形成能はCD44⁺細胞で高く,Thy1⁺細胞で低く,Thy1⁺/CD44⁺細胞はその中間であった(図2)。

図1: Thy1 陽性細胞を5日間培養して出来た小型肝細胞コロニー。Thy1 と CD44 両方発現することを確認した。(参考文献4)

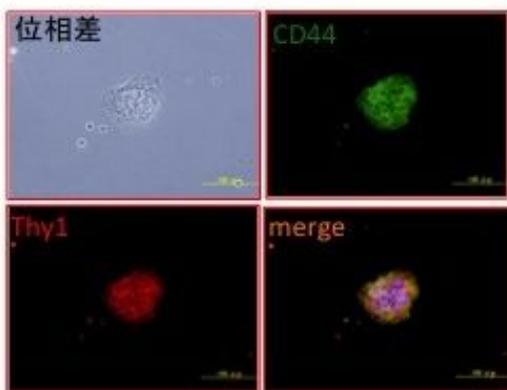
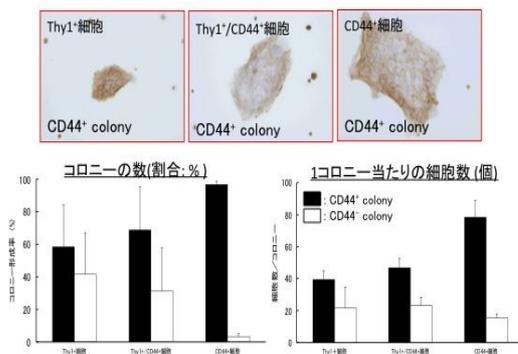
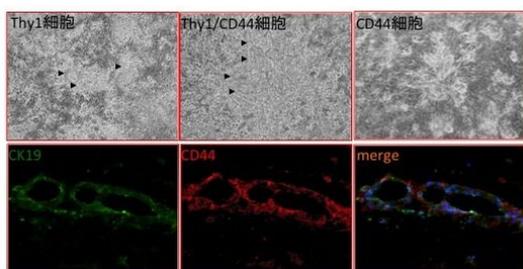


図2: 5日間培養後のSHコロニー形成能。(参考文献4)



また,Thy1⁺/CD44⁺両陽性細胞を胆管分化誘導すると,胆管を形成した(図3)。

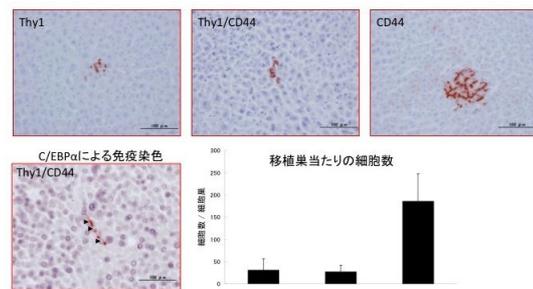
図3: コラーゲンゲルサンドウィッチ培養による胆管形成。(参考文献4)



(2) Retrorsine/PH 移植モデルにおけるドナー細胞の解析

単離した Thy1⁺細胞,Thy1⁺/CD44⁺細胞,CD44⁺細胞を Retrorsine/PH モデルに移植したところ,CD44⁺細胞で生着率が高く,Thy1⁺細胞,Thy1⁺/CD44⁺細胞では生着率が低かった(図4)。また,正着したドナー細胞は C/EBP 陽性の肝細胞に分化していた。

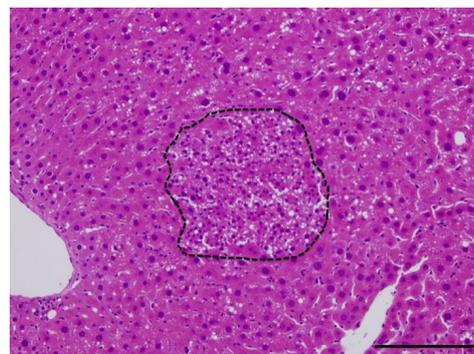
図4: Retrorsine/PH モデル移植実験におけるドナー細胞の生着率(参考文献4)



(3) Retrorsine/PH 移植モデルにおけるレシピエント由来 SHPCs 解析

Retrorsine/PH モデルには,手術14日後に図5のようなSHPCsの細胞集塊が出現する。

図5: control 手術14日後に出現するSHPCs H-E写真 Bar=500μm



そこで Retrorsine/PH 移植モデルにおけるレシピエント由来 SHPCs の挙動を解析したところ,control に比べ SHPCs cluster の数(図6)及びサイズ(図7)が有意に大きくなった。

図6: SHPCs cluster の数(A)

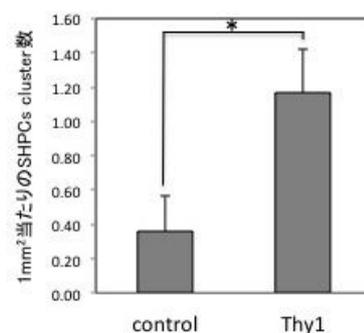
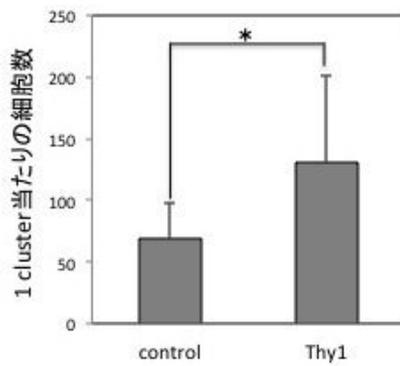


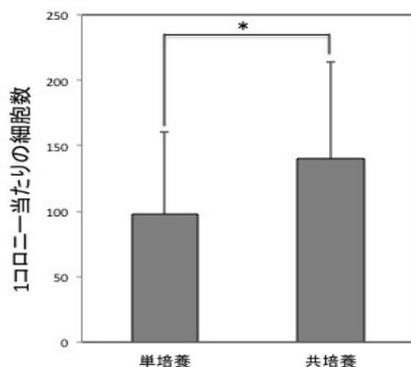
図 7 : SHPCs 1 cluster における細胞数



(4) SH と Thy1⁺細胞との間接共培養

SH と Thy1⁺細胞を Cell Strainer を介した間接共培養を行ったところ, SH コロニーが増大した(図 8)ことから, Thy1⁺細胞が分泌する何らかの液性因子が SH の増大に関与することが示唆された。

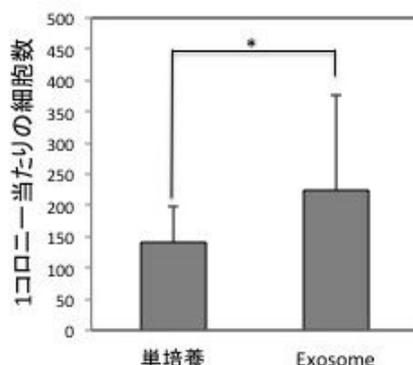
図 8 : SH と Thy1⁺細胞との共培養による SH コロニー細胞数



(5) Thy1 陽性細胞由来 Exosome による SH 増殖能の解析

液性因子としては, RNA や miRNA を含む Exosome と細胞増殖因子などが考えられる。そこで, Thy1⁺細胞を 2 日間培養して市販キットを用いて抽出した Exosome を SH 培養で投与したところ, SH コロニーが増大した(図 9)。

図 9 : Exosome 投与による SH コロニー細胞数



以上の結果から, Thy1⁺細胞は肝細胞と胆管上皮細胞, どちらにも分化可能な細胞である一方, Exosome などの液性因子を分泌し, 他の肝前駆細胞を増殖させることで肝再生に寄与している可能性が示唆された。今後, SHPCs の詳細な特性, 及び Thy1 陽性細胞由来 Exosome 中に含まれる因子を中心に SHPCs 増殖促進機構をさらに解析を進める予定である。

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 7 件)

1. Tanimizu N, Nishikawa Y, Ichinohe N, Akiyama H, Mitaka T: Sry HMG box protein 9-positive (Sox9+) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM-) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration. *J Biol Chem*, Mar 14; 289(11): 7589-7598 2014 DOI: 10.1074/jbc.M113.517243. 査読有
2. Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T: Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. *J Cell Sci*, 15(126), 5239-5246. 2013 DOI: 10.1242/jcs.133082. 査読有
3. Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ooe H, Ichinohe N, Hirata K, Mitaka T: Preoperative hepatocyte transplantation prevents cirrhotic rats from receiving the fatal damage by a liver resection. *Cell Transplantation*, in press 2013 DOI: 10.3727/096368913X668649 査読有
4. Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H, Nakamura Y, Mizuguchi T, Kon J, Hirata K, Mitaka T: Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. *Hepatology*, Vol. 57, No. 3, 1192-1202. 2013. DOI: 10.1002/hep.26084. 査読有
5. Takamoto T, Ichinohe N, Tabata Y: Proliferation of Rat Mesenchymal Stem Cells in Collagen Sponges Reinforced with Poly(Ethylene Terephthalate) Fibers by Stirring Culture Method. *J Biomater Sci Polym Ed*. Volume 23, Issue 13, 1741-1753. 2012 査読有 DOI:10.1163/156856211X598184
6. Ichinohe N, Kon J, Mitaka T: Isolation

of hepatic progenitor cells from the galactosamine-treated rat liver. *Liver Stem Cells. Method in molecular Biology*, 826(1) 49-58. 2012 DOI:10.1007/978-1-61779-468-1_5 査読有

7. Ooe H, Chen Q, Kon J, Sasaki K, Miyoshi H, Ichinohe N, Tanimizu N, Mitaka T: Proliferation of Rat Small Hepatocytes Requires Follistatin Expression. *J Cell Physiol*. Volume 227, Number 6, 2363-2370, 2012 DOI: 10.1002/jcp.22971. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: 細胞移植におけるレシピエント肝再生機構の解析 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3.4-6 京都) [口演発表]
2. 谷水直樹, 市戸義久, 西川祐司, 三高俊広: 細胆管反応を伴うマウス障害肝臓に出現する肝前駆細胞の増殖および分化能の解析 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6 京都) [口演発表]
3. 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: Retrorsine/部分肝切除モデルにおける肝再生機構の解析 第 19 回日本肝臓医生物研究会 (2013.11.30 札幌)
4. 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: Thy1 陽性細胞移植における肝再生促進機序の解析 第 46 回北海道病理談話会 (2013.10.12 札幌) [口演発表]
5. Ichinohe N, Tanimizu N, Mitaka T: Thy1-positive cells transplantation activates the growth of resident hepatic progenitor cells in rat livers. 第 20 回肝細胞研究会 (2013.9.26-27 大阪) [口演発表]
6. 市戸義久, 谷水直樹, 今純子, 三高俊広: 細胞移植におけるレシピエント肝再生機構の解析 第 49 回日本肝臓学会総会 (2013.6.6-7 東京) [口演発表]
7. 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: 肝前駆細胞の分化誘導因子と成熟化能の解析 第 102 回日本病理学会総会 (2013.6.6-8 札幌) [口演発表]
8. 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: 障害肝より分離した Thy1 陽性細胞移植における肝再生促進機序の解析 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3.22 横浜) [口演発表]
9. 水口徹, 市戸義久, 中村幸雄, 柴田捻人, 谷水直樹, 吉川大和, 三高俊広, 平田公一: 肝幹細胞による再生医療における最新の知見 第 42 回日本創傷治癒学会 (2012.12.2-4 札幌) [シンポジウム]
10. 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: 細胞移植治療における肝幹・前駆細胞の有用性 第 45 回北海道病理談話会 (2012.10.13 札幌) [口演発表]

11. 中村幸雄, 水口徹, 川本雅樹, 目黒誠, 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: ラット肝硬変モデルにおける肝細胞移植の影響についての検討 第 19 回肝細胞研究会 (2012.6.29-30 札幌) [ポスター発表]
12. 市戸義久, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: Thy1 陽性細胞移植における肝再生促進機序の解析 第 19 回肝細胞研究会 (2012.6.29 札幌) [口演発表]
13. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: Thy1 陽性 oval 細胞における肝再生機構の解析 第 48 回日本肝臓学会総会 (2012.6.7 金沢) [口演発表]
14. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: Thy1 陽性細胞移植における肝再生機構の解析 第 101 回日本病理学会総会(2012.4.27 東京) [口演発表]

〔図書〕(計 2 件)

1. 市戸義久, 大栄秀和, 谷水直樹, 三高俊広. 各種肝病態における肝オーバル細胞・小型肝細胞の同定 再生医療叢書 5 巻 代謝系臓器 102-110, 2012.
2. 三高俊広, 市戸義久, 谷水直樹. 肝再生における幹細胞の機能. 肝胆膵, 65 巻, 1号, 37-46 2012

〔その他〕

ホームページ等

web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue_Regeneration/Top_page.html

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