

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293289

研究課題名(和文) ヒト小型肝幹細胞移植の臨床応用に向けた基盤的臨床前研究

研究課題名(英文) Fundamental Researches for the Application of Human Small Hepatocytes in Clinical Treatment

研究代表者

平田 公一 (HIRATA, Koichi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50136959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床応用に向けたヒト小型肝幹細胞移植の実用化に向けての基盤的研究として、(1) ヒト小型肝幹細胞の分離・同定・保存・保存解凍後の細胞特性とその再現性の探索、(2) ヒト小型肝幹細胞の増殖・分化と再生反応亢進化について、人為的制御の可能性の探索、(3) ヒト小型肝幹細胞の動物肝への細胞移植、肝組織内に内在する小型肝幹細胞の分布・動態を探索、(4) ヒト小型肝幹細胞移植後の腫瘍化形成の有無に関する長期経過観察、を中心課題として研究し、下記の具体的成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The researches for the clinical application of human small hepatocyte stem cells (hu-SHSC) for cell transplantation in liver resulted as follows. (1) The hu-SHSC isolation were stable, using the step-wise collagenase perfusion method and the Percoll R gradient centrifugation method. To identify the specificity of hu-SHSC, histochemical examinations and molecular analysis were referred. The cytological influence under several kinds of preservation intervals in freezed condition were analysed. Finally, it has been proven that the purification and preservation of hu-SHSC were steadied. (2) The possibility of artificial control on proliferation, differentiation and promotion in hepatic regeneration were satisfied. (3) The transplantation of hu-SHSC in rodent liver was succeeded in proliferation and differentiation. (4) No characteristics concerned to tumorigenicity of SHSC has been examined, but now is ongoing. SHSC may be a candidate as the donor cell in injured liver.

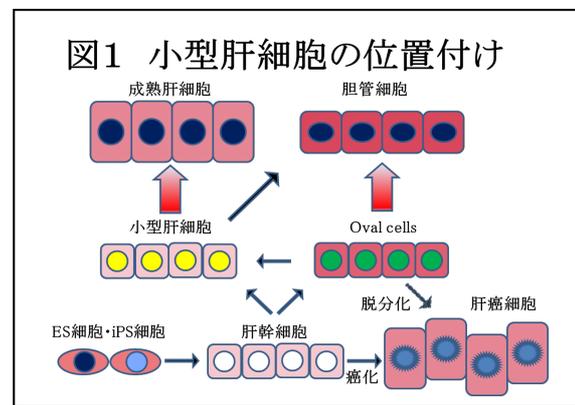
研究分野：医歯薬学、外科臨床医学、消化器外科学、肝胆膵外科学、腫瘍学、移植学、再生医学、肝細胞分子生物学

キーワード：消化器外科 肝臓外科 細胞移植 組織再生 肝不全

1. 研究開始当初の背景

肝幹細胞研究は小動物肝を用いた研究において盛んに成され、一定の研究成果が報告されつつあった。しかしヒト小型肝幹細胞を用いた研究については、当該研究グループ以外にみられない。その臨床応用のためには、基礎知見を確定的なものとしねばならず、さらに *in vitro*、*in vivo* 条件下で人為的増殖・分化を実現させることが重要である。本研究は細胞移植による臨床応用を目的とした基礎的研究として申請した。

小型肝幹細胞は、肝実質細胞と胆管上皮細胞へ分化しうる両能性 (bipotentiality) を有する細胞である。正常肝ではほとんど存在しないが、高度肝障害時あるいは成熟肝細胞が再生不良を来した際に肝幹細胞の活性化によって肝組織修復がなされとされている。肝組織修復においては、肝類洞内細胞の作用が密接に関係するなど、局所の組織環境が肝幹細胞の活性化につながっている。肝幹細胞は胆管細胞系の oval cell や肝細胞系の小型肝細胞に分類される (図 1)。小型肝細胞は研究分担者の三高が正常肝から分離・発見した肝幹細胞の一つで、これまでにヒトにおいても肝幹細胞として分離しており無血清培養を可能としている。小型肝細胞はヒアルロン酸受容体の CD44 を発現し、Thy1 陽性の一部の oval cell も小型肝細胞を経由して成熟肝細胞へと分化することを示してきた。旺盛な増殖能は *in vitro* のみならず *in vivo* においても再生置換できることも証明してきた。この小型細胞について、ヒト化小型肝細胞として安全に応用しうることによって、初めて臨床応用が可能となりうると考えられ、その解決が望まれている。



2. 研究の目的

研究の背景にある知見としては肝幹細胞は背景肝の障害度によって増殖能力や分化機能が異なることが示されており、障害肝からの Thy1 陽性細胞や CD44 陽性細胞は、正常肝からの肝幹細胞とは増殖活性の異なることを証明していたこと、肝障害度が肝幹細胞の増殖能力に影響を与えるようであることから、臨床的には肝障害度を正確に評価・把握するための特異的マーカー・指標を用いた細胞移植治療を念頭に置いた肝障害度評価法の確立の必要性の観点から、新たな考え方に基づいた評価法の確立も目的とせねばならない。そのために多様な肝機能因子をクラスター化することで肝障害度の評価を体系化し分析することを初期の目的としている。ヒト臨床に小型肝細胞を使用する方向性としてこれまでは細胞移植を念頭においているが、一方で内在性の肝幹細胞を活性化させることで肝機能を補填させるという新しい発想も抱いている。実際、動物実験レベルでのこれまでの我々の研究では、生着した移植細胞では説明の出来ない肝機能の改善効果が観察されており、この要因を明らかにした上で臨床研究へと発展させることを考えている。その研究方法として具体的には、

(1) **ヒト肝幹細胞**の分離・同定・保存・保存解凍後の細胞特性とその再現性の探索において、まず細胞凍結保存期間について、30日間と90日間の2種について検討する。とくに、**細胞機能や増殖能を発現できる至的条**

件を明らかにする。

(2) **ヒト肝幹細胞**の増殖・分化の人為的制御との再生促進化に関する可能性について、増殖能の増強効果が期待される**増殖促進因子の探索**を行い、*in vitro*での移植細胞法を確立し、臨床応用の可能性の糸口を検討する。

(3) **ヒト肝幹細胞**の動物肝への細胞移植と肝組織内での**内在性の肝幹細胞の移植後動態**については、外来性の肝幹細胞移植によって内在性の肝幹細胞活性化を目的とした細胞移植用カクテルを作成し、内在性の肝幹細胞と移植細胞の双方にとって最適な増殖条件を探索する。

(4) 肝幹細胞移植後の**腫瘍化形成の有無に関する長期経過観察**については(3)の研究の一環として外来性の肝幹細胞のみならず内在性に存在する細胞の腫瘍化の有無を確認する。並行して、**有害事象の確認と安全性についての検討**を行う。

移植以外に根治的治療法の無い肝硬変症や肝不全時の肝再生促進物質の開発や根本的治療法の確立への貢献を念頭に置いている研究と考えている。幹・前駆細胞の移植法の確立や肝組織形成と内在性細胞の関与を明らかにすることは、人為的制御を可能とする移植医療の将来像の為に、小型肝細胞についてヒト臨床適用へと結びつけなければならないとの研究と考えている。

3. 研究の方法

4 種の研究目的に添って、以下のような手法概要の下、研究を行った。

(1) 分離・同定・保存・保存解凍後の細胞特性とその再現性の探索：移植可能な細胞の安定した保存に最適な凍結保存カクテルの開発を行う。とくに採取する背景肝の肝障害度が大きく肝幹細胞の増殖能に影響していることから、肝機能因子も加味した保存方法を分別する研究過程を設定する。最終的には細胞バンクと細胞データベースの構築を目指した以下の研究について明らかにする。具

体的には、1) 細胞数と保存液量、2) 保存液の添加方法（一括置換法と段階置換法の比較）、3) 凍結温度（段階凍結法と凍結温度調節法）について、従来の標準保存液とする UW 液に 20%FBS および 10%DMSO 含有した凍結用保存液を実験条件の基礎とし、発展的に検討を進める。

(2) 増殖・分化の人為的制御と再生促進化に関する可能性の探索：細胞移植による再生置換モデルを用いて、移植効率を改善すべく移植細胞に増殖因子などによる移植補助カクテルを開発する。Choline-deficient 食誘発ラット硬変肝は NASH と病態が似ているが、これに肝幹細胞を移植すると移植細胞で再生置換が起きることを発見した。これによって再生過程や機序を明らかにし、効率化を図る。F344 ラット Wild type ラット() を使用し、第 5 週齢より choline deficient 食 (CDAA) を投与し、組織学的・血液生化学的に肝硬変と判断できる時期まで食餌投与を継続する。単離したヒト肝幹細胞を放射線照射モデルラットあるいは肝硬変モデルラットに細胞移植し、*in vivo*において GFP 染色にてレシピエント肝での生着の有無を、また肝細胞だけでなく胆管上皮細胞などへの分化が生じているかを解析する。二重染色、さらには性染色体の染色などにより解析を行う。また可能であれば 70% 肝切除を施行し、そこへ委嘱した際の効果などを観察するとともに形態学的評価および分子生物学的解析を行いヒト肝幹細胞の機能評価と動態分析を行う。

(3) 肝細胞の分離・培養および培養条件下での肝細胞加齢別の侵襲下分子反応に関する研究については、CDAA 食によるラット硬変肝あるいは放射線大量照射による急性肝不全マウスモデル肝にヒト小型肝細胞の移植を試みる。細胞移植が成功する確率は前者で低いと仮定されるが、移植性に差を生じた際には、レシピエント肝側の因子による要因を肝機能検査から比較検討する。毛細胆管収縮蛋白

(MRP2, MDR1, MDR2, etc) や肝幹細胞を特徴付ける分子(CD44, CD133, Dlk, Thy-1) の変化の有無を共焦点レーザー顕微鏡などで観察する。このような動物の肝臓からの肝幹細胞の採取、培養し、colonyまで増殖させる。

今回の研究では、移植細胞の同定にはY染色体をFISH法でCD26を蛍光法による同定に加えてDPPIVによる活性染色を行い同定する。Ki67あるいはPCNAによる標識と幹細胞マーカー(CD44, CD133, Dlk, Thy-1) による標識によって内在性の幹細胞の局在を同定し、この活性化の分子メカニズムを解明するために、マイクロダイゼクション法などを用いて前駆細胞に発現している受容体などの遺伝子発現を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト肝幹細胞を用いた実験研究の推進：小動物を使用した肝幹細胞移植とヒト肝幹細胞採取を安全に行う基盤的研究を行った。前者については肝再生置換モデルを使用した。ドナー細胞として小型肝細胞と成熟肝細胞を使用し再生置換効率の比較を行った。また、NASH 肝硬変モデルに対する肝細胞移植では、肝切除の生存率を向上させ、長期生存した個体では肝再生置換を生じていた。また、ドナー細胞として多能性幹細胞の性格を示したのは新生児期の胆管上皮細胞で、成熟胆管細胞は多能性が消失していた。

(2) ヒト肝幹細胞を臨床応用するための基礎的研究：分化誘導後の肝幹細胞の移植効率の検討；正常成熟マウス肝臓から樹立した肝前駆細胞株に OncostatinM を投与して成熟誘導した細胞を Retrorsine/PH モデル NOG マウス肝臓に移植すると、誘導せぬ細胞に比べて生着効率が著明に高まった。長期培養ができなかったラット肝細胞において、CD44 陽性小型肝細胞(CD44-SHs)の一部に継代培養可能な細胞群が存在することを見出し、その特性について解析を行った。継代可能な肝

細胞は、Matrigel 依存性で 4 ヶ月以上増殖可能であり、理論上 50 回以上分裂する細胞が相当数存在することを見出した。CD44-SHs は、3 代の継代により生着した細胞は 3.17 倍増殖した。増殖した細胞は、albumin, HNF4alpha 等の肝細胞マーカーを発現していた。また Matrigel の重層により CD44-SHs は成熟化し、CYP3A 活性を持ち毛細胆管網を形成した。正常ヒト肝臓から分離したヒト小型肝細胞も同手法を用いて sub-culture 可能な事を確認した。肝臓内在性肝前駆細胞の活性化機序；骨髄間葉系細胞を移植することにより内在性肝前駆細胞が増殖することを見出し、骨髄間葉系細胞の分泌する exosomes が前駆細胞に IL17RB を誘導し、類洞内皮細胞とクッパー細胞には、それぞれ IL17RB のリガンドである IL17B, IL25 発現を誘導することにより前駆細胞の増殖が促進されることを見出した。ヒト化肝臓ハイブリットマウスの肝再生とリモデリング；ヒト正常肝細胞を NOD/SCID マウスに移植を試み、ヒト化肝臓マウスの作成を検討した。小動物においては継代培養可能な肝細胞の樹立方法を確立できた。今後、ヒト肝幹細胞に応用することを目指したい。

(3) 細胞移植時の造腫瘍性評価。細胞製剤の作成に於いて、安全性の確保は重要な課題である。ルテラン/B-CAM 分子はラミノン 5 の特異的受容体となっていることから、造腫瘍効果に関して検討した。肝細胞癌からこの分子が放出されており、ルテラン/B-CAM 分子が腫瘍の増殖促進に働いていることを証明した。ヒト肝細胞の分離は、ドナー細胞採取に係る手技や安全性の確立が急務であった。外側区域切除による安全性と効率性を重視したドナー採取法として外科手技の報告を行った。また、虚血再灌流障害の術中モニタリングは難しく、乳酸によって肝細胞の生存率への影響と切除後のドナーに

生じる合併症との影響に関して報告した。合併症の分類と程度に関して一定の標準的な基準を作成した。また、ドナー採取における切除領域についても解剖学的領域を意識した切離方法と意識しない方法とでは、細胞の増殖能に影響が出るほか、切除適応になった病態の長期予後も影響を与えうる可能性を指摘した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Tanimizu N, Kaneko K, Itoh T, Ichinohe N, Ishii M, Mizuguchi T, Hirata K, Miyajima A, Mitaka T. Intrahepatic Bile Ducts Are Developed Through Formation of Homogenous Continuous Luminal Network and Its Dynamic rearrangement in Mice. *Hepatology* in press 2016 (査読有)
2. Kasuya J, Sudo R, Masuda G, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of hepatic stellate cell-incorporated liver capillary structures in small hepatocyte tri-culture using microporous membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2015 Mar;9(3):247-56. 10.1002/term.1630 (査読有)
3. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Okita K, Ota S, Ishii S, Ueki T, Kimura Y, Furuhashi T, Hirata K. The impact of aging on morbidity and mortality after liver resection: a systematic review and meta-analysis. *Surg Today* 2015 Mar;45(3):259-70. (査読有)
4. Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ichinohe N, Ooe H, Kawamoto M, Meguro M, Hirata K, Mitaka T. Preoperative hepatocyte transplantation improves the survival of rats with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis after partial hepatectomy. *Cell Transplant*. 2014;23:1243-1254. (査読有)
5. Kikkawa Y, Miwa T, Tanimizu N, Kadoya Y, Ogawa T, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Soluble Lutheran/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. *Exp Cell Res*. 2014;328:197-206. (査読有)
6. Ishii M, Mizuguchi T, Harada K, Ota S, Meguro M, Ueki T, Nishidate T, Okita K, Hirata K. Comprehensive review of post-liver resection surgical complications and a new universal classification and grading system. *World J Hepatol*. 2014;6:745-751. (査読有)
7. Mizuguchi T, Kawamoto M, Nakamura Y, Meguro M, Harada K, Ota S, Hui TT, and Hirata K. New technique of extracorporeal hepatic inflow control for pure laparoscopic liver resection. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2015;25:e16-20. (査読有)
8. Ishii S, Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Ota S, Nishidate T, Okita K, Kimura Y, Hui TT, Hirata K. Propensity score analysis demonstrated the prognostic advantage of anatomical liver resection in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20:3335-3342. (査読有)
9. Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ichinohe N, Ooe H, Kawamoto M, Meguro M, Hirata K, Mitaka T. Preoperative hepatocyte transplantation improves the survival of rats with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis after partial hepatectomy. *Cell Transplant*. 2014;23:1243-54. (査読有)
10. 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*. 2013; 57:1192-202. 10.1002/hep.26084 (査読有)
11. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Hui TT, Hirata K. Preoperative liver function assessments to estimate the prognosis and safety of liver resections. *Surg Today*. 2014; 44: 1-10. 10.1007/s00595-013-0534-4 (査読有)
12. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Ota S, Hui TT, Hirata K. Prognosis and Predictors of Surgical Complications in Hepatocellular Carcinoma Patients With or Without Cirrhosis after Hepatectomy. *World J Surg*. 2013; 37: 1379-87. (査読有) 10.1007/s00268-013-1989-6
13. Tatsumi H, Masuda Y, Imaizumi H, Yoshida S, Goto K, Yama N, Mizuguchi T, Hirata K. Asialoglycoprotein receptor scintigraphy with 99mTc-galactosyl human serum albumin (99mTc-GSA) as an early predictor of

survival in acute liver failure. Anaesth Intensive Care. 2013; 41: 523-8. (査読有)

14. 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, 126(Ppt22): 5239-5246 (2013) (査読有) doi: 10.1242/jcs.133082
15. Harada K, Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Ota S, Sasaki S, Miyanishi K, Hatakenaka M, Shinomura Y, Kato J, Hirata K. Prediction of postoperative liver failure and evaluation of modified criteria for liver resection with computed volume analysis Hepatogastroenterology 2013 (in press).
16. Ishii S, Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Ota S, Nishidate T, Okita K, Kimura Y, Hui TT, Hirata K. Propensity score analysis demonstrated the prognostic advantage of anatomical liver resection in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2014 Mar 28;20(12):3335-42. (査読有)
17. Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H, Nakamura Y, Mizuguchi T, Hirata K, Kon J, Mitaka T. Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. Hepatology, 57(3): 1192-1202 (2013) (査読有) doi: 10.1002/hep.26084
18. 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, 126(Ppt22): 5239-5246 (2013) (査読有) doi: 10.1242/jcs.133082

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 小型幹細胞の継代培養法

発明者: 三高俊広、石井雅之、市戸義久、谷水直樹、水口 徹、平田公一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許 2016-16210 号

出願年月日: 2016年01月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 公一 (HIRATA, Koichi)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 50136959

(2) 研究分担者

三高 俊広 (MITAKA Toshihiro)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50231618

水口 徹 (MIZUGUCHI Toru)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30347174

谷水 直樹 (TANIGUCHI, Naoki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00333336

石井 雅之 (ISHII Masayuki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 50643201

本望 修 (HONMOU, Osamu)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90285007

目黒 誠 (MEGURO Makoto)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50448601

川本 雅樹 (KAWAMOTO Masaki)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70404605

巽 博臣 (TATSUMI, Hiroomi)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70404613

前佛 均 (ZENBUTSU, Hitoshi)
札幌医科大学・道民医療推進学講座・講師
研究者番号: 90372820