

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591580
 研究課題名 (和文) 組織幹細胞と胚性幹細胞の 2 実験系による
 肝・膵細胞の分化誘導と膵β細胞への分化転換
 研究課題名 (英文) The verification for plasticity of hepatic stem cell by using
 functional analysis of embryonic stem cell and organ-specific stem
 cell
 研究代表者
 宮川 眞一 (MIYAGAWA SHIN-ICHI)
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：80229806

研究成果の概要：

マウス肝門脈結紮モデルにおいて、門脈結紮肝葉に誘導される肝組織内在性幹細胞の単一クローンを樹立した。同細胞は液性因子及び細胞外マトリックスの違いにより肝実質細胞及び胆管上皮細胞へと分化する、bipotentiality を示した。また、肝臓細胞から膵臓細胞 (特に内分泌細胞) への分化転換に関して、成熟肝細胞に転写因子 Pdx1 及び Ngn3 を共発現させた場合、効率的にインスリン産生細胞を誘導しうることを示した。これらの結果に、ES 細胞からの内胚葉細胞誘導実験の結果を加味し、今後さらに効率的な肝から膵への分化誘導方法を検討していく。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：組織幹細胞, 胚性幹細胞, リプログラミング, Pdx1, Ngn3

1. 研究開始当初の背景

膵臓はその 95%以上を外分泌細胞が占め、インスリンを分泌するβ細胞などの内分泌細胞はわずか数%を占めるに過ぎないが、糖代謝調節で中心的な役割を果たすβ細胞は臨床的にきわめて重要である。

現在「β細胞の再生による糖尿病の治療法」を確立しようという研究が活発に行なわれ、再生医学的な手法により新たに細胞を分化させ細胞移植を行なうことが新たな方法論として注目されている。どのような細胞ソ

ースからβ細胞を得るかという点では、大別して体性幹細胞 (組織幹細胞) システムを利用するものと、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いる方法がある。近年、マウスを用いた発生研究では、膵臓及び肝臓には共通の前駆細胞が存在しうる可能性を示唆する所見が多数報告されている。また体性 (組織) 幹細胞の研究分野では、肝・膵臓前駆細胞をそれぞれ成熟した膵臓・肝臓細胞類似の細胞へと分化させる、といった知見も報告されている。

我々は、過去にマウス ES 細胞を用いた肝

細胞への分化誘導の過程において、肝発生の細胞分化系譜に準じ効率的に内胚葉由来細胞を分化誘導するには、中胚葉由来細胞の働きが重要であると報告してきた。近年、再生医療分野におけるES細胞を用いた研究では、細胞系譜分化誘導の概念が高まりつつあり、これに基づき、従来分化誘導が比較的難しいとされてきた、肝細胞、膵β細胞への効率的な分化誘導の期待が持たれている。

このような背景に鑑み、我々は胚性幹細胞(ES細胞)を細胞系譜分化誘導の概念に基づく体組織発生を解析するツールとして位置づけ、ここから得られた知見に基づき、特に肝臓における体性幹細胞(組織幹細胞)効率的に分離し、膵β細胞様細胞へと効率的に分化させることを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

我々の究極的な目標は、成熟肝組織から分離した組織幹細胞を効率的に膵β細胞様細胞に分化させることであるが、この系を構築するにおいて以下の点を解明しなければならない。

- (1) 肝臓における組織幹細胞を効率的にはどのような方法が必要か?
- (2) 上記手法は臨床応用に足るものか?
- (3) 肝組織幹細胞を膵β細胞様細胞にリプログラミングするのに必要なファクターは?

これらの命題を解明すべく、我々は体性幹細胞(組織幹細胞)システムを利用する方法と、胚性幹細胞(ES細胞)を用いる方法の両系を用い研究を開始した。

体性幹細胞(組織幹細胞)システムを利用した系として、我々は肝臓門脈結紮モデルに着目した。正常な肝臓組織においては、分化の初期化及び分化転換が出現することは考えにくい。肝片葉の門脈枝を結紮(塞栓)することにより対側葉が代償性に肥大することは既に知られており、ラットを用いた検討では、門脈結紮葉非実質細胞分画に増殖性と肝実質細胞への分化能を有する細胞が発現することが報告されている。また実地臨床においては、門脈塞栓術は拡大肝切除術を要する症例における術後残存容積を確保する方法として既に確立された術式である。これらの事由から、我々はマウス門脈結紮モデルを用いて肝臓内存在性幹細胞を効率的に分離する手法を検証する。

ES細胞を用いた系では、同細胞を、*in vitro*での個体発生を模倣する簡便な解析ツールとして利用し、内胚葉前駆細胞の分化誘導及び肝前駆細胞及び膵前駆細胞への分化のスイッチに重要な条件を検討する。

3. 研究の方法

A. 体性幹細胞を利用した実験系

(1) マウス門脈結紮モデルの作成
C57BL/6J (10週齢, ♂)の門脈一次分枝(左枝を実体顕微鏡下に結紮し、門脈(70%環流域)結紮モデルを作成する。

(2) 分離細胞に対するコロニーアッセイ
同モデルより、結紮後7, 14, 21日目に門脈結紮・非結紮両葉から非実質細胞分画を分離しコロニーアッセイを行い、最も効率的に肝前駆細胞(Hepatic progenitor cells: HPCs)、即ち上皮細胞様コロニーを分離する時間的タイミングを同定する。

(3) 分離細胞に対するSingle cell colony assay

分離細胞に対するSingle cell colony assayを行い、経代の可否及び液性因子・細胞外マトリックスの違いによる細胞挙動の変化を検証する。

(4) 膵内分泌細胞様細胞への分化誘導
得られたHPCsを膵内分泌細胞lineageへとリプログラミングするために必要な因子を決定するため、予備実験として同系統のマウスから得られた肝実質細胞(mature hepatocyte)に対して膵臓発生特異的転写因子を導入し、リプログラミングの可否を検討する。

B. ES細胞を用いた実験系

本分野は海外共同研究者である、小川真一郎(McEwen Centre for Regenerative Medicine, Tronto, Canada, 信州大学外科所属, 2007年4月より上級博士研究員としてGordon Keller laboratoryに留学中)と遂行している。同研究室ではヒトES細胞を用い、無血清培養下での内胚葉前駆細胞を経由した膵・肝前駆細胞への分化誘導条件の検討を行っており、培養条件等を相互に共有している。

4. 研究成果

A. 体性幹細胞を利用した実験系

(1) マウス門脈結紮モデルの作成
門脈一次分枝(70%環流域)結紮し、術後の肝臓重量変化を検討した結果、全肝重量には変化が無く、結紮・非結紮葉の重量比は術後14日で逆転することが分かった(図1.)。

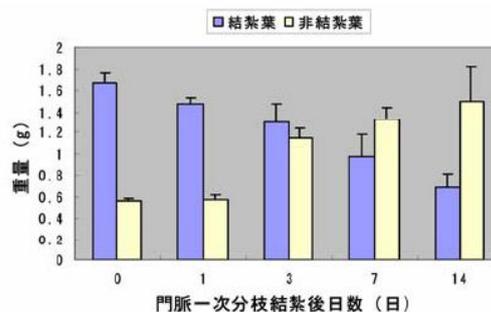


図1. 門脈一次分枝結紮後の日数と肝臓重量比の推移

(2) 分離細胞に対するコロニーアッセイ術後7, 14, 21日目に, 門脈結紮・非結紮両葉より分離環流法を用いて非実質細胞分画を分離し, 時間的タイミング及び結紮の有無による上皮様コロニー形成率の違いについて比較検討を行った。元来肝非実質細胞分画は胆管上皮・類洞内皮細胞をはじめとする雑多な細胞集団であり, 正常肝からの分離においてもコロニーを形成しうる。しかし, これらの分画は主に線維芽細胞であることが多く, 形態的に上皮細胞様コロニーとは異なる。

そこで我々は, 分離細胞分画から得られた全コロニー数とそのうちの上皮細胞様コロニー数をそれぞれカウントし, その形成率を比較した(図2.及び 図3.)。

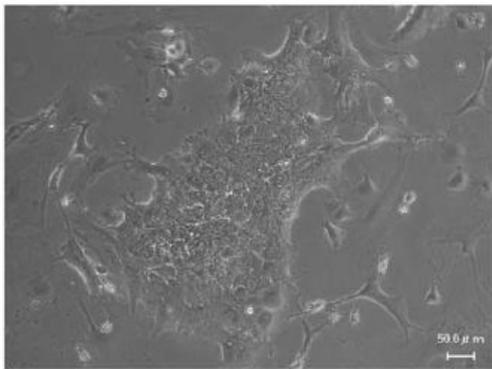


図2. 上皮細胞様コロニー

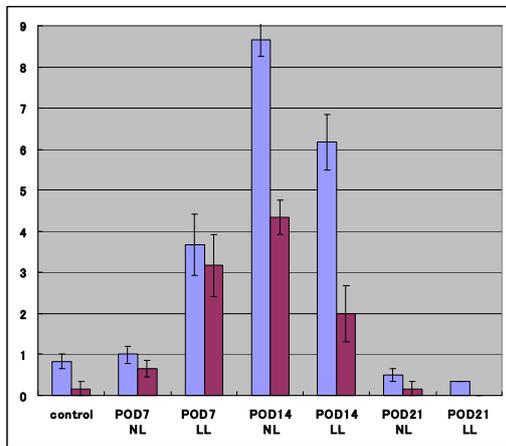


図3. コロニー形成率

青:全コロニー数, 赤:上皮細胞様コロニー数
NL:Non-Ligated lobe, LL:Ligated Lobe

結果, 門脈結紮後7日目の結紮葉から分離した非実質細胞分画が, 最も高いコロニー形成率を示した。

(3) 分離細胞に対する single cell colony assay

門脈結紮後7日目の結紮葉から樹立された

上皮細胞様コロニーから, 限界希釈法により Single cell colony を再度樹立した (Hepatic progenitor cells: HPCs)。

同細胞は6ヶ月以上の長期にわたり, 経代維持することが可能だった。また, マトリゲル上で2次元培養すると adult hepatocytes 様の形質を発現することが, RT-PCR, 免疫染色等により証明された。同様に, コラーゲンゲル内で3次元培養を行うと, 胆管組織に類似した管腔形成枝分かれ構造を形成することが確認できた。

本研究内容は, 2009年3月の日本再生医療学会総会において発表した。

(4) 膵内分泌細胞様細胞への分化誘導

我々が樹立した HPCs をソースとし, 膵β細胞様細胞へのリプログラミングを誘導するにあたり, 予備実験として同系統のマウスから分離した mature hepatocytes に対して, 膵臓発生特異的転写因子である Pancreas and duodenal homeobox 1 (Pdx1) 及び Neurogenin 3 (Ngn3) を独立もしくは共発現させることにより肝臓から膵臓へのリプログラミングを惹起しうるかを検討した。

このような分化誘導実験においてはアデノウイルスベクターをはじめとするウイルスベクターが使用されているが, これらは生体に投与した場合, viral component の発現に伴う免疫応答が問題となる。このため, 本予備実験はエレクトロポレーション法を改変し, 初代培養肝細胞のような増殖能に乏しい細胞へも効果的な遺伝子導入を行ううる, nucleofection 法を用いて行った。

Nucleofection による遺伝子導入効率を他の非ウイルス性遺伝子導入試薬 (Lipofectamine 2000 及び FuGene6) と比較検討した結果, 約10倍の効率を得られることが確認された(図4.)。

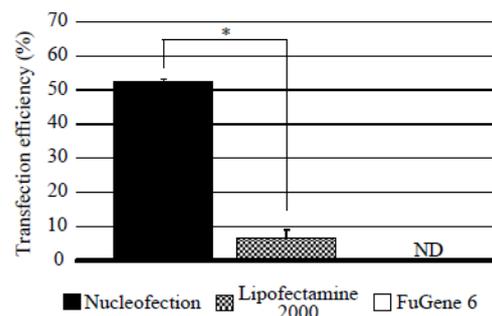


図4. 遺伝子導入効率

(* P < 0.05)

本法を用いて, mature hepatocytes に Pdx1 及び Ngn3 を単独もしくは共発現させると, Pdx1 と Ngn3 を共発現させた場合に有意に高い内因性 C-peptide の産生が見られた。また, IRES (Internal Ribosomal Entry Site) を用いて Pdx1 と Ngn3 の共発現を担保した

方が、個々の発現ベクターを co-transfection するよりも効率的であった (図 5.)。また、同プラスミドを導入された細胞はグルコース負荷に応じ、培養液中へインスリンを分泌する能力を有することが確認された (図 6.)。

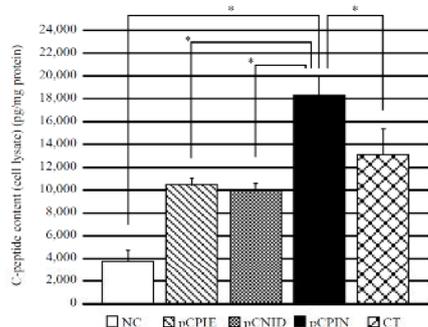


図 5. 内因性 C-peptide 産生量

NC; Negative control
 pCPIE; Pdx1 単独発現プラスミド
 pCNID; Ngn3 単独発現プラスミド
 pCPIN; Pdx1, Ngn3 共発現プラスミド
 CT; Co-Transfection

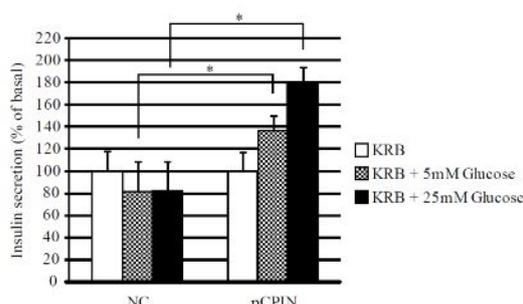


図 6. インスリン分泌能の解析
 (KRB; Krebs-Ringer bicarbonate buffer)

Mature hepatocytes を用いた一連の実験結果は、2008 年 11 月台湾において開催された 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (Asian Pacific Region) において発表したほか、現在論文投稿中である (*Biochemical and Biophysical Research Communication, in submission*)。

B. ES 細胞を用いた実験系

本分野は海外共同研究者である、小川真一郎 (信州大学外科所属、2007 年 4 月より McEwen Centre for Regenerative Medicine, Tronto, Canada へ留学中) との共同研究として遂行している。所属する Gordon Keller laboratory では、ES 細胞からの効率的な内胚葉細胞の分化・誘導方法を検討しているが、彼らは 2007 年 ES 細胞から分化する内胚葉前駆細胞は c-Kit, CXCR4 をその表面マーカーとして発現することを報告している

(BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. Nature Biotechnol. 2006 Nov;24(11):1402-11)。

我々の門脈結紮モデルから分離した非実質細胞分画に対しても、この c-Kit/CXCR4 の組み合わせでの sorting を試みたが、有意な分画は得られなかった。これは、門脈結紮に際して動員が推定される組織幹細胞が、既に肝臓細胞の lineage にコミットされていることを示唆する所見と考察される。今後、ヒトを含めた ES 細胞による細胞分化の検討が進むにつれ、肝組織内在性幹細胞の分離により特化した表面マーカーが同定されると考えている。

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 21 件)

- Mita A, Miyagawa S, Ichii H 他 6 名
 Purification method using iodixanol (OptiPrep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations, leading to prolonged beta-cell survival during pretransplantation culture. Transplant Proc. 2009 Jan-Feb; 41(1):314-5. 査読有
- Nakata T, Miwa S, Miyagawa S 他 3 名
 Clinical and pathological features of primary carcinoma of the cystic duct. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2009;16(1):75-82. 査読有
- Ikegami T, Miwa S, Miyagawa S 他 5 名
 Arterial reconstruction in a case of subintimal dissection of celiac arterial tributaries in living donor liver transplantation: a case report. Transplant Proc. 2008 Dec; 40(10): 3794-6. 査読有
- Ishizone S, Miyagawa S 他 5 名
 Surgical treatment for anorectal malignant melanoma: report of five cases and review

- of 79 Japanese cases. *Int J Colorectal Dis.* 2008 Dec; 23(12): 1257-62. 査読有
5. Soeda J, Miwa S, Miyagawa S 他 8 名
Primary liver carcinoma exhibiting dual hepatocellular-biliary epithelial differentiations associated with citrin deficiency: a case report. *J Clin Gastroenterol.* 2008 Aug;42(7):855-60. 査読有
 6. Komatsu D, Miyagawa S, Kamata T 他 2 名
NADPH oxidase 1 plays a critical mediating role in oncogenic Ras-induced vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene.* 2008 Aug 7;27(34):4724-32. 査読有
 7. Mita A, Miyagawa S, Ichii H 他 7 名
Anti-proinflammatory effects of sirolimus on human islet preparations. *Transplantation.* 2008 Jul 15;86(1):46-53. 査読有
 8. Kubo N, Miyagawa S 他 4 名
Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser capture microdissection. *J Drug Target.* 2008 Jun; 16(5): 396-404. 査読有
 9. Yoshizawa K, Miyagawa S, Nakano M 他 13 名
De novo autoimmune hepatitis following living-donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Clin Transplant.* 2008 May-Jun;22(3):385-90. 査読有
 10. Nakata T, Miwa S, Miyagawa S 他 5 名
Identification of genes associated with multiple nodules in hepatocellular carcinoma using cDNA microarray: multicentric occurrence or intrahepatic metastasis? *Hepatogastroenterology.* 2008 May-Jun; 55(84): 865-72. 査読有
 11. Yanagisawa Y, Miyagawa S, Taniguchi S 他 3 名
Reduction of Calponin h1 expression in human colon cancer blood vessels. *Eur J Surg Oncol.* 2008 May;34(5):531-7. 査読有
 12. Mita A, Miyagawa S 他 8 名
Nonsurgical policy for treatment of bilioenteric anastomotic stricture after living donor liver transplantation. *Transpl Int.* 2008 Apr;21(4):320-7. 査読有
 13. Noike T, Miwa S, Miyagawa S 他 2 名
Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2008 Feb;39(2):201-8. 査読有
 14. Kubota K, Miwa S, Miyagawa S 他 5 名
Bone marrow-derived cells fuse with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model. *Carcinogenesis.* 2008 Feb;29(2):448-54. 査読有
 15. Kobayashi A, Miyagawa S, Miwa S, Nakata T.
Prognostic impact of anatomical resection on early and late intrahepatic recurrence in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008; 15(5): 515-21. 査読有
 16. Koide N, Miyagawa S 他 5 名
Clinicopathologic features and histochemical analyses of proliferative activity and angiogenesis in small cell carcinoma of the esophagus. *J Gastroenterol.* 2007 Dec;42(12):932-8. 査読有

17. Nomura K, Miwa S, Miyagawa S 他 3 名
Detection of hepatic metastases from colorectal carcinoma: comparison of histopathologic features of anatomically resected liver with results of preoperative imaging. J Clin Gastroenterol. 2007 Sep;41(8):789-95. 査読有
18. Ishizone S, Miyagawa S, Ota H 他 7 名 In vivo bactericidal activities of Japanese rice-fluid against H. pylori in a Mongolian gerbil model. Int J Med Sci. 2007 Aug 10;4(4):203-8. 査読有
19. Yanagisawa Y, Miyagawa S 他 5 名 Modified Irinotecan/5FU/Leucovorin therapy in advanced colorectal cancer and predicting therapeutic efficacy by expression of tumor-related enzymes. Scand J Gastroenterol. 2007 Apr;42(4):477-84. 査読有
20. Maruta F, Miyagawa S 他 4 名 A clinical study of docetaxel with or without 5'DFUR as a second-line chemotherapy for advanced gastric cancer. Med Oncol. 2007;24(1):71-5. 査読有
21. Miwa S, Miyagawa S 他 6 名 Is major hepatectomy with pancreatoduodenectomy justified for advanced biliary malignancy? J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2007;14(2):136-41. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Sakai S, Motoyama H, Miyagawa S et al. マウス門脈結紮モデルより分離した肝前駆細胞の機能解析と分化誘導. 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月5日, 東京(東京国際フォーラム)
2. Motoyama H, Miwa S, Miyagawa S et al. Co-expression of Pdx1 and Ngn3 transdifferentiate hepatic cell

s into insulin-producing cells without viral vectors. 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), 2008年11月7日, Chien-Tan Overseas Youth Activity Center (Taipei, Taiwan)

3. Motoyama H, Miwa S, Miyagawa S et al. 肝代謝能を指標とした, ES 細胞由来肝葉組織の機能解析. 第19回肝胆膵外科学会, 2007年6月7日, 横浜市(パシフィコ横浜)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHIN-ICHI)
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

田川 陽一 (TAGAWA YOH-ICHI)

東京工業大学・生命理工学部・准教授
研究者番号: 70262079

丸田 福門 (MARUTA HUKUTO)

信州大学・医学部・准教授
研究者番号: なし
(平成19年度 逝去)

(3) 連携研究者

田川 陽一 (TAGAWA YOH-ICHI)

東京工業大学・生命理工学部・准教授
研究者番号: 70262079