

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790485
 研究課題名（和文） 肝幹細胞における増殖制御機構の解析と幹細胞移植モデルの開発
 研究課題名（英文） Research on molecular mechanism of hepatic stem cell proliferation and development of mouse models for stem cell transplantation
 研究代表者
 柿沼 晴（KAKINUMA SEI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員
 研究者番号：30372444

研究成果の概要(和文)：

研究代表者らは、初代肝幹細胞を分離・培養して、目的分子の発現を修飾することで肝幹・前駆細胞の増殖制御に関わる分子機構の解明を試み、2つの転写因子 Prox-1 と Sall4 がそれぞれ、増殖と胆管細胞分化を制御することを発見した。また肝幹/前駆細胞を肝障害マウスに移植して肝不全を治療しうる動物モデルの構築も試み、高度の肝ドナーキメラズムと長期の治療効果が得られる細胞移植系を確立することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The first objective of this research project is clarification of molecular mechanisms in proliferation of primary mouse hepatic stem/progenitor cells (HSPCs). Primary mouse HSPCs were sorted using surface markers, and were infected with a viral vector expressing a target gene, then were cultured. Our data demonstrated that transcription factor Prox-1 enhances the proliferation of HSPCs, and Sall4 regulates the cell-fate determination of HSPCs. Second objective is development of mouse models for stem cell transplantation. The HSPCs were transplanted into liver-injured recipient mice. Our data showed that the recipient livers were reconstituted by donor HSPCs, and that donor cells were engrafted in long-term.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学(肝臓病学)

キーワード：

(1) 再生医学 (2) 肝細胞 (3) 幹細胞 (4) 発生・分化 (5) 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

• 本邦では、肝癌を含めた慢性肝疾患によって、年間約 50,000 人が死亡し、その死因は終末像としての肝不全が大半を占めている。現在のところ、致死的な肝不全に対する根治的治療法は肝移植のみであるが、脳死ドナーの絶対的不足・生体ドナーに対する精神的・社会的負担が社会問題となっており、代替治療の確立が強く求められている。代替治療の一つとして、肝細胞を移植する「肝細胞移植療法」が従来から研究されてきたが、その効果は未だ明らかではない。

• 近年肝幹細胞の同定によって、より増殖能の高い細胞を移植治療に利用する試みが注目を集めている。肝幹細胞は、自己複製能、高い増殖能及び肝細胞・胆管細胞への2方向性分化能の3つの能力を有する細胞であり、分離・同定する手法が研究協力者らによって開発・確立された(Suzuki A, et al. *J Cell Biol*, 2002)。肝幹細胞は生体内ではごく少数の細胞群であり、その分化・増殖を制御する分子メカニズムには不明の点も多いため、これを移植医療に効率的に利用する方法は現在のところ確立されていない。

• これに対して、研究代表者は研究協力者らの支援のもとに、科学研究費補助金(平成18-19年若手研究B:研究経費3500千円)「肝細胞分化の分子機構の解析と致死肝不全モデル動物への細胞移植療法の開発」に取り組んできた。これまでの研究において、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入系によって、目的分子がマウス肝幹細胞の増殖・終末分化にどのような機能を有するののかについて *in vitro* で解析しうる実験系を、研究協力者らの支援のもとに独自に構築した。そして、肝幹/前駆細胞(以後増殖能と2方向性分化能を有する細胞を肝幹/前駆細胞と総称する)では Wnt シグナルに支配される転写因子 TCF/LEF が増殖・分化を制御していることを示した (in submission、第13回肝細胞研究会/会長賞受賞、2007年日本肝臓学会ワークショップ発表)。さらに最近、この assay 系に改良を加え、肝細胞系譜のみならず、胆管細胞系譜への分化能を検定しうる assay 系を構築する事にも成功した。

• 一方で、研究代表者はこれまでに、独自に開発した分化誘導培養系によって、ヒト臍帯血由来細胞が肝前駆細胞に分化しうる事、臍

帯血中には移植後に機能的肝細胞に分化する細胞が存在することを報告する(Kakinuma et al, *Stem Cells*, 2003, Kakinuma et al, *Transplant Proc*, 2007)など、細胞移植に関する研究を一貫して行ってきた。

2. 研究の目的

研究代表者は今回申請する研究において、(1): 初代肝幹細胞を分離・培養し、これに対して特定の目的分子の発現を修飾することで肝幹/前駆細胞の増殖制御に関わる分子機構について解明を試みる。さらに、その結果得られた知見をもとに、(2): 肝幹/前駆細胞の増殖活性を亢進・制御した細胞、もしくはこれを利用して作成する細胞担体を肝障害マウスに移植し、致死肝不全を治療しうる動物モデルの構築を目指す。これらの結果をもとに、将来的に肝幹細胞を致死肝不全の治療に応用する、移植療法の技術基盤を確立することを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

(1). マウス肝前駆細胞・肝幹細胞の分離、培養

• 研究代表者はマウス胎仔肝臓から高速セルソーターを用いて、 $Dlk^+CD45^-Ter119^-$ の初代肝幹/前駆細胞 (bipotential stem/progenitor cells) が高濃度に純化された画分を分取し、増殖もしくは肝細胞への分化を誘導する培養実験系を確立することを試みた。

• 同様に、純化した初代肝幹/前駆細胞に対してコラーゲンゲルと TNF α を併用した培養系によって胆管の樹枝状構造を *in vitro* で形成させる、胆管系譜分化の assay も確立することを試みた。以下の検討ではこれらを用いて、純化した肝幹/前駆細胞における、特定の目的分子による増殖調節機構及び終末分化に影響する効果について解析を進めていった。

• 同時に、さらに増殖性の高い細胞集団を得るために、肝幹・前駆細胞の細胞表面抗原の探索を網羅的に行った。

(2). ウイルスベクターによる遺伝子導入/siRNA 系を用いた目的遺伝子の肝幹細胞増殖に対する機能のスクリーニング

• 前記に示した肝幹/前駆細胞に対して、ウ

ウイルスベクターによって分化・増殖に関与することを我々が予想している遺伝子の強制発現を行った。ベクターには、既の実績のあるレトロウイルス・レンチウイルスを主として使用した。強制発現させた細胞に対する single cell colony forming assay による増殖能の評価、及び肝細胞系譜・胆管細胞系譜への分化誘導による分化能の評価によって各遺伝子の幹細胞機能に与える影響を探索した。効果が得られた分子に関しては、siRNA knock down 系によってデータの整合性を検証した。

・本研究においては、knock out mouse での評価が困難な分子（胎生肝形成以前に致死となる、或いは functional redundancy によって形質の発現が認められないと予想される分子など）を特に選択してスクリーニングを進めた。

(3). 肝幹細胞を用いた細胞移植系の開発と移植後の細胞動態の解析

・まず成体由来肝細胞を用いて、高度の肝キメリズムが得られる移植系として、FAH 欠損マウス・レトロルシン・肝切除・残肝放射線照射などを組み合わせて前処置を与える手法を確立することを試みた。確立した移植系を用いて、増殖誘導効果を有する標的分子を強制発現及び knock down した肝幹/前駆細胞を移植し、そのドナーキメリズム・増殖性・終末分化に関して検証した。また、有効なレシピエント前処置に関するさらなる検討をすすめた。

(4). 肝幹細胞とマトリックス担体を用いた肝小葉類似組織構築系の開発

・肝幹・前駆細胞の homing 能力を補うもう一つ的手段として、予め細胞集団をマトリックスの中で立体構造を形成させ、それを肝臓内もしくは腹膜に直接埋め込む手法を考えた。具体的には、マトリゲル、コラーゲンゲル、その他の細胞外マトリックスを利用して、これを *in vitro* で1つの細胞担体として作成し、肝臓内もしくは腹膜に直接埋め込むことで、移植後の生着率を高くすることを試みた。

(5). 致死的肝不全モデルマウスに対する移植

・以上の検討を踏まえて、最も有効であると考えられた手法を用いて、肝障害マウスに対する移植の治療効果に関して検討をすすめた。具体的には、適切な前処理を行った後に、肝幹・前駆細胞を移植して、その効果を半年間にわたって観察した。

4. 研究成果

(1). マウス肝幹・前駆細胞の分離、培養

・既報において、胎生中期マウス肝臓に於いて Dlk⁺CD45⁻Ter119⁻の分画に肝幹・前駆

細胞が濃縮されていることが示されているが、それ以上に濃縮が可能か否かは不明であった。そこで、研究代表者は、細胞表面抗原として既知のものの中に、分取しうるマーカーがあるか否かを探るため、計 100 種類以上のモノクローナル抗体を用いて、肝幹/前駆細胞画分に染まる抗体をスクリーニングした。その結果、抗 CD13 抗体は肝幹/前駆細胞を比較的特異的にマーキングしうることを示した。同様のスクリーニング系において、抗 CD13 抗体は抗 Dlk 抗体や抗 CD133 抗体と比較して、胎生中期肝幹/前駆細胞を特異的に染色しうることを示された。以上の結果をまとめて学術誌に発表した(Kakinuma et al, J Hepatol 2009, 文献1)。

・従来までは、肝幹/前駆細胞を培養系によって肝細胞系譜に分化する誘導培養系を確立していたが(Kamiya et al. 1999)、本研究の過程で、コラーゲンゲルへの包埋培養によって、胆管細胞系譜にも誘導しうる事が明らかになり、これを利用した解析ができるようになった(Oikawa et al, Gastroenterology 2009 文献5)。

(2). ウイルスベクターによる遺伝子導入系を用いた各種遺伝子のスクリーニング

・転写因子 Prox-1 は肝発生に重要な役割を果たし、Prox-1 欠損マウスでは、肝芽細胞の遊走能が低下するため肝芽の形成不全に陥り、その結果胎生致死となることが報告されている。この知見をもとに、Prox-1 を強制発現するレトロウイルスベクターを構築し、肝幹・前駆細胞に強制発現した。

・その結果、Prox-1 を過剰発現する肝幹・前駆細胞は、長期間継代培養することが可能になり、対照群に比較して増殖能は亢進していた。同時に、遊走能は高まっていた。

・一方で、この細胞は誘導培養により、肝細胞に分化させることも可能であることから、この変化は、癌化を惹起したものではなく、増殖能・遊走能を維持したまま、終末分化まで可能な肝幹・前駆細胞をライン化することができたと考えた。

・さらに、Prox-1 の機能を抑制することで知られている、Lrh-1 を同時に強制発現させると、この肝幹・前駆細胞は増殖能が著しく低下した。

・Prox-1 は、細胞周期を負に制御する p16^{INK4a} のプロモーター領域に結合して、その転写活性を負に制御した。逆に、Lrh-1 は、p16^{INK4a} のプロモーター領域に結合して、その転写活性を正に制御した。これらの結果より、Prox-1 と Lrh-1 は協同的に作用して、p16^{INK4a} の転写活性を制御して、細胞周期をコントロールしていることが示された。以上の結果をまとめて、学術誌に発表した(Kamiya et al. Hepatology 2008, 文献9)。

・同様に、転写因子 Sall4 について研究を行った。転写因子 Sall4 は ES 細胞や白血病幹細胞など数種類の幹細胞に発現する事が知られている。ES 細胞においては、Sall4 の発現を欠失させると、その未分化性が失われることが既に報告されている。

・我々は肝幹・前駆細胞における Sall4 の機能を解析した。Sall4 は胎生中期までの肝幹・前駆細胞に発現しているが、胎生中期以降の肝細胞には発現がみられなかった。肝幹・前駆細胞に Sall4 の強制発現を行いつつ、胆管への分化誘導培養を行うと、誘導される胆管構造の数が有意に上昇した。一方で、肝細胞への分化誘導を行っても、その効率と肝細胞としての機能分子の発現が対照群に比較して有意に低かった。

・さらに、Sall4 の翻訳を抑制しうる shRNA を lentiviral vector を用いて強制発現し、その機能を Knock down せしめると、誘導される胆管構造の数が有意に減少した。同様に肝細胞への分化誘導を行うと、肝細胞としての機能分子の発現が高くなった。

・これらの結果をもとに、胆管障害を与えたマウスに Sall4 を強制発現した肝幹・前駆細胞を移植したところ、ドナー由来の胆管が対照群に比較して有意に多かった。これらの結果より、Sall4 は肝幹・前駆細胞の胆管細胞系譜への分化を正に誘導することが明らかになった。以上の結果をまとめて、学術誌に発表した (Oikawa et al. Gastroenterology 2009, 文献5)。

(3).肝幹細胞を用いた細胞移植系の開発と移植後の細胞動態の解析

・まず成体由来肝細胞を用いて、高度の肝キメリズムが得られる移植系として、FAH 欠損マウス・レトロルシン・肝切除・残肝放射線照射などを組み合わせて前処置を与える手法を確立することを試みた。

・FAH 欠損マウスあるいは放射線照射を用いた移植系の場合、移植後の死亡率が比較的高いなど、実験系の不安定性が見られた。一方で、レトロルシンと部分肝切除を組み合わせるとニードマウスに移植する実験系では、生存率が高く、結果が比較的安定していた。

・この移植系に GFP トランスジェニックマウスより分離した胎生肝臓より分離した初代肝幹・前駆細胞を移植したところ、移植後3週間目で、ドナー細胞によるコロニー形成が肝臓内に認められ、そのコロニーはアルブミンを発現する肝細胞として生着していたことを見いだした (Kakinuma et al, J Hepatol 2009, 文献1)。

・本移植系を応用して、高脂血症を呈する ApoE 欠損マウスに対して野生型肝幹・前駆細胞を移植したところ、高脂血症が治癒し、移植した細胞がレシピエント肝で1年以上にわたって肝細胞として機能することを示した(第95回日本

消化器病学会総会にて発表)。

・確立した移植系を用いて、成体肝臓由来の肝幹・前駆細胞を移植したところ、胎生細胞と同様に、ドナー細胞によるコロニー形成が肝臓内に認められ、そのコロニーはアルブミンを発現する肝細胞として、長期間にわたって生着していたことを見いだした (Kamiya et al, Gastroenterology 2009, 文献4)。

・増殖誘導効果を有する標的分子を強制発現及び knock down した肝幹/前駆細胞を移植し、そのドナーキメリズム・増殖性・終末分化に関して検証した。その結果、一部の分子に関して、強制発現によって移植効率を正に調節することを見いだしているため、現在も検討を継続している。また、有効なレシピエント前処置に関してもさらなる検討をすすめており、次の研究計画で継続して開発する予定である。

(4).肝幹細胞とマトリックス担体を用いた肝小葉類似組織構築系の開発

・肝幹・前駆細胞の homing 能力を補うもう一つの手段として、予め細胞集団をマトリックスの中で立体構造を形成させ、それを肝臓内もしくは腹膜に直接埋め込む手法について検討した。

・肝幹・前駆細胞をマトリジェル (EHS gel) と共に培養することによって、試験管内で肝細胞への誘導が促進され、類洞様の構築をとることを示した (Kamiya et al, Gastroenterology 2009, 文献4)。

・次いで、肝幹・前駆細胞をコラーゲンゲル及び TNF α と共に培養することによって、試験管内で胆管細胞への誘導が促進され、樹枝様の構築をとることを示した (Oikawa et al, Gastroenterology 2009, 文献5)。

・このような、マトリックス担体にて腎臓皮膜下への移植を試みたが、結果は生着がみられなかった。

(5). 致死的肝不全モデルマウスに対する移植

・最後に、これまでの検討を踏まえ、血指摘肝不全モデルマウスに対する移植効果を検討した。

・本移植系を応用して、高脂血症を呈する ApoE 欠損マウスに対して野生型肝幹・前駆細胞を移植したところ、高脂血症が治癒し、移植した細胞がレシピエント肝で1年以上にわたって肝細胞として機能することを示した(第95回日本消化器病学会総会にて発表)。

・本移植系においては、移植をせずに前処理のみを行って経過をみた ApoE 欠損マウスでは、移植後12週目程度で、安楽死せしめる必要性があるほど衰弱することが判明した。すなわち、肝幹・前駆細胞の細胞移植によって、致死的な病態のマウスが救命されている可能性が示された。今後、本結果に関してさらなる研究を継続する予定である。

(6). まとめ

以上のように、本研究計画では、予定していた実験的検討は全て行うことができ、その結果として英文原著論文を2年間で9報発表することができた。本研究計画での実績をもとに、次の研究計画でもさらに細胞移植メカニズムの解析に取り組む予定である。

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9件)

1. Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A, Yamazaki Y, Oikawa T, Okada K, Nakauchi H. Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol* 51:127-38, 2009. 査読有り.
2. Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol* 44:167-72, 2009. 査読無し.
3. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus *in vivo*. *J Clin Invest* 120:179-190, 2010. 査読有り.
4. Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology* 137:1114-26, 2009. 査読有り.
5. Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S, Zeniya M, Nishinakamura R, Tajiri H, *Nakauchi H. Sall4 regulates cell fate decision of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 136:1000-11, 2009. 査読有り.

6. Itsui Y, Sakamoto N, Kakinuma S, Nakagawa M, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Karakama Y, Mishima K, Yamamoto M, Watanabe T, Ueyama M, Funaoka Y, Azuma S, Watanabe M. Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* 50:1727-37, 2009. 査読有り.
7. Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, Mogushi K, Nagaie S, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G, Mishima M, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Chen CH, Kakinuma S, Tsuchiya K, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M. Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 2010 (in press). 査読有り.
8. Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M. Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 2010 (in press). 査読有り.
9. Kamiya A, Kakinuma S, Onodera M, Nakauchi H. Prospero-related homeobox 1 and liver receptor homolog 1 coordinately regulate long-term proliferation of murine fetal hepatoblasts. *Hepatology* 48:252-264, 2008. 査読有り.

[学会発表] (計7件)

1. Kakinuma S, Kamiya A, Ohta H, Nakauchi H: Flowcytometric analysis of cell surface molecules on mouse fetal hepatic stem/progenitor cells. -*FASEB summer research conference, Liver growth, development and disease*. August, 2008, Snowmass, CO, USA.

2. マウス胎生中期肝幹/前駆細胞を用いた細胞移植：柿沼 晴、紙谷聡英、太田春彦、坂本直哉、渡辺守、中内啓光（一般ポスター演題/優秀演題受賞）JDDW 2009（第13回日本肝臓学会大会）2009年10月15日 京都
3. マウス肝細胞移植における Matrix Metalloproteinase の関与：柿沼 晴、紙谷聡英、渡辺守、中内啓光 第16回肝細胞研究会（シンポジウム/臨床応用をめざした肝細胞研究の展開）2009年6月26日 静岡
4. 肝幹/前駆細胞表面抗原の網羅的解析と細胞移植：柿沼 晴、紙谷聡英、中内啓光 第95回日本消化器病学会総会（ワークショップ/消化器臓器における幹細胞研究の進歩）2009年5月7日 札幌
5. 肝幹/前駆細胞表面抗原の網羅的解析と細胞移植：柿沼 晴、紙谷聡英、中内啓光 JDDW 2008（第12回日本肝臓学会大会ワークショップ/肝再生：基礎と臨床の Bridge 研究）2008年10月18日 東京
6. 胎生中期肝幹/前駆細胞表面抗原の解析と細胞移植：柿沼 晴、太田春彦、紙谷聡英、中内啓光 第15回肝細胞研究会（シンポジウム/肝障害と幹細胞へ肝修復における幹細胞の役割）2008年6月28日 静岡
7. 肝幹/前駆細胞表面抗原の FACS による網羅的解析：柿沼 晴、太田春彦、紙谷聡英、中内啓光 第44回日本肝臓学会総会（口演）2008年6月6日 松山

〔図書〕（計4件）

1. 柿沼 晴：幹細胞維持に関わるシグナル伝達-幹細胞の機能と Wnt シグナル 分子消化器病（先端医学社）7巻1号 p65-70(2010) 査読無
2. 柿沼 晴：幹細胞を用いた肝再生医療の可能性 iPS 細胞の産業的応用技術（シーエムシー出版）p77-84 (2009) 査読無
3. 柿沼 晴：TCF/LEF 経路を介した肝幹・前駆細胞成熟化の調節機構 臨床消化器内科（日本メディカルセンター）23巻13号 p1813-1819 (2008) 査読無
4. 柿沼 晴：Wnt-TCF/LEF 経路による肝幹細胞の分化・増殖調節機構の解析 Liver Forum in Kyoto 第10回学術集

会記録集（メディカルトリビューン）
p53-58 (2008) 査読無

〔産業財産権〕
○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 晴 (KAKINUMA SEI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員
研究者番号：30372444

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

紙谷 聡英 (KAMIYA AKIHIDE)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：30321904

坂本 直哉 (SAKAMOTO NAOYA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授
研究者番号：10334418