

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10665

研究課題名(和文) 特異的細胞表面マーカーによる、切除肝からの内在性幹細胞の単離

研究課題名(英文) Isolation of hepatic progenitor cells using specific surface molecules

研究代表者

小林 聡 (Kobyashi, Akira)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：90334903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は当初、我々が独自に樹立した肝組織内在性幹細胞を用いて、signal sequence trap法により特異的細胞表面マーカーを同定し効率的な肝組織からのcell sortingを企図したが、特異的マーカーの同定に至らなかった。このため当初研究計画に盛り込んでいた、肝由来細胞の膵内分泌細胞への可塑性検討を進めることとした。

この検討では、膵臓特異的転写因子を異所性発現させ分化転換が惹起された細胞に対し、特定の液性因子(N2サプリメント、GLP-1 receptor agonist, notch阻害剤, TGF-阻害剤)を付与することにより、分化転換細胞の機能的成熟が促されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の知見は分化転換細胞の機能的成熟を促進する特定の物質が存在することを示唆するものであり、糖尿病を含めた再生医療における新たなアプローチを提示するものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Initially, we attempted to identify a specific cell surface molecule for adult liver-derived progenitor cells to isolate progenitor cells from liver tissue efficiently. However, we failed to identify specific surface molecule. Thus, we decided to proceed another study about liver-to-pancreas transdifferentiation of progenitor cells, which was originally included in the research proposal.

In this study, we demonstrated that soluble factors promote functional maturation of transcription factors (TFs)-mediated transdifferentiated cells. Treatment with an N2 supplement in combination with three soluble factors (GLP-1 receptor agonist, notch inhibitor, and TGF- inhibitor) enhanced liver-to-pancreas transdifferentiation. This finding suggests that treatment with specific soluble factors promotes the functional maturation of transdifferentiated cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：組織特異的幹細胞 分化転換 液性因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓は人体最大の臓器であり、解毒・合成・代謝など多岐にわたる機能を有する。これらの肝機能が不可逆的に低下する状態（劇症肝炎、非代償性肝硬変）に対する臨床的打開策として適応しうる治療法は、現時点では肝臓移植のみである。諸外国とは異なり、本邦における肝臓移植の主流は生体肝移植であり、症例数は毎年着実に増加を続けて 2005 年には 566 例/年となったが、これをピークとし以降減少に転じている[1]。その背景に慢性的なドナー不足が存在することは周知の事実である。このような背景を踏まえ、臓器としての肝臓そのものを用いるのではなく、肝組織を形成しうる幹細胞を利用するという観点から、ES 細胞/iPS 細胞などの多能性幹細胞を用いた stem cell therapy が検討されてきた。その一方、肝臓の自己増殖能を鑑み、肝臓に内在する臓器特異的幹細胞 (autologous hepatic stem cell (AHSC)) (図 1)を利用するという方法論も注目されている[2]。

このような AHSC が肝の非実質細胞分画内に存在することは古くから知られていたが[3]、その割合は非実質細胞の 0.043%程度と非常に微小な population である[4]。しかし我々は門脈塞栓/結紮後の代償性肝再生に着目し、マウス門脈結紮葉に増殖性/可塑性という幹細胞特性を有する細胞集団 (portal branch ligation-stimulated hepatic cells (PBLHCs)) が出現することを特定し、かつその単離に成功した[5]。

PBLHCs は下記のような特徴を有する、AHSC と考えられる細胞集団と考えられた。

- ① 自己増殖性を有する。
- ② 幹細胞の発現形質である Hmga2 (high mobility group AT-hook 2) を発現する。
- ③ Hepatocytes 及び cholangiocytes の双方に分化する bi-potentiality を有する。
- ④ 正常肝組織からも分離が可能である。
- ⑤ 細胞の凍結保存及び継代が可能である。

これら知見に基づき、われわれはヒトにおける同細胞を stem cell therapy のソースとして用いることができないか着想するに至った。

参考文献

1. The Japanese Liver Transplantation Society. Liver Transplantation in Japan -Registry by the Japanese Liver Transplantation Society-. Japanese Journal of Transplantation 2014; 49: 261-274.
2. Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. J Gastroenterol 2009; 44: 167-172.
3. Azuma H, Hirose T, Fujii H et al. Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver. Hepatology 2003; 37:1385-1394.
4. Yamamoto H, Togo S, Zheng YW et al. Adult rat hepatic bipotent progenitor cells remain dormant even after extensive hepatectomy. Wound Repair Regen 2007; 15: 422-429.
5. Sakai H, Tagawa Y, Tamai M et al. Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 2010; 403: 298-304.

2. 研究の目的

ヒトにおける AHSC を stem cell therapy に適応するに当たり、最適な臨床材料は手術による切除検体であると考えられた。しかしこれら組織から効率的に AHSC を分離するにあたっては、肝を構築する他の細胞を効率的に除外する方法論を構築しなければならない。現在最も有効な手法は細胞表面マーカーに基づく cell sorting であり、事実我々の同定した PBLHCs も、CD133, CD44, Sca-1 といった複数の幹細胞表面マーカーを発現しているため、これらを用いて分離することは不可能では無い。しかしいずれのマーカーも AHSC に特異性がある訳では無く、特に CD44 に関しては癌幹細胞の表面マーカーとして認知されているものでもあるため[6]、効率的な AHSC の単離を行うに当たっては、同細胞に特異性の高い細胞表面マーカーを特定する必要があった。

このような背景に基づき、我々は、“PBLHCs に特異的な細胞表面マーカーを同定することで、ヒト切除肝組織から効率的に AHSC を単離しうる”，という作業仮説を持つに至り研究を企画した。具体的には、signal sequence trap (SST) 法により PBLHCs に特異的な細胞表面マーカーを同定し、これを用いて肝組織からの cell sorting を行うことを企図していたが、残念ながら特異的マーカーの同定に至らず継続困難と考えられた。このため当初研究計画に盛り込んでいた、PBLHCs を用いた、“AHSC の膵内分泌細胞への可塑性検討”を進めることとした。

参考文献

6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 3983-3988.

3. 研究の方法

AHSC の膵内分泌細胞への可塑性検討において、我々は特に膵内分泌細胞形質の獲得における細胞外液性因子の関わりに着目した。

これを検証するため、肝臓に内在する AHSC である PBLHCs に対して膵臓発生特異的転写因子群を異所性導入しインスリン産生細胞を誘導 (liver-to-pancreas transdifferentiation) する系

を用いて、”分化転換細胞に細胞外液性因子を付与することにより分化転換効率を亢進せしめる”という仮説を提唱し、以下の実験系を通じて解析した。実験系の陽性対照として mouse insulinoma cell line である β TC6 を適宜用いた。

- A) インスリン産生細胞への分化転換を誘導しうる、最適な転写因子群の同定
- B) 培養環境の最適化（接着培養と浮遊培養の比較、血清添加の可否に関する検討）
- C) インスリン産生細胞誘導における最適な液性因子群の同定
- D) 最適化された液性因子群投与下における、インスリン産生並びに分泌能の検討
- E) 最適化液性因子群投与下における、膵及び肝臓関連遺伝子の発現性の検討
- F) 糖尿病マウスに対する細胞移植モデルの検討
- G) 最適化液性因子群投与下におけるインスリン産生能の経時的変化 (*in vitro*)

4. 研究成果

A) インスリン産生細胞への分化転換を誘導しうる、最適な転写因子群の同定
肝細胞からインスリン産生細胞への分化転換を惹起しうる転写因子 (Pdx1, Ngn3, NeuroD1, MafA) と nuclear-localized GFP (nGFP) を強発現するアデノウイルスベクターを準備し、単一遺伝子 (4パターン)、2遺伝子 (6パターン)、3遺伝子 (4パターン)、及び4遺伝子 (1パターン) の強発現パターン (計15パターン) を用いて内分泌ホルモンの発現性を比較検討した (Fig 1A 及び1B)。

結果、インスリン遺伝子 (Ins1, Ins2) の発現性は Pdx1, Ngn3, MafA の3遺伝子共発現系で最も高かった (Fig 1C 及び1D)。グルカゴン遺伝子 (Gcg) の発現性は Ngn3, NeuroD1, MafA の共発現系で最も高値だった (Fig 1E)。ソマトスタチン遺伝子 (Sst) の発現性は Pdx1, Ngn3, NeuroD1 の共発現系が有意に高値であった (Fig 1F)。Pancreatic polypeptide 遺伝子 (Ppy) の遺伝子発現は遺伝子導入細胞では確認できなかった (Fig 1G)。全ての遺伝子導入群において、C-ペプチド産生性は β TC6 のそれに遠く及ばないものの (Fig 1H), Pdx1, Ngn3, MafA の3遺伝子共発現系が最もインスリン産生細胞への選択的誘導を達成しうると考えられた。

B) 培養環境の最適化(接着培養と浮遊培養の比較、血清添加の可否に関する検討)
次に我々は分化転換が培養環境に影響を受けるか否かを検討した。我々は Pdx1, Ngn3, MafA の3遺伝子と赤色蛍光蛋白 mCherry を共発現するアデノウイルスベクターを準備し (Fig 2A), 培養方法 (接着培養 (AC) と浮遊培養 (SC)) ならびに培養液 (血清含有 (SCM)) 並びに非含有 (SFDM) の組み合わせを計4パターン作成し、7日間の培養期間における変化を確認した (Fig 2B)。SFDM は多能性幹細胞の膵内分泌細胞分化誘導プロトコールに準じ作成した[7-9]。培養期間を通じて細胞形態に目立った変化は認められなかったものの、AC では細胞数が徐々に減少したのに対し、SC では凝集塊を形成しそのサイズに目立った変化を認めなかった (Fig 2C)。インスリン遺伝子並びに蛋白の発現性を比較すると、SC-SFDM における発現性が最も高く、特に Ins2 遺伝子の発現性は AC-SCM のおよそ180倍であった (Fig 2D-2F)。これらの知見は三次元培養と血清非含培地の利用が効率的な分化転換に寄与することを示す知見であると考えられた。

C) インスリン産生細胞誘導における最適な液性因子群の同定

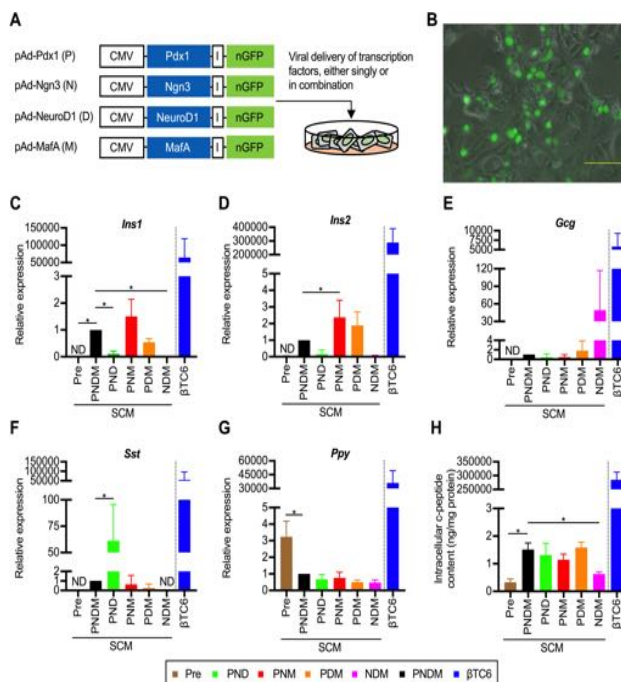


Fig. 1. A triple combination of transcription factors (TFs) induces transdifferentiation into insulin-producing cells *in vitro*.

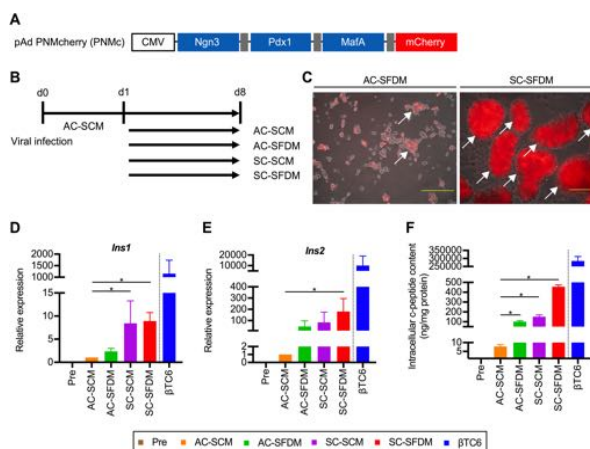


Fig. 2. The assessment of the synergistic effects between a 3D culture system and serum-free differentiation medium for cellular transdifferentiation.

続いて我々は SFDM に添加した液性因子個々の必要性に関して検討した。SFDM には 2 種類のサプリメント (B27 並びに N2) と 7 種類の単一分子 (EGF, exendin-4, forskolin, L685, 458, nicotinamide, noggin, SB431542) が含まれていたため、これらを個別に解析した (Fig 3A)。まず B27 及び N2 サプリメントの必要性に関して解析すると、Ins2 遺伝子の発現性が B27 サプリメントを除いた場合に有意に亢進し、C-ペプチドの発現は N2 サプリメントのみを付与した場合に最も増強することが判明した (Fig 3B-3D)。また並行して単一分子の必要性に関してそれぞれを個別に除いて解析すると、Ins1 及び Ins2 遺伝子及び C-ペプチドの発現性は exendin-4, L-685, 458, noggin の 3 分子のみ (M3) を付与した場合に最も亢進することが判明した (Fig 3E-3I)。

※図中の M7, M4, M3 はそれぞれ以下の単一分子の組み合わせを示す。
 M7 : EGF, exendin-4, forskolin, L685, 458, nicotinamide, noggin, SB431542
 M4 : exendin-4, forskolin, L685, 458, noggin
 M3 : exendin-4, L685, 458, noggin

D) 最適化された液性因子群投与下における、インスリン産生性並びに分泌能の検討

上記 C) で示した N2 サプリメントと M3 に関して更に解析を加えた。Ins1 及び Ins2 の発現性は N2 と M3 を同時に付与した際に最も亢進した (Fig 4A, 4B)。また膵β細胞特異的な proprotein convertase をコードする Pcsk1 及び Pcsk2 の発現性を解析すると、N2+M3 の条件下でいずれも亢進を認め、特に Pcsk1 に関しては統計学的有意性を認めた (Fig 4C, 4D)。C-ペプチドの発現性も N2 及び M3 の共付与下で非付与下のおよそ 12 倍に上昇していることが判明した (Fig 4E)。これらの知見は N2+M3 の投与により成熟β細胞に類似したプロホルモンのプロセッシングが行われている可能性が示唆するものだった。

N2+M3 投与下では C-ペプチド陽性細胞凝集塊を認め (Fig 4F, 4G)、陽性細胞割合も約 1.2 倍と有意に亢進していた (Fig 4H-4J)。

N2+M3 投与のインスリン分泌能を解析すると、非投与下では認められなかった細胞外グルコース濃度に応じたインスリン分泌能を獲得していることが示された。これらの知見は N2+M3 の付与が分化転換細胞の機能的成熟に寄与している可能性を示すものであった。

E) 最適化液性因子群投与下における、膵及び肝臓関連遺伝子の発現性の検討

分化転換における液性因子の関わりをより詳細に評価するため、膵及び肝臓関連遺伝子の発現性に関して検討した。N2+M3 投与細胞では非投与細胞に比べ様々な膵臓関連遺伝子の発現増強を認めた。インスリン (Fig 5A, 5B), prohormone convertase (Fig 5C, 5D) のみならず、インスリン分泌に関わる sulfonylurea receptor 1 (Abcc8) や glucose transporter 2 (Slc2a2), 膵臓特異的転写因子 (NeuroD1, Pax4, Pax6, Isl1) の発現増強を認めた。他方、インスリン以外の内分泌ホルモン遺伝子 (Sst, Ppy) の発現亢進は認められず、強制発現させた Pdx1, Ngn3, MafA 遺伝子の発現性はβTC6 よりも高値であることが確認された。内分泌α細胞に特異的転写因子 (Arx) の発現性は有意な低下を認めた (Fig 5A-5P)。肝臓関連遺伝子に関しては、遺伝子非導入細胞に対する液性因子の付与にてこれらの遺伝子の発現性が低下していることが示され、N2+M3 投与が肝からの脱分化に寄与する可能性が示された (Fig 6A-6F)。

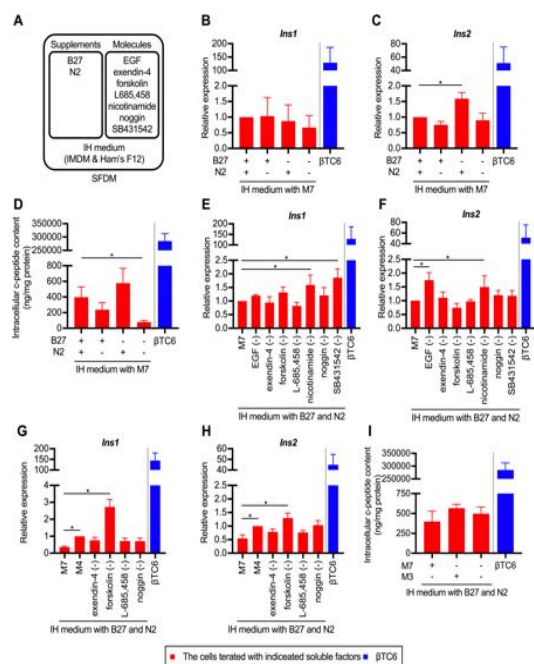


Fig. 3. Comprehensive analyses about extracellular environment of transdifferentiated cells.

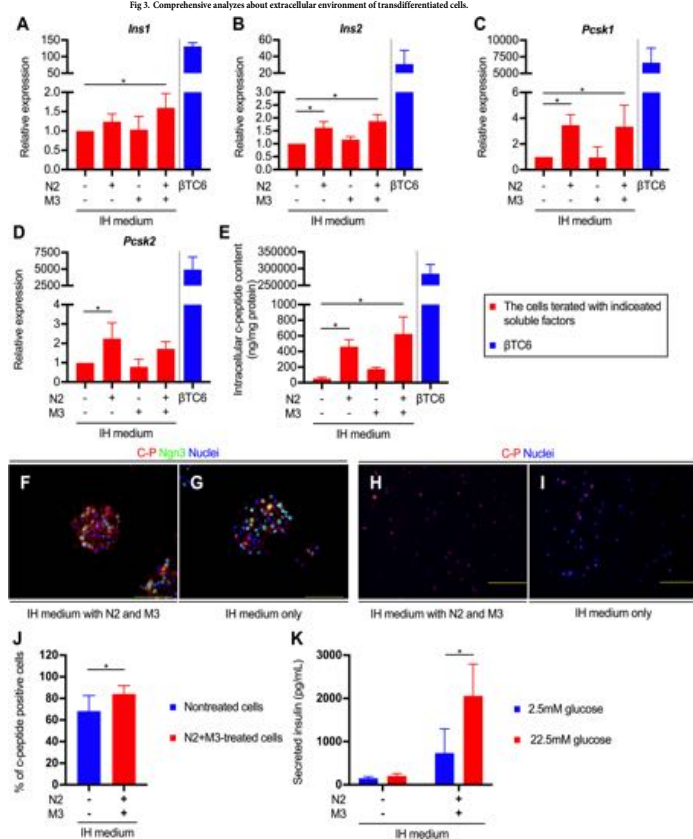


Fig. 4. The effect of simultaneous administration of N2 and M3 for cellular transdifferentiation.

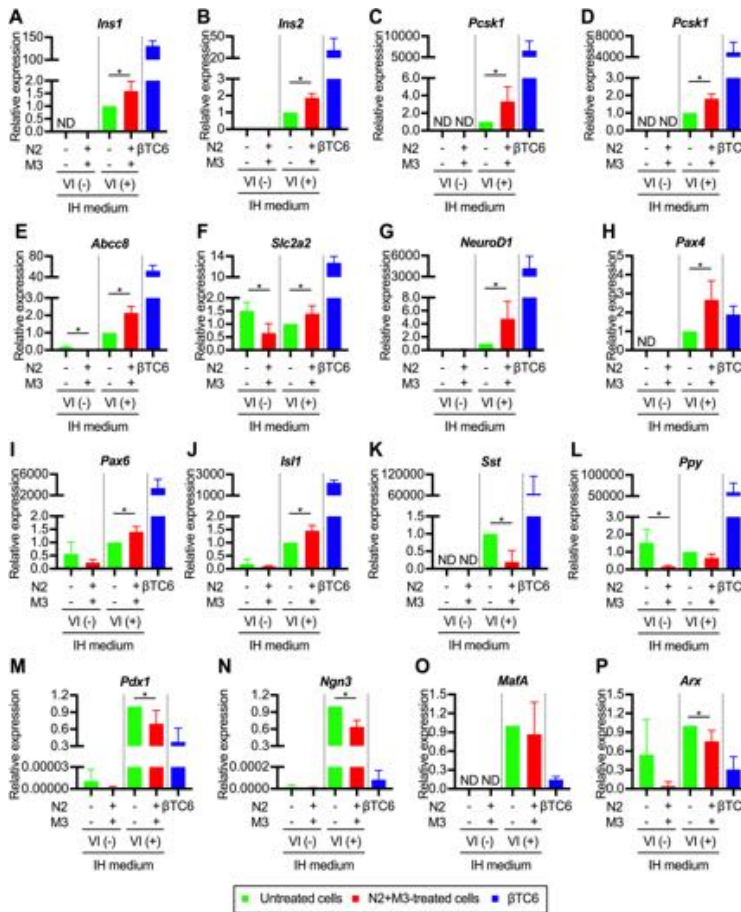


Fig. 5. Expressions of pancreas-related genes in the transdifferentiated cells.

F) 糖尿病マウスに対する細胞移植モデルの検討
 N2+M3 投与細胞のインスリン分泌能は糖尿病マウス移植モデルを用いて更に精査した. 腎被膜下への細胞移植後 3 日目まで非移植群に対する有意な血糖値低下を認めた. 血糖値の改善は移植グラフト摘出 (移植後 28 日目) まで維持され, グラフト摘出に伴い再増悪した (Fig 7A). マウスの体重に関しては両群間に有意な違いを認めなかった (Fig 7B). 移植モデルの腎被膜下にはインスリン陽性細胞集塊が認められた (Fig 7C).

G) 最適化液性因子群投与下におけるインスリン産生能の経時的変化 (*in vitro*)

最後に分化転換細胞のインスリン産生能が N2+M3 投与によりどの提示の期間維持可能なのかを *in vitro* で検討した. インスリン遺伝子の発現性は投与後 14 日目をピークに上昇し, その後徐々に減衰した. 一方細胞内 C-ペプチド含有量は 56 日目まで同様のレベルで維持された. 形態的には 56 日目まで目立った変化はなかったが, Ngn3 発現細胞は 7 日目以降減少し 56 日目には確認できなかった. これらの結果は, N2+M3 投与により分化転換細胞のインスリン産生能は *in vitro* で長期維持が可能であることを示すものであった.

今回の検討により得られた一連の知見は, 異所性遺伝子導入により惹起された分化転換は特定の分子の付与により機能的成熟を促進しうることを示唆するものであった.

参考文献

1. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006; 24 (11):1392–401.
2. Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2012; 8(2):274–84.
3. Nostro MC, Sarangi F, Yang C, et al. Efficient generation of NKX6-1+ pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines. *Stem cell reports.* 2015; 4 (4):591–604.

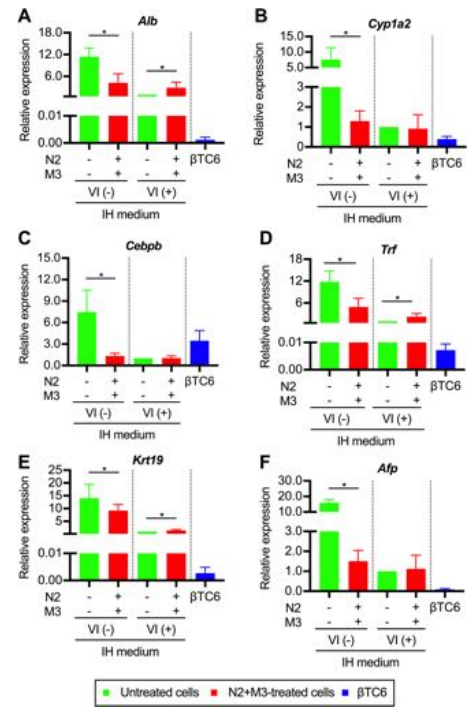


Fig. 6. The gene expressions of liver-related genes in the transdifferentiated cells.

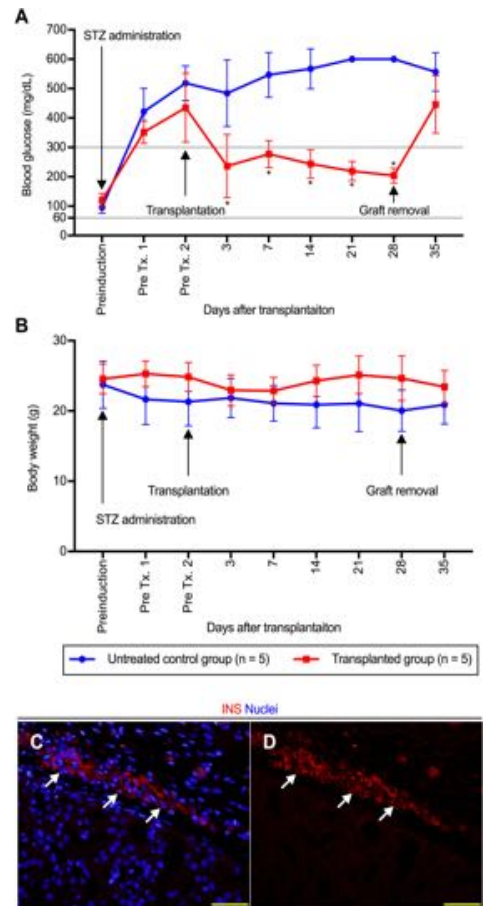


Fig. 7. Transdifferentiated cells ameliorate hyperglycemia in diabetic mouse.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukushima K, Kobayashi A.	4. 巻 7(6)
2. 論文標題 Hepatoid carcinoma of the pancreas mimicking neuroendocrine tumor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatobiliary Surg Nutr.	6. 最初と最後の頁 501-502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/hbsn.2018.10.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada S, Kobayashi A, Nakamori S, Baba H, Yamamoto M, Yamaue H, Fujii T.	4. 巻 164(5)
2. 論文標題 Resection for recurrent pancreatic cancer in the remnant pancreas after pancreatectomy is clinically promising: Results of a project study for pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1049-1056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2018.05.050.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motoyama Hiroaki, Kobayashi Akira, Yokoyama Takahide, Shimizu Akira, Sakai Hiroshi, Notake Tsuyoshi, Fukushima Kentaro, Miyagawa Shin-ichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Treatment with specific soluble factors promotes the functional maturation of transcription factor-mediated, pancreatic transdifferentiated cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0197175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0197175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura T, Hida S, Kitazawa M, Fujii C, Kobayashi A, Takeoka M, Taniguchi SI, Miyagawa SI.	4. 巻 293(17)
2. 論文標題 Fascin1 suppresses RIG-I-like receptor signaling and interferon- production by associating with I B kinase e in colon cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 6326-6336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.819201.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi K, Kobayashi A, Motoyama H, Kitazawa M, Shimizu A, Notake T, Yokoyama T, Matsumura T, Takeoka M, Miyagawa SI.	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Survival pathway of cholangiocarcinoma via AKT/mTOR signaling to escape RAF/MEK/ERK pathway inhibition by sorafenib.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 843-850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.6153.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本山博章
2. 発表標題 Liver-to-pancreas transdifferentiationに寄与するniche factorの同定
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 明 (SHIMIZU AKIRA) (00447773)	信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師 (13601)	
研究分担者	本山 博章 (MOTOYAMA HIROAKI) (20569587)	信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・助教 (13601)	
研究分担者	宮川 真一 (MIYAGAWA SHINNICHI) (80229806)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	