

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：基礎研究(B)
 研究期間：2007～2009 年度
 課題番号：19390353
 研究課題名（和文）肝に局在する新規分子マーカーを用いた高質な肝予備能評価を目指した基礎的研究
 研究課題名（英文）Basic research objected to establish the highly qualified assessment of hepatic reserve function by utilizing new molecular marker localized in liver
 研究代表者
 平田公一（HIRATA KOICHI）
 札幌医科大学・医学部・教授
 研究者番号：50136959

研究成果の概要（和文）：研究計画の主軸は、(1)肝予備能評価を目的とした肝に局在する適切分子の探索、(2)肝再生時に消長しうる肝幹細胞の分離・同定・増殖とその制御、(3)肝組織への肝（幹）細胞移植による治療法の探索、の3種であった。(1)では、特定蛋白を用いた定量的評価法の理論的有用性に対する接着分子とくに claudin 局在の意義、(2)ではラットおよびヒト肝における肝幹細胞の移植による成功的制御、(3)では、遺伝子導入細胞あるいは新鮮幹細胞による移植治療の可能性であり、それらの可能性・有用性を示唆する成果を得た。

研究成果の概要（英文）：The researches were composed of three kinds of contents as follows: (1) the studies about low localized molecules utilized for the assessments of hepatic function, (2) the regulation on isolation, identification and proliferation of hepatic stem cells recognized to have key roles and (3) the possibility of gene-transfected hepatocyte or hepatic stem cell on the treatment for hepatic dysfunction. Our results showed (1) the logical significance of asialoglycoprotein receptor count method and the distribution of adhesion molecules (especially claudins) on hepatic cell function, (2) successful modification of hepatic stem cells *in vitro*, and (3) the clinical capability by the cell transplantation utilized gene-transfected hepatocytes or fresh hepatic stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・肝臓外科学

キーワード：肝予備能評価、新規分子、肝不全、胆汁うっ滞、接着装置、肝幹細胞、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

高水準に達した消化器外科周術期管理法において高度な治療技術の継続の意義が問われる病態のひとつとして、臓器不全があげられる。なかでも肝不全は、消化器外科領域で経験しうる病態としては、予後予測の点で現状の医療水準から打破する新たな展開が望まれている病態である。それは肝不全防止・予知策としての低肝予備能症例の厳密な機能判定がなお不十分な状況にあり、より正確な標準的診断指標を求められる時期を迎えることへの、早期の学術的な備えが必要とされると考えられる。すなわち肝切除後あるいは重症感染にともなう胆汁うっ滞や肝不全の発生防止対策とその治療につながるより高度な重症度判定・予後予知評価の国際的標準の確立が望まれる。また再生肝あるいは成熟肝細胞や組織幹細胞の毛細胆管機能や肝実質細胞機能における間葉系細胞の関与についての研究 (Sudo R, Hirata K, et al, *J Cell Physiol* 2004;199:252)、iNOS の肝障害発生への関与 (Kukita K, Hirata K, et al, *J Surg Res* 2005;125:78)、代謝への影響 (Kawamoto M, Hirata K, et al, *Liver Int* 2006;26:203)、線維化の影響 (Kawamoto M, Hirata K, et al, *World J Gastroenterol*, in press) などの研究成果から次への分子レベルの研究としての、胆汁うっ滞と外科的病態との関係をより厳密に評価できる研究背景がそろいつつあり、頭書の課題を解決したいとの目標のもとに以下の基礎的・臨床的研究を目的とした。

2. 研究目的

本研究の目的は、肝不全発生に関係のある肝構成細胞上の key となる分子を抽出し、それが外科侵襲因子としてのサイトカインや液性因子との関係で毛細胆管運動制御機構にどう影響を及ぼしているのかを臨床的あるいは基礎的に可能な限り明確にすることが究極の目標に設定するための基礎的研究である。今日までトランスポーターに関する

研究はもっぱらその消長と mRNA の定量的研究に重点を置こうとする研究がみられたが、本研究ではその分布と機能発現性をみるものであり、臨床への有用性を探り、その結果から予後予知および、修飾因子を探するための基本的研究とするものである。次いで生体バリアの本体は、細胞と細胞の隙間をシールするタイト結合にあることから、胆汁うっ滞時に肝細胞のタイト結合の機能失調が生じるか否かを明らかにし、肝細胞の新規タイト結合蛋白である claudin に注目してその意義を明白にした。

一方、肝組織幹細胞としての小型肝細胞と成熟型肝細胞を利用した肝細胞移植を試み、肝細胞移植後の毛細胆管形成に関与する因子等の動態を明らかにするとともに細胞移植応用研究の可能性を探るものである。

3. 研究方法

(1) 肝細胞の分離・培養および培養条件下でのトランスポーターおよび claudin-2 に関する研究

① ラット肝細胞を対象としたトランスポーターについての研究

ラット肝臓の肝細胞膜に存在するトランスポーターの機能の発現について mRNA、Protein レベルで northern blot, western blot 法を用いて測定を行った。

② ラット肝細胞および肝細胞癌細胞株等を対象とした claudin-2 を始めとするタイト結合蛋白に関する研究

毛細胆管を形成し胆汁の排泄がみられる特殊な肝細胞株でさまざま肝細胞研究に用いられている。毛細胆管とタイト結合の検討において最も適したモデルと考えられる。

claudin を中心にタイト結合蛋白の発現や局在の変化を Western blot、RT-PCR、免疫染色によって検討した。PB 処置時におけるタイト結合ストランド形成を解析する目的で freeze fracture replica を電子顕微鏡で観察した。siRNA により特異的に claudin-2 の発現を低下させて形態や毛細胆管への色素排泄を検討し、さらにタイト結合蛋白や極性分子

の免疫染色や他のタイト結合蛋白やシグナル伝達分子の発現をWestern blotを実施しメカニズムを解析した。

(2) 小型肝細胞・初代肝細胞の凍結保存・解凍・培養および遺伝子導入・細胞移植

検討項目としては 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）が対象となり、従来の標準保存液と考えられるUW液に20%FBSおよび10%DMSO含有凍結保存液を5ml用凍結チューブに装填して行うことを実験条件の基礎とし、多くの培養・増殖に関する検討を行った。

(3) 成体ラット肝前駆細胞の膵内分泌ホルモン産生細胞へのインビトロにおける形質転換の検討

【検討項目】

Pdx-1 遺伝子導入後の細胞を用いて膵島分化に關与する転写因子[Pdx-1, HNF3 β , Neurogenin3(Ngn3), NeuroD, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax6]の蛋白発現をWestern blotting analysis で評価した。また、Pdx-1と膵内分泌ホルモン(インスリン、グルカゴン)の mRNA 発現を RT-PCR 法にて評価した。また、インスリンとグルカゴンとの蛍光二重染色は共焦点レーザー顕微鏡で検討した。

(4) ヒト障害肝および再生肝材料の採取

ヒト肝を対象として、(a)病態肝における再生現象と幹細胞発現の有無とその消長、(b)病態肝における胆汁輸送に關わるトランスポーターの分布と肝細胞接着装置の相関を明らかにする目的で採取する。検索にあたっての対象分子については、現在pilot studyとして行っている研究成果に基づいて選択する予定である。これらの成果から、胆汁うっ滞の改善につながりうる分子を抽出し可能であれば分子生物学的分析へとつなげたい。

4. 研究成果

(1) ①コロニー経時的変化

培養 12 日目に再播種後、細胞は成熟化し三次元構造をとり細胞間には毛細胆管構造を形成するようになった。

②成熟化に伴う遺伝子の発現

毛細胆管側細胞膜上に発現する排泄型有機アニオントランスポーター (Mrp2) は成熟肝細胞と比較し発現は低い、成熟化するに従いその発現量は上昇した。

③免疫組織染色

12 日目、再播種高前の小型肝細胞の細胞膜上には、有機アニオントランスポーター Oatp1,Oatp2,Mrp2 の発現は認めなかった。一方、Mrp3 は類洞側膜上に発現を認めた。28 日目、再播種後の小型肝細胞では、成熟化し三次元構造を形成した類洞側膜上に Oatp1,Oatp2 の発現を認め、毛細胆管膜側上に Mrp2 の発現を認めるようになった。

④EHBR との比較検討

免疫組織染色上、EHBR 由来小型肝細胞は、毛細胆管膜の形成はあるが毛細胆管膜上に Mrp2 の発現は認めなかった。

(2) マウス肝細胞株と初代培養ラット肝細胞を用いた、OSM のタイト結合蛋白 claudin-2 に与える影響

OSM 処置による claudin-2 発現誘導は、マウス肝細胞株では PKC 阻害剤、p38MAP kinase 阻害剤、PI3 kinase 阻害剤で強く抑制を認め、MAP kinase 阻害剤では軽度の抑制を認めた。初代培養ラット肝細胞では、PKC 阻害剤で claudin-2 の発現が強く抑制され、PI3 kinase 阻害剤で軽度抑制を認めた。一方、MAP kinase 阻害剤、p38MAP kinase 阻害剤では抑制効果を認めなかった。

(3) claudin-2 に焦点を当てた肝細胞における毛細胆管の形成と機能についての検討

PB 処置により MRP-2 の発現増加が認められ、一方タイト結合蛋白では claudin-2、occludin の発現増加と局在変化が認められた。PB 処置により毛細胆管周囲のタイト結合ストランドの増加も認められた。WIF-B9 において claudin-2 を siRNA により特異的に発現低下させた。無処置および PB 処置ともに毛細胆管形成の減少および毛細胆管内への色素排泄の減少が認められた。

(4) 小型肝細胞の膵島細胞への分化転換の検討

A. 成体ラット肝前駆細胞の膵内分泌ホルモ

ン産生細胞へのインビトロでの形質転換効率の検討

Pdx-1 遺伝子導入により膵島分化に関与する転写因子(HNF3 β , Pdx-1, Ngn3, NeuroD, Nkx2.2, Pax6)の発現誘導を認めた。つまり肝細胞に本来発現していない転写因子が膵臓分化への master switch である Pdx-1 遺伝子を導入することにより膵島分化に関与する転写因子が誘導された。

(5) 成人ヒト肝組織における肝前駆細胞の分離と無血清培養法の確立

播種した細胞の一部はヒアルロン酸コート dish に生着し無血清培地下においても増殖を認めた。培養 21 日目におけるコロニーの平均細胞数は約 100 個であり、培養の経過とともにコロニー構成細胞の大型化・成熟化を認めた。

RT-PCR の結果、ヒト SHs コロニーでの肝特異的遺伝子 (albumin、transferrin、 α_1 -antitrypsin、fibrinogen、glutamine synthetase) および CYPs 遺伝子の発現が認められた。また肝細胞マーカー (K8、K18) のみならず、胆管細胞マーカー (K7、K19) の遺伝子発現も同様に認められた。

(6) ヒト障害肝および再生肝材料の採取

2008 年より着実に生体材料の蓄積ができており、データベースとして retrospective research をできる形で整理されている。これらは論理的にクリアした形で実施している。

<考察・結語>

(1) 胆汁に関する transporters について

小型肝細胞において Mrp3 の他、成熟肝細胞と比較し高発現であったのが Bcrp、Mrp1、Mdr1b といった排泄系のトランスポーターであった。これら排泄系トランスポーターの発現は、肝前駆細胞に特徴的であること報告されており、特に Bcrp は骨髄幹細胞のほか、その他の組織幹細胞での発現、肝前駆細胞である Ova1 cell での発現が報告されている。今回の実験では、細胞膜トランスポーターの発現と維持が示された。今後、新薬開発に当たっての薬物代謝あるいは胆汁分泌に関わ

る病態の解析を in vitro で検討可能なモデルの可能性を示した。

(2) Claudins の意義について

肝細胞では、claudin-2 が同様の機序で毛細胆管形成に関与していると推測された。一方、confocal microscopy の結果より、claudin-2 のノックダウンは細胞内空胞の癒合から毛細胆管形成に至る過程を阻害している可能性が示唆された。今後、黄疸治療や肝再生治療においてターゲット分子の候補になることが期待される。

(3) ラット小型肝細胞移植と膵島内分泌細胞遺伝子 Pdx-1 導入小型肝細胞移植について
小型肝細胞の移植細胞源としての可能性

今回の研究で観察されたグルコース反応性を保有した膵島ホルモンを産生できる形質転換できたことは有用な移植細胞源として期待できる。

肝細胞に特異的な形質転換

今回、肝細胞特異的マーカーである CK8 と膵内分泌ホルモンとの二重染色を行なったところ肝細胞の分化転換を証明しえた。アデノウイルス感染による遺伝子導入は、その発現は一時的とされており永久的な遺伝子発現の得られる他の感染ベクターも応用する必要があると思われる。

Pdx-1 遺伝子の導入と膵島細胞分化に関与する転写因子、膵内分泌ホルモンの発現

HNFs 転写因子の制御の相違が Pdx-1 遺伝子の導入でさまざまなホルモン産生細胞へと形質転換を生じた可能性が考えられた。

機能的な膵内分泌細胞への分化

Pdx-1 遺伝子の導入により小型肝細胞が膵内分泌類似細胞へ形質転換し、さらにグルコース濃度の変化によりインスリン産生細胞、グルカゴン産生細胞が相互に反応しホルモンを分泌した可能性が考えられる。

Pdx-1 遺伝子導入による小型肝細胞と成熟肝細胞の形質転換の相違

Nkx2.2、Nkx6.1 の誘導にも HNFs 制御が関与しており成熟肝細胞と比較して小型肝細胞の HNFs 制御の相違が誘導発現の違いが生じたと考えられる。また、今回の研究結果として Pdx-1 遺伝子の導入により小型肝細胞

ではグルカゴンに加えインスリンが優位に発現していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- ① Mizuguchi T, Nagayama M, Meguro M, Shibata T, Kaji S, Nobuoka T, Kimura Y, Furuhashi T, Hirata K. Prognostic impact of surgical complications and preoperative serum hepatocyte growth factor in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy. *J Gastrointest Surg*. 査読有. 2009 Feb;13(2): 325-33.
- ② Nobuoka T, Mizuguchi T, Oshima H, Shibata T, Kaji S, Nagayama M, Meguro M, Mitaka T, Hirata K. Impaired liver regeneration with humoral and genetic disturbances in urinary trypsin inhibitor-deficient mice. *Liver Int*. 査読有. 2009 Aug;29(7):979-87.
- ③ Son S, Kojima T, Decaens C, Yamaguchi H, Ito T, Imamura M, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Knockdown of tight junction protein claudin-2 prevents bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Histochem Cell Biol*. 査読有. 131:411-424, 2009.
- ④ Kojima T, Murata M, Yamamoto T, Lan M, Son S, Takano K-I, Yamaguchi H, Ito T, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Tight junction proteins and signal transduction pathways in hepatocytes. *Histol Histopathol*. 査読有. 24:1463-1472, 2009.
- ⑤ Oshima H, Kon J, Ooe H, Hirata K, Mitaka T. Functional Expression of Organic Anion Transporters in Hepatic Organoids Reconstructed by Rat Small Hepatocytes. 査読有. *J Cell Biochem*, 104(1), 68-81 (2008) PMID: 18022823
- ⑥ Kawasaki H, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Oshima H, Sasaki Y, Tokino T, Kokai Y, Miyazaki J, Mitaka T, Hirata K. In vitro transformation of adult rat hepatic progenitor cells into pancreatic endocrine hormone-producing cell. 査読有. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 15(3), 310-317 (2008) PMID: 18535770
- ⑦ Kawasaki H, Mizuguchi T, Oshima H, Nobuoka T, Shibata T, Kaji S, Kokai Y, Katsuramaki T, Mitaka T, Hirata K. Efficient transformation of small hepatocytes into insulin-expressing cells by forced expression of Pdx1. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 査読有. 15(4), 403-409 (2008) PMID:18670842
- ⑧ Sasaki K, Kon J, Mizuguchi T, Chen J, Ooe H, Oshima H, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of Hepatocyte Progenitor Cells Isolated from Adult Human livers in Serum-free Medium. *Cell Transplantation*, 査読有. 17(10-11), 1221-1230 (2008) PMID: 19181216
- ⑨ Toru Mizuguchi, Tadashi Katsuramaki, Minoru Nagayama, Makoto Meguro, Toshihito Shibata, Shinsuke Kaji, Koichi Hirata. Rapid Recovery of Postoperative Liver Function after Major Hepatectomy using Saline-linked Electric Cautery. *Hepato-Gastroenterology* 査読有. 2008;55:2188-2192
- ⑩ Kikkawa Y, Sudo R, Kon J, Mizuguchi T, Nomizu M, Hirata K, Mitaka T. Laminin alpha 5 mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or Lutheran/basal cell adhesion molecule. *Exp Cell Res*. 査読有. 2008 Aug 15;314(14):2579-90.
- ⑪ Imamura M, Kojima T, Lan M, Son S, Murata M, Osanai M, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Oncostatin M induces upregulation of claudin-2 in rodent hepatocytes coinciding with changes in morphology and function of tight junctions. *Exp Cell Res*, 査読有. 313:1951-1962, 2007.
- ⑫ Kikuchi H, Katsuramaki T, Kukita K, Taketani S, Meguro M, Nagayama M, Isobe M, Mizuguchi T, Hirata K. New

strategy for the antifibrotic therapy with oral administration of FR260330 (a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor) in rat experimental liver cirrhosis. Wound Repair Regen. 査読有.2007;15(6):881-8.

- ⑬ Katsuramaki T, Mizuguchi T, Nagayama M, Kimura Y, Furuhashi T, Yamaguchi K, Hata F, Hirata K. Analysis of the changes pattern of serum apolipoprotein A-1 after hepatectomy. Hepatogastroenterology. 査読有. 2006 Nov-Dec;53(72):924-7.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者：平田 公一
(札幌医科大学・医学部・教授)
研究者番号：50131959
- (2) 研究分担者：澤田 典均
(札幌医科大学・医学部・教授)
研究者番号：30154149
- (3) 研究分担者：三高 俊広
(札幌医科大学・医学部・教授)
研究者番号：50231618
- (4) 研究分担者：小島 隆
(札幌医科大学・医学部・准教授)
研究者番号：30260764
- (5) 研究分担者：水口 徹
(札幌医科大学・医学部・講師)
研究者番号：30347174
- (6) 研究分担者：今村 将史
(札幌医科大学・医学部・助教)
研究者番号：00404608
- (7) 研究分担者：信岡 隆幸
(札幌医科大学・医学部・助教)
研究者番号：50404603
- (8) 研究分担者：川本 雅樹
(札幌医科大学・医学部・兼任助教)
研究者番号：70404605
- (9) 研究分担者：中村 幸雄
(札幌医科大学・医学部・研究員)
研究者番号：50516648
- (10) 研究分担者：孫 誠一
(札幌医科大学・医学部・研究員)
研究者番号：60404612
- (11) 研究分担者：柴田 稔人

- (札幌医科大学・医学部・研究員)
研究者番号：80404622
(12) 研究分担者：梶 晋輔
(札幌医科大学・医学部・研究員)
研究者番号：90404623