

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591610

研究課題名(和文)

新規表面抗原の同定に基づくマウス肝幹細胞の分離および特性解析

研究課題名(英文)

Isolation and characterization of murine hepatic stem cells (HPCs) based on a new surface antigen.

研究代表者

安近 健太郎 (YASUCHIKA KENTARO)

京都大学・医学研究科・病院特定助教

研究者番号：00378895

研究成果の概要(和文)：

我々のグループでは、マウス胎仔肝組織内の肝幹細胞(HPC)は、CD49f+/CD45-/Thy1-の分画に含まれることを示してきた。これに加えて、胎仔肝で発現し成熟肝で発現を認めない膜貫通型タンパク質である gp38 に着目し、この表面抗原で選り分けることにより、より特異的に肝幹細胞を分離できることを示した。また、gp38 で選別した肝幹細胞の特性解析により、その未分化の維持に Wnt signal の活性化が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Previously, we clarified the surface antigen profiles of hepatic progenitor cells (HPCs) in fetal liver tissue as the CD49f+/CD45-/Thy1- cell fraction. In this study, we represented that more immature HPCs could be detected by using a novel surface antigen gp38 which was expressed in fetal livers but not in adult livers. Furthermore, the characterization of gp38-positive HPCs revealed that activation of Wnt signal pathway was related to the maintenance the undifferentiated state of HPCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：肝幹細胞、表面抗原、gp38

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患に対する新たな治療戦略開発の観点から、再生医療に期待が集まっている。幹細胞生物学の発展に伴い、個体を構成する各種臓器・組織(骨髄、脳、筋肉など)には自己複製能と多分化能を併せ持つことにより定義される組織性幹細胞(造血系幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など)が存在することが示されている。近年多くの研究室において組織性幹細胞に関する研究が行われており、すでに臨床応用されている造血系幹細胞

のほか、パーキンソン病への臨床応用が期待される神経幹細胞などが単離され、その特性解析が進められている。一方、肝臓においては、small hepatocyte や oval cell といった肝幹細胞候補が同定されているが、未だその prospective marker の同定には至っておらず今後さらなる検討が必要である。一方、我々の生体は多種多様な臓器・組織により構成されているとはいえ、もともとは一つの受精卵から発生してきたものであり、受精卵が発生を始めた初期にはすべての臓器・組織の

細胞をつくる能力を持った細胞が存在する。この細胞は株化され、胚性幹細胞 (ES 細胞) と呼ばれており、個体を構成するすべての細胞に分化可能である。1998 年にヒト ES 細胞株が樹立されたことを踏まえ、このヒト ES 細胞を培養器の中で目的の機能細胞へ分化させた後、人工臓器や移植治療に用いる可能性が現実のものとなってきている。近年ヒト ES 細胞を用いた研究が全世界で精力的に行われており、既に血液細胞や神経細胞へ分化誘導することが可能となりつつある。一方、難治性肝疾患治療や創薬研究への応用が期待される肝細胞は個体発生の初期に分化してくる外胚葉 (神経系) や中胚葉 (血管、血液、筋肉など) の細胞とは異なり、複雑な組織間相互作用の結果発生してくるために、その発生過程に関わる分子メカニズムの全貌が未だ解明されていない。従って、ヒト ES 細胞から肝細胞を分化誘導したとする報告はいくつかあるものの、そのほとんどは限られた細胞外シグナルによる分化誘導であり、肝細胞の誘導効率は低い。こうした現状を踏まえて、ES 細胞から肝細胞を確実にかつ効率よく分化誘導するためには、肝臓の正常発生過程を踏襲して分化誘導する必要があると考えられることから胎仔 (児) 肝前駆/幹細胞がその分化誘導過程の重要な道標になる。すなわち、ES 細胞から腹側前腸内胚葉細胞を経て肝幹細胞へ分化誘導させ、さらに肝前駆細胞、成熟肝細胞へと分化誘導させる必要があると考えられる。我々はこれまでにマウス胎仔肝前駆細胞の分離法を確立した後⁵、マウス成体肝からも肝前駆/幹細胞の分離に成功した。さらに、蛍光励起セルソーターを利用した細胞の単離、さらには単離した細胞の特性解析を行ってきた。その後、マウス胎仔肝前駆細胞の表面抗原解析を行い、蛍光励起セルソーターを用いて CD49f 陽性肝前駆細胞/幹細胞分画と Thy1 (CD90) 陽性間葉系細胞分画を分離精製することに成功した。さらに、胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞が *in vitro* において CD49f 陽性肝前駆細胞を成熟肝細胞へと安定的に成熟化させることを見いだした。さらに、このマウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞を細胞表面抗原の一つである gp38 の発現の有無により二種類の subpopulation に分画し、その特性解析を施行したところ、gp38+/Thy1+間葉系細胞は接触共培養により胎仔肝前駆細胞を *in vitro* において成熟化させる働きがある一方で、gp38-/Thy1+間葉系細胞は胎仔肝前駆細胞を未分化状態で維持させる働きがあることを発見した。さらに、ジフテリア毒素投与により肝臓に特異的に障害を惹起できるトランスジェニックマウスに上記の如く分離および特性解析を進めてきたマウス胎仔肝前駆細胞を細胞移植することにより致死的肝障

害モデルマウスの致死率が改善することを示しただけでなく、マウス ES 細胞由来初期内胚葉細胞の細胞移植においてもその治療効果を証明した。

2. 研究の目的

本研究は肝幹細胞を利用した再生医療実現に向け、マウス肝幹細胞の特異的表面抗原を同定すると共に、この prospective marker を用いて肝幹細胞を分離しその特性解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス肝幹細胞特異的遺伝子候補の選別

① マウス肝前駆/幹細胞分画の分離

我々が上記の先行研究においてすでに確立した方法に基づき、全身に green fluorescent protein (GFP) を発現する遺伝子改変マウスより蛍光励起セルソーター (FACS Vantage SE) を利用して、マウス成体肝臓由来肝前駆/幹細胞分画を分離する。また、同時に成熟肝細胞分画の分離を行うことが可能であり、同一個体より肝前駆/幹細胞分画と成熟肝細胞分画とを分離する。

② 肝幹細胞特異的発現遺伝子のスクリーニング

上記のようにして同一個体より分離する肝前駆/幹細胞分画と成熟肝細胞分画のそれぞれより mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製したうえで、DNA サブトラクション解析を施行する。これにより、肝前駆/幹細胞分画に特異的に発現する遺伝子候補を選別する。(一次スクリーニング)。選別したそれぞれの遺伝子の中から蛍光励起セルソーターによる細胞分離に利用可能な細胞表面抗原遺伝子を選び出すために genome informatics の情報を利用して、膜貫通ドメインを持つ遺伝子をさらに選び出す。こうして選び出した各候補遺伝子に対して PCR primer を設定したうえで、改めて分離した肝前駆/幹細胞分画に対して RT-PCR を行い、実際に遺伝子発現を確認する (二次スクリーニング)。さらに、肝前駆/幹細胞分画より発現蛋白質を抽出し、二次元電気泳動を行うことにより発現遺伝子のタンパク発現を確認する (三次スクリーニング)。こうして肝幹細胞特異的発現遺伝子候補を絞り込む。

(2) マウス胎仔肝幹細胞分離

① マウス胎仔肝での候補遺伝子発現解析

我々が上記の先行研究においてすでに確立した方法に基づき、マウス胎仔肝より肝前駆/幹細胞分画を cell aggregate 法を利用して分離・濃縮した上で、蛍光励起セルソーターを用いて、CD49f+/Thy1-/CD45-細胞 (肝前駆/幹細胞) を分離する。各胎齢に基づき、経時的に細胞を分離した上で、上記でスクリー

ニングした肝幹細胞特異的遺伝子候補の発現を RT-PCR により胎齢ごとに比較解析することにより、より未分化状態で発現量の多い遺伝子を検証する。こうして肝幹細胞特異的表面抗原遺伝子候補を同定する。

② マウス胎仔肝幹細胞分離

上記のようにして同定した肝幹細胞特異的新規表面抗原の発現有無により蛍光励起セルソーターを用いてマウス胎仔肝前駆/幹細胞分画 (CD49f+/Thy1-/CD45-細胞) をさらに分画する。

(3) マウス胎仔肝幹細胞の特性解析

① マーカー遺伝子発現解析

上記のようにして新規に同定する肝幹細胞特異的表面抗原により prospective に単離する肝幹細胞に対して、従来の組織学的解析に基づき同定されてきた alpha-fetoprotein (AFP), albumin, CK19, FoxA2, GATA4 などの未分化肝細胞マーカーや tyrosine aminotransferase (TAT), Tryptophan 2,3-dioxygenase (TO), Glucose 6-phosphatase (G6P) などの成熟肝細胞マーカー、さらには alpha-smooth muscle actin (SMA), desmin, Goosecoid, brachury などの中胚葉マーカーなどこれまでに同定されている各種分化マーカーに対する RT-PCR や免疫染色を行い、単離した肝幹細胞の characterization を行う。

② 幹細胞特性の検証

蛍光励起セルソーター (FACS Vantage SE, DiVa) を用いて新規表面抗原により規定する肝幹細胞を clonal sorting し、96 穴プレートでの培養を行った後に再度フローサイトメトリー解析を行い、単離した細胞の自己複製能を検証する。さらに、種々の増殖因子 (HGF, FGF2, EGF, Oncostatin M, insulin, transferrin, Activin など) を添加した培地や種々の細胞外基質 (collagen I, IV, laminin, Matri-Gel など) を利用した分化誘導培養を行った上で、RT-PCR, 免疫染色による上記の各分化マーカー発現を解析することにより、多分化能の有無を検証する。

③ 発現遺伝子の網羅的解析と肝幹細胞の分化・増殖に関わる分子メカニズムの解明

上記のようにして単離するマウス胎仔肝幹細胞の発現遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析し、個体発生初期において細胞の分化や増殖などに関与することが知られているシグナル伝達系 (Wnt, Nodal, Smad, Notch など) に関わる遺伝子発現の検証を行う。さらに、幹細胞分画に有意に発現を認めるシグナル伝達系の刺激の有無による肝幹細胞の反応 (分化・増殖・アポトーシス) を RT-PCR, 免疫染色, MTT assay などにより in vitro において詳細に解析し、肝幹細胞の分化・増殖に関わる分子メカニズムの解明を行うと

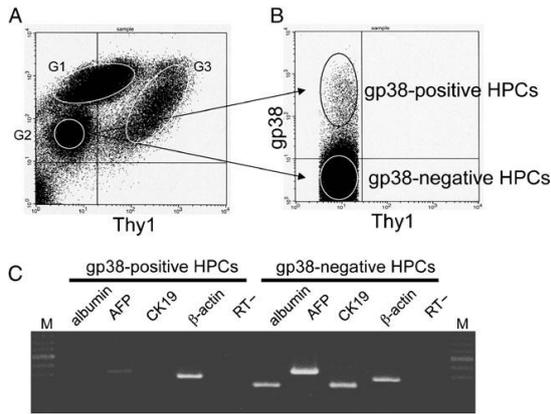
もに、肝幹細胞の至適培養条件や分化誘導条件の検証・確立を行う。

4. 研究成果

(1) 新しいマウス胎仔肝内肝幹細胞特異的表面抗原の同定

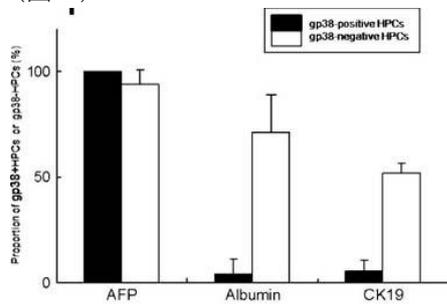
我々は、胎生 13.5 日のマウス胎仔肝から得た細胞において、表面抗原による分類を用いて、肝幹細胞 (HPCs) を豊富に含有する CD49f+/CD45-/Thy1-分画を分離できるとの報告をしていきた。ただ、この分画の細胞も heterogeneous な細胞のパターンを示しているおり、HPCs の中でも様々に異なった分化段階の細胞が混在していると考えられた。このため、より未分化な肝幹細胞を選り分けるための表面抗原マーカーの同定が期待された。まず、肝前駆細胞と肝成熟細胞の間で、DNA サブトラクション解析を行い、肝前駆細胞での発現が成熟肝細胞と比較して著明に up-regulate している遺伝子をスクリーニングした。この中で、表面抗原となりえるもので、蛋白の発現などのスクリーニングを行った後、候補遺伝子 (蛋白) として gp38 を選び出した。gp38 は、podoplanin ともいわれ、mucin-type transmembrane glycoprotein であり、リンパ球マーカーとして確立された蛋白である。この gp38 を用いることで、HPCs の CD49f+/CD45-/Thy1-分画はさらに gp38+ と gp38- の分画に分けられた。この分画間で、肝細胞特異的細胞マーカーの発現や、肝細胞特性の検証を行い、gp38 がより未分化な肝幹細胞の選別に有用かどうかを検証した。まず、CD49f+/CD45-/Thy1-分画のなかで、gp38+ の分画は $1.7 \pm 0.3\%$ のみであった。また、RT-PCR にて gp38+ と gp38- 分画間での遺伝子の発現を比較したところ、AFP は両方の分画で発現していたのに対して、CK19 と Albumin の発現は、gp38- 分画にのみ認め、gp38+ では認めなかった。(図 1) さらに、免疫染色を行い比較したところ、RT-PCR の結果と同様に、gp38+ 分画で Albumin 陽性細胞および CK19 陽性細胞の割合がそれぞれ $4.0 \pm 6.9\%$, $5.7 \pm 4.9\%$ と、gp38- 分画と比較して著しく低いことが明らかになった。(図 2) また、MTS assay にて細胞の増殖スピードを比較したところ、gp38+ 分画の細胞が gp38- 分画よりも doubling time が短いことが分かった。さらに BrdU 染色にて gp38+ 分画のほうが BrdU 陽性細胞の割合が有意に高いことが分かった。以上の知見により、gp38+ 分画の細胞は、HPCs の含まれる CD49f+/CD45-/Thy1-分画の中でも、より未分化でかつ増殖能の高い細胞分画を示していることが明らかとなった。すなわち、gp38 が新しいマウス胎仔の HPCs 特異的な表面抗原であることが証明された。

(図 1)



(A) Flow cytometric fractionation of the cell aggregates derived from E13.5 fetal livers using anti-CD45, CD49f, and Thy1 antibodies. The cell aggregates were composed of three fractions: a CD49f+CD45+Thy1- fraction (G1: CD45 positive hematopoietic cells), a CD49f+CD45-Thy1- fraction (G2: CD49f-positive HPCs), and a CD49f+CD45-Thy1+ fraction (G3: Thy1-positive mesenchymal cells). (B) The CD49f-positive HPCs were further separated into two fractions using anti-gp38 antibodies. (C) An RT-PCR analysis of the gp38-positive HPCs (left) and the gp38-negative HPCs (right).

(図 2)



The proportion of AFP-, albumin-, and CK19-positive cells in both the gp38-positive and gp38-negative HPC fractions (E13.5)

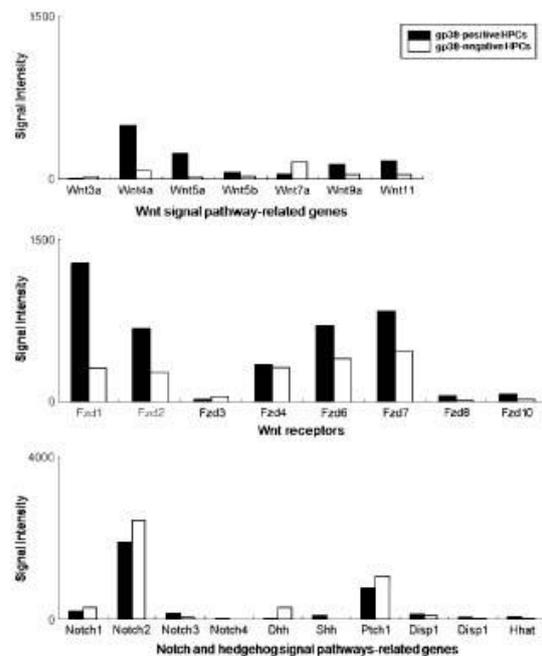
(2) 新しい表面抗原マーカーgp38 によるマウス胎仔肝幹細胞の分離と特性解析

gp38 positive の HPCs が未分化な状態を維持している分子メカニズムを明らかにするために、胎生 13.5 日目胎仔肝より得た HPCs を gp38+ と gp38- の分画に分け、microarray による分析を行った。これにより、gp38+ 分画の細胞では、Wnt4, 5a, 5b, 9a, 11, frizzled homolog (Frd) 1, 2, 8, 10 の遺伝子発現が、著明に亢進していることが分かった。一方、gp38- 分画の細胞では、Foxa2, Hex, c-Met などの遺伝子発現が亢進していること

が分かった。このことは、Wnt signal pathway に関連する遺伝子が、胎生 13.5 日目の gp38+ の HPCs で、活性化していることを示している。ただ、sonic hedgehog や notch signal pathway に関する遺伝子発現には gp38+/- の間に違いは認めなかった。(図 3)

この Wnt signal pathway の働きを検証するために、gp38+ および gp38- HPCs に Wnt3a を投与し、その増殖能を MTS assay にて評価した。その結果、gp38+ 細胞は Wnt3a 投与により doubling time が著明に短くなったのに対して、gp38- 細胞の doubling time は Wnt3a 投与による変化はないことが分かった。さらに、gp38+ 細胞で Wnt3a 投与群と非投与群で AFP, Albumin, CK19 などの発現を quantitative PCR にて定量的に比較したところ、有意な変化は認めないことが分かった。これらの Wnt3a 投与実験の結果により、gp38+ HPCs に対して、Wnt signal pathway の活性化が、分化を促すことのない増殖刺激となることが示唆された。

(図 3)



Microarray analyses comparing the gene expression between the gp38-positive and gp38-negative HPCs. The black bars indicate the gene expression of the gp38-positive HPCs and the white bars show those of the gp38-negative HPCs. Dhh desert hedgehog, Shh sonic hedgehog, Ptch patched homolog, Disp dispatched homolog, Hhat hedgehog acyltransferase, AFP alpha-fetoprotein, CK19 cytokeratin 19.

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 5 件)

- ① 小西小百合、安近健太郎、石井隆道、福光剣、加茂直子、藤田直哉、猪飼伊和夫、上本伸二、A transmembrane glycoprotein, gp38, is a novel marker for immature hepatic progenitor cells in fetal mouse livers、In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal、査読有、Vol. 47、2011、pp45-53
- ② 石井隆道、安近健太郎、福光剣、猪飼伊和夫以下 7 名、In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers、Cell Tissue Research、査読有、Vol. 339、No. 3、2010、pp505-512

[学会発表] (計 11 件)

- ① 梶原正俊、石井隆道、猪飼伊和夫、上本伸二、山中伸弥、Variation in hepatic differentiation propensity among human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines、The 8th International Society for Stem Cell Research (ISSCR)、2010 年 6 月 16-19 日、San Francisco, U. S. A.
- ② 上村良、石井隆道、安近健太郎、猪飼伊和夫、Comparative study of transplantation of cells at various differentiation stages into mice with induced lethal liver damage、第 45 回欧州肝臓学会議(EASL)、2010 年 4 月 14-18 日、ウィーン、オーストリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安近 健太郎 (YASUCHIKA KENTARO)
京都大学・医学研究科・病院特定助教
研究者番号：00378895

(2) 研究分担者

猪飼 伊和夫 (IKAI IWAO)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：60263084

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：40252449

加茂 直子 (KAMO NAOKO)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：50452355

石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：70456789