

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390365

研究課題名（和文）ヒト肝細胞増産と肝組織移植を目指した基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for the production of human hepatocytes and the transplantation of hepatic tissues

研究代表者

三高 俊広 (Toshihiro Mitaka)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50231618

研究成果の概要（和文）：

肝前駆細胞である小型肝細胞を増産する手法の開発と *in vitro* における肝組織化とその移植方法の確立を目的に研究を行った。小型肝細胞は成熟肝細胞とは異なり Follistatin/Activin 系により増殖が制御されていることがわかった。幹細胞である Oval 細胞は小型肝細胞を介して肝細胞に分化するが、十分に成熟化することはできず、移植しても長期間生着し続けることはできず細胞老化に陥る。その結果は、肝幹・前駆細胞は一時的に肝機能を補助する細胞としての働きをしていることを示唆する。また、小型肝細胞、星細胞、血管内皮細胞を用いた類洞再構築モデルを確立し、星細胞が血管構築と肝細胞分化を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to develop the methods of producing a large number of small hepatocytes (SHs), hepatic progenitor cells, and to establish the methods of hepatic organoid formation *in vitro*. In addition, we examined how cells and tissues could be transplanted into liver. Unlike mature hepatocytes the growth of rat SHs was regulated by Follistatin/Activin system. Although oval cells, hepatic stem cells, differentiated into hepatocytes via SHs, they could not completely mature. The transplanted hepatic stem/progenitor cells could not survive for a long term in the recipient liver and disappeared by cellular senescence. Thus, the role of hepatic stem/progenitor cells in severe liver failure may be to compensate for the lost hepatic functions transiently. To use the model of hepatic sinusoids constituting rat SHs, stellate cells, and endothelial cells, we clarified that quiescent stellate cells might regulate the capillary formation of endothelial cells and maturation of SHs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：肝再生、肝幹・前駆細胞、細胞移植、増殖、分化、肝組織形成、肝発生、人工肝臓

1. 研究開始当初の背景

ヒト肝細胞は肝細胞移植などの臨床応用や創薬研究に必要とされているが、その入手は極めて困難である。申請者らは、肝前駆細胞である小型肝細胞 (Small hepatocytes; SHs) を正常ラット肝臓から分離培養することに成功し、In vitro で胆汁分泌や薬物代謝能などの肝細胞機能を発現する類肝組織の形成にも成功している。最近、申請者らはヒト正常肝組織から SHs を分離培養することに成功した。しかしながら、現法を用いた場合、(1) 正常肝組織が得られにくく、かつ得られる細胞の絶対数が少ない、(2) ヒト SHs は増殖が3~4週間で止まる、(3) 胆管や血管を組み込んだ肝組織が形成できない、などの問題点があり、ヒト SHs を大量に確保し、再生医療や創薬研究に使用するのが難しいとわかってきた。

2. 研究の目的

申請者は、上記の問題点を克服し、ヒト SHs を増産する方法の確立を本研究の主たる目的とし、次いでヒト SHs を用いた体内外肝組織形成方法の確立を目指す。そのために、

- (1) SHs の増殖制御機構の解明及び小型肝細胞の増産
- (2) 成熟肝細胞の小型肝細胞化
- (3) 胆管や血管を組み込んだより生体肝臓に近い組織の形成を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 「SHs の増殖及び増産」に関する研究

- ① 培養ラット SHs の Follistatin/Activin の発現調節を遺伝子・タンパク質レベルで検討
- ② 成熟ラット肝細胞を培養し、CD44 遺伝子をレンチウイルスにより導入し、小型肝細胞化を試みる
- ③ CD44 mRNA に対する shRNA を作成し、レンチウイルスに組み込んで、ラット SHs に感染させ、CD44 発現抑制をする

(2) 「肝組織移植」に関する研究

- ① ラット肝幹・前駆細胞及び成熟肝細胞を Retrorsine 投与ラット肝臓に移植し、ドナー細胞の生着・増殖の条件を検討する。
- ② 肝硬変ラット肝臓に成熟肝細胞を移植し、生着し肝機能改善可能かを検討する

(3) 「肝組織形成」に関する研究

- ① 肝組織形成における基底膜成分の役割の検討
- ② 肝細胞、星細胞、類洞内皮細胞の相互関係を検討するために in vitro での類洞再構築モデルの作成
- ③ 肝芽細胞株を用いた胆管形成

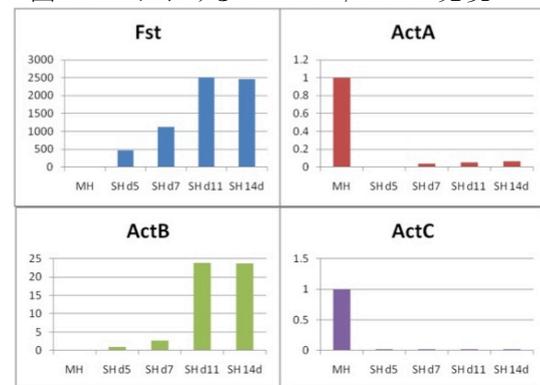
4. 研究成果

(1) 「小型肝細胞の増殖及び増産」に関する研究

① Follistatin/Activin の発現調節による SHs の増殖と成熟化

成熟ラット肝臓から分離した SHs は増殖しコロニーを形成する。成熟肝細胞は1, 2度分裂するだけだが、SHs は10日間で6回以上分裂する。DNA chip を用いた解析から、SHs は Follistatin (Fst) を特異的に発現し、肝細胞の持つ ActivinA の発現は著減していることがわかったので、PCR で培養経過における Fst/Activin 発現を検討した(図1)。

図1 SHsにおけるFollistatin/Activin発現



SHs は、Fst, ActivinB を分泌し、Fst は ActivinA 及び B と結合することにより、Activin の肝細胞に対する増殖抑制作用を中和していた。Fst に対する中和抗体や shRNA を用いて Fst の発現を抑制すると SHs の増殖能が低下することから、SHs は、増殖因子存在下で、Fst を分泌することで Activin による増殖抑制から逃れて選択的に増殖できることがわかった(文献3)。

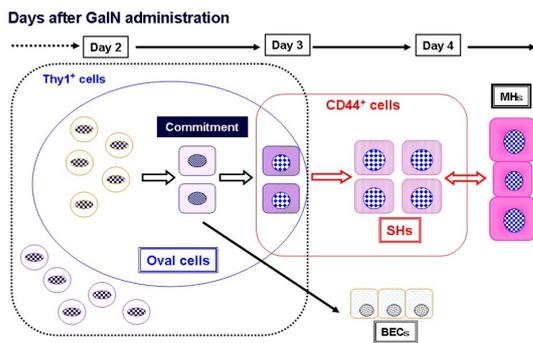
- ② CD44 遺伝子を成熟肝細胞へ導入することにより、肝細胞の小型肝細胞化が可能かどうか検討した。レンチウイルスに CD44 遺伝子を導入して感染させているが、遺伝子導入効率が上がらず、小型肝細胞化の実験は成功していない。
- ③ CD44 に対する shRNA を組み込んだレンチウイルスを用いて SHs の CD44 抑制実験を行い、SHs における CD44 の役割を検討した。CD44 を抑制しても SHs の増殖活性は落ちず、また明瞭な分化誘導も見られていない。引き続き検討が必要である。

(2) 「肝組織移植」に関する研究

- ① Galactosamine (GalN) 投与により惹起された急性肝炎からの再生において、未分化な Thy1 陽性細胞が肝細胞へ分化する機序を解明した。GalN 投与後グリソン鞘周囲に現れる Thy1 陽性細胞の

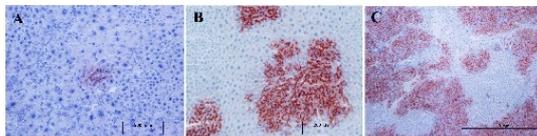
一部は、oval細胞になり、1~2日の間にCD44陽性SHsを介して肝細胞に分化することを明らかにした(文献14)。Thy1陽性細胞の肝細胞への分化の方向付けは、EGF, HGF, FGFにより起こり(論文投稿中)、Thy1を発現している間は胆管上皮細胞への分化能も有しているがCD44単独陽性になると、肝細胞への一方向性分化となる(図2)。

図2 Thy1陽性細胞の肝細胞への分化過程



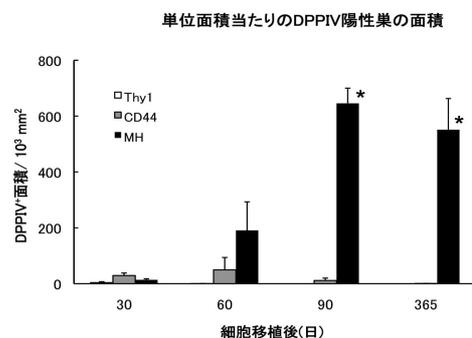
Thy1, CD44陽性細胞をRetrorsine/PHモデルラットに移植し(図3)、Repopulation率を調べた(図4)。

図3 移植したThy1, CD44陽性細胞及び成熟肝細胞により形成された移植細胞巣



DPPIV陽性のThy1陽性細胞(A), CD44陽性細胞(B), 成熟肝細胞(C)をRetrorsine/PHモデルのDPPIV陰性ラット肝臓に脾臓経由で移植した。移植後、30日(A), 60日(B), 90日(C)

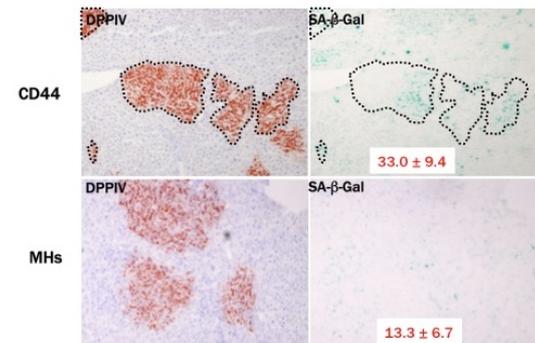
図4 レシピエント肝におけるrepopulation率



移植細胞は、分化が進んだ細胞ほど生存率が高く、置換効率も高かった。Thy1及びCD44細胞由来移植巣では、移植後2週までは活発に増殖する細胞が多く成熟肝細胞由来のものより大きな

移植巣を作ったが、類洞形成は未熟で、肝細胞の成熟化の指標であるC/EBP α 発現率は成熟肝細胞由来の細胞巣より明らかに低かった(文献2)。また、Thy1及びCD44細胞由来の移植細胞巣を構成する細胞は、移植後30日を過ぎた頃より細胞老化に陥り急速に消失することが判った(図5;文献2)。

図5 移植細胞巣における細胞老化マーカー(Senescence-associated- β -Galactosidase)発現

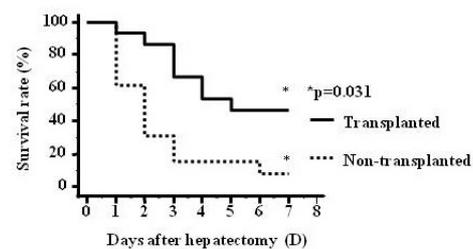


CD44陽性細胞及び成熟肝細胞(MHs)をretrorsine/PHモデルラットに移植後、60日目の肝臓。

障害肝から分離誘導したThy1及びCD44陽性細胞を培養し、分化・成熟化させ、類肝組織を作成させて、正常ラット由来のSHsによる類肝組織と比較した。その結果、Thy1及びCD44陽性細胞は、C/EBP α 発現や毛細胆管形成が少なく、肝細胞として完全に成熟化できないことを示唆していた(論文投稿中)。

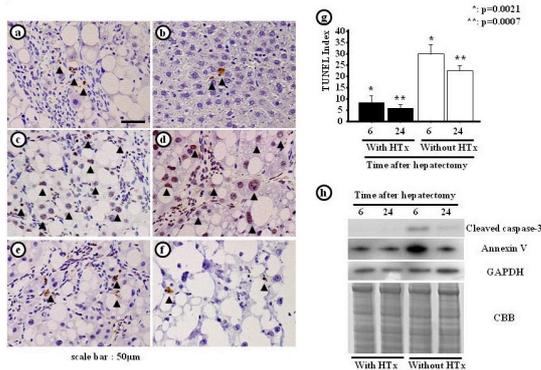
②コリン欠乏・低メチオニン食を12週投与したラットに脾臓経由で成熟肝細胞を移植した後、2/3部分肝切除を行うと、約半数のラットを生存させることができた(図6)。生存したラット肝臓では、レシピエントの肝細胞のapoptosisが抑制され(図7)、増殖が促進されていた(論文投稿中)。

図6 肝硬変ラット部分肝切除後の早期死の肝細胞移植による抑制



Choline欠乏食を12週間投与したラットに成熟肝細胞(1×10^6 細胞)移植し、24時間後に2/3部分肝切除を行った。

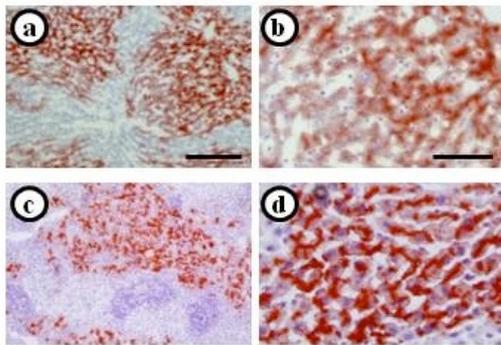
図7 肝細胞移植によるアポトーシス抑制



Choline欠乏食を12週間投与したラット肝臓(a)とコントロール肝臓(b)、成熟肝細胞を移植したラット肝臓(e, f)と移植していない肝臓(c, d)にTUNEL染色を行った。TUNEL陽性細胞の数(g)と抗Caspase-3とannexin V抗体を用いたWestern blotによる解析(h)。

肝細胞を移植された肝臓では、既存の肝細胞のNFκBシグナル系が活性化され、生存シグナルが入ると推察されたが詳細は現在のところ不明である。また、長期生存したラットの肝臓及び脾臓には移植肝細胞が大きなクラスターを作り、肝細胞として機能していた(図8;論文投稿中)。

図8 ドナー肝細胞による置換と脾臓の肝臓化



Choline欠乏食を12週間投与したラット肝臓に脾臓経由で性樹幹細胞を移植し、24時間後に2/3部分肝切除を行った。切除後6ヶ月目の肝臓(a, b)と脾臓(c, d)におけるDPPIV陽性移植細胞巣。

単離した肝幹・前駆細胞、肝細胞を、肝細胞増殖抑制を受けたレシピエントに移植すると生着し増殖する。しかしながら、幹・前駆細胞であっても正常肝臓に生着させることは難しかった。レシピエントラットに肝硬変を起し、成熟肝細胞を移植すると効率は良くないが確実に生着し増殖することを確認した。これまで遺伝子改変により劇症肝炎を起し、致死するマウスモデルにおいてのみ移植細胞によるrepopulationは認められな

ったので、よりヒトのNASHの病態に近いモデルにおいてドナー細胞が生着・増殖できることがわかったことは、細胞移植による肝疾患の治療法の開発に繋がると考えられる。しかしながら、組織化した細胞をレシピエント肝又は他の組織に移植することに今のところ成功していない。

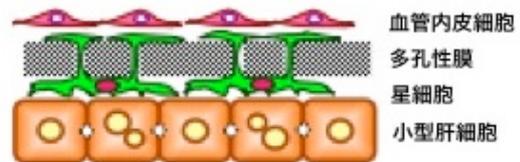
(3)「肝組織形成」に関する研究

①肝組織形成における基底膜成分の役割を検討した。

胎仔期、新生仔期、成体の肝臓を、laminin α1 およびα5 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、基底膜を構成する laminin の発現を検討した結果、胎仔期の胆管を裏打ちする基底膜ではα1 とα5 が発現しているが、管腔構造が完成する生後10日以降は、α1 の発現が消失し、α5 のみが発現していた。細胞を分取して laminin α1 およびα5 を発現している細胞の同定を行ったところ、線維芽細胞が Laminin α1、胆管上皮細胞が laminin α5 を発現していることがわかった。したがって、胆管発生の初期には線維芽細胞から laminin が供給されるが、発生が進行すると胆管上皮細胞自らが laminin を発現・供給していると考えられた。また、laminin α5 のノックアウトマウスの胎生17日の肝臓では、野生型と同様、門脈の周囲に胆管上皮細胞が認められたが、ノックアウトマウスの胆管は、未熟な構造の状態にとどまっているものが多かった。以上の結果から、肝芽細胞から胆管上皮細胞が分化する段階と胆管構造形成の開始時点では、laminin α1 を含む laminin と上皮細胞の相互作用が重要であるが、その後、構造形成が進行して成熟した胆管構造が完成するためには、laminin α5 を含む laminin が重要な機能を果たしていると考えられた(論文投稿中)。

②肝細胞、星細胞、類洞内皮細胞の相互関係を検討するために in vitro での類洞再構築モデルを作成するために、小型肝細胞と星細胞を共培養した多孔性膜の対側に血管内皮細胞を培養することにより、3次元的な疑似類洞構造を培養皿に構築した(図9;文献7)。

図9 類洞再構築モデル



結果、多孔成膜の孔径により星細胞の挙動が異なり、星細胞体を通ることのできないが、細胞突起が通る1μmの時、内皮細胞と細胞突起が接着

し多角形から長方形化する。また星細胞は desmin 陽性で活性化していなかった。小型肝細胞は内皮細胞、星細胞の存在下で、増殖は抑制され、分化機能は亢進し、成熟化することがわかった(文献7)。また、Matrigel による血管内皮細胞の毛細血管様構造の誘導も星細胞突起の存在によって促進され、細胞体との接触によって抑制されることがわかった(文献1)。

③肝芽細胞株(HPPL)を用いた胆管形成

HPPL の3次元培養では、Laminin $\alpha 1$ を含む laminin 依存的に Cyst 形成が進むが、完成した Cyst の周囲には laminin $\alpha 5$ が存在した。肝前駆細胞は、胆管構造形成の過程で、 $\alpha 1$ との相互作用から $\alpha 5$ との相互作用に移行し、 α 鎖に依存して管腔構造の形成と維持をするのではないかと考え、laminin のレセプターである $\beta 1$ -integrin の中和抗体を用いて検討した。その結果、laminin $\alpha 1$ は Cyst 形成に必要で、その後の Cyst の構造成熟や維持には laminin $\alpha 5$ が重要である可能性が明らかになった(論文投稿中)。

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 33 件)

1. Kasuya J, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Spatio-temporal Control of Hepatic Stellate Cell-Endothelial Cell Interactions for Reconstruction of Liver Sinusoids *in vitro*. *Tissue Engineer A*, 18: 1045-1056, 2012 doi: 10.1089/ten.tea.2011.0351 査読有り
2. Ichinohe N, Kon J, Sasaki K, Nakamura Y, Ooe H, Tanimizu N, Mitaka T. Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine- treated rat livers. *Cell Transplant*, 21:11-22, 2012 doi: 10.3727/096368911 X580626 査読有り
3. Ooe H, Chen Q, Kon J, Sasaki K, Miyoshi H, Ichinohe N, Tanimizu N, Mitaka T. Proliferation of rat small hepatocytes depends on follistatin expression. *J Cell Physiol*, 227: 2363-2370, 2012 doi: 10.1002/jcp.22971 査読有り
4. Ichinohe N, Kon J, Mitaka T. Isolation of hepatic progenitor cells from the galactosamine-treated rat liver. *Methods Mol Biol*, 826:49-58, 2012 doi: 10.1007/978-1-61779-468-1_5 査読有り
5. Kasuya J, Sudo R, Tamogami R, Masuda G, Mitaka T, Tanishita K. Reconstruction of 3D stacked-up hepatocyte tissues by degradation of microporous poly (*D,L*-lactide-co-glycolide acids) membranes. *Biomaterials*, 33(9): 2693-2700, 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.039> 査読有り
6. Kikkawa Y, et al. An antibody to the lutheran glycoprotein (Lu) recognizing the LU4 blood type variant inhibits cell adhesion to laminin $\alpha 5$. *PLoS One* 6(8), e23329, 2011 doi:10.1371/journal.pone.0023329 査読有り
7. Kasuya J, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Hepatic stellate cell-mediated 3D tri-culture model of hepatocytes and endothelial cells. *Tissue Eng A*, 17: 361-370, 2011 doi: 10.1089/ten.tea.2010.0033 査読有り
8. Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N, Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem*. 149(3): 231-239, 2011 doi: 10.1093/jb/mvr001 査読有り
9. 中村幸雄、水口徹、三高俊広、平田公一. 障害肝と肝細胞移植. *Surgery Frontier* 2011;18:288-291, 2011 査読無し
10. Mitaka T, Ooe H. Drug Metabolism Reviews focusing on drug transporter interactions in the liver: Characterization of hepatic-organoid cultures. *Drug Metab Rev*, 42:472-481, 2010 doi:10.3109/03602530903492020 査読有り
11. 水口徹、三高俊広^⑨、平田公一^⑩、他. 消化器外科と再生医療-肝細胞移植研究の現状と将来展望-. *消化器外科*, 33 巻 3 号、373-380, 2010 査読無し
12. Nobuoka T, Mizuguchi T, Mitaka T^⑧, Hirata K^⑨, et al. Impaired liver regeneration with humoral and genetic disturbances in urinary trypsin inhibitor-deficient mice. *Liver Int*, 29, 979-987, 2009 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.01990.x 査読有り
13. Ooe H, Kon J, Oshima H, Mitaka T. Thyroid hormone is necessary for expression of constitutive androstane receptor in rat hepatocytes. *Drug Metabol Dispos*, 37:1963-1969, 2009 doi:10.1124/dmd.108.022905 査読有り
14. Kon J, Ichinohe N, Ooe H, Chen Q, Sasaki K, Mitaka T. Thy1-positive cells have bipotential ability to differentiate into hepatocytes and biliary epithelial cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. *Am J Pathol*, 175(6): 2362-2371, 2009 doi: 10.2353/ajpath.2009.080338 査読有り
15. 市戸義久、今純子、大柴秀和、三高俊広. 肝臓における幹細胞. *肝胆膵*, 59 巻 4

号、573-580, 2009 査読無し

[学会発表] (計 71 件)

1. Nakamura Y, et al. Hepatic Progenitor Cell Transplantation for Improving Survival after Liver Resection of Rat Non-alcoholic Steatocirrhotic Liver Model. 7th Annual Academic Surgical Congress, Quick shot oral presentation, Las Vegas, NV, USA, February 14-16, 2012.
2. Tanimizu N, et al. Differentiation potential of cholangiocytes. Liver Down Under: Liver development, diseases & regeneration. Nov 28-Dec 2, 2011, Perth, Australia (Oral presentation, Nov29)
3. Mitaka T, et al. Restricted differentiation of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. Liver Down Under: Liver development, diseases & regeneration. Nov 28-Dec 2, 2011, Perth, Australia (Oral presentation, Nov 29)
4. 市戸義久、他。「肝前駆細胞移植治療におけるレシピエントラット肝再生機序の解析」(シンポジウム2 肝再生の制御機構) 第18回肝細胞研究会、2011年6月24日、東京都
5. Tanimizu N, et al. Role of laminin in bile duct morphogenesis. Epithelial plasticity and epithelial to mesenchymal transition, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Jan 21-26, 2011, Vancouver, Canada, (Poster) Jan 23, p91.
6. Hirata K, et al. Intrahepatic distribution, preservation and transplantation of hepatocyte progenitor cells isolated from adult liver in human and rat. 18th United European Gastroenterology Week. October 23-27, 2010, Barcelona, Spain
7. 三高俊広、他。パネルディスカッション4 肝臓の再生機構を考える: 今後の肝再生医療への展望: 「肝幹・前駆細胞の分化・再生能力」 JDDW 2010、2010年10月13日、横浜市
8. 市戸義久、他。ワークショップ16 肝臓疾患と組織幹細胞/progenitor cell: 病態解析と治療戦略「肝幹・前駆細胞の分化誘導因子の解析」 JDDW 2010、2010年10月14日、横浜市
9. 三高俊広. 特別講演「幹細胞と肝組織再構築」第22回代用臓器・再生医学研究会総会、2010年1月23日、札幌市(招待講演)
10. 市戸義久、今純子、大柴秀和、中村幸雄、三高俊広。「Thy1/CD44両陽性肝前駆細胞の分化機序の解析」(口演: 優秀演題賞)、第16回肝細胞研究会、2009年6月27日、山形市、

11. 三高俊広. 特別講演「肝幹細胞と組織再構築: 肝再生医療へ向けて」第35回日本急性肝不全研究会、2009年6月3日(水)、神戸市 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

1. 市戸義久、大柴秀和、谷水直樹、三高俊広。「各種肝病態における肝オーバル細胞・小型肝細胞の同定」再生医学叢書第5巻、第5章肝細胞の機能制御・分化誘導」、朝倉書店、印刷中、2012

[その他]

ホームページ等

http://web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue_Regeneration/Top_page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三高 俊広 (MITAKA TOSHIHIRO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50231618

(2) 研究分担者

谷水 直樹 (TANIMIZU NAOKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00333386

大柴 秀和 (OOE HIDEKAZU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90452979

市戸 義久 (ICHINOHE NORIHISA)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 80452978

水口 徹 (MIZUGUCHI TORU)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30347174

平田 公一 (HIRATA KOICHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50136959

吉川 大和 (KIKKAWA YAMATO)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20274227

谷下 一夫 (TANISHITA KAZUO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 10101776