

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 16日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790385

研究課題名（和文）肝幹細胞活性化機構の解明と肝組織工学への応用

研究課題名（英文）Analysis in activation of hepatic stem/progenitor cells and development of application to hepatic tissue engineering

研究代表者

市戸 義久 (ICHINOHE NORIHISA)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80452978

研究成果の概要（和文）：肝前駆細胞として oval 細胞と小型肝細胞が知られている。我々はこれまでに Thy1 陽性 oval 細胞の一部が CD44 陽性の小型肝細胞を介して肝細胞へ分化することを報告してきたが、詳細はわかっていない。本研究の結果、(1)未分化 Thy1 陽性 oval 細胞の小型肝細胞への分化誘導因子として、EGF, bFGF, HGF が Key となる誘導因子であった。(2) Thy1 陽性細胞と CD44 陽性細胞は肝細胞には分化するが、成熟化までは至らなかった。(3) Thy1 陽性細胞と CD44 陽性細胞、そして正常成熟肝細胞の移植実験における肝細胞置換能を比較検討したところ、Thy1 陽性細胞と CD44 陽性細胞の生存率は低かった。この生存率は細胞老化によるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Oval cells and small hepatocytes (SHs) are known as hepatic stem and progenitor cells, and Thy1 and CD44 are used as a marker, respectively. Although oval cells are believed to differentiate into mature hepatocytes (MHs) through SHs, the details of their differentiation process are not well understood. In the present experiment we used Thy1⁺ oval and CD44⁺ cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. (1) EGF, basic FGF, or HGF could trigger the hepatic differentiation of sorted Thy1⁺ cells to form epithelial cell colonies. (2) Thy1⁺ oval and CD44⁺ cells are able to differentiate into hepatocytes, the degree of hepatic maturation of the induced hepatocytes may not be equal to that of normal resident ones. (3) Thy1⁺, CD44⁺ cells and MHs were transplanted into livers treated with retrorsine following partial hepatectomy. Both stem and progenitor cells could differentiate into hepatocytes in host livers. Repopulation efficiency and the survival period of Thy1⁺, CD44⁺ cells in the long term was very low. The short life of the cells may be due to their cellular senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞・組織，再生医学，肝幹・前駆細胞，生体組織工学，細胞移植，分化

1. 研究開始当初の背景

肝障害時に出現する肝幹・前駆細胞として、オーバル細胞と小型肝細胞がある。オーバル細胞とは肝化学発癌過程に出現する楕円形の核を持つ細胞で、障害肝においては、オーバル細胞の出現は一時的で、その後、成熟肝細胞(Mature hepatocyte)に置き換わる。代表的なマーカーとして、Thy1, c-kit, Dlk, OV-6等が知られている。一方、小型肝細胞とは、申請者が所属する研究室の三高が世界で初めて発見し(Mitaka et al, Hepatology, 1992), 以後三高研究室で精力的に研究が行われてきた。小型肝細胞は、成熟ラット肝臓に存在する形態学的にやや小さな肝細胞で、強い増殖能を持ち、培養するとクローナルに増殖しコロニーを形成する。肝非実質細胞と混合培養すると成熟化し、成熟肝細胞とほぼ同様の特徴を持つ。また、培養経過に伴い一部の細胞は3次元構造をつくり、組織化する(Mitaka et al, Hepatology, 1999)。正常ヒト肝組織内においても同様の細胞が存在することがわかっている(Sasaki et al, Cell Transplant. 2008)。代表的なマーカーとして、CD44, BR13, D6.1A(Kon et al, J. Hepatol. 2006)が同定されている。オーバル細胞については多くの研究室で研究が行われているが、オーバル細胞から小型肝細胞への分化機序はまだ明らかになっていない。我々はガラクトサミン(GalN)投与肝障害モデルラットを用いて以下のことを明らかにしてきた。(Kon, Ichinohe et al. AJP, 2009)

- ① GalN 投与 3 日目から単離した Thy1 陽性細胞は CD44 陽性の小型肝細胞に分化する。
- ② GalN 投与 2 日目から単離した Thy1 陽性細胞は未成熟な肝幹細胞のために小型肝細胞に分化出来ない。
- ③ GalN 投与 3 日目から単離した Thy1 陽性細胞はコラーゲンのサンドイッチ培養すると胆管を形成する。

そこで、次の疑問は以下の2点である。

- (1) Thy1 陽性細胞が CD44 陽性の小型肝細胞を介して肝細胞に分化するのなら、その中間体として、Thy1⁺/CD44⁺細胞が存在するはずである。
- (2) GalN 投与 2 日目から単離した Thy1 陽性細胞は未成熟な肝幹細胞のために小型肝細胞に分化出来ないならば、種々の細胞外基質や増殖因子により、未分化 Thy1 陽性細胞を活性化させ、小型肝細胞に分化する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オーバル細胞の活性化・分化誘導機序について解析することにより、肝疾患における肝細胞再生誘導治療へ繋げることである。そのために、以下の3点に焦点を絞り、解析を行った。

(1) 未分化な肝幹細胞が高い増殖能・分化能を有する小型肝細胞に活性化する因子を解明するため、単離した肝幹細胞に対し、種々の増殖因子が分化機序に与える影響を調べる。

(2) 小型肝細胞に分化した肝幹・前駆細胞が成熟化するか、*in vitro*で検討する。

(3) 肝幹細胞移植による *in vivo* 分化機構の解析を行い、肝再生機序の解明につなげる。

3. 研究の方法

(1) 肝障害モデルラット作製

8-10 週令 Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) 陽性ラット腹腔内に D-galactosamine (GalN: 75 mg/100g 体重) を投与し、急性肝障害を惹起する。

(2) 細胞単離

投与後、2 日目、3 日目、4 日後にコラゲナーゼ灌流方法を用いて細胞を分離する。抗 Thy1, 抗 CD44 抗体及び磁気ビーズ (MACS システム) を用いて Thy1⁺細胞, Thy1⁺/CD44⁺細胞, CD44⁺細胞ソートし、培養又は移植実験に用いた。培養実験では 1x10⁵ 個の細胞を 35-mm dish に播種し、DMEM+10% FBS+10mM Nicotinamide+10 ng/ml EGF+Ascorbic acid + Insulin + dexamethazone + antibiotics などを添加した培地で培養した。

(3) 未分化な Thy1 陽性細胞の小型肝細胞分化誘導因子の解析

GalN 投与 2 日目の肝臓から単離した Thy1 陽性細胞は、まだ肝細胞への分化が方向付けられていない細胞であるために、小型肝細胞を培養する培地だけでは小型肝細胞に分化できなかったと考えられる。そこで、GeneChip の増殖因子受容体の解析結果から、小型肝細胞への分化を誘導する因子候補を選び出し、培地に添加することにより、誘導因子の同定を試みた。

(4) 肝幹・前駆細胞の成熟化誘導

単離した Thy1⁺細胞と CD44⁺細胞の成熟化能を検討するため、GalN 投与 3 日後の Thy1⁺細胞と CD44⁺細胞を 10 日間培養した後、Cell Dissociation Buffer でコロニーを剥がし、35mm dish 当たり 2000 コロニーになるよう再播種し、高密度培養を行って、成熟化誘導を行った。Control として、正常肝から単離した小型肝細胞 (SH) を用いた。成熟化度を評価するため、Fluorescein diacetate (FD) を培養液に添加し、毛細胆管に取り込ませ、毛細胆管長を測定した。また成熟肝細胞マーカーである C/EBP α の陽性率を測定した。

(5) 細胞移植

移植は、5 週令 DPPIV 陰性雌ラットに Retrorsine を投与し、2/3 部分肝切除処理 (Ret/PH モデルラット) した後、5x10⁵ 細胞を脾臓経由で移植した。control として成熟肝細胞 (MHs) を用いた。移植後 14、30、60 日後

に肝臓を摘出し、凍結標本作製し、DPPIV 活性染色及び、増殖能を Ki67, 類洞形成を SE-1, 成熟化度を C/EBP α の抗体を用いて免疫染色を行った。また Senescence-associated β galactosidase (SA-gal) 活性染色を行った。

4. 研究成果

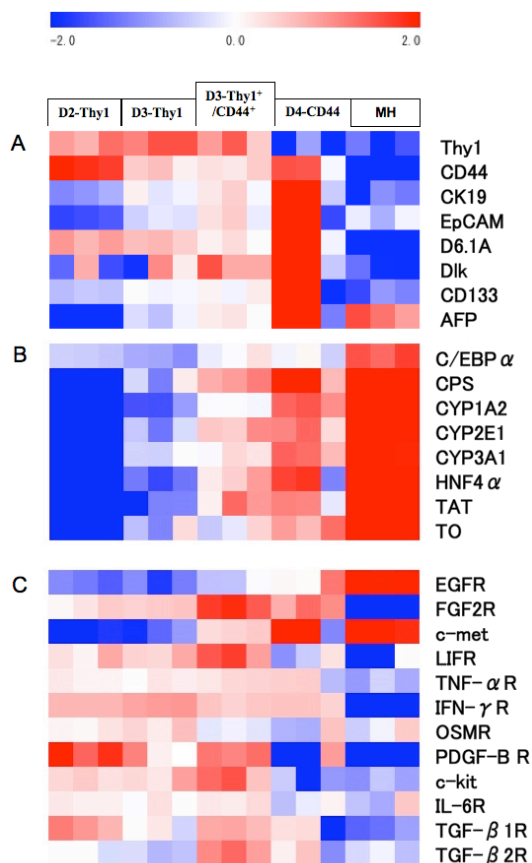
(1) 単離した細胞の Characterization

単離した GalN 投与 2 日後の Thy1 陽性細胞 (D2-Thy1), 3 日後の Thy1⁺細胞 (D3-Thy1), Thy1⁺/CD44⁺細胞 (D3-Thy1⁺/CD44⁺), 4 日後の CD44⁺細胞 (D4-CD44), そして control として成熟肝細胞 (MHs) を DNA microarray で遺伝子発現解析を行った (図 1)。

結果, D2-Thy1 は未分化な細胞で, D3-Thy1⁺/CD44⁺細胞は, Thy1⁺細胞と CD44⁺細胞の中間に位置すると考えられた。

図 1: 単離した細胞の DNA microarray による遺伝子発現解析

A; 肝幹細胞マーカー,
B; 成熟肝細胞マーカー,
C; 細胞増殖因子受容体



(2) 未分化な Thy1 陽性細胞の小型肝細胞分化誘導因子の解析

GeneChip の増殖因子受容体の解析結果から, 小型肝細胞への分化を誘導する因子候補として, 上皮成長因子 (EGF), 繊維芽細胞増

殖因子-2 (FGF-2), 肝細胞増殖因子 (HGF), 腫瘍壊死因子- α (TNF- α), インターフェロン- γ (IFN- γ), オンコスタチン-M (OSM), 血小板由来促進因子-B (PDGF-BB), 幹細胞促進因子 (SCF), インターロイキン-6 (IL-6), トランスフォーミング増殖因子 (TGF)-1 及び 2 を選び出し, 培地に添加することにより, 誘導因子の同定を試みた。Thy1 陽性細胞を 10 日間培養し, CD44 陽性小型肝細胞コロニーの誘導の有無を検討した。結果, EGF, bFGF, HGF を添加した場合のみ小型肝細胞様コロニーが出現し, 他の因子では認めなかった (data not shown)。また, EGF, bFGF, HGF の組み合わせの検討を行い, 小型肝細胞コロニー形成能を解析したところ, 3 つを組み合わせることにより大きいコロニーをより多く形成した (表 1)。以上の結果は, 未分化な Thy1 陽性細胞の一部は, EGF, bFGF, HGF によって肝細胞への分化が方向付けられることを示唆している。

表 1: EGF, bFGF, HGF の組み合わせによる小型肝細胞コロニー形成

	CD44+ コロニー数	1コロニー当たりの細胞数
EGF	12.3 \pm 6.7	33.8 \pm 2.1
EGF+bFGF	18.3 \pm 7.6	91.1 \pm 1.8
EGF+HGF	10.7 \pm 4.6	114.3 \pm 2.4
EGF+bFGF+HGF	21.3 \pm 8.5	108.9 \pm 2.5

(3) Thy1⁺細胞, CD44⁺細胞の成熟化能解析

Thy1⁺細胞と CD44⁺細胞由来コロニーを高集中度培養し, 成熟化能として毛細胆管長を測定したところ, Thy1⁺細胞と CD44⁺細胞の毛細胆管長は SH と比較し, 有意に短いことが示された (図 2)。また, 同様に C/EBP α の陽性率を測定したところ, Thy1⁺細胞と CD44⁺細胞で低いことが示された (図 3)。

図 2: Thy1⁺細胞, CD44⁺細胞, SH 由来コロニーの FD 取り込み画像と毛細胆管長

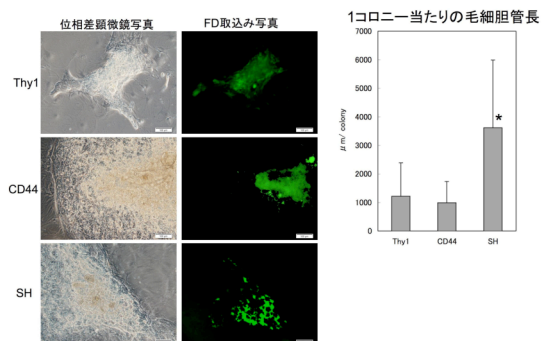
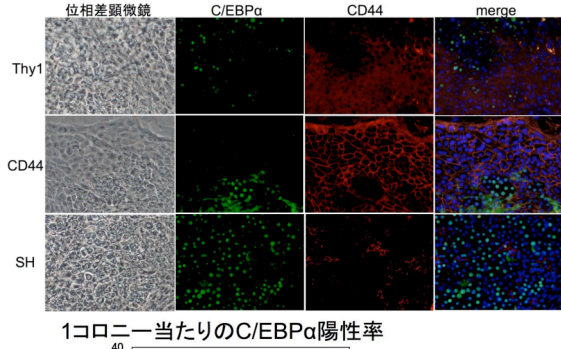


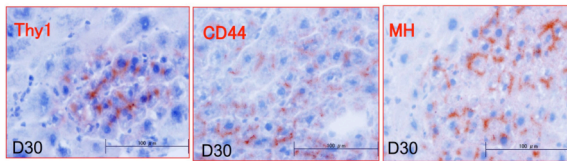
図3: C/EBP α の免疫染色と陽性率



(4) 細胞移植における in vivo 分化機構の解析

移植した細胞の分化機序を解析するため、GalN 投与2日後から単離した DPPIV 陽性 Thy1 陽性細胞, 4 日後から単離した CD44 陽性細胞, そして正常肝臓から単離した成熟肝細胞(MH)を、Ret/PH モデルラットに移植した。ドナー由来移植細胞巣は、DPPIV 活性 (図4)の発現で同定した。

図4 移植細胞巣の DPPIV 活性染色



Thy1 陽性細胞由来の移植細胞巣の数は、CD44、MH と比較すると圧倒的に少なく、90 日以降のレシピエントラット肝臓には認められなかった。CD44 陽性細胞由来の細胞巣では、移植巣の平均の大きさは図5で示すように移植後30日まではMH由来のものより明らかに大きく、Ki67 染色(図6)で示すように増殖している細胞は MH 由来の細胞より多い傾向を示した。移植後60日目までは、移植細胞巣の数にほとんど違いは見られなかったが、それ以降 MH 由来の細胞巣は明らかに大きくなっていく一方、CD44 由来の細胞巣は数も面積も減少していった (data not shown)。

図5: 移植細胞巣の大きさ

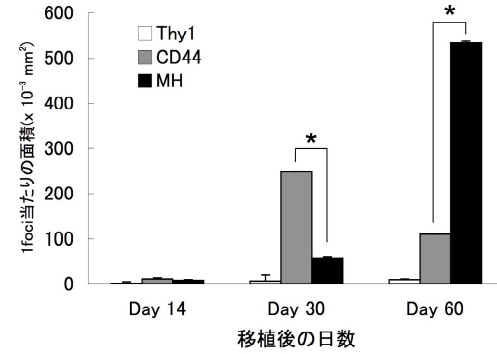
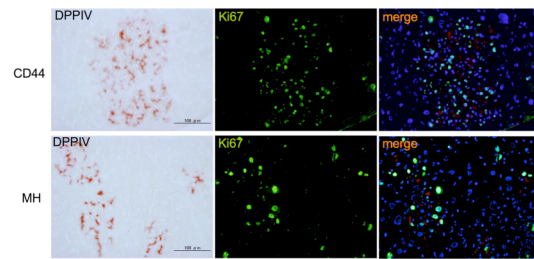


図6 Ki67 による免疫染色(移植後14日目)



CD44 陽性細胞由来と MH 由来の細胞の増殖活性に違いがあったことから、その原因を検討するために移植細胞巣における類洞形成と構成細胞の分化度を検討した。類洞内皮細胞マーカーとして SE-1 を、成熟肝細胞マーカーとして C/EBP α を用いた(図7)。移植後14日目の CD44 陽性細胞由来の細胞巣では、類洞内皮細胞が十分に侵入していないものが多く見られ(図8)、C/EBP α を発現している細胞は少なかった。一方、ほとんどの MH 由来の細胞巣では、類洞内皮細胞による類洞形成が認められ、C/EBP α を発現している細胞が多く見られた。(図9) これらの結果は、肝幹・前駆細胞は移植後直ぐにはレシピエント肝臓の細胞索には組み込まれずに、小葉内で増殖し、ある程度の大きさになって徐々に類洞形成をしていることを示唆している。つまり、レシピエント肝臓内での移植細胞の増殖活性は高いが成熟度が不十分であると考えられる。一方、MH 由来の細胞は、移植後早期に肝細胞索内に組み込まれるために、増殖が抑えられ成熟した状態に比較的早期に回復すると考えられる。

図7: 類洞内皮細胞マーカー(SE-1)と成熟肝細胞マーカー(C/EBP α)による免疫染色

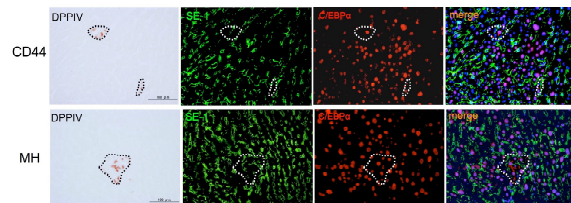


図 8: foci の大きさと類洞形成との関係

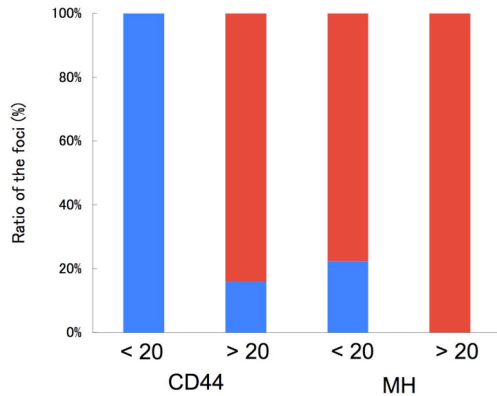
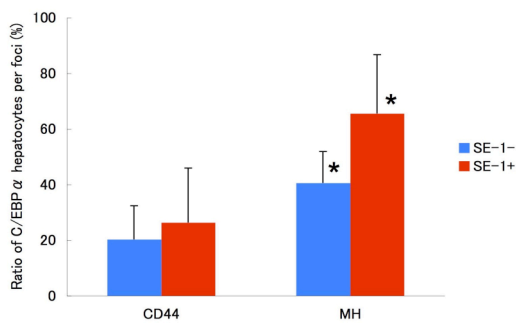


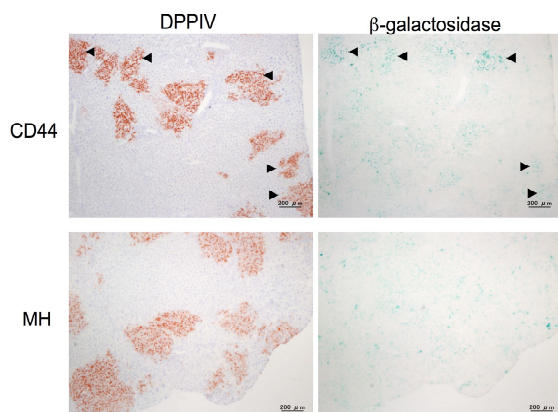
図 9: 類洞形成と C/EBP α 陽性率との関係



*p<0.05: significant difference from the CD44 cells.

細胞老化マーカーである Senescence-associated β galactosidase (SA-gal) 活性染色 (図 10) を行った結果、移植後 30 日目では移植細胞巣には SA-gal 陽性細胞をほとんど認めなかったが、移植後 60 日目の CD44 陽性細胞由来の細胞巣内には SA-gal 陽性細胞を多数認める一方、MH 由来の細胞巣にはほとんど SA-gal 陽性細胞を認めなかった。このことは、移植後 30 日では、CD44 由来細胞移植巣の消失が明瞭ではなかったことと関係していると考えられる。一方、MH 由来細胞巣は、移植後 1 年経過してもほとんど消失せずに維持されていた。

図 10: SA-gal 活性染色による細胞老化解析



(移植後 60 日目)

以上の結果より、Thy1 陽性細胞の一部は、EGF、bFGF、HGF の作用によって、肝細胞への分化が方向付けられ、CD44 陽性小型肝細胞を介して肝細胞に分化する。しかし、成熟化までは至らず、再生に寄与したそれらの肝幹・前駆細胞は長期では cellular senescence に陥り、自死していくと考えられる。

肝幹・前駆細胞移植は、長期的にレシピエント動物の肝細胞機能を維持させることに用いるのは難しく、短期的にレシピエント肝機能を補完し、レジデントの肝細胞機能の回復を待つまでの役割であると考えたほうがよいのかもしれない。

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 4 件)

1. Norihisa ICHINOHE, Junko KON, Toshihiro MITAKA: Isolation of hepatic progenitor cells from the galactosamine-treated rat liver. *Liver Stem Cells. Method in molecular Biology*, 826(1) 49-58. 2012

DOI: 10.1007/978-1-61779-468-1_5 査読有り

2. Norihisa ICHINOHE, Junko KON*, Kazunori SASAKI, Yukio NAKAMURA, Hidekazu OOE, Naoki TANIMIZU, and Toshihiro MITAKA: Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem cells, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant*. 21, 11-22.2012.

DOI: 10.3727/096368911X580626 査読有り

3. Hidekazu Ooe, Qijie Chen, Junko Kon, Kazunori Sasaki, Hiroyuki Miyoshi, Norihisa Ichinohe, Naoki Tanimizu, Toshihiro Mitaka: Proliferation of Rat Small Hepatocytes Requires Follistatin Expression. *J Cell Physiol*. Volume 227, Number 6, 2363-2370, 2012

DOI: 10.1002/jcp.22971. 査読有り

4. Norihisa ICHINOHE, Takayoshi NAKANO, Toshihiro MITAKA, Yukichi UMAKOSHI, and Yasuhiko Tabata: Proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow stromal cells on bio-apatite with different crystalline facets. *J Biomed Mater Res, Part A*, Volume 93A, Number 2, 646-655, 2010

DOI: 10.1002/jbm.a.32569 査読有り

[学会発表] (計 16 件)

1. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: 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 第 19 回肝細胞研究会 (2011.6.24-25 東京)

2. 大栄秀和, 陳 其潔, 今純子, 市戸義久, 谷水直樹, 三高俊広: ラット小型肝細胞の増殖機序 第 19 回肝細胞研究会 (2011.

6. 24-25 東京)
3. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: 細胞移植治療における肝幹・前駆細胞の有用性 第 47 回日本肝臓学会総会 (2011. 6. 2-3 東京)
 4. 三高俊広, 市戸義久, 中村幸雄: 肝幹・前駆細胞移植によるレシピエントラット肝臓の再生 第 47 回日本肝臓学会総会 (2011. 6. 2-3 東京)
 5. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: 肝前駆細胞移植治療における再生機序の解析 第 100 回日本病理学会総会(2011.4.28-30 横浜)
 6. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: 肝幹・前駆細胞移植におけるドナー細胞増殖機序の解析 第10回日本再生医療学会 (2011.3.1-2 東京)
 7. 中村幸雄, 水口徹, 市戸義久, 大栄秀和, 谷水直樹, 三高俊広, 平田公一: ラット肝障害モデルに対する肝細胞移植の影響についての検討 第 10 回日本再生医療学会 (2011.3.1-2 東京)
 8. 中村幸雄, 水口徹, 市戸義久, 大栄秀和, 千賀一徳, 谷水直樹, 平田公一, 三高俊広: ラット肝障害モデルに対する肝細胞移植の効果についての検討 第 99 回北海道癌談話会例会 (2010.10.23 札幌)
 9. 市戸義久, 三高俊広: 肝幹・前駆細胞の分化誘導因子の解析 第14回肝臓学会大会 (2010.10.13-14 横浜)
 10. 三高俊広, 市戸義久: 肝幹・前駆細胞の分化・再生能力 第 1 4 回肝臓学会大会 (2010. 10. 13-14 横浜)
 11. 中村幸雄, 水口徹, 柴田稔人, 谷水直樹, 大栄秀和, 市戸義久, 川本雅樹, 目黒誠, 古畑智久, 木村康利, 信岡隆幸, 三高俊広, 平田公一: 肝硬変ラットモデルにおける肝細胞移植の有用性についての検討 第 14 回肝臓学会大会 (2010. 10. 13-14 横浜)
 12. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 三高俊広: 肝前駆細胞移植におけるドナー細胞増殖機序の解析 第 17 回肝細胞研究会 (2010. 6. 18-19 秋田)
 13. 中村幸雄, 市戸義久, 大栄秀和, 谷水直樹, 三高俊広, 水口徹, 平田公一: 食餌により作成した肝障害ラットモデルにおける肝細胞移植の有用性についての検討 第 17 回肝細胞研究会 (2010. 6. 18-19 秋田)
 14. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 谷水直樹, 三高俊広: 肝前駆細胞の分化機構の解析 第 46 回日本肝臓学会総会 (2010. 5. 27-28 山形)
 15. 市戸義久, 今純子, 大栄秀和, 中村幸雄, 三高俊広: 肝前駆細胞移植におけるドナー細胞増殖機序の解析 第 99 回日本病理学会総会 (2010. 4. 27-29 東京)
 16. 三高俊広, 市戸義久, 今純子, 大栄秀

和: 肝幹・前駆細胞移植と Repopulation 第 1 2 回プロメテウスの会 (2010. 4. 17 静岡)

[図書] (計 1 件)

1. 市戸義久, 大栄秀和, 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 再生医療叢書 第 5 巻 代謝系臓器 朝倉書店

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市戸 義久 (Ichinohe Norihisa)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 80452978