

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790632

研究課題名（和文） 肝幹・前駆細胞の分化増殖機構の解析と疾患治療モデルの構築

研究課題名（英文） Analysis on molecular mechanisms of proliferation and differentiation of hepatic stem/progenitor cells and development of animal model for treatment of liver diseases using hepatic stem cells

研究代表者

柿沼 晴（KAKINUMA SEI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：30372444

研究成果の概要（和文）：

研究代表者らは、細胞表面抗原によって濃縮したマウス肝幹・前駆細胞を用いて分化・増殖の分子機構を解析し、目的分子の発現を調節した移植系を用いて、肝幹・前駆細胞による細胞移植効率の向上を図る研究を行った。その結果、Wnt5aを介した経路により、肝幹・前駆細胞の胆管細胞への分化が調節されていることを発見した。また、MMP2及びMMP14を欠失させると、細胞移植の効率が悪化することが判明し、MMPの調節によって、細胞移植をより効率化することができることが示された。本研究は、将来の自己由来幹細胞を用いた肝再生医療の進歩に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Investigators of this research project have analyzed on the molecular mechanisms of differentiation and proliferation of primary hepatic stem/progenitor cells purified by cell surface markers. We have also studied whether modulation of several molecules improves therapeutic efficacy of transplantation using hepatic stem/progenitor cells. We found that Wnt5a and Wnt5a-related molecules control the biliary differentiation of hepatic stem/progenitor cells. Next, our data indicated that loss of MMP2 or MMP14 worsens the efficacy of transplantation using hepatic stem/progenitor cells. These studies contribute to the progress of regenerative medical science and autologous stem cell therapy against liver diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

本邦では、肝癌を含めた慢性肝疾患によって、年間約 40,000 人以上が死亡し、その死因は終末像としての肝不全が大半を占めている。現在のところ、致死性肝不全に対する根治的治療は肝移植のみであるが、脳死ドナーの絶対的不足・生体ドナーに対する精神的・社会的負担が社会問題となっており、代替治療の確立が強く求められている。代替治療の一つとして、肝細胞を移植する「肝細胞移植療法」が従来から研究されてきたが、その効果は未だ明らかではない。

一方で近年、肝幹細胞が同定され、より増殖能の高い細胞を移植治療に利用する試みが注目を集めてきた。肝幹細胞は、自己複製能、高い増殖能及び肝細胞・胆管細胞への 2 方向性分化能の 3 つの能力を有する細胞であり、分離・同定する手法が研究協力者らによって開発・確立された。さらにヒト iPS 細胞の樹立成功に伴い、iPS 細胞から自己由来肝幹・前駆細胞（以後増殖能と 2 方向性分化能を有する細胞を肝幹・前駆細胞と総称する）を誘導して用いる移植治療の実現化が期待され、細胞移植のメカニズムを解析する必要性は高まる一方である。ところが肝幹細胞は生体内ではごく少数の細胞群であり、その分化・増殖を制御する分子メカニズムには不明の点も多く、これを移植医療に効率的に利用する方法は現在のところ確立されていない。

これまで研究代表者は、肝幹細胞における増殖制御機構の解析と幹細胞移植モデルの開発に取り組んできた。そして、濃縮したマウス肝幹・前駆細胞を用いてウイルスベクターによる遺伝子導入を行い、目的分子が増殖・終末分化にどのような機能を有するののかについて *in vitro* で解析しうる実験系を、独自に構築した。加えて最近、研究代表者はマウスにおける新規の細胞移植系として、Apolipoprotein E(Apo E)欠損マウスをレシピエントとして、薬剤・部分肝切除で前処理したマウスに細胞移植を行うことで、最終的に 70% 以上の高いドナーキメラリズムを達成しつつ、移植後のドナーキメラリズムを定量的に

評価・追跡できる移植系の構築に成功した。

2. 研究の目的

このような、確立された学術・研究基盤に基づいて、研究代表者らは、今回申請する研究計画において、以下の目的を設定した。すなわち、〈1〉細胞表面抗原によって濃縮したマウス肝幹・前駆細胞を用いて分化・増殖の分子機構を *in vitro* で解析する。〈2〉この結果に基づいて目的分子の発現を調節した移植系を用いて、肝幹・前駆細胞による細胞移植効率を解析し、移植効率の向上を図る。〈3〉これらの結果を踏まえ、疾患モデルマウス由来 iPS 細胞から分化誘導した肝前駆細胞を、移植効率を向上させた状態で移植して、自己由来細胞を用いた肝疾患治療モデルを示す。これらの研究によって、将来の自己由来幹細胞を用いた移植・肝再生医療の学術・技術的な基盤形成に貢献することを、本計画の目的とする。

3. 研究の方法

(1). マウス肝幹・前駆細胞の分離、培養、*in vitro* での形質解析

研究代表者はマウス胎仔肝臓から高速セルソーターを用いて、初代肝幹・前駆細胞として、 $CD13^+CD133^+CD45^-Ter119^-$ の画分に増殖能の高い細胞が濃縮されていることを報告した。また最近、 $CD13^+CD133^+c-kit^-Sca-1^-CD45^-Ter119^-$ の画分に、成体由来の肝幹・前駆細胞が濃縮されていることも報告した (*Gastroenterology*, 2009)。これらの初代細胞に対して、レンチウイルスベクターによって標的分子を強制発現・siRNA knock down をしつつ、増殖能、成熟肝細胞・胆管細胞への分化誘導、細胞遊走能について *in vitro* で検定する。

(2). マウス肝幹・前駆細胞における Wnt 経路の機能に関する解析

濃縮した初代肝幹・前駆細胞における、特定の目的分子による形質の変化について、まず *in vitro* でスクリーニング的に解析を進めてゆく。その中でも、特に Wnt 経路の下流分子に関して、増殖能、成熟肝細胞・胆管細胞へ

の分化誘導、細胞遊走能等について解析する。

(3). ApoE 欠損マウスをレシピエントとした肝幹・前駆細胞移植後の細胞動態の解析

研究代表者は移植した初代肝細胞・初代肝幹/前駆細胞によって、高度のドナーキメリズムが得られる細胞移植系を独自に開発した。さらに同系を用いて ApoE 欠損マウスをレシピエントとして移植を行うと、高コレステロール血症が長期改善し、細胞移植の治療効果が機能的に確認できることを確認した。血清コレステロールを定量することによって、ドナーキメリズムのモニタリングと定量化も可能であった。まずは、本移植系を用いて、Matrix Metalloproteinase family 分子が移植効率にどのような影響を与えるのかに関して、移植系による検定を進める。移植効率に有意差が見られれば、どのようなメカニズムで移植効率を制御するのかについても解析をすすめる。

(4) .マウス iPS 細胞を用いた肝前駆細胞誘導の実施と条件検討

マウス iPS 細胞から肝幹・前駆細胞を誘導する手法に関しては、ES 細胞で既に報告されているいくつかの報告に基づいて行う。具体的には Activin A 添加無血清培地で細胞を培養し、E-cadherin と CXCR4 の発現によって FACS で分離した後に、FGF・EGF・BMP4 の添加によって肝前駆細胞分化を誘導する。

(5) .ApoE 欠損マウス由来 iPS 細胞を用いた肝前駆細胞移植による治療効果の検証

上記(1)-(4)の研究成果をもとに、ApoE 欠損マウス由来の iPS 細胞から肝幹・前駆細胞を誘導する。誘導の前後、適当な時期に ApoE 遺伝子をレンチウイルスベクターで強制発現せしめ、移植の効率化に必要な遺伝子が同定されていれば、これも調節したうえで細胞移植を行う。

4. 研究成果

(1)マウス肝幹・前駆細胞の分離、培養、*in vitro* での形質解析：マウス胎仔もしくは成体肝臓由来の初代肝幹・前駆細胞に対して、レンチウイルスベクターによって標的分子を強制発現・siRNA knock down をしつつ、増殖能、成熟肝細胞・胆管細胞への分化誘導、細胞遊走能について *in vitro* で検定した。その結果、肝幹・前駆細胞の培養環境の最適化がより進められた (1st JSGE International Topic Conference 招待講演にて発表)。

(2)マウス肝幹・前駆細胞における Wnt 経路の機能に関する解析：Wnt 経路の下流分子に関して、増殖能、成熟肝細胞・胆管細胞への分化誘導、細胞遊走能等について解析した。その結果、非古典的経路のリガンドである Wnt5a を添加した肝幹・前駆細胞は胆管細胞への分化誘導を遅延させることが示された。また肝幹・前駆細胞由来の細胞株を用いた検討でも、Wnt5a を添加すると擬似的胆管構造形成が抑制されることが示された(第 62 回米国肝臓病学会年次総会で発表、論文投稿中)。

(3)ApoE欠損マウスをレシピエントとしたマウス肝幹・前駆細胞移植後の細胞動態の解析：成体由来肝細胞を用いて、高度の肝キメリズムが得られる移植系を確立した。ApoE欠損マウスに対して、野生型のマウス胎仔由来肝幹・前駆細胞を移植したところ、高脂血症が治癒し、移植した細胞がレシピエントの肝臓内で1年以上にわたって肝細胞として機能することを示した。さらに、成体マウス肝臓から分離した肝幹・前駆細胞についても検討し、移植細胞が長期間肝臓を再構築できることを示した(JDDW2010パネルディスカッション及び第62回米国肝臓病学会年次総会にて発表)。(4)マウスiPS細胞を用いた肝前駆細胞誘導の実施と条件検討：マウスiPS細胞から肝前駆細胞誘導の条件検討を行い、現時点での至適条件を設定した(2011年肝臓学会総会で発表)。

(5) ApoE欠損マウス由来iPS細胞を用いた肝前駆細胞移植による治療効果の検証：ApoE欠損マウスより樹立したiPS細胞を培養し、現在移植により治療効果を検討している。

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 18 件)

1. Kakinuma S, Onozuka I, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, and Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient

- mice. *Biochem Biophys Res Commun* 406:134-140, 2011.
2. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 56(3):1315-23, 2012.
 3. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sakaguchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 56(3): 602-8, 2012.
 4. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka I, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; in press.
 5. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsushashi H, Izumi N. Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 17:35-43, 2012.
 6. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 85:5986-94, 2011.
 7. Hiramatsu N, Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sakaguchi F, Tamori A, Kakinuma S, Matsuura K, Izumi N. Pretreatment prediction of anemia progression by pegylated interferon a2b plus ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C infection: Decision-tree analysis. *J Gastroenterol* 46:1111-19, 2011.
 8. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M. Inhibitory effect of triterpenoid compound, with or without interferon-alpha, on hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agent Chemother* 55:2537-45, 2011.
 9. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Serum interleukin-6 levels can predict resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 16:1081-1091, 2011.
 10. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 41:258-269, 2011.
 11. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M, and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 83:871-878, 2011.
 12. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S,

- Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus *in vivo*. *J Clin Invest* 120:179-190, 2010.
13. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tuchiya K, Imamura M, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in-vivo analyses of plaque-derived cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 405: 361-369, 2010.
 14. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Mishima K, Onuki-Karakama Y, Yamamoto M, Funaoka Y, Watanabe T, Kiyohashi K, Nitta S, Azuma S, Kakinuma S, Tuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 407: 80-90, 2010.
 15. Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka S, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, Watanabe M. Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agent Chemother* 54:3179-86, 2010.
 16. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Honda M, Ito K, Mizokami M, Watanabe M. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 40: 1063-1071 2010.
 17. Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, Mogushi K, Nagaie S, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G, Mishima M, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Chen CH, Kakinuma S, Tsuchiya K, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M. Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 45:523-36, 2010.
 18. Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M. Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon α 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 45: 656-665, 2010.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M: MMP-2 and MMP-14 derived from donor cells enhance therapeutic efficacy of liver cell transplantation in mice. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA.
 2. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M: Loww of Wnt5A promotes biliary differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. USA **(Young Investigators Travel Award winner)**
 3. Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Watanabe M, Nakauchi H. Analysis of cell surface molecules on transplantable hepatic progenitor cells in mouse fetal neonatal livers. 1st JSGE International Topic Conference. **(Invited Spekaer)** September, 2010. Kamakura, JAPAN.
 4. Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Watanabe M, Nakauchi H. Therapeutic model of hepatic cell transplantation without genetic liver injury in recipients. FASEB Summer Research Conferences 2010, Liver growth, injury, and metabolism. August, 2010, Snowmass, CO, USA.
 5. 肝線維化プロセスにおける Matrix Metalloproteinase-2 の機能: 柿沼 晴、紙谷聡英、小野塚泉、東正新、坂本直哉、中

内啓光、渡辺守 (一般演題/優秀演題受賞) JDDW 2011 (第 15 回日本肝臓学会大会) 2011 年 10 月 20 日 福岡

6. Noncanonical Wnt 経路による肝幹/前駆細胞の分化制御: 幾世橋 佳、柿沼 晴、渡辺守 JDDW2011 (第 15 回日本肝臓学会大会・第 53 回日本消化器病学会大会) ワークショップ (肝疾患と幹細胞—炎症、再生、発癌まで—) 2011 年 10 月 21 日 福岡
7. Noncanonical Wnt 経路によるマウス肝幹・前駆細胞の分化制御機構への関与: 幾世橋 佳、柿沼 晴、紙谷聡英、小野塚泉、中川美奈、坂本直哉、中内啓光、渡辺守 第 47 回日本肝臓学会総会 (一般演題) 2011 年 6 月 3 日 東京
8. 細胞移植時のドナーキメリズム形成に対する Matrix Metalloproteinase の関与: 柿沼 晴、中内啓光、渡辺守 JDDW2010 (第 14 回日本肝臓学会大会・第 52 回日本消化器病学会大会) パネルディスカッション (肝臓の再生機構を考える) 2010 年 10 月 13 日 横浜
9. 肝臓細胞移植におけるドナー由来 Matrix Metalloproteinase の関与: 柿沼 晴、紙谷聡英、坂本直哉、渡辺守、中内啓光 第 46 回日本肝臓学会総会 (一般演題) 2010 年 5 月 28 日 山形

[図書] (計 2 件)

1. 柿沼 晴: iPS 細胞と Direct Conversion
G.I. Research (先端医学社) 19 巻 6 号 p78-79 (2011)
2. 柿沼 晴: 肝細胞及び肝幹・前駆細胞移植における Matrix Metalloproteinase の関与 分子標的薬 その作用機序と効果予測 (アークメディア) p159-166 (2010)

[産業財産権]

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿沼 晴 (KAKINUMA SEI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・寄附講座教員 (講師)

研究者番号: 30372444

(2)分担研究者

なし

(3)連携研究者

なし