

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460474

研究課題名(和文)肝幹細胞移植による内在性肝前駆細胞増殖機構の解析

研究課題名(英文)Hepatic stem cells transplantation activates the growth of intrinsic hepatic progenitor cells in recipient rat livers.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：レトロルシン/部分肝切除(Ret/PH)モデルラット肝臓では、small hepatocyte-like progenitor cells (SHPCs)という肝前駆細胞が一過性に出現するが、その増殖機構は未解明である。障害肝由来Thy1陽性細胞をRet/PHモデルに移植すると、SHPCsが増大する。移植したThy1陽性細胞が細胞外小胞を分泌することで、類洞内皮細胞でInterleukin(IL)17Bを、Kupffer細胞でIL25を、SHPCsでIL17 receptor B(IL17rb)を誘導していた。IL17RBシグナル活性化により内在性肝前駆細胞の増殖が促進されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In retrorsine (Ret)/70% partial hepatectomy (PH) model rat livers small hepatocyte-like progenitor cells (SHPCs) transiently appear to form clusters. However, the molecular mechanisms regulating their proliferation remain unknown. We found that transplantation of Thy1+ cells isolated from galactosamine-treated rat livers transiently increased the liver mass by expanding SHPCs in Ret/PH model livers. In this study, we examined the mechanism of the enhanced liver regeneration. Extracellular vesicles secreted from Thy1+ cells induced interleukin 17 b (IL17b) and IL25 expression in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells, respectively, whereas they induced IL17 receptor b (IL17rb) in SHPCs. In conclusion, Thy1+ cells transplantation enhanced the growth of intrinsic hepatic progenitor cells via IL17RB signals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞・組織 再生医学 肝幹・前駆細胞 細胞移植 生体組織工学

1. 研究開始当初の背景

申請者は、D-galactosamine (GalN)投与肝障害モデルラット肝臓から Thy1 陽性 oval 細胞を単離し、小型肝細胞 (Small Hepatocytes; SHs)への分化機構について研究を行ってきた。これまでの我々の研究でわかったことは、

GalN 投与 2 日後に、グリソン鞘周囲に Thy1 陽性細胞が出現し、3 日後には肝小葉内に浸潤していくが、4 日後には消失する。(Ichinohe et al. Method in molecular Biology, 2012)

GalN 投与 3 日目の障害肝由来 Thy1 陽性細胞は上皮系細胞と間葉系細胞からなる heterogeneous な細胞集団であり、Thy1 陽性細胞の一部が小型肝細胞を介して肝細胞に分化し、また胆管にも分化する二分化能を有する。(Kon J, Ichinohe N, et al. Am J Pathol 2009)

GalN 投与 2 日目の障害肝由来 Thy1 陽性細胞は未分化な細胞で、そのままでは小型肝細胞に分化できず、EGF, FGF-2, HGF 存在下で肝細胞への分化が運命付けられ、Thy1/CD44 両陽性細胞、CD44 陽性小型肝細胞へと分化する。(Ichinohe et al, Hepatology 2013)

肝障害由来 Thy1 陽性細胞と CD44 陽性細胞、正常成熟肝細胞 (Mature hepatocytes; MHs) を Retrorsine (Ret)/部分肝切除 (Partial Hepatectomy; PH)モデルラットに移植し、ドナー細胞の置換率を検討したところ、Thy1 陽性細胞 << CD44 陽性細胞 < MH であった。Thy1 及び CD44 陽性ドナー細胞の多くは細胞老化に陥り、排除されるために置換率が低いことが示唆された。(Ichinohe et al, Cell Transplant 2012)

しかしながら、Thy1 陽性細胞移植肝臓は置換率が最も低いにも関わらず、肝臓が最も大きくなっていることを見出した。そこで、切片組織を観察したところ、レシピエント由来の肝前駆細胞の 1 つ、Small hepatocyte-like progenitor cells (SHPCs)の集塊の数と大きさが著しく増大していた。

これまでに他の臓器においても細胞移植によって内在性前駆細胞増生による再生促進という報告はない。そこで本申請においては、Thy1 陽性細胞由来の内在性肝幹細胞活性化因子を解明することで、新しい肝再生誘導治療方法の開発を目的とした。

2. 研究の目的

Thy1 陽性細胞移植による内在性肝前駆細胞増殖促進機構を解明することを目的として、以下の流れで実験を行なった。

(1) 肝組織切片から Laser Micro-dissection (LMD)法により、SHPCs のみを採取し DNA microarray を行い、移植群で発現が上昇している細胞増殖因子受容体の網羅的解析を行い、候補因子を抽出する。

(2) 候補因子誘導のメカニズムを解析する。

(3) 候補因子による増殖促進効果を確認する。

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 GalN (75 mg/100g 体重) を投与し、急性肝障害を惹起した。

(2) Thy1 陽性細胞単離・培養

投与後、2 日目にコラゲナーゼ肝灌流方法を用いて細胞を分離した。抗 Thy1 抗体及び磁気ビーズ (MACS システム) を用いて Thy1⁺細胞をソートし、培養又は移植実験に用いた。培養実験では 1×10^5 個の細胞を 35-mm dish に播種し、DMEM +10% FBS+10 mM Nicotinamide + 10 ng/ml EGF + Ascorbic acid 2 phosphate (Asc2P) + Insulin + dexamethasone + antibiotics などを添加した培地で培養した。

(3) Thy1⁺細胞培養上清から Extracellular vesicles (EVs) の抽出

単離した Thy1⁺細胞を 10-cm culture dish に播種し、2 日間培養した培養上清から SBI 社製 ExoQuick-TC™ Exosome Isolation Reagent を用いて EVs を抽出 (Thy1-EVs)。小型肝細胞培養に投与し、増殖能を解析した。

(4) SHs の単離・培養

SHs の単離・培養については 8-10 週令 DPPIV 陽性ラットに対し、コラゲナーゼ肝灌流方法を用いて細胞を分離する。非実質細胞分画をヒアルロン酸コートディッシュに播種し、DMEM/F12 に 10 mM Nicotinamide + 10 ng/ml EGF + Asc2P + ITS + dexamethasone + 1% BSA + antibiotics を添加した無血清培地で培養を行った。Thy1 陽性細胞由来の液性因子の影響を検討するため、Thy1-EVs を培地に加え、SHs の増殖能を解析した。また、実験結果から得られた候補因子を培地に添加し、増殖能を解析した。

(5) 細胞移植及び EVs 投与

移植は、7 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、 5×10^5 細胞を脾臓経由で移植もしくは同等細胞数の Thy1-EVs を腸間膜静脈経由で投与した。Control として非細胞移植群を用いた。また、他細胞の検討のため、MHs を用いた。移植後 14 日後に肝臓を摘出し、凍結標本作製し、SHPCs cluster の数及び大きさを検討した。

(6) 解析手法

肝組織切片から LMD 法により、SHPCs のみを採取し、DNA microarray を行った。移植群で発現が上昇している細胞増殖因子受容体の網羅的解析を行い、候補因子を抽出し、Realtime PCR 法にて確認した。

(7) 細胞単離

正常ラット、Ret/PH モデルラット、Thy1 陽性細胞移植ラット肝臓から、SE-1 陽性類洞内皮細胞 (SECs) と CD68 陽性 Kupffer 細胞 (KCs) を MACS 法で単離し、遺伝子発現を解析した。

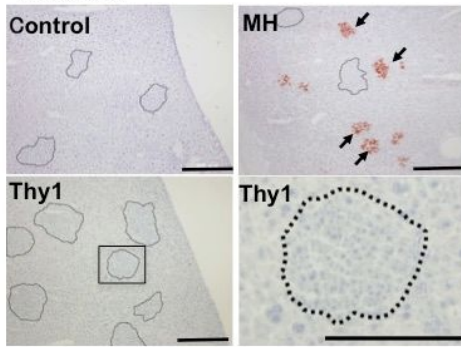
4. 研究成果

(1) Thy1 陽性細胞移植による SHPCs 挙動

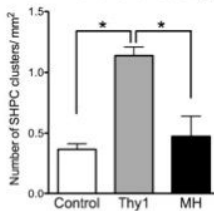
Thy1 陽性細胞を Ret/PH モデルに脾臓経由で移植したところ、生着した細胞は少ないが、レシピエント由来の SHPCs cluster 数及び構成細胞数が有意に増大した(図 1)。しかしながら、MH を移植した場合には増大は見られなかった。

図 1 : SHPCs の挙動

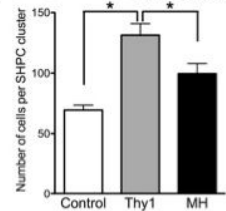
A. 組織観察



B. SHPCs cluster 数



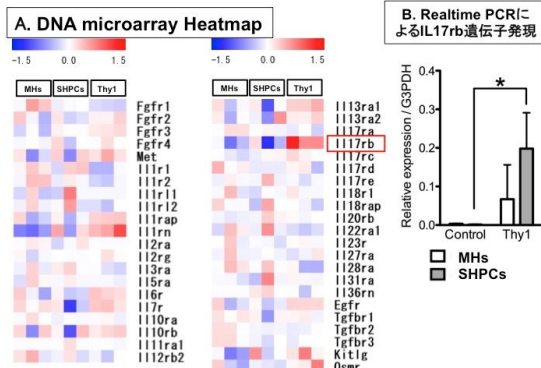
C. SHPCs 構成細胞数



(2) LMD による SHPCs の抽出、及び細胞増殖因子重要遺伝子の網羅的解析

凍結組織切片から LMD 法により SHPCs を単離し、RNA を抽出した後、DNA microarray により、細胞増殖因子受容体の網羅的解析を行った。その結果、発現量が 2 倍以上差のある因子で有意に高いものとして Interleukin 17 receptor b (IL17rb) が候補として上がった。Realtime PCR においても Control に比べ、Thy1 陽性細胞移植群の SHPCs で有意に発現が高いことを確認した。(図 2)

図 2 : SHPCs における細胞増殖因子受容体の網羅的解析

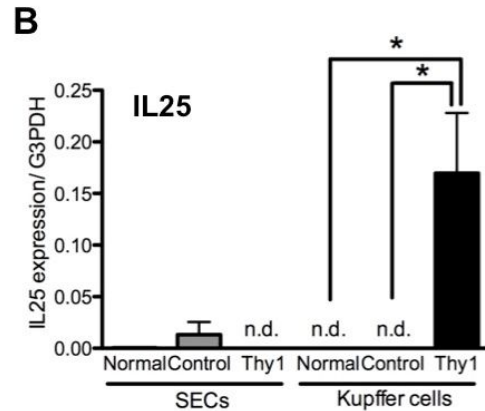
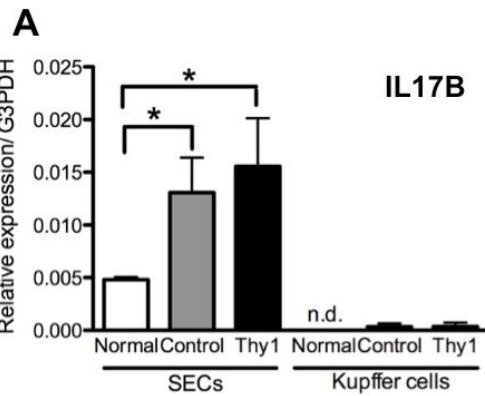


(3) リガンド解析

IL17rb に結合するリガンドとして、IL17B と IL25 が知られている。2 つの因子について移植した Thy1 陽性細胞での発現は低かったため、他の細胞が分泌している可能性が考えられた。そこで、正常ラット、Ret/PH モデルラット、Thy1 陽性細胞移植ラット肝臓から、SE-1 陽性 SECs と CD68 陽性 KCs を MACS 法で単離し、リガンドの発現を検討したところ、SECs で IL17B、KCs で IL25 の発現が有意に増大していた(図 3)。

図 3 : 内在性細胞のリガンド解析

A. IL17B B. IL25



(4) IL17B/IL25/IL17RB 誘導解析

IL17RB シグナルの誘導メカニズムを解析するため、Thy1 陽性細胞の培養上清から EVs を抽出(Thy1-EVs)し、これを正常肝由来の SECs、KCs、及び SHs 培養に添加することで、誘導されるか検討した。結果、SECs で IL17b が、KCs で IL25 が、SHs で IL17rb が誘導された(図 4)。

また、Thy1-EVs が in vivo において実際に SHPCs を増大させるか検討するため、Ret/PH モデルラットに対し、腸間膜静脈経由で Thy1-EVs を投与し、SHPCs の挙動を解析した。結果、Thy1-EVs を投与すると、Control 群に比べ、SHPCs cluster の数及び大きさが有意に増大した(図 5-A~C)。また、Thy1-EVs 投与群において、SHPCs における IL17rb の発現が有意に増大していた(図 5-D)。

図4 : Thy1-EVs における IL17b/IL25/IL17rb 誘導解析

A; IL17b, B; IL25, C; IL17rb

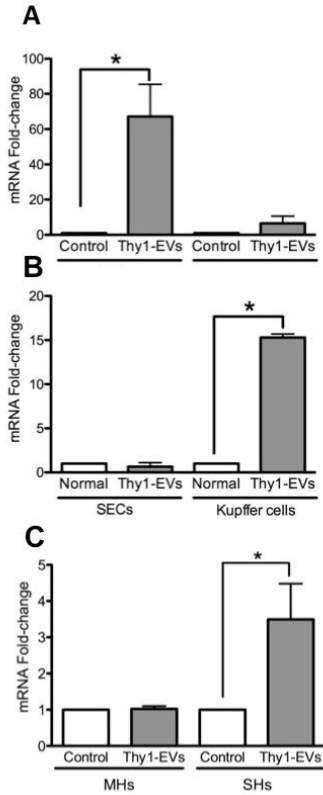
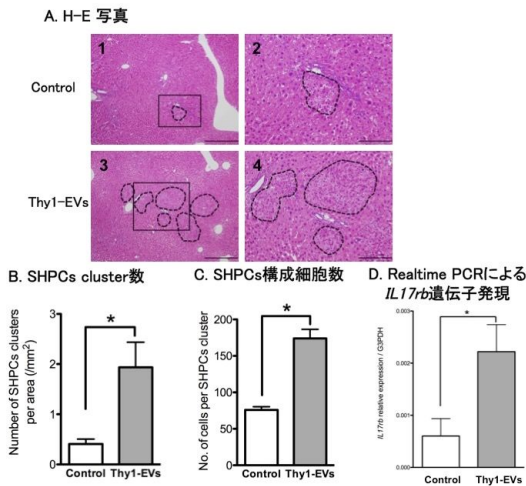


図5 : Thy1-EVs 投与における SHPCs 挙動

A; H-E 染色写真 B; SHPCs cluster 数
C; SHPCs 構成細胞数 D; IL17rn 遺伝子発現



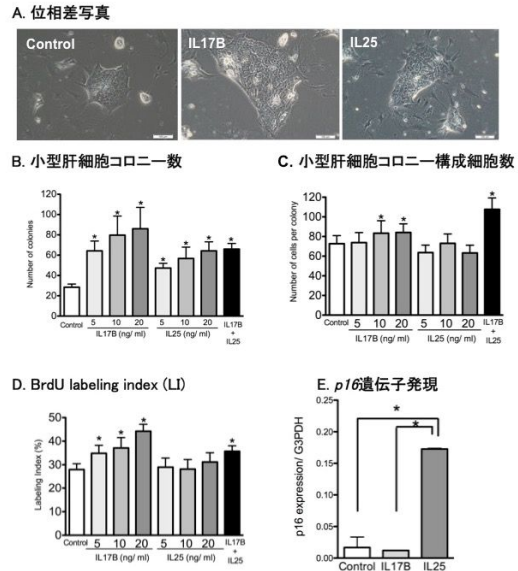
(5) IL17B/IL25 による増殖促進効果

IL17B と IL25 において、実際に肝前駆細胞の増殖を促進させるか、*in vitro* において解析した。SHs 培養に IL17B と IL25 を投与して培養すると、IL17B と IL25 とともに SH コロニー数を増大させた(図 6-B)が、SHs コロニー構成細胞数及び BrdU Labeling index (LI) を有意に増大させたのは IL17B 投与群のみであった(図 6-C, D)。IL25 は p16 依存性の細胞老化を誘導する、との研究報告があることから、

SHs における p16 の遺伝子発現を検討したところ、IL25 投与群において、有意に p16 の発現が増大していた(図 6-E)。

図6 : IL17B/IL25 投与による SH 増殖促進効果

A; 位相差写真像 B; SHs コロニー数
C; SH コロニー構成細胞数 D; LI (%)
E; p16 遺伝子発現解析

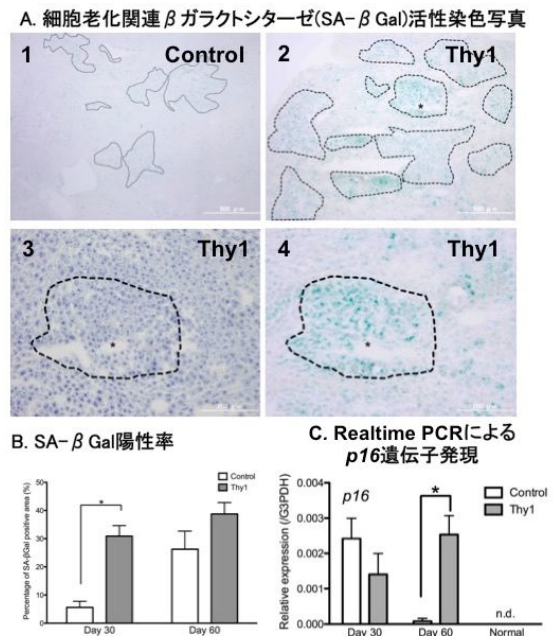


(6) 増大した SHPCs 運命解析

IL25 の作用により、増大した SHPCs が細胞老化に陥っている可能性が示唆されたため、肝組織において、細胞老化関連 ガラクトシターゼ(SA- Gal)活性染色及び SHPCs における p16 発現解析を行った(図 7)。

図7 : SHPCs における細胞老化解析

A; SA- Gal 活性染色組織写真
B; SA- Gal 陽性率
C; SHPCs における p16 遺伝子発現



結果、移植 30 日目において、Control 群に比べ、Thy1 陽性細胞移植群で SA- Gal 陽性率が有意に増大していた (図 7-B)。また移植 60 日目において、SHPCs における p16 の遺伝子発現が有意に増大していた。しかしながら、肝細胞機能の低下は見られなかった。

以上の結果から、移植された Thy1 陽性細胞は EVs を分泌することによって、レシピエント由来の細胞を活性化させ、SECs で IL17B を、KCs で IL25 を、SHPCs で IL17rb を誘導させることで内在性の SHPCs を増大させ、肝再生に寄与するが、KCs の IL25 の作用により、肝細胞機能を維持したまま、細胞老化に陥ってしまう可能性が示唆された。今後、Thy1-EVs の中から IL17rb や肝再生促進シグナルを誘導する因子を同定することで、新規治療法の開発へつなげていきたいと考えている。

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 7 件)

1. Ishii M, Kino J, Ichinohe N, Tanimizu N, Ninomiya T, Suzuki H, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatocytic parental progenitor cells of rat small hepatocytes maintain a self-renewal capability after long-term culture. *Scientific Reports*, (2017) DOI: 10.1038/srep46177 査読あり
2. Tanimizu N, Ichinohe N, Yamamoto M, Akiyama H, Nishikawa Y, Mitaka T. Progressive induction of liver progenitor cells in chronically injured liver. *Scientific Reports*, Jan 4; 7: 39990 (2017) DOI: 10.1038/srep39990 査読あり
3. Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Kon J, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Transplantation of Thy1+ cells accelerates liver regeneration by enhancing the growth of small hepatocyte-like progenitor cells via IL17RB signaling. *Stem Cells*, Apr; 35(4): 920-931 (2017) DOI: 10.1002/stem.2548 査読あり
4. Tanimizu N, Ichinohe N, Ishii M, Kino J, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes in vitro and repopulate liver tissue. *Stem Cells*, 34(12): 2889-2901 (2016) DOI: 10.1002/stem.2457 査読あり
5. Tanimizu N, Kaneko K, Itoh T, Ichinohe N, Ishii M, Mizuguchi T, Hirata K, Miyajima A, Mitaka T. Intrahepatic bile

ducts are developed through formation of homogeneous continuous liminal network and its dynamic rearrangement. *Hepatology* Jul; 64(1): 175-188 (2016) DOI: 10.1002/hep.28521 査読あり

6. Okita K, Mizuguchi T, Ota S, Ishi M, Nishidate T, Ueki T, Meguro M, Kimura Y, Tanimizu N, Ichinohe N, Torigoe T, Kojima T, Mitaka T, Sato N, Sawada N, Hirata K. Pancreatic regeneration: basic research and gene regulation. *Surg Today*, Jun;46(6):633-40. (2016) doi: 10.1007/s00595-015-1215-2. 査読あり
7. Tanimizu N, Kobayashi S, Ichinohe N, Mitaka T. Downregulation of miR122 by grainyhead like-2 restricts hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells. *Development*, 141(23):4448-56. 2014. doi: 10.1242/dev.113654. 査読あり

[学会発表](計 13 件)

1. 市戸義久、石井雅之、木野潤一、谷水直樹、三高俊広. 障害肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞による肝再生促進機序の解析 第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年 3 月 7-9 日 (8 日口演発表) 仙台国際センター、仙台市
2. 市戸義久、谷水直樹、三高俊広. 間葉系細胞移植における細胞間相互作用と肝再生機構 第 23 回肝細胞研究会、2016 年 7 月 7-8 日 (木)(7 日ポスター発表) 大阪大学中之島センター、大阪市
3. 市戸義久、石井雅之、木野潤一、谷水直樹、三高俊広. 内在性肝前駆細胞増殖促進による肝再生誘導機構の解析 第 52 回日本肝臓学会総会、2016 年 5 月 19-20 日 (19 日口演発表) ホテルニューオオタニ幕張、千葉市
4. 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、三高俊広. 骨髄間葉系細胞による肝前駆細胞増殖促進機序の解析 第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12-14 日 (13 日口演発表)、仙台国際センター、仙台市
5. 市戸義久、石井雅之、木野潤一、谷水直樹、三高俊広. 細胞移植による内在性肝前駆細胞増殖促進機構の解析 第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17-19 日 (19 日口演発表)、大阪国際会議場、大阪
6. 市戸義久、石井雅之、木野潤一、谷水直樹、三高俊広. Thy1 陽性細胞由来液性因子による内在性肝前駆細胞増殖促進機構の解析 第 22 回肝細胞研究会、2015 年 6 月 4-5 日 (4 日ポスター発表)、米子コンベンションセンター、米子
7. 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、三高俊広. Thy1 陽性細胞移植における内在性肝前駆細胞増殖促進機構の解析 第 51 回

- 日本肝臓学会総会、2015年5月21-22日(22日口演発表)、同仁堂、熊本
8. 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、三高俊広 障害肝由来 Thy1 陽性細胞移植によるレシピエント由来肝前駆細胞増殖機序第104回日本病理学会総会、2015年4月30日-5月2日(5月1日ポスター発表)、名古屋国際会議場、名古屋市
 9. 市戸義久、石井雅之、木野潤一、今純子、谷水直樹、三高俊広 障害肝由来 Thy1 陽性細胞移植における内在性肝前駆細胞増殖機構の解析 第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19-21日(20日口演発表)、パシフィコ横浜、横浜
 10. 市戸義久、石井雅之、今純子、谷水直樹、三高俊広 Thy1 陽性細胞移植における内在性肝前駆細胞増殖機構の解析 第47回北海道病理談話会、2014年10月11日(口演発表)、旭川グランドホテル、旭川
 11. 市戸義久、石井雅之、今純子、谷水直樹、三高俊広 Thy1 陽性細胞移植におけるレシピエント由来肝前駆細胞増殖機構の解析 第21回肝細胞研究会、2014年6月27-28日(28日口演発表)、東京医科歯科大学、東京
 12. 市戸義久、石井雅之、今純子、谷水直樹、三高俊広 障害肝由来 Thy1 陽性細胞における肝再生機構の解析 第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29-30日(29日口演発表)、ホテルニューオータニ、東京
 13. 市戸義久、石井雅之、今純子、谷水直樹、三高俊広 障害肝由来 Thy1 陽性細胞移植における肝再生機構の解析 第103回日本病理学会総会、2014年4月24-26日(25日口演発表)、広島国際会議場、広島市

他、共同研究による学会発表 15 件

〔図書〕(計 1 件)

1. 市戸義久、石井雅之、谷水直樹、水口徹、平田公一、三高俊広 組織幹細胞と組織修復 Surgery Frontier. Vol 21. No. 3, 67-69, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：小型肝細胞の継代培養方法
発明者：三高俊広、石井雅之、市戸義久、谷水直樹、水口徹、平田公一
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2016-16210
出願年月日：平成 28 年 1 月 29 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue_R

[egeneration/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

(2)連携研究者

三高 俊広 (Mitaka Toshihiro)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50231618

谷水 直樹 (Tanimizu Naoki)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00333386