

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670584

研究課題名(和文)肝細胞機能を有するヒト肝前駆細胞株の樹立

研究課題名(英文)Research for the establishment of human hepatocytic progenitor cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：継代培養可能な肝幹細胞株の樹立を試みた。成熟ラット肝臓から分離培養した小型肝細胞コロニーからCD44抗体を用いて分離したCD44陽性小型肝細胞をMatrigel上で培養すると増殖しコロニー形成する細胞が出現し、その細胞は4回以上継代可能で4ヵ月以上増殖し続けた。細胞はAlbumin, HNF4 を発現し、形態的にも機能的にも肝細胞としての特徴を維持していた。Retrorsine/PH処置マウスへ移植すると肝細胞として生着する。またマウス小型肝細胞株の樹立に成功した。今後は、ラット・マウスで用いた方法を応用してヒト肝幹細胞の樹立を目指し、臨床応用に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：We performed the experiments to establish hepatocytic progenitor cell lines that can be subcultured. CD44-positive small hepatocytes (CD44-SHs) sorted from SH colonies were cultured in serum-free medium on Matrigel-coated dishes. CD44-SHs could be subcultured at least 4 times and maintain the growth ability for more than 4 months. The cells showed expression of hepatocyte-specific genes and proteins such as albumin and HNF4 in a whole period. CD44-SHs morphologically and functionally demonstrated typical characteristics as hepatocytes. When the cells were transplanted into NOG mouse livers, they could be engrafted and differentiate into hepatocytes. On the other hand, mouse SHs derived from a healthy adult mouse could be lined, which possessed hepatocytic characteristics. Although we succeeded in performing one passage of human SHs, we have not yet succeeded the sequential passages of human SHs. We try to establish human SH lines for clinical application in near future.

研究分野：実験病理学

キーワード：小型肝細胞 肝前駆細胞 継代培養 CD44 Matrigel 増殖 self-renewal 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

成体肝臓から分離した成熟肝細胞は、通常の方法で培養するとDNA合成するが細胞分裂できず増殖しない。しかしながら、劇症肝炎マウスにマウス成熟肝細胞を移植するモデルや、ラット成熟肝細胞を Retrorsine/PH 処置ラットに移植するモデルでは、レシピエント動物の肝臓の大部分はドナー肝細胞により置換される。さらにヒト肝細胞を uPA/SCID マウス肝臓に移植したヒト肝細胞置換マウスが作られている。ドナー肝細胞の大きさや ploidy に関わらずレシピエント動物の肝臓内で増殖できることから、成熟肝細胞は旺盛な増殖能力を持っていると考えられている。つまり、生体外では肝細胞が増殖できない何らかの障害が肝細胞に起こると考えられてきた。我々は、ビタミンの一種であるニコチナミドと増殖因子を添加した培養液を用いると成熟肝細胞は in vitro において多数回分裂し増殖することを見出した (Mitaka T et al Hepatology, 1991)。さらに肝細胞中に極めて増殖能の強い小型肝細胞が存在することを見出した (Mitaka T et al, Hepatology, 1992)。幹細胞は自己保持能・自己増殖能を持つが分化機能は有していないと定義されるが、小型肝細胞は基盤的な肝分化機能を維持しつつ、顕著な増殖能を持つ。そのため我々は、肝前駆細胞と総称しているが、個々の細胞の増殖能に違いがあることが分かっている。

2. 研究の目的

本研究では、小型肝細胞中に小型肝細胞を生み出す元になる幹細胞が存在すると仮定し、継代培養可能な肝幹細胞株の作成を試みた。正常成体肝臓から分離した小型肝細胞を適切な培養条件下で増殖させる方法の確立を目指した。我々は、ヒト小型肝細胞の分離培養法をすでに確立しているので、ラット・マウスにおいて確立した手法を用いて、ヒト小型肝細胞からも同様に肝幹細胞株を作成し、ヒト肝細胞の大量供給を可能にする手法の開発を最終目的とした。

3. 研究の方法

平成 26 年度は主にラット小型肝細胞から継代培養可能なクローンを作るために、その条件を検討した。27 年度はラットの実験を継続するとともにマウス及びヒト小型肝細胞の株化方法の検討を行った。

(1) 成熟雄ラット肝臓から分離した細胞をヒアルロン酸塗布培養皿上で無血清培養する (Chen Q et al, Nat Protocol, 2007)。

(2) 小型肝細胞コロニーから分離した細胞を抗 CD44 抗体でソートし、各種細胞外基質を塗布した培養皿で培養し、コロニー形成能を検討する。

(3) CD44 陽性小型肝細胞 (CD44-SHs) の継代培養を行い、増殖能及び分裂回数数の推定を行う。

(4) 継代培養可能な小型肝細胞の特性解析を行う。

網羅的遺伝子解析 (Agilent 社製)
Realtime PCR

Immunocytochemistry

Flow cytometry

(5) CD44-SHs に Matrigel® 投与による成熟化誘導を行い in vitro 分化能を検討する

(6) 継代培養した小型肝細胞を Retrorsine/PH モデルラット肝臓又は NOG mouse 肝臓に移植し、in vivo 分化能を検討する。

(7) マウス小型肝細胞の株化方法を確立し、in vitro/in vivo 分化能を検討する。

(8) ヒト肝組織から分離した細胞を用いてヒト小型肝細胞の継代培養法を検討する。

本研究は、札幌医科大学動物実験委員会及び倫理委員会の承認を得た後、行った。

4. 研究成果

(1) CD44-SHs の基質依存性

ヒアルロン酸塗布培養皿上に形成されたラット小型肝細胞コロニーを分離し、細胞を分散後、CD44 抗体を用いてソートした細胞を Collagens type I & type IV, Laminin, Fibronectin, Matrigel 塗布培養皿上に播種し、コロニー形成能を検討した。

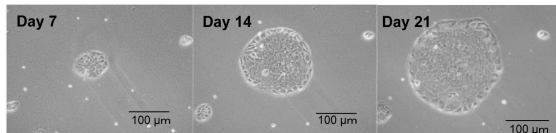


図1 Matrigel 上で増殖する CD44-SHs

CD44-SHs を Matrigel 上で培養すると、コロニーを形成し増殖し続けた (図1)。28 日目に分離し、再び Matrigel 上に播種すると、播種した細胞の約 15% は接着し、接着した細胞は増殖しコロニーを形成した。

CD44-SHs は基質依存性があり、Laminin, collagen type IV 上でもコロニー形成を認めるが、Matrigel 上で CD44-SHs は著明に増殖した (図2)。

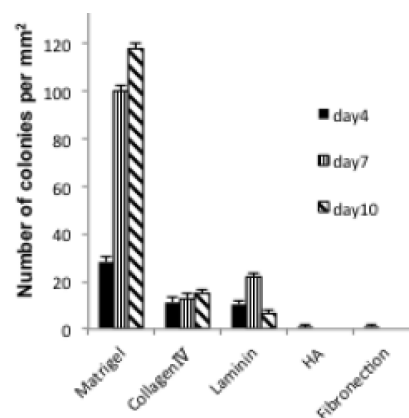


図2
CD44-SHs
の基質依存性増殖

(2) CD44-SHs の増殖に必要な因子の同定

培養液のいずれの成分がコロニー形成に必須であるか検討した。Nicotinamide を含まない培養液では細胞は増殖せず、コロニー形成は見られなかった。EGF 等の増殖因子が無くてもコロニー形成は認められることから Autocrine に増殖可能であるが、添加するとコロニー形成は促進された。また Insulin, Dexamethazone に CD44-SHs の増殖促進効果を認

めた(表1)。

CD44-SHs は Nicotinamide 及び増殖因子依存性に増殖すると考えられた。

	No. of colonies	No. of cells per colony	Labeling index (BrdU ⁺)
Control	113	35.4 ± 2.3	29.1 ± 1.5
Nicotinamide (-)	0	-	-
EGF(-)	45	18.1 ± 1.4 *	4.6 ± 0.9 *
ITS (-)	70	26.7 ± 2.1 *	24.3 ± 1.6
Dex (-)	79	25.3 ± 1.6 *	27.9 ± 2.1
Asc2P (-)	101	32.0 ± 2.6	32.9 ± 2.0

Mean ± SEM
*: p < 0.05, vs Control

表1 CD44-SHs 増殖に必要な因子

(3)CD44-SHs の増殖能

CD44-SHs の増殖能を継代毎に調べた。トリプシンで分離した細胞を Matrigel 塗布培養皿で培養した。播種した細胞の約 15% が生着し、その多くは単一細胞であった。10 個以上の細胞からなるコロニーの数と構成細胞数を一週毎に調べた。図3A は、コロニー構成細胞数の分布を示したものである。

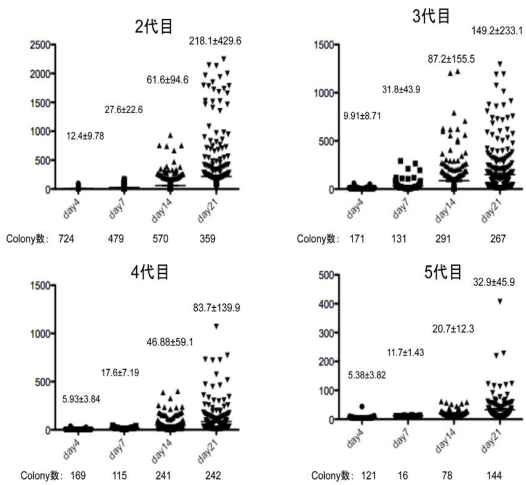


図3A CD44-SHs のコロニー形成能と増殖能

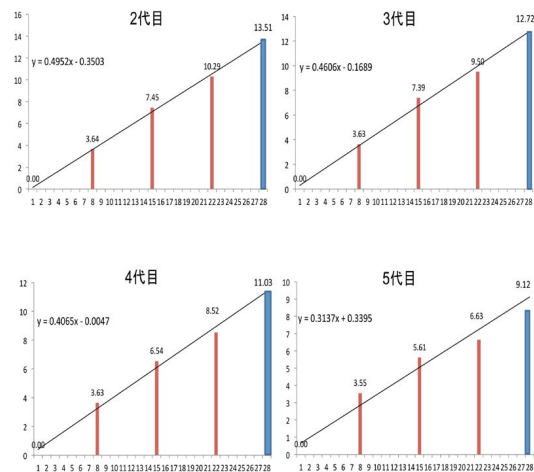


図3B CD44-SHs の各世代における分裂回数

個々のコロニーの増殖能に相違があり、増殖能の高いコロニーがそれぞれの継代に一定の割合で存在することが分かった。継代毎に増殖能

の高い(細胞数の多い)上位 10% のコロニーを選び、再プロットし近似曲線を求め、対数をとって、培養 28 日間における細胞の分裂回数の概算を試みた(図 3B)。その結果、CD44-SHs は、2、3 代目で平均約 13 回、4 代目で 11 回、5 代目でも 9 回分裂していた。初代で 6 回分裂したと仮定すると、一部の CD44-SHs は 4.5 ヶ月間に 50 回以上分裂していたことになる。

(4)CD44-SHs の特徴

増殖する CD44-SHs が、肝細胞の特徴を維持しているか免疫染色により確認した(図4)。

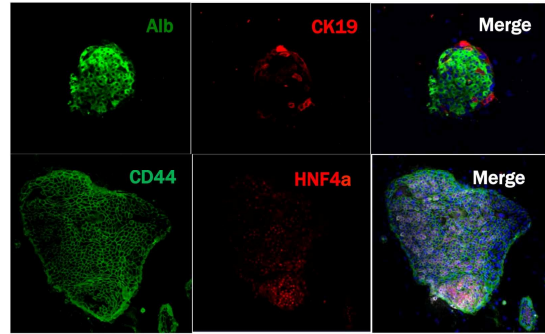


図4 3代目のコロニーの免疫染色像

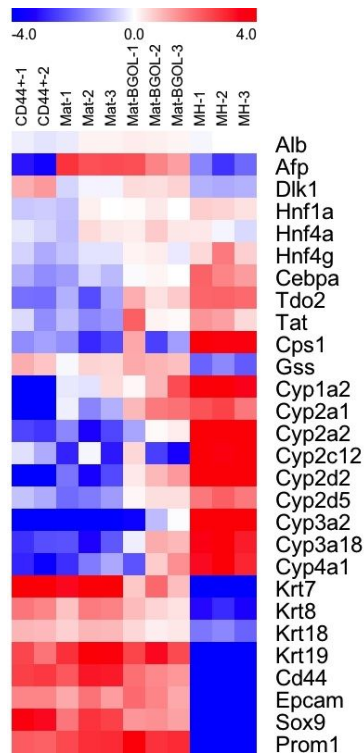


図5 網羅的遺伝子発現解析

CD44-SHs は継代を重ねても Albumin と CD44 の遺伝子及びタンパク質を発現していた。コロニー毎に割合は異なるが胆管上皮細胞マーカーである CK19 陽性細胞が存在していた。また 3 代目まではコロニー内に HNF4α 及び C/EBPα 陽性細胞が多数存在していたが、4 代目以降 C/EBPα を発現する細胞はほとんど認められなかった。

アジレント社製 microarray を用いて細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。CD44 抗体を用いて分離した初代の小型肝細胞 (CD44) に比較して Matrigel 塗布培養皿上で継代した CD44-SHs(Mat)

は、肝細胞特異的遺伝子である Albumin, Hnf4 α , GS 等を発現していた。

(5) CD44-SHs の in vitro 分化能

小型肝細胞は、旺盛な増殖能と基底膜成分を含む細胞外基質による成熟化能を持っている (Mitaka T et al, Hepatology, 1999; Sugimoto S et al, J Cell Biochem, 2002)。継代培養した CD44-SHs もこの様な能力を維持しているか検討した。図 5 で示すように Matrigel 投与により成熟化誘導した細胞(Mat-BGOL)は、Cebpa, Tdo2, Tat, Cps1, Cyps のような高分化機能を担う遺伝子を投与前と比較し高発現していた。また CK19, Sox9 等の胆管細胞マーカーの発現低下を認め、Albumin 及び Tdo2 遺伝子発現は、優位に発現増加していることを確認した(図 6)。

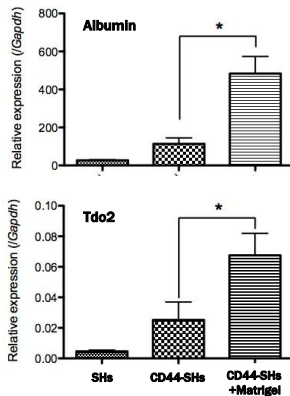


図6 qPCRによる遺伝子発現解析

肝細胞の機能の一つである解毒において重要な働きをする薬物代謝酵素 Cytochrome P450 のタンパク質発現も Matrigel 投与により誘導され、CYP3A 活性も持っていることが分かった(図7)。

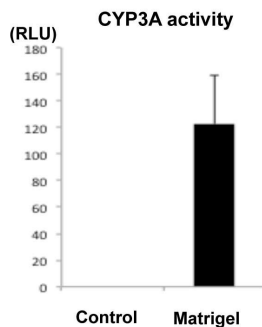


図7 Matrigel投与に誘導されたCYP3A活性

図8で示すように PAS 陽性の Glycogen が細胞質中に増加した。Glycogen 顆粒の存在は透過電子顕微鏡でも確認している (data not shown)。

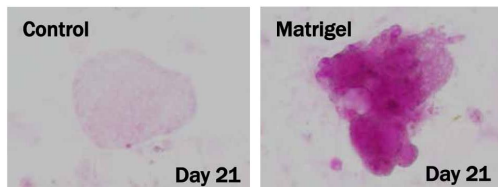


図8 PAS染色

小型肝細胞は、基底膜様構造の存在により3次元的に組織化し類肝組織 Hepatic organoid を

形成する。組織内には毛細胆管網が発達する。Fluorescein Diacetate (FD)は、肝細胞内で代謝されると Fluorescein として MRP2 を介して毛細胆管内に分泌される。FD を培養液に加え、類肝組織内に毛細胆管ネットワークが形成されるか否か検討した

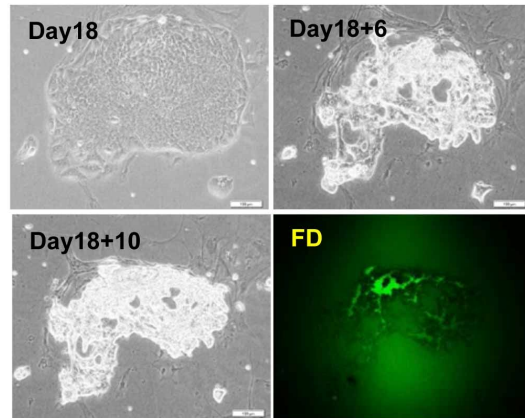


図9 Hepatic organoidを形成した細胞にFDを投与し、毛細胆管形成を調べた

類肝組織内に蛍光が網目状に見られ、毛細胆管網が形成されていることが分かった。

(6) CD44-SHs の生体内での分化能

CD44-SHs()が生体内で肝細胞へ分化可能か、NOG マウス肝臓()に脾臓経路で移植を行った。

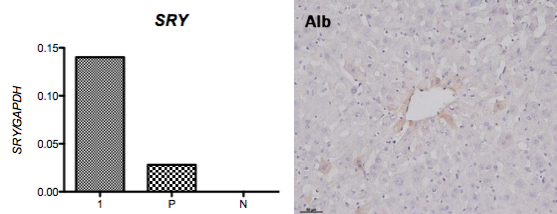


図10 NOG マウス肝臓におけるドナー細胞(Sry)の存在、移植8週間後の肝組織のqPCRとラットアルブミン免疫染色

図 10 で示すように移植 8 週間後のマウス肝臓に Sry 遺伝子の発現が認められ、ドナー細胞の生着が確認された。ラットアルブミンに特異的に反応する抗体を用いて免疫染色を行い、ドナー細胞の生着部位を調べたところ、肝小葉内に散在して存在し、特に pericentral zone に多く認められた。

(7) マウス小型肝細胞の株化方法の確立と in vitro/in vivo 分化能の検討

ラットと同様に、低速の遠心分離を繰り返すことによって、小型肝細胞分画から小型肝細胞を培養することは可能であった。しかしながら、胆管上皮細胞が多く混入するために、肝細胞コロニーを選択的に形成させることが困難であった。そこで、FACS を用いて、非血球分画の ICAM-1(+)/EpCAM(-)細胞を分離した(図 11A)。

この分画には、小型肝細胞が濃縮されており Laminin 111 上で培養することにより、継代可能なクローンを得ることができた。

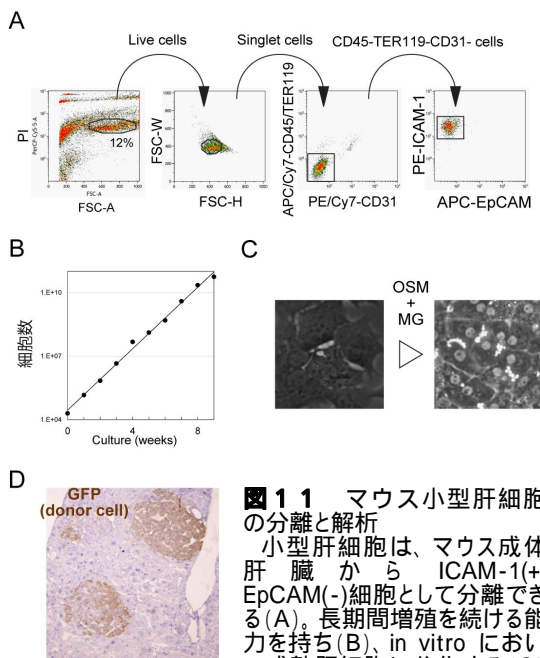


図 11 マウス小型肝細胞の分離と解析
 小型肝細胞は、マウス成体肝臓から ICAM-1(+)
 EpCAM(-)細胞として分離できる(A)。長期間増殖を続ける能力を持ち(B)、in vitro において成熟肝細胞に分化する(C)。

また、移植を行うと、レシピエント肝臓に肝細胞として生着する(D)。

これらの細胞は、in vitro において増殖能を維持し(図 11B)、肝細胞への分化能も維持していた(図 11C)。また、Retrorsine 処理後、70%部分肝切除を行ったヌードマウスに脾臓経路で移植すると、レシピエント肝臓に肝細胞として生着した(図 11D)。特に Oncostatin M を用いて分化誘導をした細胞を移植すると生着率・置換率が向上した。

(8)ヒト肝前駆細胞の継代培養

ヒト小型肝細胞はラットと同様に HA 上で増殖することがわかっている(Sasaki K et al, Cell Transplant, 2008)。CD44 抗体を用いてヒト小型肝細胞の継代培養を試みた。CD44-hSHs はラットの場合と同様に Matrigel 上でコロニーを形成した。しかしながら、CD44-hSHs の継代培養では非実質細胞の増殖が著しく、3 代目への継代には成功していない。ラット・マウスとは異なる手法の開発が必要と考えられ、引き続き検討することとした。

本研究により、正常成体肝臓の肝細胞中には、極めて高い増殖能を有する肝細胞(SHs)が存在し、その中に更に SHs を供給する幹(前駆)細胞相当の細胞が存在し得ることを明らかにできた。それらの細胞の特性解析を慎重に行い、マウスで成功した手法を参考にラット及びヒト細胞の株化方法の確立を目指す。また肝幹・前駆細胞移植による細胞治療方法を確立するために、ドナー細胞の生着・置換効率を向上させる手法の開発を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. 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 luminal network and its dynamic rearrangement. Hepatology, in press (2016) doi: 10.1002/hep.28521 査読有り

2. Tanimizu N, Mitaka T. Morphogenesis of Liver Epithelial Cells. Hepatol Res, in press (2016) doi: 10.1111/hepr.12654 査読有り
3. Kasuya J, Sudo R, Masuda G, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of hepatic stellate cell-incorporated liver sinusoidal structures in small hepatocyte tri-culture using microporous membranes. J Tissue Eng Regen Med, 9(3):247-256 (2015) doi: 10.1002/term.1630 査読有り
4. Tanimizu N, Kobayashi S, Ichinohe N, Mitaka T. Downregulation of miR122 by grainyhead like-2 restricts the hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells. Development, 141(23): 4448-4456 (2014) doi: 10.1242/dev.113654 査読有り
5. Tanimizu N, Nishikawa Y, Ichinohe N, Akiyama H, Mitaka T. Sry HMG box protein 9-positive (Sox9+) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM-) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration. J Biol Chem, 289: 7589-7598 (2014) doi: 10.1074/jbc.M113. 517243 査読有り
6. Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ooe H, Ichinohe N, Hirata K, Mitaka T. Preoperative hepatocyte transplantation prevents cirrhotic rats from receiving the fatal damage by a liver resection. Cell Transplantation, 23: 1243-1254 (2014) doi: 10.3727/096368913X668649 査読有り

[学会発表](計 35 件)

1. 谷水直樹, 市戸義久, 石井雅之, 木野潤一, 水口徹, 三高俊広. 「成体の肝前駆細胞を用いた Ex vivo での機能的肝細胞の増幅」第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 19 日, 大阪国際会議場, 大阪市
2. 石井雅之, 市戸義久, 木野潤一, 谷水直樹, 水口徹, 三高俊広. 「継代培養可能な成熟ラット由来肝細胞の分離とその特性解析」第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 18 日, 大阪国際会議場, 大阪市
3. 三高俊広, 市戸義久, 石井雅之. シンポジウム 3 肝再生 基礎から臨床 「細胞移植によるレシピエント肝細胞の再生」第 19 回日本肝臓学会大会, 2015 年 10 月 8 日(木), グランドプリンスホテル新高輪, 東京都
4. 石井雅之, 市戸義久, 木野潤一, 谷水直樹, 三高俊広. 「長期間増殖可能な成熟ラット肝細胞の分離培養法」第 23 回日本肝臓医学物学会, 2015 年 9 月 26 日, 丸駒温泉, 千歳市
5. 谷水直樹, 西川祐司, 三高俊広. シンポジウム 1

- 「肝再生の Update」肝上皮細胞が示す分化可塑性の制御機構の解明」第 22 回肝細胞研究会、2015 年 6 月 4 日、米子コンベンションセンター、米子市
6. 三高俊広、ワークショップ 6「臨床応用の基盤形成を目指した肝再生研究の新展開」基調講演「新生肝細胞による治療を目指した研究の現状」第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 22 日、ホテル日航熊本、熊本市
 7. 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 5 月 1 日、名古屋国際会議場、名古屋市
 8. 谷水直樹、西川祐司、市戸義久、三高俊広。「慢性肝障害時に誘導される Sox9(+)肝前駆細胞の組織再生への寄与」(口演)第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 20 日、パシフィコ横浜、横浜市
 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」(口演)第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 20 日、パシフィコ横浜、横浜市
 10. Tanimizu N、Nishikawa Y、Mitaka T. International Session (Symposium) 1 “Lineage plasticity of cholangiocytes and hepatocytes in liver regeneration. “(Oral) in Stem cells in liver regeneration and therapy: Present and future scope. 第 18 回日本肝臓学会大会、2014 年 10 月 23 日、ポートピアホテル、神戸市
 11. 谷水直樹、金子洸太、伊藤暢、三高俊広。「マウス肝臓の胆管形成過程の 3 次元的解析」(口演)第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館、京都市
 12. Tanimizu N、Mitaka T. Molecular mechanisms defining the lineage plasticity of cholangiocytes. (Oral & Poster) 2014 FASEB Summer Research Conference, July 6-11, 2014, Keystone Lodge, Keystone, CO, USA
 13. 小林誠司、谷水直樹、三高俊広。「胆管上皮細胞の分化能を制御する分子メカニズムの解析」(ポスター賞)第 21 回肝細胞研究会、2014 年 6 月 27 日、東京医科歯科大学、東京都
 14. 三高俊広、市戸義久。「細胞移植と肝再生：動物モデルからの考察」ワークショップ 2 臨床応用を視野に入れた肝再生研究の新たな展開。第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29 日、ホテルニューオータニ、東京都
 15. 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」(口演)第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29 日、ホテルニュー

ーオータニ、東京都

(図書) (計 1 件)

1. Mizuguchi T、Mitaka T、Hirata K. Role of Branched Chain Amino Acids in Cellular and Organ Damage: The prognostic significance of the preoperative branched chain amino acid to tyrosine ratio. In Rajendram R, Preedy VR, Patel VB, Eds. In branched chain amino acids in health and disease. London: Springer; 2015, pp65-77

(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: 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-16210

出願年月日: 2016 年 1 月 29 日

国内外の別: 国内

(その他)

ホームページ等: 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門

http://web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue_Development_%26_Regeneration/Tissue_Devel%26Regen.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・准教授

研究者番号: 00333386

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

(3) 連携研究者

平田 公一 (HIRATA Koichi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 50136959