

200/0468

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ヒト肝組織からの肝幹細胞分離・同定及び分化誘導と
肝不全治療に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 岡 義 生

平成14(2002)年4月

目 次

I. 総括研究報告		
研究の統括、ヒト肝組織の採取と 臨床応用のための評価に関する研究		
山岡 義生	-----	1
II. 分担研究報告		
1. ヒト小型肝細胞の分離法の開発に関する研究		
三高 俊広	-----	13
2. ヒト肝組織から肝組織幹細胞分離・同定に関する研究		
猪飼 伊和夫	-----	19
3. ヒト肝幹細胞分離・同定に関する研究		
廣瀬 哲朗	-----	24
4. ヒト組織形成に関する情報提供		
塩田 浩平	-----	34
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	42

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

「ヒト肝組織からの肝幹細胞分離・同定及び分化誘導と肝不全治療」に関する研究
主任研究者 山岡 義生 京都大学消化器外科・教授

研究要旨

本研究の目的は、ヒト肝組織から小型肝細胞や肝幹細胞を分離・同定し、成熟肝細胞に分化誘導させ、この細胞が肝不全の治療に有効であるかを検討することである。研究1年目の本年度においては、分担研究者の三高の研究により、成熟ラットから小型肝細胞を分離培養し、小型肝細胞を増殖能・分化能は保ったまま最長90週凍結保存可能な手法を確立した。さらに基底膜成分からなる細胞外基質（Matrigel）の投与により増殖する小型肝細胞の成熟化を誘導することが可能となった。

また分担研究者の猪飼の研究では、手術検体より得られたヒト正常肝組織成体肝からヒトの小型肝細胞の分離を試みたが、ラット小型幹細胞分離と同じ手法では分離不可能であった。しかし、ヒト成熟肝細胞の長期培養の過程でヒト血清を用いた培養により、増殖能を持った小型の肝細胞が成体ヒト肝組織にも存在することが確認された。

分担研究者の廣瀬の研究では、成体マウス肝の非実質細胞分画を浮遊培養することで、未分化内胚葉細胞マーカーであるアルファフェトプロテイン陽性細胞を効率よく採取可能となった。また分化培地の利用により、この細胞が成熟肝細胞への分化誘導が可能な肝前駆細胞であることも検証された。さらに、内胚葉系細胞に高い green fluorescent protein (GFP) 発現を示すトランスジェニックマウスを利用した蛍光励起セルソーターでのモノクローナルな解析の結果から、この細胞が多分化能・自己複製能を有する肝幹細胞と同定された。マウス肝幹細胞が同定・分離されたことより、ヒト組織からの肝幹細胞分離に必須である肝幹細胞の表面抗原・細胞特性解析も可能となった。

上記に加えて、将来的には胚性幹細胞から分化誘導された成熟肝細胞をも細胞源として利用する目的のため、その前段階として遺伝子導入によりマウス胚性幹細胞から肝系未分化内胚葉細胞へと分化した細胞を容易に検出・分離する手法を検討し、霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入の検討もおこなった。

A. 研究目的

正常機能を持つヒト肝細胞の供給源の開発とその臨床応用をめざし、ヒト肝組織から小型肝細胞や肝幹細胞を分離・同定し、成熟肝細胞に分化誘導させ、この

細胞が肝不全の治療に有効であるかを検討することを目標としている。本研究1年目の本年度はまず実験動物での検討として、ラットを用いて小型肝細胞の分化・成熟化誘導、凍結保存方法の確立、お

よびマウス成体肝組織に存在する肝幹細胞を同定・分離・精製することを主たる目標とした。さらにヒト検体を用いた実験では、これまでの知見をふまえてヒト正常肝組織から小型幹細胞・肝幹細胞を同定・分離することを目標とした。

B. 研究方法

(1) ラット小型肝細胞の分化・成熟化誘導およびその凍結保存実験

・成熟雄ラット肝臓をコラゲナーゼ液にて灌流分離後、小型肝細胞からなるコロニーを laminin, fibronectin, type IV collagen, mixture of laminin and type IV collagen, Matrigel 等の細胞外基質を投与して培養をおこなう。培養液中には増殖因子として TGF β , basic FGF, bNGF, PDGF を加える。

・分化・成熟化検討は tryptophan dioxygenase (TO), fibrinogen, carbamoylphosphate synthetase (CPS) I, transferrin, 肝細胞特異的転写因子 HNF4a, HNF6, C/EBP α 蛋白質などの発現を、増殖能の検討は PCNA 蛋白質の発現を用いて検索し、超微形態は電子顕微鏡にて検討する。

・CellBanker を用いて小型肝細胞を -80 度の超低温冷凍庫にて長期間保存する。37度急速解凍後に培養を行い、接着したコロニー数、コロニーの増殖率、albumin の分泌能、fibrinogen, CPS I, transferrin, TO 蛋白質産生、電子顕微鏡による超微形態観察を凍結前と比較検討する。

(2) マウス成体肝組織からの肝幹細胞

分離・同定・分化誘導実験

・成熟雄マウス肝臓をコラゲナーゼ灌流にて細胞分離し、その非実質細胞分画を低酸素浮遊培養させることで、混入している成熟肝細胞を除外しつつ接着細胞を細胞集塊として採取する。

・採取した細胞塊のうち接着培養後に得られるコロニーの特性解析を行い、その中に存在する未分化内胚葉系細胞の増殖能・分化能・成熟化能を検証する。

・内胚葉系の characterization には、細胞免疫染色や Western blot 法を用いてアルファフェトプロテイン発現を、他 lineage の検討は Latex beads や Dil labeled AcLDL の取り込み、 α -Smooth muscle actin の免疫染色および RT-PCR によるマーカー発現で確認する。

・分化誘導培地として、DMEM にインスリン、ascorbic acid、DMSO、Dexamethazon を加えたものを用いる。さらに、長期培養後の成熟化の検討には肝成熟化マーカーとして tryptophan dioxygenase (TO)、transferrin、 α 1-antitrypsin(AAT) 等の発現を RT-PCR 法などを用いて検討し、超微形態を電子顕微鏡にて検討する。

・さらに、肝内では内胚葉系細胞に強く green fluorescent protein(GFP)を発現する成熟雄マウス肝臓を用いて、細胞の大きさと GFP 強度を指標に未分化内胚葉細胞を精製することでクローナルな解析を可能とし、その多分化能・自己複製能などの幹細胞としての特性を検証する。この細胞の特異的な表面マーカーを検証するべく、その候補となる細胞接着因子や血球系未分化細胞マーカーなどの発現をフローサイトメトリーを用いて検討し、肝幹細胞特異的マーカーを同定する。

(3) ヒト成体肝組織からの小型肝細胞および肝幹細胞の分離・同定実験

・ヒト検体は京都大学医学部附属病院で肝腫瘍のため肝切除を施行された症例において、「京都大学医学部医の倫理委員会」の承認のもと、腫瘍に付随して切除された正常部肝臓組織を用いる。

・切除された正常部肝臓組織からコラゲナーゼ液を用いた穿刺2段階還流法にて細胞を単離した後、我々がマウスで確立した方法を用いて、肝幹細胞を採取する。

・マウスと同様にアルファフェトプロテイン、アルブミン、サイトケラチン19の発現をRT-PCR法および細胞免疫染色法を用いて検証し、肝幹細胞の同定およびその多分化能を検討する。

(4) 胚性幹細胞から肝幹細胞への分化誘導実験

・マウス胚性幹細胞にアルブミンプロモーター下でGFPを発現するプラスミドを遺伝子導入し、GFP発現を元に肝系未分化内胚葉細胞を同定・分離し、上記と同様に分化誘導を検討する。

・平成14年度に京都大学再生医科学研究所以て樹立予定のヒト胚性幹細胞の利用を考慮し、同研究所で既に樹立されたカニクイザル胚性幹細胞にマーカー遺伝子の導入を行いその導入効率を検討する。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた実験は「京都大学医学部医の倫理委員会」の承認のもと、動物実験は京都大学動物取扱

規程および札幌医科大学動物取扱規程に則り、大学の実験許可を受けて実施している。

C. 研究結果

(1) ラット小型肝細胞の分化・成熟化誘導およびその凍結保存実験

小型肝細胞の分化・成熟化の検討では、Matrigelの投与により小型肝細胞は形態変化を示し、3次元構築を伴って索状構造を形成しつつゆっくり増殖し、それと共に分化マーカーのTO, fibrinogen, CPS I, transferrin, HNF4a, HNF6, C/EBPα 蛋白発現が増加した。一方、Laminin, Fibronectin, type IV collagen, mixture of laminin and type IV collagen 投与では、小型肝細胞による3次元構築は誘導されなかった。また発現量はMatrigelの場合に比較して少なかったものの、分化マーカーのTO蛋白質の発現はコントロールに比べて促進された。増殖能の検討ではPCNA蛋白質の発現は、Laminin, Fibronectin, type IV collagen, mixture of laminin and type IV collagen 投与によってもコントロールとほとんど変わりがなかったが、Matrigel投与によってその発現が抑制された。増殖因子に関しては、TGFβが0.1 ng/ml以上の濃度では小型肝細胞の増殖を抑制し、1 ng/ml以上では明らかに細胞死を誘導することが確認されたが、その他の増殖因子では小型肝細胞による3次元構築・分化マーカー発現・増殖能に変化はなかった。Matrigelにより分化誘導を受けた小型肝細胞は背丈が増し細胞質が大きくなり、超微形態観察においてもその細胞質内にミトコンド

リア、粗面小胞体、peroxisome、glycogen 顆粒が豊富に存在し、細胞間には毛細胆管構造が良く発達していることから成熟化していることが確認された。

小型肝細胞は単細胞の状態では-80度で凍結保存するとほぼすべての細胞が死ぬが、コロニーの状態では長期間の凍結保存が可能であり、凍結解凍後の生着率は約60%であった。また、最長90週凍結保存した小型肝細胞を増殖させることも可能であり、凍結後もその増殖能・アルブミンの産生能・他の蛋白産生能が維持されていた。

(2) マウス成体肝組織からの肝幹細胞分離・同定・分化誘導実験

コラゲナーゼ処理にて成体肝臓から分離採集された肝非実質細胞分画の細胞を低酸素条件下で数時間浮遊培養させることにより、混入している成熟肝細胞を除外し、細胞接着因子のホモフィリックな結合により同種細胞同士が結合して出来る細胞塊が採取された。この細胞塊から得られたコロニーの5%は上皮様形態を示し、未分化内胚葉細胞マーカーであるアルファフェトプロテインやアルブミン、サイトケラチン19陽性細胞で構成されるが、培養初期はVE-カドヘリンやデスミン陽性の血管内皮細胞や星細胞の混入を認めた。しかしながら、そのコロニーをDMEMにインスリン、ascorbic acid、DMSO、Dexamethazonを加えた分化培地にて培養していくと、クッパー細胞や血管内皮細胞、星細胞等は消失していく一方、アルブミン、サイトケラチン19単独陽性のコロニーが見られるようになり、さらに成熟肝細胞特異的遺伝子発現も認めた。さらに形態学的に観察

される2核細胞の出現や細胆管の形成、電子顕微鏡でのミトコンドリアやペルオキシゾームなどの細胞内顆粒の増加およびtight junctionやmicrovilliの存在からも肝細胞への成熟化が確認され、この上皮様形態を示すコロニー中における幹細胞の存在が示唆された。

次いで、クローナルな解析を可能とするために、我々のGFPトランスジェニックマウスが肝臓では内胚葉系細胞に強くGFPを発現していることと上記で得られた細胞の大きさを指標として肝幹細胞分離を試みた。GFPトランスジェニックマウスの成体肝から得られた肝非実質細胞分画(SSC^{low})中でGFP強発現群のみをフローサイトメトリーで細胞分離・培養したところ、形態学的に未分化内胚葉系細胞に類似したアルファフェトプロテイン陽性細胞が分離された。培養を続けると細胞一つ一つからアルブミン、サイトケラチン19単独陽性細胞やそれらを共に発現する細胞が出現・増殖し、分化成熟細胞出現後にも元の細胞と同じサイズとGFP発現を示す未分化内胚葉系細胞が存在したことから、これらの細胞が多分化能・自己複製能を有する肝幹細胞と考えられた。

さらにこのGFP^{high}、SSC^{low}の細胞の表面抗原解析から、肝幹細胞分離に必須である肝幹細胞特異的な表面抗原に関する知見が得られつつあり、現在この結果をGFP陰性の通常マウスに適用し、これらの表面抗原マーカーが肝幹細胞分離に必要十分であるかの検討を行っている。

(3) ヒト成体肝組織からの小型肝細胞および肝幹細胞の分離・同定実験

分担研究者の廣瀬によりマウス成体肝

から肝幹細胞の同定・分離が可能となってきたため、我々はさらにヒト検体からの肝幹細胞分離を試みた。マウス成体肝幹細胞採取と同様の手法をヒト検体正常部肝臓に用いることで、ヒト成体肝臓からも形態学的に肝幹細胞と思われる細胞が採取された。接着培養後に免疫染色にてこの細胞の蛋白発現を検討するとアルファフェトプロテイン、アルブミン、サイトケラチン19陽性であり、マウスで得られた肝幹細胞に相当する細胞がヒト検体正常部肝組織からも採取可能であることが示唆された。

(4) 胚性幹細胞から肝幹細胞への分化誘導実験

また、将来的には胚性幹細胞から分化誘導された成熟肝細胞の利用を考慮していることから、我々はその前段階となる実験動物由来胚性幹細胞への遺伝子導入やその分化誘導法をも検討をはじめた。マウス胚性幹細胞に、アルブミンプロモーター下に内胚葉系細胞のみで特異的にGFPを発現するプラスミドを遺伝子導入して培養するとEmbryoid body内にGFP陽性細胞が確認された(図1)。このことは内胚葉系に分化した肝幹細胞をGFPをマーカーとしてセルソーターを用いて分離できることを示しており、現在このGFP陽性細胞の遺伝子発現や、さらなる成熟化の誘導方法を検討中である。

また、京都大学再生医科学研究所にて樹立されたカニクイザル胚性幹細胞に蛍光標識としてDsRedを発現するマーカー遺伝子を導入してその導入効率の検討をおこなったところ、高い導入効率を得られることが確認出来たが(図2)、現時点では手技的に不安定であるため、こ

れに関しては更なる検討を要する。

D. 考察

我々はこれまでのマウスを用いた研究により、成体肝臓からも成熟肝細胞と胆管上皮細胞に分化しうる肝幹細胞とも言うべき未分化細胞を効率よく高純度に分離・同定が可能となり、さらにその手法を応用することでヒト検体から肝幹細胞に相当する細胞の分離が可能となりつつある。

肝幹細胞の同定・分離に関しては、これまで肝前駆細胞同士がホモフィリックな細胞接着因子(おそらくE-Cadherinであると我々は考えている)の結合により細胞塊を形成することを利用して分離してきたが、マウスにおいては本年度のGFPトランスジェニックマウスを用いた研究により、セルソーターを用いて肝幹細胞を同定でき、さらにヒトでも肝幹細胞を分離するために必須である肝幹細胞特異的な表面抗原に関する知見が得られつつある。このことはより純粋に肝幹細胞を分離出来るようになるだけでなく、特異的な表面抗原のヒトホモログを用いることでヒト肝組織からも肝幹細胞が分離出来ることを意味しており、来年度にはヒトからの肝幹細胞分離を目指してさらに検討を進める計画である。

本年度の研究結果から得られた小型肝細胞や肝幹細胞から成熟肝細胞への分化誘導に関しては、現在までに培地や添加する増殖因子を変えることによりmRNAの発現レベルでは成熟肝細胞特異的な遺伝子発現を誘導することが可能となりつつあるが、機能を含めた成熟度が成体肝細胞と比べて十分なものであるかは検討

の余地がある。今後の肝不全症例などへの臨床応用を考慮した場合、採取した肝幹細胞を目的とする成熟細胞へと確実に分化誘導する方法を確立し、十分な成熟機能を有する細胞を必要に応じて適宜利用できるようになる必要があるため、分化誘導法についても今後さらなる改良が必要である。これを可能とするべく来年度にかけては、分化段階が異なる肝系細胞を材料に subtraction 法や microarray 法などを用いた分子生物学的解析を行い、肝細胞の分化・増殖に関わるマスター遺伝子を検討し、分化誘導法を最適なものとしていく計画である。マウスにおける最適な分化誘導法が確立できた際には、現在分離可能となっているヒト肝幹細胞からのヒト成熟肝細胞分化にこれを応用していく計画である。

さらに機能面に関しては、特異的蛋白が検出できるのみならず、試験管内でのアルブミン産生能、薬物代謝能など実際に即した機能評価や、マウスを用いての移植実験を含む前臨床試験での治療効果等の検討をも行う必要があることから、これらの検討も考慮している。

一方、平成14年度には京都大学再生医科学研究所においてヒト胚性幹細胞が樹立される予定であり、肝細胞の分化・増殖に関わるマスター遺伝子が解明されれば、ヒト胚性幹細胞から成熟肝細胞への分化誘導の可能性が現実近づき、将来的な細胞源として有用であると考えている。

E. 結論

・ラット小型肝細胞の増殖と分化・成熟化は肝非実質細胞の産生する細胞外基質

により調整され、基底膜様構造・成分の存在下で成熟化する。さらに小型肝細胞は、増殖能・分化能を維持しながら長期間凍結保存可能で、解凍後にも増殖可能である。

・マウス成体肝内に存在する、自己複製能および肝細胞・胆管細胞への分化能を有する肝幹細胞を効率よく分離・同定することが可能となった。

・肝幹細胞を分化誘導培地で培養することにより、成熟肝細胞特異的遺伝子発現の誘導が可能であった。

・表面抗原解析により、ヒトでの肝幹細胞を分離するために必須である肝幹細胞特異的な表面抗原に関する知見が得られつつある。

・遺伝子導入を用いて内胚系細胞のみに特異的に GFP を発現させることでマウス胚性幹細胞から肝系内胚葉に分化した細胞を採取することが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Shiota K. Toward the prevention of human birth defects: a personal perspective. *Congenital Anomalies* 41:72-75 (review) (2001).
2. Kobayashi M, Nakamura H, Yodoi J, Shiota K. Ontogenesis of anti-oxidative enzymes in mouse embryos and fetuses: An immunohistochemical study. *Italian Journal of Anatomy and*

- Embryology*, 106 (2 Suppl 2):137-142 (2001)
3. Hinoue A, Fushiki S, Nishimura Y, Shiota K. In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain. *Developmental Brain Research* 132(1):59-676 (2001)
 4. Bessho Y, Sakata R, Komatsu S, Shiota K, Yamada S, Shinkai Y, Kageyama R. Dynamic expression and essential function of *Hes7* in somite segmentation. *Genes and Development* 15(20):2642-2647 (2001)
 5. Ikenouchi J, Uwabe C, Nakatsu T, Hirose M, Shiota K. Embryonic hydromyelia: Cystic dilataion of the lumbosacral neural tube in human embryos. *Acta Neuropathologica* 103(3): 248-254. (2002)
 6. Mitaka T. Hepatic Stem Cells: From Bone Marrow Cells to Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 281(1):1-5 (2001)
 7. Hirata K, Ikeda S, Honma T, Mitaka T, Furuhata T, Katsuramaki T, Hata F, Mukaiya M. Sepsis and cholestasis: basic findings in the sinusoid and bile canaliculus. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8(1): 20-26 (2001). (Review)
 8. Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, in press (2002) (Review)
 9. Higaki N, Mitaka T, Sato F, Hirata K, Mochizuki Y. Maintenance of connexin 32 and 26 expression in primary cultured rat hepatocytes treated with 3-acetylpyridine. *J Gastroenterol Hepatol* 16(7): 806-815 (2001)
 10. Mizuguchi T, Kamohara Y, Hui T, Neuman T, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Regulation of c-met expression in rats with acute hepatic failure. *J Surg Res* 99(2): 385-396 (2001)
 11. Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiyama N, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Enhanced proliferation and differentiation of rat hepatocytes cultured with bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 189(1): 106-119 (2001)
 12. Mitaka T, Sato F, Ikeda S, Sugimoto S, Higaki N, Hirata K, Lamers WH, Mochizuki Y. Expression of carbamoylphosphate synthetase I and glutamine synthetase in hepatic organoids reconstructed by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Cell Tissue Res* 306(3): 467-471 (2001)
 13. Mizuguchi T, Palm K, Hui T, Aoki T, Mochizuki Y, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Effects of bone marrow stromal cells on the structural and functional polarity of primary rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol*, in press (2002).
 14. Ikeda S, Mitaka T, Sugimoto S, Harada K, Mochizuki Y. Proliferation of rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *J Hepatology*, in press, (2002)
 15. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Shiotani T, Matsushita T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Kanazawa A, Terajima H, Mochizuki

- Y, Yamaoka Y. Long-Term Culture of Primary Human Hepatocytes with Preservation of Proliferative Capacity and Differentiated Functions. *J Surg Res*, in press (2002)
16. Sugimoto S, Mitaka T, Ikeda S, Harada K, Ikai I, Yamaoka Y, Mochizuki Y. Morphological Changes Induced by Extracellular Matrix Are Correlated with Maturation of Rat Small Hepatocytes. *Hepatol*. In press (2002)
17. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Shiotani T, Matsushita T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Kanazawa A, Terajima H, Mochizuki Y, Yamaoka Y. Long-Term Culture of Primary Human Hepatocytes with Preservation of Proliferative Capacity and Differentiated Functions. *J. Surg Res.* in press (2002)
18. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. Alpha fetoprotein positive immature endodermal cells from adult mouse liver. in press (2002)
19. Yasuchika K, Hirose T, Yamaoka Y, Fujii H, Oe S, Azuma H, Fujikawa T. Establishment of efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells. *Hepatology* in press (2002).
20. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatology* in press (2002) .
21. Oe S, Hirose T, Fujii H, Yasuchika K, Nishio T, Iimuro Y, Morimoto T, Nagao M, Yamaoka Y. Continuous intravenous infusion of deleted form of hepatocyte growth factor attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol* 34:832-9, 2001.
22. 三高俊広. 肝臓の幹細胞. *Molecular Medicine* 38(1): 8-15 (2001) (総説)
23. 三高俊広、池田慎一郎、杉本真一. 肝臓の再生. *肝胆膵* 42(2):195-201 (2001) (総説)
24. 三高俊広、原田 敬介、池田慎一郎、杉本真一. 肝臓の幹細胞システム. *GI Research*, 19(3), 229-234 (2001) (総説)
25. 池田慎一郎、三高俊広. 幹細胞・クローン研究プロトコール、中辻憲夫編、羊土社、東京、171-178 (2001)
26. 三高俊広. 動き出した再生医療の臨床 -肝臓-. *分子細胞治療* 1(1): 78-85 (2002) (総説)
27. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療の実際とこれからの展望. *実験医学* (2002印刷中)
28. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療. *Surgery Frontier* (2002印刷中)
29. 藤井英明, 廣瀬哲朗, 山岡義生. HIF (Hypoxia Inducible Factor). *Surgery Frontier* (2002印刷中)
30. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療はどこまで来たか. *外科治療・特集「再生医療時代の幕開けを知る」* 86(1):1-8 2002.
31. 安近健太郎, 東久弥, 藤川貴久, 廣瀬哲朗. 肝幹細胞の分化. *最新医学* 57(1):94-101, 2001.

32. 安近健太郎, 廣瀬哲朗, 末盛博文, 中辻憲夫. ES細胞と再生医療. 今日の移植 14(5):542-548, 2001.
33. 廣瀬哲朗 安近健太郎. 肝幹細胞. 肝胆膵 42(2):179-187, 2001

(2) 学会発表

1. Mizuguchi T, Sugiyama N, Aoki T, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Bone marrow cells promote growth and differentiation of cultured rat hepatocytes. EB2001, Orland, FL, U.S.A. April 4, 2001.
2. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Terajima H, Kanazawa A, Nishitai R, Matsushita T, Yamanokuchi S, Sugimoto s, Matsuo K, Shiotani T, Yamaoka Y. Proliferation and maintenance of primary human hepatocytes. ESSR Congress 2001, Santiago de compostela, Spain Jun 6-9, 2001.
3. Mitaka T. In Vitro reconstruction of hepatic tissues and their application. The 6th US-Japan Symposium on Drug Delivery System. Maui, Hawaii, U.S.A. December 16-21, 2001.
4. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Terajima H, Kanazawa A, Nishitai R, Matsushita T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Matsuo K, Shiotani T, Yamaoka Y. Proliferation and Maintenance of primary human hepatocytes. ESSR Congress 2001, Santiago de Compostela, Spain Jun. 6-9, 2001
5. 池田慎一郎、三高俊広、原田敬介、望月洋一、平田公一. ラット肝細胞の毛細胆管運動に対する炎症性 cytokine の影響. 第 101 回日本外科学会総会(仙

台). 日外会誌 102 巻、臨時増刊号、501(2001)

6. 桂長門、猪飼伊和夫、塩谷智裕、杉本真一、松尾宏一、山之口賢、松下貴和、西躰隆太、寺島宏明、三高俊広、山岡義生. 臨床応用へ向けたヒト正常肝細胞の長期維持及び臓ショック法の開発の試み. 第 101 回日本外科学会総会(仙台). 日外会誌 102 巻、臨時増刊号、108(2001)
7. 三高俊広. ワークショップ「肝細胞移植の最前線：小型肝細胞を用いた in vitro 肝組織形成とその応用」第 9 回細胞療法研究会抄録集 38、2001 年 4 月 21 日：松本
8. 三高俊広. シンポジウム「肝細胞の形態と機能制御：小型肝細胞を用いた in vitro 肝組織形成」第 8 回肝細胞研究会抄録集 119、2001 年 6 月 30 日：東京
9. 須藤亮、三高俊広、池田慎一郎、杉本真一、原田敬介、池田満里子、谷下一夫、望月洋一. シンポジウム「肝細胞の再生：small hepatocytes によって形成される再構成肝組織における毛細胆管の機能」第 8 回肝細胞研究会抄録集 104、2001 年 6 月 30 日：東京
10. 池田慎一郎、三高俊広、原田敬介、望月洋一、平田公一. 「ラット肝細胞の毛細胆管運動に対する炎症性 cytokine の影響」第 8 回肝細胞研究会抄録集 127、2001 年 6 月 30 日：東京
11. 原田敬介、三高俊広、池田慎一郎、杉本真一、平田公一、望月洋一. 「長期間凍結保存した小型肝細胞の増殖と機能」第 8 回肝細胞研究会抄録集 128、2001 年 6 月 30 日：東京
12. 杉本真一、三高俊広、池田慎一郎、

- 原田敬介、猪飼伊和夫、山岡義生、望月洋一.「ラット小型肝細胞の形態変化と成熟化」第8回肝細胞研究会抄録集164, 2001年6月30日:東京
13. 桂長門、三高俊広、猪飼伊和夫、塩谷智裕、松尾宏一、杉本真一、山之口賢、西体隆太、寺嶋宏明、山岡義生.「ヒト正常肝細胞長期培養及び機能維持を目指した培養法の工夫」第8回肝細胞研究会抄録集 p 165, 2001年6月30日:東京
14. 三高俊広.「ラット小型肝細胞に関する研究から肝幹細胞に付いて考える」第91回日本病理学会ワークショップ. 日本病理学会会誌91(1) p119, 2002年3月26日:横浜
15. 桂長門、猪飼伊和夫、塩谷智裕、杉本真一、松尾宏一、山之口賢、松下貴和、西体隆太、寺嶋宏明、三高俊広、山岡義生. 臨床応用へ向けたヒト正常肝細胞の長期維持及び増殖法の開発の試み. 第101回日本外科学会総会(仙台).日外会誌 102 巻、臨時増刊号. 108(2001)
16. 杉本真一、三高俊広、池田慎一郎、原田敬介、猪飼伊和夫、山岡義生、望月洋一. ラット小型肝細胞の形態変化と成熟化. 第8回肝細胞研究会抄録集164, 2001年6月30日:東京
17. 桂長門、三高俊広、猪飼伊和夫、塩谷智裕、松尾宏一、杉本真一、山之口賢、西体隆太、寺嶋宏明、山岡義生. ヒト正常肝細胞長期培養及び機能維持を目指した培養法の工夫. 第8回肝細胞研究会抄録集 165, 2001年6月30日:東京
18. 桂長門、猪飼伊和夫、三高俊広、塩谷智裕、杉本真一、松尾宏一、山之口賢、松下貴和、西体隆太、金澤明宣、寺嶋宏明、山岡義生. 正常ヒト肝細胞長期培養及び機能維持を可能にする培養液の検討. 第56回日本消化器外科学会総会(秋田)
19. 安近健太郎、廣瀬哲朗、藤井英明、大江正士郎、藤川貴久、東久弥、内藤雅人、馬場慎司、北方敏敬、山岡義生. 「マウス胎仔肝前駆細胞の分離精製と応用に関する基礎的検討」第102回日本外科学会総会(京都).日外会誌 103 巻、臨時増刊号.(2002)
20. 東久弥、廣瀬哲朗、藤井英明、大江正士郎、安近健太郎、藤川貴久、山岡義生. 「成体マウス正常肝からのAFP陽性未分化内胚葉細胞の分離」第102回日本外科学会総会(京都).日外会誌 103 巻、臨時増刊号.(2002)
21. 藤川貴久、廣瀬哲朗、東久弥、安近健太郎、藤井英明、大江正士郎、山岡義生. 「Fluorescence-activated cell sorting(FACS)を用いたGFPトランスジェニックマウスからの成体肝幹細胞の分離と精製」第102回日本外科学会総会(京都).日外会誌 103 巻、臨時増刊号.(2002)
22. 藤井英明、廣瀬哲朗、大江正士郎、安近健太郎、東久弥、藤川貴久、山岡義生. 「マウス部分肝切除後再生肝への骨髄由来細胞 commitment の検討」第56回日本消化器外科学会総会(秋田)
23. 藤井英明、廣瀬哲朗、大江正士郎、安近健太郎、東久弥、藤川貴久、山岡義生. 「マウス部分肝切除後再生肝への骨髄由来細胞生着の検討」第101回日本外科学会総会(仙台).日外会誌 102 巻、臨時増刊号.(2001)

24. Oe S, "Expansion of putative hepatic stem cells during dHGF treatment of thioacetamide-induced liver fibrosis in rats." 米国消化器病週間、肝臓病学会 2001年5月20～23日 米国アトランタ市
25. Hirose T, "Blastosphere A new culture method for human fetal hepatic progenitor cells." 米国消化器病週間、肝臓病学会 2001年5月20～23日 米国アトランタ市
26. 廣瀬 哲朗 「ヒト胎児肝前駆細胞の新規分離精製及び長期培養法の確立」第56回日本消化器外科学会総会(秋田)
27. 安近 健太郎 「マウス胎児肝前駆細胞の分離精製と細胞遺伝子治療への応用に関する基礎的検討」第56回日本消化器外科学会総会(秋田)
28. 大江 正士郎 「d HGFによるthioacetamide肝硬変治療に伴うstem-like cellの進展」第56回日本消化器外科学会総会(秋田)
29. Hideaki Fujii, Tetsuro Hirose, Shoshiro Oe, Kentaro Yasuchika, Hisaya Azuma, Takahisa Fujikawa, Yoshio Yamaoka. "Contribution of bone marrow cells in regenerating mouse liver after partial hepatectomy" 日本組織工学会(川崎)
30. 廣瀬 哲朗 「ヒト胎児肝前駆細胞へのex vivo遺伝子導入の試み」第37回日本移植学会 2001年12月15、16日(東京)
1. 安近 健太郎 「胎児肝前駆細胞の分離精製と細胞遺伝子治療への応用に関する基礎的検討」第37回日本移植

学会 2001年12月15、16日(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

1. 三高俊広. 「凍結保存可能な小型肝細胞の調整方法、およびその凍結保存方法」(特願2000-164158; PCT/JP01/04555)
2. 三高俊広、猪飼伊和夫、山岡義生、桂長門. 「正常ヒト成熟肝細胞用培養液」(特願2000-288291; PCT/JP01/08168)
3. 三高俊広、杉本真一. 「肝組織誘導に適した小型肝細胞高含有コロニー、その調整法、小型肝細胞コロニーからの肝組織誘導方法」(特願2001-125525)
4. 山岡義生、猪飼伊和夫、桂長門、三高俊広 「正常ヒト肝細胞用培養液」(特願2000-288291; PCT/JP01/08168)

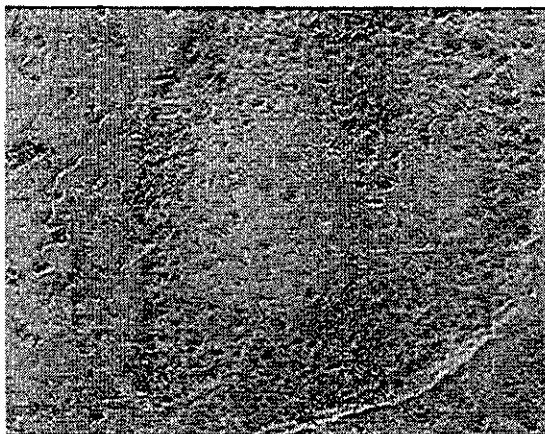
図 1

ES細胞からの肝細胞分化

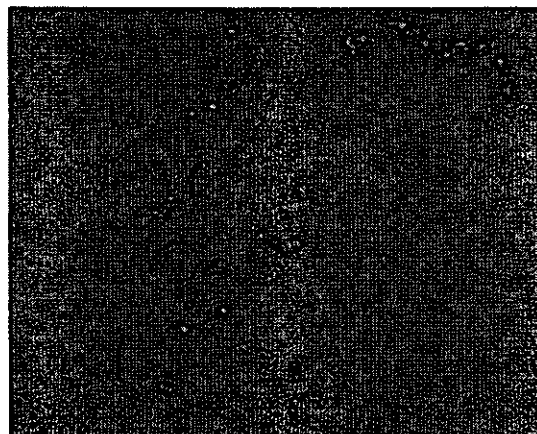


図 2

カニクイザルES細胞



遺伝子導入されたDsRed



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

「ヒト肝組織からの肝幹細胞分離・同定及び分化誘導と肝不全治療」に関する研究
分担研究者 三高 俊広 札幌医科大学がん研究所・助教授

研究要旨

成熟ラットから小型肝細胞を分離培養し、コロニーを形成させる。コロニーを培養皿から剥離することにより、小型肝細胞を多く含んだ分画を得ることができる。この小型肝細胞のコロニーは新たな培養皿で培養することも凍結保存することも可能で、増殖能・分化能は保たれていた。最長90週凍結保存可能で、その生着率は約60%であった。増殖する小型肝細胞は基底膜成分からなる細胞外基質 (Matrigel)の投与により成熟化を誘導することが可能であり、成熟肝細胞が持つ TO, fibrinogen, CPS I, transferrin, HNF4 α , HNF6, C/EBP α などの蛋白質を発現するようになる。ラット小型肝細胞の増殖・分化の *in vitro* での調節が可能であることが分かったのでヒト肝幹細胞の分離同定後の研究に応用可能と考えられる。

A. 研究目的

ラットから分離した肝幹細胞の一種である小型肝細胞を培養皿上で増殖・分化（成熟化）を調整する方法を見いだすこと、また小型肝細胞の増殖能力・分化能力を維持したまま凍結保存する方法を確立することにより、ヒト肝臓より分離・同定された肝幹細胞に応用できるように準備することを本年度の主たる研究目的とする。

これらの方法の確立は、ヒト肝細胞移植治療のための細胞バンクの設立に寄与するばかりではなく、薬物代謝、肝炎ウイルス研究のための安定的な細胞供給の道を開くものとする。

B. 研究方法

(1) 細胞外基質及び増殖因子によるラット小型肝細胞の分化・成熟化誘導実験

・成熟雄ラット肝臓をコラゲナーゼ液にて灌流し、細胞を分離する。小型肝細胞からなるコロニーを形成させた後、コロニーのみを培養皿より剥離し、新規の培養皿に3000コロニー/培養皿の濃度で播種する。

・10日間培養後、細胞外基質として laminin, fibronectin, type IV collagen, mixture of laminin and type IV collagen, Matrigel を投与し、10日間培養を続ける。

・同様に増殖因子として TGF β , basic FGF, β NGF, PDGF を培養液中に加え、10日間培養を続ける。

・分化・成熟化のマーカーとして tryptophan dioxygenase (TO), fibrinogen, carbamoylphosphate synthetase (CPS) I, transferrin, 肝細胞特異的転写因子 HNF4 α , HNF6, C/EBP α 蛋白質などの発現を Western blot 法などを用いて検索す

る。

- ・増殖能のマーカーとして PCNA 蛋白質の発現を、Immunocytochemistry, Western blot 法を用いて検索する。
- ・超微形態を電子顕微鏡にて検討する。

(2) ラット小型肝細胞の凍結保存の実験

- ・成熟雄ラット肝臓をコラゲナーゼ液にて灌流し、細胞を分離する。小型肝細胞からなるコロニーを形成させた後、コロニーのみを培養皿より剥離し、コロニーを 50 x g 1 分遠心する。
- ・沈殿を CellBanker に浮かせた後、-30 度に 1 時間保存する。
- ・-80 度の超低温冷凍庫にて長期間保存する。
- ・37 度急速解凍後、培養液に浮遊させ、培養皿に 3000 コロニー/60-mm dish の濃度で播種する。
- ・接着したコロニー数、コロニーの増殖率を経時的に記録し検討する。また albumin の分泌を ELISA 法により測定する。Northern blot 法を用いて mRNA の発現も検討する。
- ・細胞に発現している fibrinogen, CPS I, transferrin, TO 蛋白質を Western blot 法により検討する。
- ・凍結保存された細胞の超微形態を電子顕微鏡を用いて調べる。

(倫理面への配慮)

動物実験は札幌医科大学動物取扱規程に則とり、大学の実験許可を受けて実施している。

C. 研究結果

(1) 細胞外基質及び増殖因子によるラット小型肝細胞の分化・成熟化誘導実験

・基底膜成分からなる Matrigel の投与により、小型肝細胞は急速にその形態を変化させ、3次元構築を行う。索状構造を形成しながら、ゆっくり増殖する。

・3次元化に伴い分化マーカーの TO, fibrinogen, CPS I, transferrin, HNF4 α , HNF6, C/EBP α 蛋白質は強く発現するようになった。

・Laminin, Fibronectin, type IV collagen, mixture of laminin and type IV collagen 投与では、小型肝細胞による3次元構築は誘導されなかったが、分化マーカーの TO 蛋白質の発現はコントロールに比べて促進された。しかしながら、その発現量は Matrigel の場合に比較して少なかった。

・増殖能のマーカーである PCNA 蛋白質の発現は、Laminin, Fibronectin, type IV collagen, mixture of laminin and type IV collagen 投与によってもコントロールとほとんど変わりがなかったが、Matrigel 投与によってその発現は抑制された。

・増殖因子の TGF β は、0.1 ng/ml 以上の濃度では小型肝細胞の増殖を抑制し、1 ng/ml 以上では明らかに細胞死を誘導した。

・basic FGF, β NGF, PDGF 投与では、小型肝細胞による3次元構築も分化マーカーの TO 蛋白質の発現も EGF 投与のコントロールとほとんど変わらず、また増殖能にも変化が見られなかった。

・Matrigel によって誘導を受けた小型肝細胞は、背丈が増し細胞質が大きくなった。細胞質内には、mitochondria, rough ER, peroxisome, glycogen 顆粒が豊富に存在し、細胞間には毛細胆管構造が良く発達していた。

(2) ラット小型肝細胞の凍結保存の実験

・小型肝細胞は、single cell の状態では -80 °C で凍結保存するとほぼすべての細胞が死ぬが、コロニーの状態では長期間の凍結保存が可能であった。生着率は約 60 % であった。

・最長 90 週凍結保存した小型肝細胞を増殖させることに成功した。

・一旦生着した小型肝細胞は増殖し、2 週間でコロニーの面積にして約 7 倍になった。その後もほぼコンフルエントに達するまで増殖を続けた。

・アルブミンの産生は、小型肝細胞の増殖に従って増え続け、2 週間でその産生量は約 5 倍になった。

・アルブミンの他にも TO, fibrinogen, CPS I, transferrin など成熟肝細胞に発現している蛋白質を産生していた。

・増殖中の小型肝細胞に Matrigel など投与することにより、小型肝細胞の成熟化を誘導することができた。

D. 考察

我々は、成熟ラット肝臓より肝幹細胞の一種と考えられる小型肝細胞を分離培養し、増殖と成熟肝細胞への分化を調節する方法を見いだした。小型肝細胞は増殖しコロニーを形成し、非実質細胞、特に星細胞の分泌する細胞外基質が小型肝細胞の周りに蓄積することによって成熟化し、3 次元的な類肝組織を形成する。立体構造構築には、基底膜の形成が必要であり、小型肝細胞の成熟化は、非実質細胞などが分泌している増殖因子によるというよりも分泌された細胞外基質によ

る誘導と考えられた。このことは、非実質細胞の増殖が抑制されると小型肝細胞の増殖が促進されるという結果とも一致する。Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma より抽出された基底膜成分からなる細胞外基質 (Matrigel™) など投与することにより分化誘導を受けた小型肝細胞は、培養後、数週間経過しているにも関わらず、成熟肝細胞が豊富に発現している転写因子の HNF4 α , HNF6, C/EBP α などを強く発現するようになり (論文投稿中、特許出願：特願2001-125525)、それら転写因子によって発現調節されている albumin, transferrin ばかりではなく、尿素合成に必要な Carbamoyl-phosphate synthetase I やアンモニア代謝に必要な Glutamine synthetase が発現するようになり、薬物代謝の Cytochrome P450 isozymes の誘導がかかるようになる (Preliminary data)。この結果は、成熟化した小型肝細胞が生体内の肝細胞と同等な機能を発揮できるということである。

小型肝細胞は、コロニーの状態での長期間の凍結保存 (液体窒素を使うことなく -80 °C で良い) が可能で、最長 90 週凍結保存した小型肝細胞を増殖させることに成功した。平均 60 % の生着率で生着した小型肝細胞は増殖し続けることができる。凍結保存した小型肝細胞も基底膜成分からなる Matrigel など投与することにより、成熟化を誘導できる (特許出願：特願2000-164158 ; PCT/JP01/04555)。小型肝細胞単独では死滅するにもかかわらずコロニーの状態で保存可能なのは、小型肝細胞の周りを非実質細胞が取り囲み、コロニーと培養皿の間に細胞外基質が蓄積し、コロニーごと剥離するとそれら非実質細胞と細胞外基質が小型

肝細胞を保護するように周囲を覆うようになるためと推測される。この方法は、他の幹細胞の凍結保存法の確立にも応用可能であると考えられる。

E. 結論

- ・ 小型肝細胞の増殖と分化・成熟化は肝非実質細胞の産生する細胞外基質によって調整されている。
- ・ 小型肝細胞は単独の細胞外基質のみでは成熟化が誘導されず、基底膜様構造ができることによって成熟化する。
- ・ 小型肝細胞の成熟化は、外部から基底膜成分の投与によっても誘導することができる。
- ・ 小型肝細胞は、増殖能・分化能を維持しながら長期間凍結保存可能で、解凍後はすぐ増殖可能である。
- ・ 凍結保存された小型肝細胞は、増殖・分化の人為的な誘導が可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 三高俊広. 肝臓の幹細胞. *Molecular Medicine* 38(1): 8-15 (2001) (総説)
2. 三高俊広、池田慎一郎、杉本真一. 肝臓の再生. *肝胆膵* 42(2):195-201 (2001) (総説)
3. Mitaka T. Hepatic Stem Cells: From Bone Marrow Cells to Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 281(1):1-5 (2001)
4. Hirata K, Ikeda S, Honma T, Mitaka T, Furuhashi T, Katsuramaki T, Hata F, Mukaiya M. Sepsis and cholestasis: basic findings in the sinusoid and bile canaliculus. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8(1): 20-26 (2001). (Review)
5. 三高俊広、原田 敬介、池田慎一郎、杉本真一. 肝臓の幹細胞システム. *GI Research*, 19(3), 229-234 (2001) (総説)
6. 池田慎一郎、三高俊広. 幹細胞・クローン研究プロトコール、中辻憲夫編、羊土社、東京、171-178 (2001)
7. Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, in press (2002) (Review)
8. Higaki N, Mitaka T, Sato F, Hirata K, Mochizuki Y. Maintenance of connexin 32 and 26 expression in primary cultured rat hepatocytes treated with 3-acetylpyridine. *J Gastroenterol Hepatol* 16(7): 806-815 (2001)
9. Mizuguchi T, Kamohara Y, Hui T, Neuman T, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Regulation of c-met expression in rats with acute hepatic failure. *J Surg Res* 99(2): 385-396 (2001)
10. Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiyama N, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Enhanced proliferation and differentiation of rat hepatocytes cultured with bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 189(1): 106-119 (2001)
11. Mitaka T, Sato F, Ikeda S, Sugimoto

- S, Higaki N, Hirata K, Lamers WH, Mochizuki Y. Expression of carbamoylphosphate synthetase I and glutamine synthetase in hepatic organoids reconstructed by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Cell Tissue Res* 306(3): 467-471 (2001)
12. 三高俊広. 動き出した再生医療の臨床 ?肝臓?. 分子細胞治療 1(1): 78-85 (2002) (総説)
 13. Mizuguchi T, Palm K, Hui T, Aoki T, Mochizuki Y, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Effects of bone marrow stromal cells on the structural and functional polarity of primary rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol*, in press (2002).
 14. Ikeda S, Mitaka T, Sugimoto S, Harada K, Mochizuki Y. Proliferation of rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *J Hepatology*, in press, (2002)
 15. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Shiotani T, Matsushita T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Kanazawa A, Terajima H, Mochizuki Y, Yamaoka Y. Long-Term Culture of Primary Human Hepatocytes with Preservation of Proliferative Capacity and Differentiated Functions. *J Surg Res*, in press (2002)
- (2) 学会発表
1. Mizuguchi T, Sugiyama N, Aoki T, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Bone marrow cells promote growth and differentiation of cultured rat hepatocytes. EB2001, Orland, FL, U.S.A. April 4, 2001.
 2. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Terajima H, Kanazawa A, Nishitani R, Matsushita T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Matsuo K, Shiotani T, Yamaoka Y. Proliferation and maintenance of primary human hepatocytes. ESSR Congress 2001, Santiago de compostela, Spain Jun 6-9, 2001.
 3. Mitaka T. In Vitro reconstruction of hepatic tissues and their application. The 6th US-Japan Symposium on Drug Delivery System. Maui, Hawaii, U.S.A. December 16-21, 2001.
 4. 池田慎一郎、三高俊広、原田敬介、望月洋一、平田公一. ラット肝細胞の毛細胆管運動に対する炎症性 cytokine の影響. 第 101 回日本外科学会総会 (仙台). 日外会誌 102 巻、臨時増刊号、501(2001)
 5. 桂長門、猪飼伊和夫、塩谷智裕、杉本真一、松尾宏一、山之口賢、松下貴和、西躰隆太、寺島宏明、三高俊広、山岡義生. 臨床応用へ向けたヒト正常肝細胞の長期維持及び臓ショック法の開発の試み. 第101回日本外科学会総会 (仙台). 日外会誌 102巻、臨時増刊号、108(2001)
 6. 三高俊広. ワークショップ「肝細胞移植の最前線：小型肝細胞を用いたin vitro 肝組織形成とその応用」第9回細胞療法研究会抄録集38、2001年4月21日：松本
 7. 三高俊広. シンポジウム「肝細胞の形態と機能制御：小型肝細胞を用いたin vitro肝組織形成」第8回肝細胞研究会抄録集119、2001年

- 6月30日：東京
8. 須藤亮、三高俊広、池田慎一郎、杉本真一、原田敬介、池田満里子、谷下一夫、望月洋一. シンポジウム「肝細胞の再生：small hepatocytesによって形成される再構成肝組織における毛細胆管の機能」第8回肝細胞研究会抄録集104, 2001年6月30日：東京
 9. 池田慎一郎、三高俊広、原田敬介、望月洋一、平田公一. 「ラット肝細胞の毛細胆管運動に対する炎症性cytokineの影響」第8回肝細胞研究会抄録集127, 2001年6月30日：東京
 10. 原田敬介、三高俊広、池田慎一郎、杉本真一、平田公一、望月洋一. 「長期間凍結保存した小型肝細胞の増殖と機能」第8回肝細胞研究会抄録集128, 2001年6月30日：東京
 11. 杉本真一、三高俊広、池田慎一郎、原田敬介、猪飼伊和夫、山岡義生、望月洋一. 「ラット小型肝細胞の形態変化と成熟化」第8回肝細胞研究会抄録集164, 2001年6月30日：東京
 12. 桂長門、三高俊広、猪飼伊和夫、塩谷智裕、松尾宏一、杉本真一、山之口賢、西躰隆太、寺島宏明、山岡義生. 「ヒト正常肝細胞長期培養及び機能維持を目指した培養法の工夫」第8回肝細胞研究会抄録集 p 165, 2001年6月30日：東京
 13. 三高俊広. 「ラット小型肝細胞に関する研究から肝幹細胞に付いて考える」第91回日本病理学会ワークショップ. 日本病理学会会誌91(1) p119, 2002年3月26日：横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

1. 三高俊広.
「凍結保存可能な小型肝細胞の調整方法、およびその凍結保存方法」
(特願2000-164158；PCT/JP01/04555)
2. 三高俊広、猪飼伊和夫、山岡義生、桂長門.
「正常ヒト成熟肝細胞用培養液」
(特願2000-288291；PCT/JP01/08168)
3. 三高俊広、杉本真一. 「肝組織誘導に適した小型肝細胞高含有コロニー、その調整法、小型肝細胞コロニーからの肝組織誘導方法」
(特願2001-125525)