

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 猪飼 伊和夫 京都大学大学院医学研究科・講師

研究要旨

手術検体より得られたヒト正常肝組織を分離培養し、keratinocyte stimulating factor medium をベースに 10% ヒト血清を加えた培養液（特願 2000-288291; PTC/JP01/08168）を用いることによって、一般的な type I collagen coated plastic dish 上での単層培養法で平均 3 ヶ月、最長 5 ヶ月の長期維持が可能となり、その中で 3 ヶ月を過ぎて維持された培養 dish にコロニー様に増殖する小型肝細胞群を認めた。一方ラットの小型肝細胞群に細胞外基質である Matrigel を用いることによって成熟化を誘導できることが分かった。これらを併せ応用することが出来れば、成熟肝細胞の培養から細胞移植もしくは人工肝臓の細胞供給源が得られる可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己増殖能力を持つES細胞、肝幹細胞は細胞移植、ハイブリッド型人工肝臓補助などの治療に有用な細胞供給源と期待されている。しかし、現在candidate細胞はあるものの未だ確立された方法はない。

我々は前回報告した長期培養を更に進めるうちに、それらの培養細胞の中に colony 様に増殖する細胞群を認めた。これらを純化し成熟化を誘導することが出来れば上記の目的に適った細胞群を得ることが期待される。

B. 研究方法

皮膚角化細胞培養液 Keratinocyte Stimulating Factor Medium (Gibco BRL) は、線維芽細胞の増殖を抑制する働きを持つことが知られている。これに、nico-

tinamide、prolene、ascorbic acid、dexamethasone、insuline、epidermal growth factor、さらにhuman serumを加えた我々の独自の培養液を用いると、肝細胞を高い機能を維持しつつかつ形質転換せずに長期に保つことが出来ることは前回報告した通りである。

ヒト正常肝組織は、京都大学医学部「医学の倫理委員会」の承認の上、京都大学医学部付属病院で手術を施行された症例で本研究のため肝組織の提供についてインフォームドコンセントを得た症例から、手術時に腫瘍と同時に摘出された肝臓から正常肝組織を採取した。症例は転移性肝癌、胆管細胞癌、肝血管腫等の計50例（平均年齢45.9±5.2歳、最少17歳、最大82歳）であった。

正常肝組織片に、27G針と10cc注射器にて 4°C EGTA 加前灌流液と 0.05% collagenase-dispase 液の二段階還流を行った。Isolationされた細胞を50gで2分の

遠沈を4回行い、得られた実質分画を 2×10^5 cells/ml の濃度で type I collagen coated dish (IWAKI) に播種した。

こうして得られた培養肝細胞について、

(1) 前回よりさらに1から2ヶ月、即ち3から5ヶ月の長期培養維持を行い、光学顕微鏡による経時的観察を行った。

(2) 一方、分担研究者の三高が開発したラット小型肝細胞の採取法、及び培養法をヒトに応用することを試みた。即ち isolation の段階からヒト小型肝細胞が得られないかを検討した。

(3) また、ヒト小型肝細胞が得られた場合の、これらの未分化細胞の成熟化をはかる方法の探求として、ラットより得られた小型肝細胞の colony に細胞外基質である Matrigel を用いることを試みた。

C. 研究結果

(1) 長期形態学的観察

1週間目ではほぼ同じ大きさの肝細胞が cuboidal に形態を保ち confluent に生着していたものが、1ヶ月目になると大型の2核の肝細胞の隙間を埋めるように小型肝細胞が密集している像が認められた。2ヶ月目になると大型の肝細胞だけが脱落し、小型肝細胞は依然 cuboidal に形態を保ち生着していた。繊維芽細胞の増殖はほぼ認められなかった。3ヶ月を超えてさらに観察を続けると、colony 様に増殖を示す小型肝細胞群を認めるようになった。一部に細胞の pile up を示す部分も認めた。

(2) 肝切片分離時の小型肝細胞採取

三高の行っているラット小型肝細胞

を得る方法では、ヒト小型肝細胞は純化出来ないことが分かった。即ち、ラットの場合、遠心後小型肝細胞が豊富に含まれる分画（非実質分画）に、ヒトの場合は成熟肝細胞も相当数混入することが分かった。実質細胞が多く含まれる為、ラットで見られるような小型肝細胞の増殖する colony 形成は認めなかった。しかし、

(1) の方法からはヒト成体肝臓にも小型肝細胞が存在することが示唆されており、現在は、ラット小型肝細胞を得る方法を改良することによりヒトからも安定・確実に小型肝細胞を分離する手法を確立しようと検討中である。

(3) Matrigel によるラット小型肝細胞 colony の成熟化の誘導について

細胞外器質である Matrigel を添加することによって、ラット小型肝細胞は成熟化を起こすことが分かった。図1に示す様に小型肝細胞 colony による albumin 産生量はその前後で著明に変化を示した。この事は細胞の phase が増殖から分化に転じた事を示している。

D. 考察

前回の報告においては単層培養という最も単純かつ簡便な様式で培養液のみの改良によって、他の細胞を意図的に混入することなく肝細胞を *in vitro* で2から3ヶ月の長期に渡って肝機能を維持しつつ培養することに成功した。今回更に長期の観察を行う事によって大型の成熟肝細胞の隙間を埋めるように増殖してきた小型肝細胞が成熟肝細胞が剥がれた後に徐々に純化され3ヶ月を超える頃には、一部 colony 様に pile up を示す部分が認められた。

結果に述べたように成熟肝細胞に関しては、一部に BrdU の取りこみ、即ち DNA 合成期への移行が認められたが、明らかな増殖を確認できるには至らなかった。しかしこれら長期維持後に出現してくる細胞群の増殖能は今後の検討課題である。

細胞内ミトコンドリア酵素活性を測定する方法 (MTT assay) にて、肝細胞の viability の推移を調べると、播種後 1 日の viability を 100 % とし、1 週目で約 80 %、1 ヶ月目で約 40 % に低下している (data not shown)。このことは全体としての (dish 1 枚分としての) 機能低下は、生きている細胞数の減少によるものであり、生き残った細胞は逆に高い機能を維持している可能性がある。この点も今後の検討課題であり、これらの細胞を純化できれば、臨床応用への道が開かれると思われる。

同時に、ヒト検体より増殖力旺盛な小型肝細胞を分離培養し、これと長期に生き延びるが増殖しない成熟肝細胞を比較検討できれば、細胞の分化と増殖を司る制御因子の解明に大きく貢献するとも考えられる。

臨床的には増殖期にある細胞を分化させて肝細胞としての機能を上げることが必要で、この点に関して、ラットで得られた成熟化の誘導因子がヒトに応用できるかの検討も今後の課題である。

E. 結論

ヒト正常肝細胞を 5 ヶ月間の長期に培養維持することが可能となり、またこの中に増殖する細胞群を認めた。また、少なくとも現時点では、初めの肝切片から

の isolation の段階では、小型肝細胞等の未分化細胞を純化する事は出来ない。従って現時点では長期培養によって出現してくる増殖小型肝細胞群を効率よく、且つ再現性よく純化することを目指し、ラット小型肝細胞の成熟化を誘導し得た Matrigel 添加法を用いる事により、細胞移植もしくは人工肝臓の細胞供給源が得られる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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)
2. 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. 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

2. 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)
3. 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
4. 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

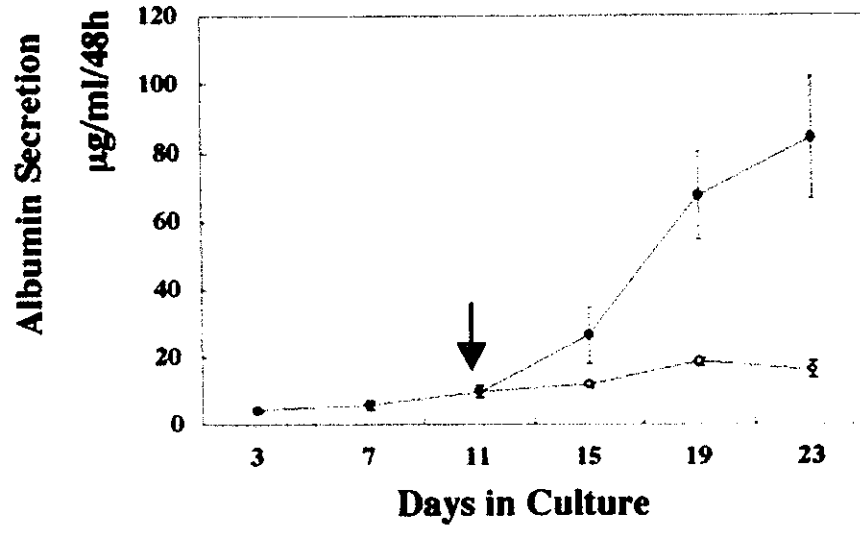
5. 桂 長門、猪飼伊和夫、三高俊広、塩谷智裕、杉本真一、松尾宏一、山之口賢、松下貴和、西体隆太、金澤明宣、寺嶋宏明、山岡義生. 正常ヒト肝細胞長期培養及び機能維持を可能にする培養液の検討. 第56回日本消化器外科学会総会 (秋田)

H.知的財産権の出願

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

アルブミン産生能 ● : Matrigel ○ : 接着培養



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 廣瀬 哲朗 京都大学再生医科学研究所・助手

研究要旨

成体マウス肝の非実質細胞分画を浮遊培養することで、その中の接着細胞を濃縮でき、得られる細胞コロニーの5%が上皮様形態を示した。その細胞は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で、分化培地の利用で成熟肝細胞への分化誘導が可能な肝前駆細胞であった。この細胞からはアルファフェトプロテイン陰性、アルブミン陽性コロニーのほか、胆管上皮細胞マーカーであるサイトケラチン19陽性コロニーも出現することからその細胞集団中における肝幹細胞の存在が示唆された。そこで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、得られている肝前駆細胞の大きさと内胚葉でのGFP発現を指標に細胞を蛍光励起セルソーターで精製した。得られた細胞一つ一つからアルブミン陽性コロニーのほか、胆管上皮細胞マーカーであるサイトケラチン19陽性細胞やそれらを共に発現する細胞が分化し、その後も大型でGFP発現がより高い分化細胞とは別に、元のサイズとGFP発現を維持する細胞が存在するだけでなく、表面抗原上も胎仔肝細胞型を呈する細胞が残存することから、自己複製能もうかがわれ、肝幹細胞と同定できた。現在進行中のこの細胞の表面抗原解析で得られる情報は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

恒常的細胞供給を狙うにあたり自己複製能を有する幹細胞の同定・分離は重要な案件といえる。この目標にむけ我々はマウス胎仔肝からの未分化内胚葉細胞（肝幹細胞候補）の分離法を成体肝へ応用することにより、マウス成体肝組織から肝幹細胞を同定・分離・精製することを本年度の主たる研究目的とした。

さらに、ヒト成体肝臓からの肝幹細胞同定・分離のためには、マウスで得られた肝幹細胞の情報が必要不可欠なため、フローサイトメトリーによる詳細な表面抗原解析も試みた。

これに基づくヒト肝幹細胞分離法確立は、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考えられる。

B. 研究方法

- (1) 浮遊培養法を用いた非実質細胞分画中の未分化内胚葉細胞分離実験
・成熟雄マウス肝臓をコラゲナーゼ液にて灌流し、細胞を分離する。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、接着細胞に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することで得られるコロニーの特性解析を行い、さらにその中で内胚葉系の細胞に焦点を当て、その増殖能・分化能・成熟化能を検証する。

・内胚葉系の **characterization** にはアルファフェトプロテイン発現を細胞免疫染色、Western blot 法を用いて行い、他 lineage のマーカーとしてはクッパー細胞による Latex beads 取り込みやクッパー細胞、血管内皮細胞による Dil labeled AcLDL の取り込み、星細胞に陽性となる α -Smooth muscle actin の免疫染色を用いる。また RT-PCR によるマーカー発現も確認する。

・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する。

・長期培養成熟化後の超微形態を電子顕微鏡にて検討する。

(2) 内胚葉 green fluorescent protein トラंसジェニックマウスを利用した肝幹細胞分離

・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コラゲナーゼ液にて灌流し、細胞を分離する。研究(1)から明らかになった未分化内胚葉細胞の大きさとトラंसジェニックマウスにおける内胚葉での GFP 強度を指標に未分化内胚

葉細胞を精製し、single cell からのクローナルな解析を可能とする。

・一つ一つの細胞からの分化過程をアルブミン、サイトケラチン19の組織免疫染色、フローサイトメトリー解析にて検討し、その多分化能・自己複製能を検証する。

・得られる細胞の特性解析のため、表面マーカー候補としてインテグリン、カドヘリン、未分化細胞マーカーである c-kit、Thy1.1 などを用い、フローサイトメトリーにてその発現を検討し、肝幹細胞特異的マーカーを同定する。

(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」の承認のもとに、動物実験は京都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) 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。この細胞塊を接着培養するとコロニーを形成し、得られた細胞コロニーの5%が上皮様形態を示した(図1)。そのコロニーは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、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、デスミン陽性なコロニーが存在することから血管内皮細胞や星細胞の混入が示唆された(図2)。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、Latex beads を取り込むクッパー細胞や Dil labeled AcLDL を取り込む血管内皮細胞、 α -Smooth muscle actin 陽性の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単独のコロニーが見られるようになり(図3)、さらに TO や AAT 等の成熟肝細胞特異的遺伝子発現を認めた(図4)。

形態学的にも2核の細胞の出現や、細胆管の形成を認めたこと(図5)、電子顕微鏡で微細構造を観察すると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や tight junction や microvilli が観察されたことから(図6)、一部で肝細胞の成熟化が進んでいることが確認された。

以上のことから、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。

(2) 内胚葉 green fluorescent protein トランスジェニックマウスを利用した肝幹細胞分離

さらにクローナルな解析を可能とするために、上記で得られた肝幹細胞のサイズの予想と我々の 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を利用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コラゲナーゼ灌流にて得られた肝非実質細胞分画

(SSC^{low})は GFP 発現の強度により2群に分かれ、そのうち 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、増殖能を持つ小型の細胞が得られた。その細胞は形態学的には先に入手可能となった未分化内胚葉系細胞に類似しており、免疫染色にてもアルファフェトプロテイン陽性であった(図7)。さらに培養を続けるとアルブミン、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・増殖してくること(図8)、また大型化し GFP 発現がより高くなる分化成熟細胞出現後にも、これとは別に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の細胞特性を維持した細胞が存在した。以上のことから(1)および(2)の実験で得られた細胞は多分化能・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を行った結果、ヒトの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、現在得られた結果を 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どうかの検討を行っている。

D. 考察

我々はこれまでのマウスを用いた研究により、成体肝臓からも肝細胞と胆管細胞に分化しうる肝幹細胞とも言うべき未分化内胚葉系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も未分化内胚葉系細胞に相当する細胞の分離が可能となった。

肝幹細胞の同定・分離に関しては、これまでは肝幹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、本年度の GFP トランスジェニックマウスを用いた研究からマウスにおいては、セルソーターを用いて特異的に肝幹細胞を同定・分離するための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ことを意味しており、来年度にはこれをヒトへと応用することをめざして、さらに検討を進める計画である。

この様にして得られた肝幹細胞の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、完全に分化誘導が行われているかについては不明な点が残っている。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、分化誘導法のさらなる改良が必要であると考えている。これを可能とするべく、来年度にかけて分化段階が異なる肝系細胞を材料に subtraction 法、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予定であり、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、薬物代謝能など実用に即した機能評価、およびマウスを用いた移植実験での治療効果の検討を行う必要があり、これらの検討も考慮している。

E. 結論

- ・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と考えられる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、成熟肝細胞特異的な遺伝子発現の誘導が可能であった。
- ・表面抗原解析により、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. Alpha fetoprotein positive immature endodermal cells from adult mouse liver. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. (2002 in press)
2. 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. (2002 in press).
3. 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. (2002 in press).
 4. 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.
 5. 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)
 6. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療. *Surgery Frontier* (2002 印刷中)
 7. 藤井英明, 廣瀬哲朗, 山岡義生. HIF (Hypoxia Inducible Factor). *Surgery Frontier* (2002 印刷中)
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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. 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)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)

6. Oe Shoshiro, Tetsuro Hirose, Hisaya Azuma, Takahisa Fujikawa, Kentaro Yasuchika, Hideaki Fuji, Yoshio Yamaoka. "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
7. Hirose T, Kentaro Yasuchika, Takahisa Fujikawa, Hideaki Fuji, Oe Shoshiro, Hisaya Azuma, Iwao Ikai, Yoshio Yamaoka. "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
8. 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)
9. 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)
10. 大江 正士郎 「dHGF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)
11. 廣瀬 哲朗、安近健太郎、藤井英明、大江正士郎、藤川貴久、東久弥、猪飼伊和夫、山岡義生. 「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4回日本組織工学会 2001年7月6、7日(川崎)
12. 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、山岡義生. 「マウス胎児肝前駆細胞の分離精製と応用に関する基礎的検討」第4回日本組織工学会 2001年7月6、7日(川崎)
13. 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" 第4回日本組織工学会 2001年7月6、7日(川崎)
14. 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)
15. 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

なし

図 1

非実質細胞分画から得られた細胞集塊 未分化内胚葉系細胞コロニー

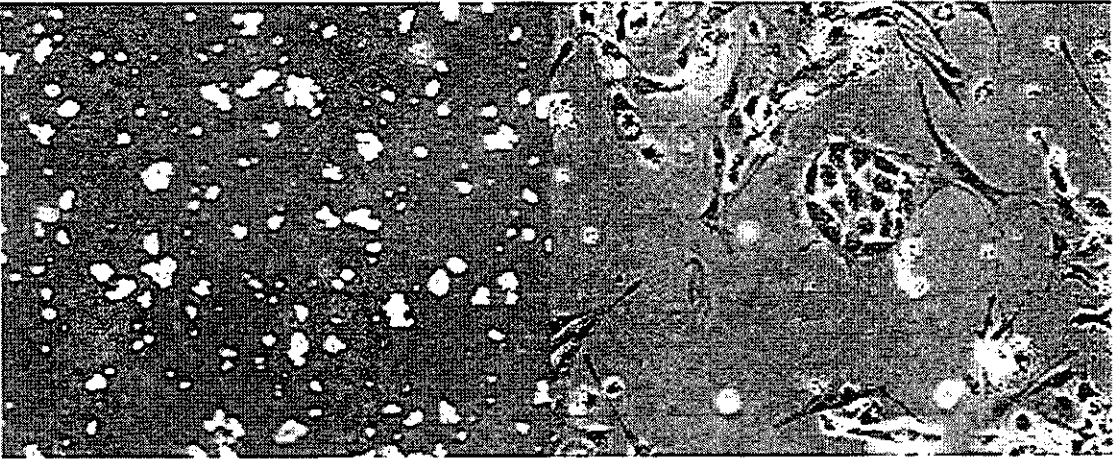


図 2

未分化内胚葉系細胞の分化過程での mRNA 発現の推移

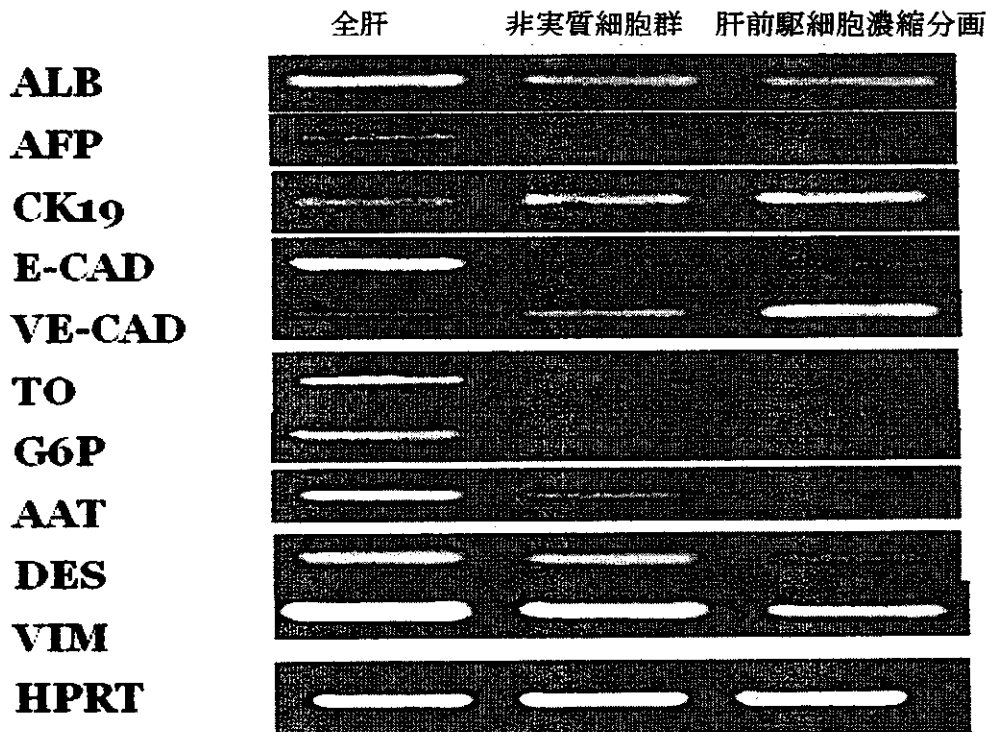


図 3

未分化内胚葉系細胞コロニーの免疫染色

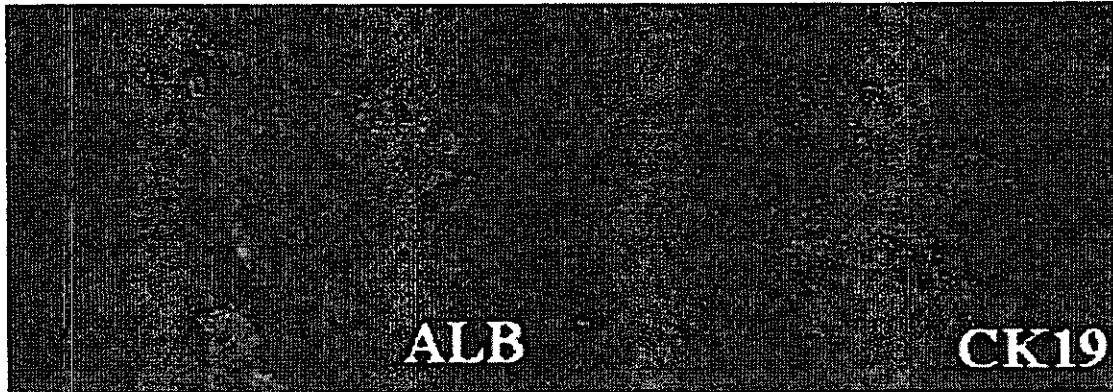


図 4

分化過程における mRNA 発現

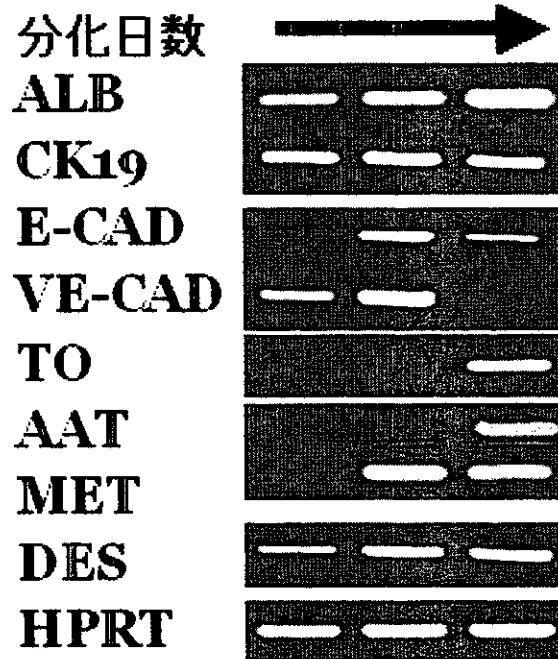


図 5

未分化内胚葉系細胞コロニーの成熟化

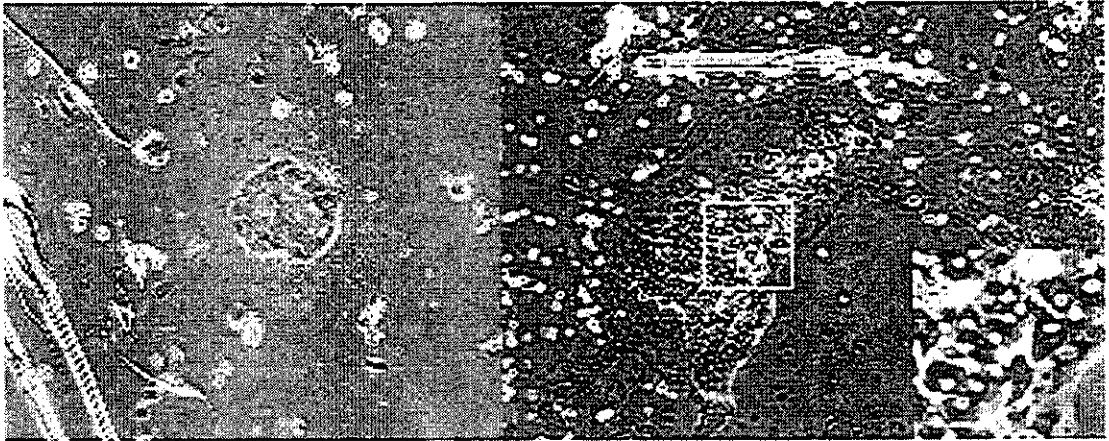


図 6

未分化内胚葉系細胞の超微形態観察

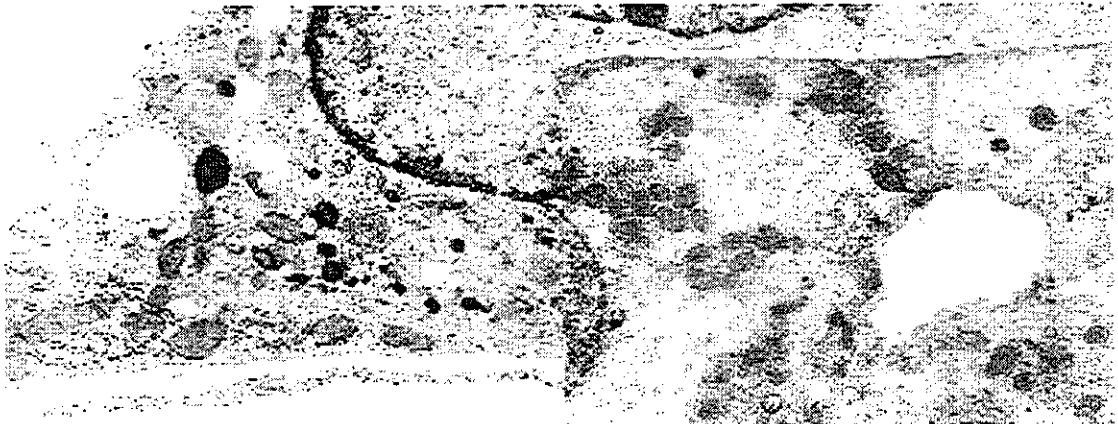


図7

GFP マウスの未分化内胚葉系細胞



免疫染色 (AFP)

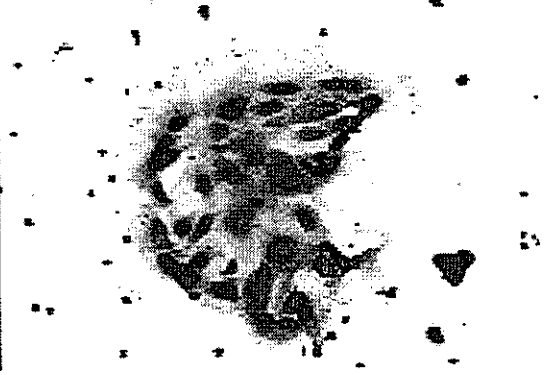
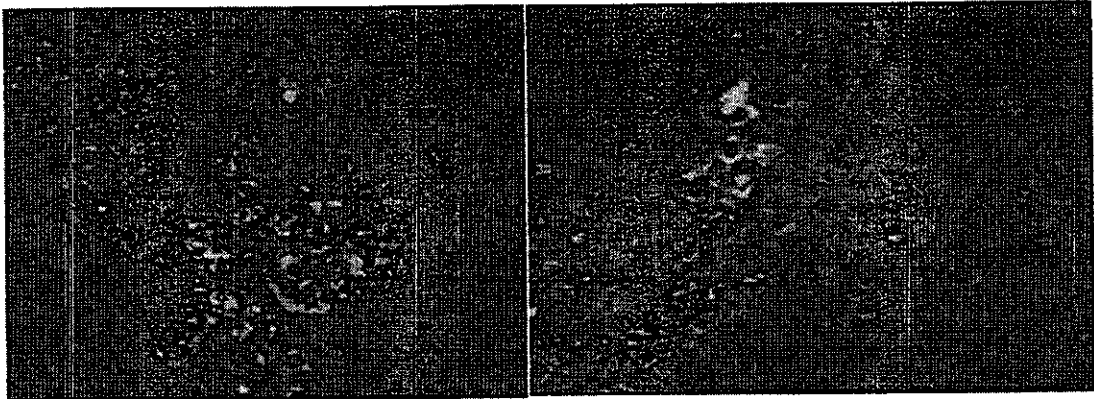


図8

二重免疫染色(緑:アルブミン, 赤:サイトケラチン19)



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）
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 塩田 浩平 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

将来的な細胞源候補の一つであるヒト胚性幹細胞を我々が分離しつつあるヒト小型肝細胞や肝幹細胞、さらにはヒト成熟肝細胞へと分化誘導し、これを有効利用するためには、未分化細胞から成熟細胞への分化過程のメカニズムやその途中過程としての胎児幹細胞に関する情報が不可欠である。胎児期の発生過程における分化・組織構築メカニズムやこれまでに得られているヒト胎児肝細胞に関する情報提供はヒト胚性幹細胞からヒト成熟肝細胞への分化誘導法の確立に有用である。

A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞から肝幹細胞および成熟肝細胞への分化誘導法の確立には、胎児肝細胞に関する情報が不可欠と考えられる。胎児期には分化・組織構築メカニズムが働いていることから、これに関する情報提供を通してヒト胚性幹細胞からヒト肝幹細胞・成熟肝細胞への分化誘導法の確立に貢献する。

B. 研究方法

既にヒト胎児より分離・培養した胎児肝細胞で確認された特異的な表面抗原などに関する情報提供を行い、これと実験動物胚性幹細胞や共同研究者の廣瀬が分離・同定を行ったマウス胎児肝細胞からの分化誘導過程とを比較検討することで、マウスで得られた分化誘導に関する知見がヒトにも応用可能かどうかを検討する。

C. 研究結果

胎児ヒト肝幹細胞は細胞の大きさ、ホモフィリックな細胞結合をすることやその特異的な表面抗原など、既に得られていた情報を照合するに、その細胞特性が共同研究者の廣瀬が分離している胎児マウス肝幹細胞及び成体マウス肝幹細胞に類似していた。

D. 考察

胎児期は細胞の増殖・分化・組織構築が盛んに行われている時期であり、そこから得られる発生学的知見は、本研究が目指しているヒト胚性幹細胞からヒト成熟肝細胞への分化誘導法の確立に有用な指標になると考えられる。またマウスとヒトの類似性から、マウスで得られた分化誘導法がヒトにも応用出来る可能性が十分に考えられた。

E. 結論

胎児発生段階の肝形成に関する研究結果から得られた情報は、臨床応用に向けたヒト胚性幹細胞からヒト成熟肝細胞への分化誘導に有用であることが確

かめられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Shiota K. Toward the prevention of human birth defects: a personal perspective. *Congenital Anomalies* 41:72-75 (2001) (review).
- 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):659-676 (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) Yamamoto Y, Yamamoto K, Hayase T, Abiru H, Shiota K, Mori C. Methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 178(3):155-160. (2002)
- 7) Cohen MM Jr, Shiota K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics*, in press (2002)
- 8) Edwards MJ, Saunders RD, Shiota K. Effects of heat on embryos and fetuses. WHO workshop report on adverse temperature levels in the human body. *International Journal of Hyperthermia*, in press (2002)
- 9) Miura T, Shiota K. An FGF-depletion model for lung branching morphogenesis. *Mechanisms of Development*, in press (2000)
- 10) Kimura S, Schaumann BA, Shiota K. Comparative investigations of human and rat dermatoglyphics: Palmar, plantar and digital pads, and flexion creases. *Anatomical Science Internationa*, in press (2002)
- 11) Kimura S, Schaumann BA, Shiota K. Ectopic ridge configurations on the interdifital webbings of Hammertoe mutant mice (Hm): Another possible role of programmed cell death. *Anaomy andt Embryology*, in press (2002).
- 12) Kobayashi, M., Nakamura, H., Yodoi, J., Shiota, K. Thioredoxin, an anti-oxidant rprotein, protects mouse embryos from oxygen stress-induced developmental abnormalities. *Free Radical Research*, in press (2002)

- 13) 塩田浩平、中津智子、上部千賀子. 正常形態発生 日本臨床別冊：「先天異常症候群辞典」上巻（黒木良和編）、p. 5-11. (2001)
- 14) 中津智子、塩田浩平. 形態発生の異常 日本臨床別冊：「先天異常症候群辞典」上巻（黒木良和編）、p. 12-20 (2001)
- 15) 塩田浩平. 異常形態発生の成因と発生機構 日本臨床別冊：「先天異常症候群辞典」上巻（黒木良和編）、p. 21-29. (2001)
- 16) 才津浩智、塩田浩平. 羊膜・羊水と胎児の発生異常 周産期医学 31(8):1085-1089 (2001) .
- 17) 塩田浩平、中津智子、上部千賀子. 初期発生と器官形成 「新女性医学大系」第 22 巻「正常妊娠」（神保利春編）、p. 33-44、中山書店（2001）.
- 18) 塩田浩平、才津浩智. 初期発生 「新女性医学大系」第 29 巻「胎児の成長・発達」（中野仁雄編）、pp. 13-24. 中山書店. (2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社 名	出版地	出版 年	ページ
池田慎一郎、三高俊広	肝前駆細胞からの増殖と分化：小型肝細胞（small hepatocyte）の分離法	中辻憲夫	幹細胞・クローン研究プロトコール	羊土社	東京	2001	171-178
廣瀬哲朗、安近健太郎、東久弥、山岡義生.	ヒト胎児肝細胞の分離と増殖.	中辻憲夫	幹細胞・クローン研究プロトコール～再生医学にかかわる基礎技術～.	羊土社	東京	2001	179-184

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Ikeda S, Mitaka T, Sugimoto S,	Proliferation of rat small hepatocytes after long-term	J Hepatology	in press		2002

Harada K, Mochizuki Y.	m cryopreservation.				
Mitaka T.	Hepatic Stem Cells: From Bone Marrow Cells to Hepatocytes.	Biochem Biophys Res Commun	281(1)	1-5	2001
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
Mitaka T.	Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells.	J Hepatobiliary Pancreat Surg	in press		2002
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 Gastroenter ol Hepatol	16(7)	806-815	2001
Mizuguchi T, Kamohara Y, Hui T, Neuman T, Mitaka T, Demetri ou AA, Rozga J.	Regulation of c-met expression in rats with acute hepatic failure.	J Surg Res	99(2)	385-396	2001
Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiya ma 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
Mitaka T, Sato F, Ikeda S, Sugimoto S, Higaki N, Hirata K, Lamers	Expression of carbam oylphosphate synthetase I and glutamine synthetase in hepatic organoids rec	Cell Tissue R es	306(3)	467-471	2001