

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

肝細胞移植系の確立と肝幹細胞の分離
および培養に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮島 篤

平成 14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

肝細胞移植系の確立と肝幹細胞の分離および培養に関する研究-----1

宮島 篤

II. 分担研究報告

1. 肝細胞培養系と人工肝臓モデル作成に関する研究 -----16

酒井 康行

2. ES 細胞からの肝細胞分化系に関する研究 -----28

渡部 徹郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----32

I. 総括研究報告

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

肝細胞移植系の確立と肝幹細胞の分離および培養に関する研究

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨 本研究は細胞治療、遺伝子治療、さらに人工肝臓の開発の鍵となる肝臓の幹細胞の同定と分離、機能評価、および培養システムを構築することにより、肝臓における再生治療の向上を目指すものである。そのために、我々が見い出したオンコスタチンMによるマウス胎仔肝細胞 *in vitro* 分化系を利用して、分化マーカー遺伝子の発現のみならず、肝細胞の構造的な成熟化についても詳細に解析した。これらの知見をもとに肝幹細胞もしくは胚性幹細胞(ES 細胞)からの効率的な肝細胞分化系の構築を目指す。

分担研究者

酒井 康行・東京大学生産技術研究所
化学工学・講師

渡部 徹郎・東京大学大学院医学系研究科分子病理学・助手

ないのが現状である。しかしながら、移植においては絶対的なドナー不足や組織適合性の問題があり、これに取って替わる有効な治療法の開発が急務となっている。その一つが、生体外で肝細胞を増やし、細胞移植や遺伝子治療に利用しようというものである。しかしながら、成体肝臓の細胞培養は短期間のみ可能であり、長期間の培養では肝機能の著しい低下を招く。一方、肝細胞株など増殖能に優れた細胞では多くの肝機能が失われている。このように、細胞の分化と増殖とは相反する関係にある

A. 研究目的

肝臓は体内でもっとも大きな臓器であり、エネルギーの代謝や貯蔵、胆汁の生産、毒物の無毒化や異物の除去など生命を維持する上で必須の役割を担っている。そのため、肝炎などの進行により重篤な機能不全に陥った場合には、生体肝移植しか有効な治療法が

のが一般的であり、この両者をコントロールすることが機能細胞を大量に調製するためには必要である。そのためには、未熟な肝細胞がどのように発生してくるのか、そしてどのように分化していくのかを細胞レベルで十分に把握しておく必要がある。

我々はこれまでに増殖能の高い胎生期の未分化肝臓細胞に着目し、この細胞を生体外で分化誘導することに成功している。そして、オンコスタチンM (OSM) が生体外で未熟な肝細胞を効率良く分化させるのに有効な因子であることを明らかにしてきた。この系は、上記の肝細胞分化のメカニズム解明に適しており、OSM の分化に対する作用を詳細に調べることにより、肝細胞分化を理解しコントロールするための知見を蓄積する。また、OSM は胎生期のみならず、成体マウスの肝傷害時にも誘導されることが明らかとなっていることから、肝再生過程においても肝細胞の増殖、分化を制御しているものと考えられる。そこで、成体においても OSM が再生肝臓中のどのような細胞に作用しているのかを解明する。

その一方で、肝細胞の元となる細胞を未分化な状態に保ちながら増殖をコントロールすることも重要である。そ

の鍵となるのが、多分化能を保ったまま増殖することが可能な幹細胞であり、これまでに様々な臓器、器官での幹細胞の存在が提唱されている。血液細胞においては血液幹細胞の研究が数多くの研究者によって精力的に進められた結果、マウスではたった1個の血液幹細胞が体内のすべての血液細胞を再構成させるに至っている。しかしながら、肝幹細胞の研究は血液幹細胞等に比べて著しく遅れており、その存在すら明確でない。

その理由として幹細胞評価系が確立していないことが考えられる。本研究では胎生肝臓に細胞を移植する方法および選択的に肝細胞の細胞死を誘導して移植肝細胞の増殖を優位にする方法などを検討する。こうした移植系が確立できれば、免疫不全マウスを使うことでヒトなど異種の肝幹細胞のアッセイとしても使える可能性がある。

肝幹細胞研究が進展していない第二の理由は未分化肝臓の細胞を分離する方法が確立していないことによる。そのために、未分化肝細胞の抗原を検索して、未分化肝細胞の分離に使える抗体を調製する。これにより、肝幹細胞の分離が可能となれば、胎生肝臓のみならず再生肝や肝臓以外の組織中の体性幹細胞から未分化肝細胞の同定や分

離に応用することができる。さらには、あらゆる細胞への分化能を有する ES 細胞から肝細胞の方向へと分化した細胞を分離することにも応用できる。これらの知見を基に、胎生期の未分化肝臓細胞の増殖期間を延長し、細胞を十分量確保した後に分化誘導して大量の機能的肝細胞を調製する方法の確立を目指す。

これまでのところ、生体から分離可能な未分化肝細胞には限りがあり、医療目的には大量の未分化あるいは成熟した肝細胞を調製する必要がある。そのためには、ES 細胞から肝細胞への分化誘導系が確立できれば、機能的肝細胞の大量調製が容易となり、細胞移植のみならず人工肝臓の素材として最適である。ES 細胞は主に LIF（白血病阻止因子）の作用により、その多分化能を保っており、LIF 非存在下で外胚葉、中胚葉、内胚葉の細胞へと分化していく。生体内では肝細胞は内胚葉に由来する細胞から発生してくるため、*in vitro*においても、内胚葉へ効率良く誘導することが肝細胞の調製に有効であると考えられる。そのために内胚葉由来臓器の形成・分化に重要な TGF- β ファミリーを介したシグナル伝達経路をマウス ES 細胞で操作することで、肝細胞を作り出すための最適

条件を検討する。その際、肝細胞の分化段階に応じて発現するマーカー遺伝子をレポーター系として ES 細胞に導入し、肝細胞へと分化した細胞の量的（誘導性）および質的（分化度）な評価を同時に行なう。マーカー遺伝子としては α フェトプロテイン、アルブミン、TAT を予定している。このようにして得られた知見をいずれはヒト ES 細胞の肝細胞分化系へと応用する。特にヒト ES 細胞から機能的肝細胞を得られれば、細胞移植や人工肝臓の実用化に大きく寄与することとなろう。

また、肝臓などの臓器移植では、つなぎの医療として機能を代替する再構築型臓器の開発が望まれる。組織再構築に適した力学的特性を持つ生分解ポリマーで細胞を担持する多孔質部と内部を貫通する血管網ネットワークを合せ持つ再構築用のテンプレートを作製し、これに機能肝細胞培養技術を組み合わせ、小動物の肝機能代替に十分な大きさの肝組織を再構築しモデル動物への移植実験で評価する。

B. 研究方法

1. 胎仔肝初代培養系における TAT プロモーターの解析

肝臓は栄養の代謝を行なう重要な臓器であり、最終分化した肝細胞では数

多くの代謝酵素を発現している。その中でも、アミノ酸代謝の key enzyme である tyrosine amino transferase (TAT) は、胎生期の肝臓では発現していないが、生後になって初めて発現するタイプの酵素であり、肝分化マーカーの一つであると考えられている。これまで、ES 細胞から肝細胞への分化誘導を試みた実験の多くは、胎生期に発現する α フェトプロテインやアルブミンのプロモーターをレポーターとして利用しているものがほとんどであり、それよりも分化段階の進んだマーカー遺伝子のプロモーター解析はほとんどなされていない。そのため、アルブミンは発現するが、さらに機能細胞へと分化するのかどうか不明であったり、更なる分化マーカーの発現の判定が必要であったりした。そこで、アルブミンより分化段階の進んだ肝分化マーカーである TAT の発現に注目した。我々の研究室では、胎生 14 日由来の肝細胞の初代培養系を確立しており、OSM がデキサメタゾン存在下で肝細胞分化を強く誘導することを明らかにしている。その際、TAT をはじめ多くの代謝酵素の発現も強く誘導されることから、この系を用いて、TAT のプロモーター解析を行なった。方法としては、まず、マウスゲノムライブラリーより単離し

た TAT 遺伝子のプロモーター領域(約 3.0kb)を Luciferase 遺伝子の上流に連結したレポーターを作成し、胎生肝細胞に導入した後、OSM による分化誘導を行ない、転写活性を解析した。さらに、様々な長さの deletion mutant を作成し、OSM による TAT の転写活性化領域の特定を行なった。さらに、肝細胞の発生過程で重要とされる C/EBP α 、STAT3 などの転写因子との関連性を詳細に調べた。

2. 肝細胞の形態形成におけるオンコスタチンMの作用の解析

人工肝臓の作製のために充填する細胞は、解毒や栄養代謝のための酵素群の発現、グリコーゲンの蓄積といった機能面はもちろんのこと、各細胞の形態や細胞群が形成する構造においても成熟肝臓に近いものであることが望まれる。

OSM による胎生肝細胞の分化誘導系は代謝酵素群の発現のみならず、核の明瞭化・豊富な細胞内顆粒・高度な細胞間構造体など形態的にも成熟した肝細胞の様相を呈する。そこで、分化誘導した後、電子顕微鏡により細胞間の構造を詳細に調べた。また、OSM の作用により細胞骨格にどのような変化が引き起こされたのかを免疫染色法

により調べた。さらに、OSM の細胞内情報伝達系のどのシグナルカスケードが、成熟肝細胞への構造変化に重要なのかをカスケード上の伝達分子を欠くミュータントマウスを用いて調べた。

3. 四塩化炭素投与マウスにおける再生肝でのオンコスタチンMの役割

OSM は胎生肝のみならず、成体においても急性肝傷害時に一過的にその発現が上昇することが明らかとなっている。このことから、OSM は成体の肝再生過程にも重要な役割を果たしていることが想定される。そこで、肝再生時にはどのような細胞が OSM を分泌しているのか、また、どのような細胞群に作用して肝再生に寄与しているのかを四塩化炭素投与肝再生モデルマウスを用いて、分子生物学的手法および細胞生物学的手法により解析した。

まず、四塩化炭素 20 μ l を腹くう内注射し急性肝傷害を誘導した後、コラゲナーゼ溶液で肝臓を還流して十分に消化し、肝臓内の細胞を分散させて回収した。その際、45 x g、1 分間、2 回遠心した沈殿を肝実質細胞分画、その上清を 80 x g、2 分間、3 回遠心した上清を非実質細胞分画とした。このようにして肝傷害後の OSM とその受

容体の発現を経時的に調べた。また、非実質画分の細胞を培養し、OSM の効果を調べた。

C. 実験結果

1. 胎仔肝初代培養系における TAT プロモーターの解析

マウスゲノム上の TAT プロモーター領域に Luciferase 遺伝子を連結してレポーターアッセイを行ない、プロモーター解析を行なった (図 1)。その結果、TAT 遺伝子の転写開始点より

0. 8kb 上流を含む領域に OSM 応答性の領域が存在することが分かった。さらに、領域を特定するため様々な長さの deletion mutant を作製し、レポーターアッセイを行なった。その結果、転写開始点から約 0.3kb を含むレポーターにおいて、OSM による最も強い転写活性化が認められた。一方、0.2kb を含むレポーターでは、OSM による転写の活性化が認められなかった。このことから、-200 から-300 にある約 100 塩基対に OSM 刺激に反応する配列が存在することがわかった。そこで、この領域の塩基配列を決定し、転写因子の応答配列を調べたところ、-230 から-270 の間に STAT3 と C/EBP α response element に類似した領域が並んで存在することが明らかになった。

この OSM に応答する配列を ORE(O_{SM} Responsive Element)と名付け、そこに含まれる STAT3 と C/EBP α の認識配列の機能をさらに詳細に調べた。すなわち、各々の配列を破壊した mutation レポーターを作成し、それらを胎生肝細胞に導入して OSM による転写活性を解析した。その結果、変異を加えない ORE では OSM に依存して、強い転写活性が認められるのに対して、STAT3-Response Element における変異、C/EBP α -Response Element における変異、及び STAT3 と C/EBP α -Response Element 両方に変異を導入したレポーターにおいては、OSM による転写の活性がほとんどみられなくなることが明らかになった。したがって、ORE では STAT3 及び C/EBP α のエレメントが必須であることが分かった。

次に、STAT3 と C/EBP α が ORE に結合するかどうかを確かめるために、ビオチン化した ORE を Dynabeads に結合したプローブを作成した。このプローブを活性化型 STAT3-C と C/EBP α 発現ベクターを導入した COS-7 細胞株から調製した細胞懸濁液と混合して、ORE プローブを磁気濃縮器で沈殿した。プローブと一緒に共沈殿したタンパクを SDS-PAGE と Western blot

法にて分析した。ここで用いた STAT3 には Flag ペプチド、また C/EBP α には Myc ペプチドの Tag を付加してあるので、各々の抗体による Western blot で検出が可能である。このビオチン化 ORE プローブにより、STAT3 と C/EBP α は ORE に直接に結合できることが明らかになった。こうした結果を踏まえて、現在、STAT3 と C/EBP α の TAT 発現における機能解析を行なっている。

次に、活性化型 STAT3-C および C/EBP α の発現ベクターをこの Wild type レポーターと一緒に肝細胞に導入し、Luciferase の活性を調べたところ、OSM 非存在下で STAT3-C は活性がなかったが C/EBP α 、及び STAT3-C と C/EBP α には依存的な転写活性化が認められた。興味深いことに、STAT3、C/EBP α を同時に発現させると、それぞれ単独で存在する時に比べ強い転写活性を示すことが明らかになった。したがって、OSM は STAT3、C/EBP α を介して、TAT 遺伝子の発現を転写レベルで制御していることが明らかになった。また、STAT3 と C/EBP α が相加的な作用を示すことから、STAT3、C/EBP α の相互作用が機能的な成熟に重要な役割を果たすことが示唆された。また、Flag (STAT3 に付加された Tag) の抗体を cell lysates に加えて免疫沈降

した結果、C/EBP α が共沈してきたこと、逆に Myc (C/EBP α に付加された Tag) の抗体を cell lysates に加えても、Flag の場合と同じく、STAT 3 を共沈できたことから、STAT 3 は C/EBP α と結合して、複合体を形成することが示唆された。このように TAT のプロモーターには、STAT 3 と C/EBP α 応答配列が存在し、OSM はその領域を介して STAT 3 を活性化した。活性化した STAT 3 は転写能力を持たないが、転写能力を持つ C/EBP α と結合して複合体になり、ORE と結合して TAT 遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

2. 肝細胞の形態形成におけるオンコスタチンMの作用の解析

OSM で分化誘導した肝細胞は形態的には成体肝臓の成熟した肝細胞に非常によく似ているが、さらに詳細に構造を調べるため、電子顕微鏡による観察を行なった。その結果、細胞-細胞間で非常に明瞭な結合領域が観察され、細胞間接着に携わる接着斑 (desmosome) 様の構造体も認められた (図 2)。また、上部の細胞膜には無数の微絨毛 (microvilli) が観察され、極性を有する上皮細胞の形態をとっていた。さらに、細胞質にはグリコーゲ

ンや脂質の顆粒が認められた。これらの特徴は成熟した肝細胞と非常によく合致するものであり、OSM が機能だけでなく、形態的にも肝細胞の成熟化に関わっていることが明らかとなった。

そこで、OSM による肝細胞の構造変化には、どのような分子が関与するのかを免疫染色法で調べた。その結果、細胞接着分子の一つである E-カドヘリンが OSM がいない状態では拡散しているのに対し、OSM 存在下では細胞膜に局在化していることが明らかとなった (図 3)。このような細胞接着分子の細胞間での局在化が成熟型肝細胞の細胞骨格形成に寄与しているものと考えられた。

OSM の細胞内情報伝達系としては、主に Ras と STAT 3 が知られている。そこで、E-カドヘリンの局在化にはどのシグナル伝達系が重要なのかを調べるために、ドミナント・ネガティブ型の Ras もしくは STAT 3 を細胞内で強制発現させた。その結果、STAT 3 のシグナルを抑えたものでは局在化に変化は見られなかったが、Ras を抑えたものでは顕著に局在化が阻害されていた (図 4)。Ras には H, K, N の 3 種類の Ras が存在するが、それぞれのノックアウトマウス由来の初代胎仔肝細胞培養を OSM 存在下で行なった結果、

K-Ras が E-カドヘリンの局在化に必須であることが明らかとなった (図 5)。

これまで、胎仔肝細胞の機能的な成熟には STAT3 が重要であると考えられてきたが、成体肝臓内での肝細胞の形態や構造形成には Ras シグナルが重要であると示唆された。

3. 四塩化炭素投与マウスにおける再生肝でのオンコスタチンMの役割

四塩化炭素投与マウスにおける肝再生過程での OSM とその受容体の発現を経時的に調べたところ、OSM は傷害後、非実質細胞で誘導され、その受容体は実質細胞で誘導されることが明らかとなった (図 6)。このことから、肝再生時に非実質細胞から実質細胞への OSM のパラクリン機構が働いていることが示唆された。

また、OSM が非実質細胞にも作用するかどうかを *in vitro* culture により調べた結果、OSM を添加した場合に顕著な形態変化が観察された (図 7)。この細胞はマーカー分子の発現から判断して類洞内皮細胞であると見られ、OSM が実質細胞以外の肝臓内の細胞にも作用していることが示唆された。また、OSM は非実質細胞における Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

(TIMP-1)の発現を誘導したことから、肝再生過程の細胞骨格の再構築にも積極的に関与していることが示唆された。このように、OSM は肝臓を構成する様々な細胞の応答に関わる因子であることが明らかとなった。

D. 考察

TAT のプロモーター解析については、OSM に応答して転写を活性化する領域の特定ができた。今後はこの領域に GFP や beta-galactosidase などのレポーター遺伝子を導入して、実際に発生過程の肝臓で機能しているかどうかを調べる必要がある。その上で、ES 細胞に導入し効率の良い肝細胞への分化条件の評価、および細胞分離に利用していきたい。

OSM の肝細胞分化系においては、肝細胞は機能面のみならず、形態的、構造的にも成熟化していることが明らかとなった。今後は三次元培養においてもそれらの構造が保たれ、成体肝臓に近い形態をとるのかどうかを検証していく必要がある。

近年、肝発生の極初期段階においては、内皮細胞の存在が重要であるという報告がなされた。成体における非実質細胞の *in vitro* 培養において、OSM による劇的な形態変化が認められたが、

その意味については現在検討中である。肝再生過程での類洞内皮細胞の役割については、SAGE法（Serial analysis of gene expression）を用いて、類洞内皮細胞で発現している遺伝子を肝再生前後で比較することにより解析を進めている。

また、未分化肝細胞の抗原の探索については、胎生14日の肝臓から細胞を回収し、ラットに免疫することでモノクローナル抗体を作製する準備を進めている。

E. 結論

我々はマウス胎仔肝細胞を材料として、*in vitro*でのOSMによる肝細胞分化誘導系を確立してきた。そして、OSMによる作用は酵素などの機能分子の遺伝子発現誘導のみならず、成熟肝でみられるような肝細胞の形態や構造形成にも関与していることを明らかにした。さらに、E-カドヘリンの局在化については、K-Rasのシグナル系が必須であることを明らかにした。肝臓では、肝細胞は極性をもって配置されており、類洞、Disse、毛細胆管などの構造を形成している。そのため、OSMが構造的にも肝細胞の成熟化に寄与していることは、人工肝臓を作製

する上でも有利な作用であると考えられる。

また、ES細胞から肝細胞への*in vitro*分化系を確立する上で、肝細胞分化を段階的にモニターできるシステムを構築することは有用である。我々は後期分化マーカーの一つであるTATのプロモーターの解析を行ない、分化誘導に応答する領域を特定した。我々は肝傷害モデルマウスを用いて、肝再生時のOSMの作用について調べた。その結果、肝再生過程ではOSMが非実質細胞で、OSM受容体が肝細胞で誘導されることが明らかとなり、非実質細胞から実質細胞へのOSMのパラクリン機構が働いている可能性を見出した。また、非実質細胞の中にもOSMに反応し劇的に形態変化する細胞が見いだされた。さらに、TIMP-1の発現を強く誘導していることも明らかとなり、肝再生過程の細胞骨格再構築に積極的に関与しているものと考えられた。

このように、OSMの肝細胞分化に対する作用を詳細に解析することにより得られた知見を、肝幹細胞もしくはES細胞からの肝細胞分化系の確立に応用していくつもりである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) K-Ras mediates cytokine-induced formation of adherens junctions during liver development.

T.Matsui, T.Kinoshita, Y.Morikawa, K.Tohya, M.Katsuki, Y.Ito, A.Kamiya, and A.Miyajima

EMBO J., **21**, 1021-1030, 2002

2) Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways.

A.Kamiya, T.Kinoshita and A.Miyajima

FEBS Letters, **492**, 90-94, 2001

2. 学会発表

1) 小島伸彦, 木下大成, 宮島 篤
(東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M および細胞高密度培養による C/EBP α の翻訳調節

第 37 回日本肝臓学会総会 (01.5.17
~5.18 パンフィコ横浜)

2) 松井貴輝 1, 木下大成 1, 沢井昭司 2,
勝木元也 2, 宮島 篤 1

1 東京大学分子細胞生物学研究所, 2 東京大学医科学研究所

K-Ras による E-カドヘリンを介した接着装

置の形成制御

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30
笹川記念会館)

3) 荘敦堯, 松井貴輝, 木下大成, 宮島 篤
(東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M による tyrosine amino transferase 遺伝子の発現制御

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30
笹川記念会館)

4) 野中秀紀, 松井貴輝, 木下大成, 宮島 篤
(東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M 類洞内皮細胞への作用

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30
笹川記念会館)

5) 小島伸彦 1, 木下大成 1, 塩尻信義 2,
宮島 篤 1 1 東京大学分子細胞生物学研究所,
2 静岡大学理学部生物地球環境科学科
オンコスタチン M による C/EBP α の転写活性調節

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30 笹
川記念会館)

6) Duch-yau Chuang, Takaaki Matui, Taisei
Kinoshita and Atsushi Miyajima

IMCB, The University of Tokyo

Regulation of Tyrosine Amino Transferase
Expression by Oncostatin M in Fetal Liver

4th International Conference of the Asia-Pacific
International Molecular Biology
Network (01.11.03~11.04 国立台湾大学
台北、台湾)

7) 松井貴輝 1, 木下大成 1, 森川吉博 2,
勝木元也 3, 宮島 篤 1

1 東大・分生研, 2 和歌山県医大, 3 基生
研

肝発生過程における細胞間接着の制御機構

第 24 回日本分子生物学会年会

(01.12.09-12.12 パシフィコ横浜)

8) 荘 敦堯, 松井貴輝, 木下大成, 宮島
篤 (東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M による tyrosine

amino transferase 遺伝子の発現制御

第 24 回日本分子生物学会年会

(01.12.09-12.12 パシフィコ横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし

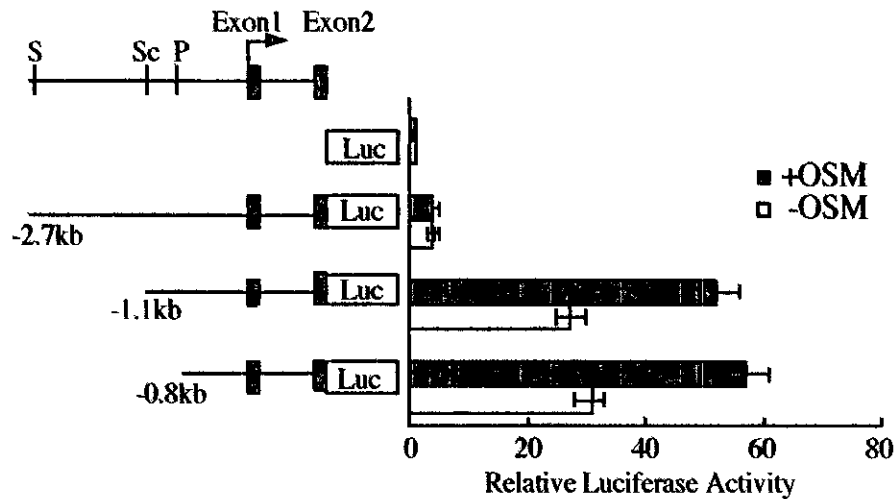


図1 TAT遺伝子のプロモーター領域のルシフェラーゼアッセイ
転写開始点より0.8kb上流領域がOSM依存的なTATの転写に必要である。
S; Sall, Sc; SacI, P; PstI

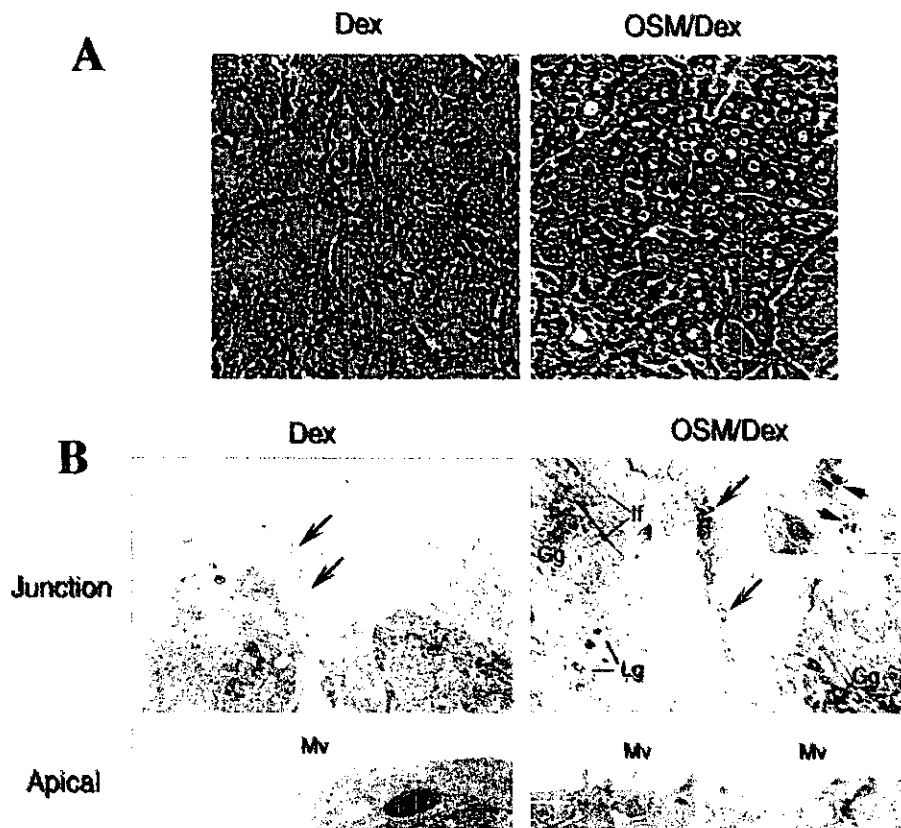


図2 オンコスタチンMにより分化した肝細胞の形態および細胞間接着構造

(A) デキサメタゾン (Dex) 存在下、オンコスタチンM (OSM) は胎仔肝細胞を成熟肝細胞様の形態に導く。

(B) 電子顕微鏡による細胞間接着構造

細胞上面には多くの微絨毛(Mv) が観察され、細胞内にはグリコーゲン(Gg)や脂質(Lg)の顆粒、中間径フィラメント(If)が見られる。また、細胞間には接着斑(desmosome)様構造 (矢印) も観察される。

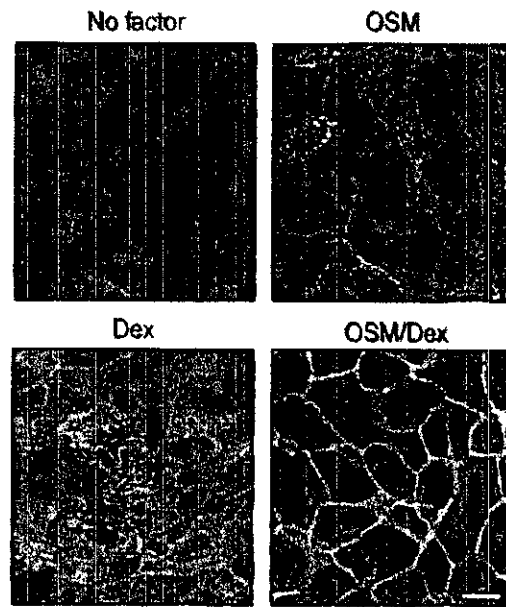


図 3 E-カドヘリンの免疫染色による解析

DexのみではE-カドヘリンの発現は誘導されるが、拡散しているのに対し、OSM存在下では細胞間接着領域での顕著な局在が誘導される。

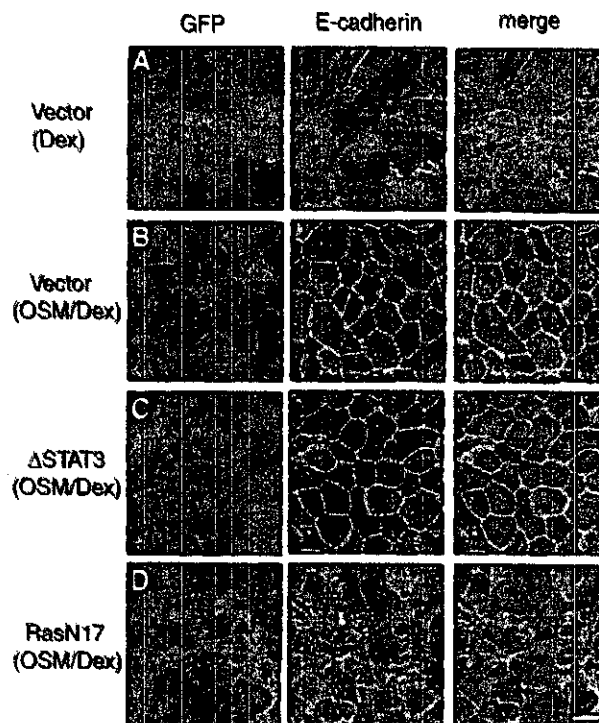


図 4 ドミナント・ネガティブ型STAT3およびRasの強制発現によるE-カドヘリン局在化の影響

ドミナント・ネガティブ型STAT3(Δ STAT3)もしくはRas(RasN17)をGFPと共に強制発現させた結果、Rasのシグナル系を抑えた場合に顕著なE-カドヘリンの局在化の阻害が見られた。

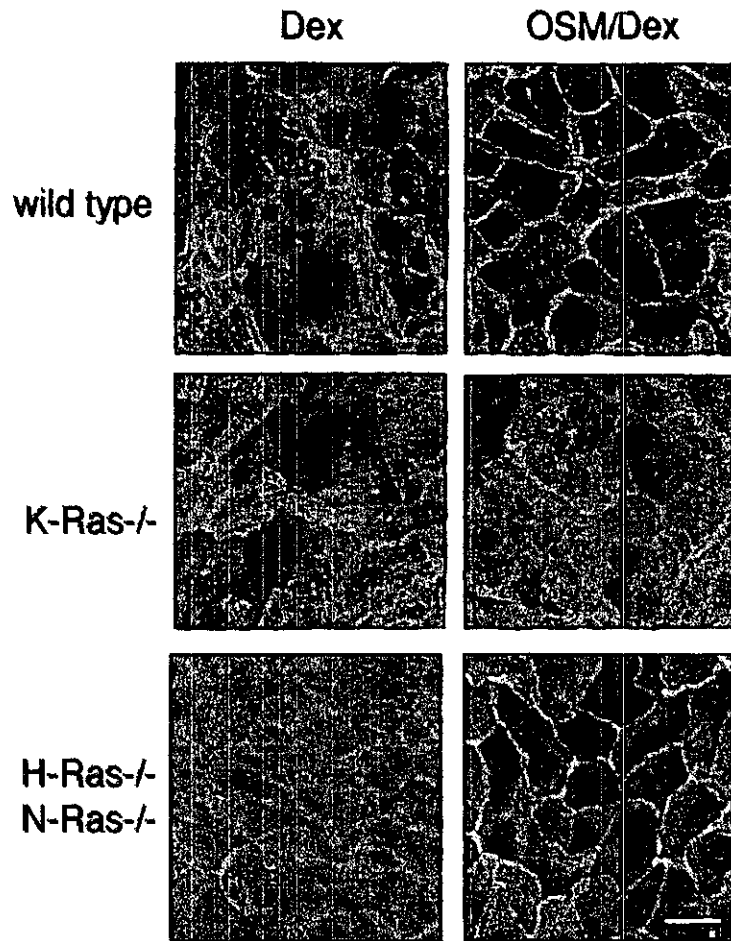


図 5 Rasノックアウトマウスを用いたE-カドヘリン局在化の解析
 3種類存在するRasファミリーのうち、H-RasとN-RasのダブルノックアウトマウスではE-カドヘリンの局在化に変化は見られなかったが、K-Rasのノックアウトマウスでは局在化が顕著に阻害された。

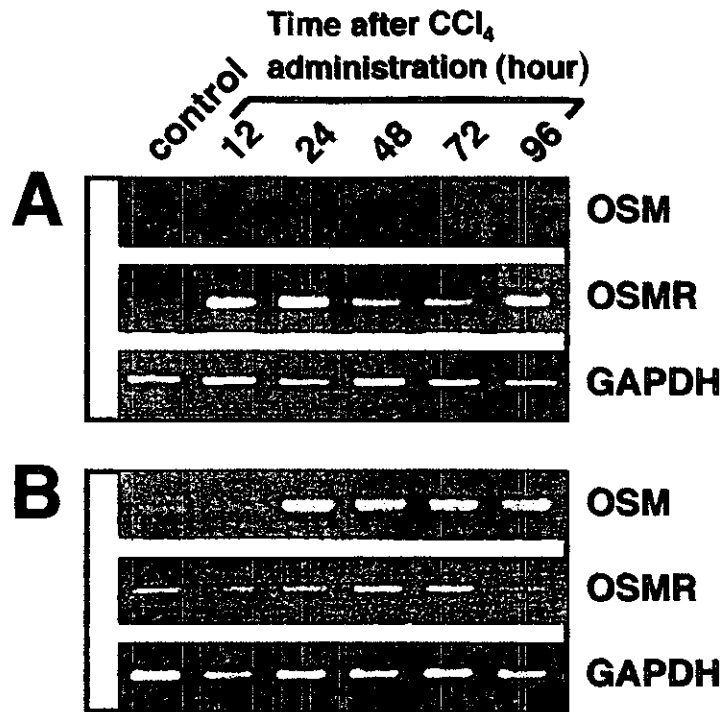


図 6 急性肝障害による肝再生モデルにおけるOSMとその受容体の発現

RT-PCR法により肝再生中のOSM、OSM受容体の発現を解析した。成体マウスにサラダ油で10倍に希釈した四塩化炭素を200 μ l/bodyで腹腔注射し急性肝障害を誘導した。四塩化炭素投与後、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間経過したところで灌流法と低速遠心法により肝細胞と肝非実質細胞を分離した。これらの細胞から抽出した全RNA 1 μ gよりfirst-strand cDNAを合成し全RNA 0.01 μ g相当をPCRの鋳型として用いた。対照は無処置のマウスを用いた。

A; 肝細胞、B; 肝非実質細胞

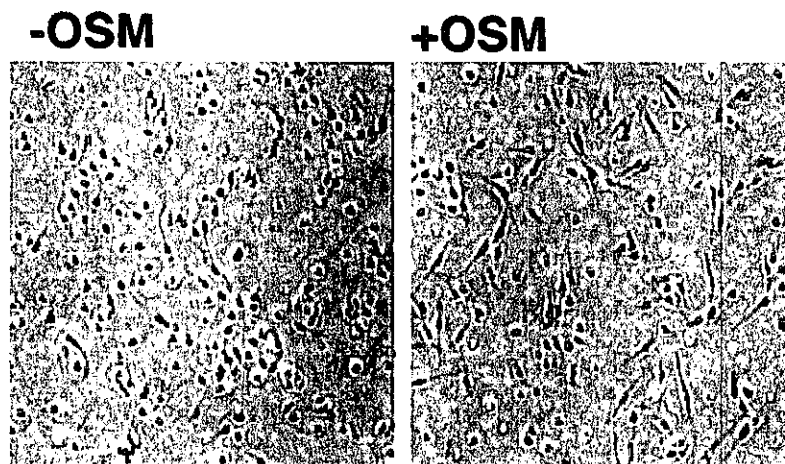


図 7 *in vitro*におけるOSMの肝非実質細胞に対する効果

成体マウスの正常肝より非実質細胞を分離し、血清、Insulin等を含むDMEM培地で培養した。培養1日目にOSMを添加した細胞 (+OSM) と、無添加の細胞 (-OSM) を3日間培養し、位相差顕微鏡で観察した。OSMは非実質細胞の顕著な形態変化を誘導した。また、このような効果は他のIL-6ファミリーのサイトカインでは見られなかった。

II. 分担研究報告

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

肝細胞培養系と人工肝臓モデル作成に関する研究

分担研究者 酒井 康行 東京大学生産技術研究所・助教授

研究要旨 肝臓などの複雑な臓器の *in vitro* 再構築を最終目的として、マウス胎仔肝細胞の *in vitro* における機能的分化に関する検討、複雑な構造を持つ生体吸収性臓器テンプレートの作製手法に関する基礎的な検討、を行った。マウス胎仔肝細胞の培養においては、ニコチンアミド・DMSO・オンコスタチンMの三者を共存させ、ポリ乳酸多孔質担体を用いた三次元培養を行うことで、*in vitro* における成熟化のレベルを従来の培養条件と比較して飛躍的に高めることができ、少なくとも細胞あたりのアルブミン分泌能については、成熟マウス肝細胞と同レベルの機能発現を達成し得た。この条件下では肝前駆細胞と考えられる小型の肝細胞が非常に活発に増殖した。臓器テンプレートの作製プロセスについては、光三次元微細造形技術の適用を最終目的として、まず光反応性生体吸収性樹脂の開発とアゾ化合物を用いる光同時発泡重合プロセスの可能性を検討した。その結果、XY平面においては少なくとも500 μm 程度の精度を持って、流路構造と細胞担時のためのランダム多孔質部を1回の紫外線照射で同時に成型できることが示された。

A. 研究目的

近年、生分解性高分子からなる臓器テンプレート上で患者の細胞を *in vitro* で増殖組織化させた後に移植し、患者の欠損した臓器機能を再生することを意図した生体組織工学に関する研究が活発化している。皮膚や軟骨など比較的平板に近く簡単な構造を持

つ臓器と異なり、肝臓や腎臓・肺などのある程度のマスと高度に組織化された内部構造を持つ実質臓器については、どのように再構築を進めるかについても未だ賛否両論であり、具体的なめどは全く立っていない。そこで本研究では、第一に、機能レベルは極めて低いが高い増殖能と