

20020457

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 岡 義 生

平成15(2003)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	-----	11
2. ヒト肝幹細胞精製法の確立に関する研究		
永尾 雅哉	-----	17
3. 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	-----	24
4. ヒト肝幹細胞分離・同定に関する研究		
廣瀬 哲朗	-----	31
5. ヒト組織形成に関する情報提供		
塩田 浩平	-----	38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	45

厚生労働科学研究費補助金（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ことを検討することである。研究2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、成熟ラット肝臓より分離培養した小型肝細胞コロニーをコラーゲンスポンジ上に播種することにより迅速に類肝組織を形成させることに成功した。また、そのコロニーに Matrigel を投与した後の小型肝細胞において、肝の代表的な薬物代謝酵素であるチトクローム P 4 5 0 (CYP)の発現誘導を行い、生体内の肝細胞と同等の機能を持つ細胞に分化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同定が可能となり、さらにコラーゲンスポンジ上で成体肝由来細胞を培養することにより、ラットと同様に迅速に類肝組織を形成させることに成功した。分担研究者の廣瀬の研究では、昨年度同定分離法を確立したマウス成体肝幹細胞と成熟肝細胞との間で遺伝子発現解析を行うことで、肝幹細胞特異的遺伝子候補の同定を行い、同時にマウス成体肝幹細胞特異的表面抗原も同定されつつあり、同時にそのヒトホモログの検索を行っている。さらに、マウス胎仔肝前駆細胞の成熟化の検討において、内皮細胞やクッパー細胞からなる分化した肝非実質細胞は、肝前駆細胞の成熟化には抑制的に作用することを解明した。一方、分担研究者の永尾と廣瀬により、その肝前駆細胞の詳細な細胞表面抗原解析から肝前駆細胞を分離・精製することが可能となり、さらにその成熟化には細胞集塊に含まれる未分化間質系細胞が重要な役割を果たすことが示された。

この様に、肝幹細胞・肝前駆細胞の詳細な特性が解明され、分化・成熟化法が確立されつつあり、今後ヒト検体への応用を検討し、ヒト肝幹細胞・ヒト肝前駆細胞・ヒト小型肝細胞の分離や成熟化法を検討する。

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ことを検討することを目標としている。本研究2

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3次元培養および薬物代謝酵素誘導

(a) 小型肝細胞の3次元培養

・成熟雄 SD ラット肝臓をコラゲナーゼ液にて灌流し、細胞を分離したのち、小型肝細胞が増殖し、コロニーを形成する培養約14日目に小型肝細胞のコロニーを分離する。小型肝細胞コロニーを濃縮し、1250~10000個/培養皿の範囲でコラーゲンスポンジに再播種する。

・培養液中に分泌されるアルブミンなどの血清タンパク質 ELISA 法や Western blot 法を用いて検討し、アンモニア代謝能や尿素産生を測定する。

・コラーゲンスポンジ中に形成される組織の構成細胞を特異的抗体で免疫染色し、個々の細胞を特定し、さらに超微形態を電子顕微鏡を用いて検討する。

(b) チトクロームP450の発現

・同様に分離した小型肝細胞がコロニーを形成する培養約14日目に、小型肝細胞のコロニーを分離し、約3000個/培養皿の濃度で新しい培養皿に再播種する、

・10日間培養後、細胞外基質として Matrigel の投与を行い、Matrigel により成熟化を誘導された小型肝細胞の 3-methylcholanthrene (3MC), phenobarbital (PB), pregnenolone (PCN), clofibrilic acid (CLOFA), ethanol (EtOH) 刺激下での、cytochrome (CYP)1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1, 2E1 誘導を検討する。

(2) ヒト小型肝細胞を用いた類肝組織構築の実験

マウス小型肝細胞の実験結果から Matrigel が成熟化に有効であることが確認されていたが、ヒトへの応用には問題があることから、新しい scaffold を検討した。

足場の材料になるものとして、コラーゲン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などをラット小型肝細胞にて検討した結果、コラーゲンタイプIシート(商品名;ヘリスタット)が組織化を促進することが明らかとなった。そこで、ヒト正常肝切片より分離された細胞を播種・培養を行い類肝組織の構築を試みた。培養後、コラーゲンシートのパラフィンブロックを作成し、シートの縦断面を H. E 染色し、形態を観察した。機能的解析として培養液中へのアルブミンの分泌を ELISA にて、増殖能の検討とし、PCNA の免疫染色にて評価した。

(3) 成体肝幹細胞に特異的に発現する表面抗原を同定する実験

・肝内では内胚葉系細胞に強く GFP を発現するトランスジェニックマウスの肝臓をコラゲナーゼ液で灌流して細胞を分離する。同種細胞接着性を利用して肝幹細胞を濃縮した後に、GFP の発光強度と細胞の大きさを指標に蛍光励起セルソーターにて肝幹細胞を高純度に分離する。

・分離した細胞より mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成する。別に分離した同じマウスの成熟肝細胞からも同様に cDNA ライブラリーを作成し、それぞれの cDNA に別々のアダプター DNA を結合させる。この2つの cDNA ライブラリーを混合してハイブリダイズ

した後に特定のプライマーを用いて PCR 法を行うと (cDNA サブトラクション法)、肝幹細胞には発現するが成熟幹細胞には発現しない cDNA のみが増幅される。増幅された cDNA をクローニングし、DNA シーケンサーを用いて塩基配列を解読して遺伝子を同定する。

(4) 胎児肝幹細胞の分化誘導における間葉系細胞の影響の検討する実験

・胎児肝より同種細胞接着性を利用して肝幹細胞を分離し、残りの分画から血液系細胞を除いた分化した間葉系細胞を分取する。肝細胞への分化誘導因子として従来知られている hepatocyte growth factor (HGF) と oncostatin M (OSM) を添加し、肝幹細胞から成熟肝細胞への分化の程度を、成熟肝細胞マーカー遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で比較することにより検討する。また、これらの因子の作用に対する分化間葉系細胞からのシグナルを検討するために、トランスウェルを用いて肝幹細胞と分化間葉系細胞を接触系と非接触系にわけて共培養する。

・我々が胎仔肝幹細胞分離に利用している細胞集塊を一旦接着培養させ、1日後に細胞を単離し、細胞塊に含まれる細胞群をその表面抗原で詳細に検討する。蛍光励起セルソーターにて分離された肝幹細胞と間葉系未分化細胞を共培養し、肝幹細胞の成熟化を成熟肝細胞マーカー発現や電子顕微鏡での微細形態観察にて検討する。

(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

もとに、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。

ヒト正常肝組織は、京都大学医学部「医の倫理委員会」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。

C. 研究結果

(1) ラット小型肝細胞の3次元培養および薬物代謝酵素誘導

(a) 小型肝細胞の3次元培養

・コラーゲンスポンジ中では、小型肝細胞の増殖速度は培養皿上よりも遅かった一方、培養経過とともに形態的に大型の成熟肝細胞へと変化し、成熟肝細胞のマーカー陽性となった。さらに、スポンジ内に形成された組織では、一部に管腔構造の形成を認め、サイトケラチン19が陽性の胆管上皮細胞様であった。しかし、類洞内皮細胞や血管内細胞は認められなかった。透過型電子顕微鏡を用いた検討では、大型細胞の細胞質中の豊富なミトコンドリアや粗面小胞体や、細胞間にあるタイト結合などの細胞間接着装置、また、毛細胆管の形成などから小型肝細胞の成熟化を確認した。

・アルブミンやトランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノーゲンなどの血清タンパク質の培養液中への分泌、尿素窒素合成能などは培養経過と共に増加し、コラーゲンスポンジが小型肝細胞の成熟化を促進することが機能的にも確認さ

れた。

(b)チトクロームP450の発現

・ Matrigel を投与した小型肝細胞と投与していないもので 3MC, PB, PCN, CLOFA, EtOH によって誘導されてくる CYP isozymes の濃度依存性を調べた結果、誘導される CYP1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1, 2E1は濃度依存性にその発現を増した。それぞれの薬剤によって誘導されてくる CYP1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1の発現量は、Matrigel 投与にて培養時間に伴い増加するが、CYP2E1は逆にその発現が減少した。CYP 酵素の活性も CPY1A で約120倍、CPY2B で約2倍、CPY3A で約3.5倍、CYP2E で約8倍活性が上がった。また尿素合成能も Matrigel 投与にて約2倍産生量が上がった。以上より、ラットでは Matrigel が小型肝細胞の成熟化に有用であることが示され、またヒトに適用する際には立体構築も可能な事を考慮すると、代替品としてコラーゲンスポンジが利用可能と考えられた。

(2) ヒト小型肝細胞を用いた類肝組織構築の実験

コラーゲンシート上での培養 35 日目、コラーゲンシートの縦断面の H.E 染色を観察すると胆管上皮が表層を覆いその下層に肝細胞及び腺管構造(胆管、血管)を認める三次元類肝組織の構築を示した。さらに、コラーゲンシート上での培養した細胞群では、培養液へのアルブミンの分泌は従来の単層培養に比し著明な増加を示した。また、類肝組織を構築した胆管細胞や肝細胞は高率のPCNA の発現を認めたことから、小型肝細胞が関与している可能性が高いと考えられた。

(3) 成体肝幹細胞に特異的に発現する表面抗原を同定する実験

我々が用いている GFP トランスジェニックマウスの肝臓をコラゲナーゼ処理し、同種細胞接着性を利用して肝幹細胞を含む細胞を濃縮すると、約5%の細胞が肝幹細胞であった。この肝幹細胞をセルソーターにて高純度に分離し、この細胞から得られた cDNA ライブラリーと別に分離した成熟肝細胞の cDNA ライブラリーをサブトラクションした後にクローニングしてその塩基配列を解読した。約500クローンのシークエンスを行い、約300遺伝子が同定し、約30の遺伝子が得られた。このうち3つは膜蛋白ドメインを有しており、特異的表面抗原として利用できる可能性が高いため、現在これを確認中である。

(4) 胎児肝幹細胞の分化誘導における間葉系細胞の影響の検討する実験

内皮細胞やクッパー細胞などの分化した間葉系細胞の肝幹細胞への影響を検討するために、肝幹細胞単独培養群と、内皮細胞やクッパー細胞などの分化した間葉系細胞との共培養群を比較すると、共培養群では肝幹細胞単独培養群に比べ明らかに肝幹細胞の成熟化が阻害されている結果が得られた。また、細胞集塊として採取される肝幹細胞の詳細な表面抗原解析から、これまでほぼ単一の細胞集団と思っていた肝幹細胞のほかにも、わずかに間葉系未分化細胞と血球系細胞が含まれることが判った。興味深いことに分離された肝幹細胞単独では成熟肝細胞への分化は誘導されないが、この間葉系未分化細胞と共培養することで分化が誘導されることが確認された。今後、このモ

デルを詳細に検討することで、分化の厳密なスイッチングの可能性を検討することとしている。

D. 考察

我々は、小型肝細胞、肝幹細胞、胚性幹細胞を成熟肝細胞へと分化・成熟化させることで肝不全治療へ応用することを目指している。小型肝細胞については、昨年度に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が、本年度はその研究を進展させ、小型肝細胞を3次元的に配置することにより、成熟化・組織化が誘導できないか検討した。その結果、小型肝細胞は基底膜がなくても空間的にコラーゲンが配置されたコラーゲンスポンジという scaffold を利用することにより、類肝組織を形成しつつ成熟化が誘導されることを解明した。形成された類肝組織は、アルブミンやトランスフェリンなど血清タンパク質の分泌能、アンモニア代謝能や尿素合成能も増加しており、形態学的に成熟化しているのみならず、機能的にも成熟化しているといえる。また、Matrigel によって成熟化誘導を受けた小型肝細胞が形成する類肝組織の薬物代謝能について検討したところ、初代培養肝細胞では、数日の内にほとんどその発現が消失するにもかかわらず、小型肝細胞では分離後約30日培養後にも constitutive に一部のチトクロームP450を発現していた。さらに、培養小型肝細胞においても代表的なチトクロームP450分子種の発現を、それぞれの誘導薬剤投与により生体内とほぼ同様に誘導することも確認し、試験管内での薬物代謝解析等への応用の可能性が示唆された。さらに、ヒト小型肝細胞

でもコラーゲンスポンジにおける培養により、同様に類肝組織構築を誘導できることも確認しており、今後小型肝細胞特異的表面抗原の特定などで、ヒトでも確実な分離方法が確立されれば様々な応用が可能であると考えている。

また、マウス胎仔肝幹細胞を用いた実験では、昨年度までには分離・成熟化がある程度可能であったが、さらに安全・確実な手法の確立を検討した。その結果、細胞集塊として肝幹細胞を分離する際に除外される内皮細胞やクッパー細胞などの分化した間葉系細胞が肝幹細胞の成熟化を抑制することを新たに見だし、これまでほぼ単一の細胞集団と考えていた肝幹細胞集塊中にはわずかの血球系細胞と未分化間葉系細胞が存在することが解明された。興味深い事に、この未分化間葉系細胞と肝幹細胞を共培養すると肝幹細胞の分化・成熟化が起きるが、肝幹細胞単独で培養するとほとんど分化・成熟化が起らないことから、この培養システムの利用により肝幹細胞の未分化状態維持と分化・成熟化とのスイッチングが人為的に調節できる可能性が示唆された。

さらに、昨年度 GFP トランスジェニックマウスを利用することで成体肝幹細胞を単離することが可能になったため、これをヒトで応用可能にするためにマウス成体肝幹細胞の遺伝子発現解析を行った。その結果、成体肝幹細胞分離に応用可能と思われる特異的表面抗原の候補がいくつか同定され、現在その特異性の確認を行っている。来年度にはそのヒトホモログの同定を計画しており、ヒト肝幹細胞特異的表面抗原が同定されれば、特異的表面抗原に対するモノクローナル抗体を利用したヒト成体肝幹細胞の分離が可能となると思われる。

さらに現在、京都大学再生医科学研究所でヒト胚性幹細胞樹立中であることから、樹立されれば前年度に確立したマウス胚性幹細胞から肝細胞系への分化誘導法や本年度に得られた肝幹細胞の成熟化法をヒト胚性幹細胞に応用することで新たなヒト細胞源の確立を目指す。

E. 結論

・小型肝細胞は、コラーゲンスポンジ中で培養すると細胞外基質の Matrigel を加えること無しに成熟を短期間に誘導することができた。

・ Matrigel によって成熟化誘導をかけた小型肝細胞においても代表的な肝薬物代謝酵素であるチトクロームP450の発現を蛋白質のみならず、活性においても誘導することが可能であった。

・コラーゲンシート上でヒト正常肝切片より分離された細胞を培養することで、類肝組織構築が可能であることが示された。

・細胞集塊としてマウス肝前駆細胞を分離する際に除外される内皮細胞やクッパー細胞などの分化した間葉系細胞がマウス肝前駆細胞の成熟化を抑制することが解明された。

・肝幹細胞は単独で培養するとほとんど分化・成熟化が起こらないが、未分化間葉系細胞が存在すると分化・成熟化が促進されることが確認された。

・マウス成体肝幹細胞の遺伝子発現解析から成体肝幹細胞特異的表面抗原が同定されつつある。

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. Hepatic progenitor cells from adult mouse liver. *Hepatology* 2003 (in press)
2. H.Hashida, A.Takabayashi, M.Kanai, M.Adachi, T.Imai, K.Kondo, N.Kohno, Y.Yamaoka, M.Miyake Aminopeptidase N Is Involved in Cell Motility and Angiogenesis: It' s Clinical Significance in Human Colon Cancer *Gastroenterology* 1222 376-386 2002
3. H.Hashida, A.Takabayashi, T.Tokuhara, T.Taki, K.Kondo, N.Kohno, Y.Yamaoka, M.Miyake Integrin $\alpha 3$ expression as a prognostic factor in colon cancer : association with MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 *International Journal of Cancer* 97 518-525 2002
4. N.Uyama, Y.Shimahara, N.Kawada, S.Seki, J.Okuyama, U.Imuro, Y.Yamaoka Regulation of Cultured Rat Hepatocyte Proliferation by Stellate Cells *Journal of Hepatology* 36 5 590-599 2002
5. H.Uchinami, Y.Yamamoto, M.Kume, K.Yonezawa, Y.Ishikawa, K.Taura, A.Nakajima, K.Hata, Y.Yamaoka Effect of Heat Shock Preconditioning on NF- κ B/I- κ B pathway during Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 282 962-971 2002
6. H.Fujii, T.Hirose, S.Oe, K.Yasuchika, H.Azuma, T.Fujikawa, M.Nagao, Y.Yamaoka Contribution of bone marrow

- cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice *Journal of Hepatology* 36 653-659 2002
7. M.Yoshida, N.Yamamoto, T.Nitta, T.Uehara, R.Terao, E.Hatano, Y.Iimuro, Y.Yamaoka Suppression of proliferative cholangitis by E2F decoy oligodeoxynucleotide *Journal of Surgical Research* 102 2 95-101 2002
 8. M.Yoshida, N.Yamamoto, T.Uehara, R.Terao, T.Nitta, N.Harada, E.Hatano, Y.Iimuro, Y.Yamaoka Kupffer cell targeting by intraportal injection of the HVJ-cationic liposome *European Surgical Research* 34 251-259 2002
 9. E.Hatano, D.A.Brenner Akt protects mouse hepatocytes from TNF- α - and Fas-mediated apoptosis through NK- κ B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 G1357-G1368 2002
 10. A.Tanaka, R.Takeda, S.Mukaihara, K.Hayakawa, K.Takasu, H.Terajima, Y.Yamaoka, T.Chiba Tumor thrombi in the portal vein system originating from gastrointestinal tract cancer *Journal of Gastroenterology* 37 220-228 2002
 11. N.Nishida, Y.Fukuda, T.Komeda, T.Ito, T.Nishimura, M.Minata, M.Kuno, H.Katsuma, I.Ikai, Y.Yamaoka, K.Nakao Prognostic Impact of Multiple Allelic Losses on Metastatic Recurrence in Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection *Oncology* 62 141-148 2002
 12. K.Yamagami, Y.Yamamoto, S.Toyokuni, K.Hata, Y.Yamaoka Heat Shock Preconditioning Reduces the Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal Modified Proteins in Ischemia-reperfused Liver of Rats Free Radical Research 36 2 169-176 2002
 13. T.Nishimura, N.Nishida, T.Itoh, M.Kuno, M.Minata, T.Komeda, Y.Fukuda, I.Ikai, Y.Yamaoka, K.Nakao Comprehensive allelotyping of Well-Differentiated Human Hepatocellular Carcinoma with Semiquantitative Determination of Chromosomal Gain or Loss Genes *Chromosomes and Cancer* 27 1-11 2002
 14. Y.Shimahara, N.Yamamoto, N.Uyama, H.Okuyama, H.Momoi, T.Kamikawa, H.Terajima, Y.Iimuro, Y.Yamamoto, I.Ikai, F.KUshihata, H.Kiyochi, N.Kobayashi, Y.Yamaoka Significance of Serum Type IV Collagen Level of Hepatectomized Patients with Chronic Liver Damage *World Journal of Surgery* 26 4 451-456 2002
 15. N.Katsura, I.Ikai, T.Mitaka, T.Shiotani, S.yamanokuchi, S.Sugimoto, A.Kanazawa, H.Terajima, Y.Mochizuki, Y.Yamaoka Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions *Journal of Surgical Research* 106 115-123 2002
 16. F.Ikeda, H.Terajima, Y.Shimahara, Y.Yamaoka. Improvement of hepatic microcirculation by ROCK inhibitor Y27632 in hepatic ischemia/reperfusion model in rat. *Proceeding of the 37th Congress of the European Society for Surgical Research*, edited by Mihaly Boros 161-164 2002
 17. G.Y.Lauwers, B.Terris, U.J.Balis, K.P.Batts, J.M.Regimbeau, Y.Chang, F.G.Cook, H.Yamabe, I.Ikai, K.R.Cleary,

- S.Fujita, J.F.Flejou, L.R.Zukerberg, D.M.Nagorney, J.Belghiti, Y.Yamaoka, J.N.Vauthey Prognostic Histologic Indicators of Curatively Resected Hepatocellular Carcinomas(A Multi-institutional Analysis of 425 Patients With Definition of a Histologic Prognostic Index) *The American Journal of Surgical Pathology* 26 1 25-34 2002
18. H.Momoi, Y.Shimahara, H.Terajima, Y.Iimuro, N.Yamamoto, Y.Yamamoto, I.Ikai, Y.Yamaoka Management of Adrenal Metastasis of Hepatocellular Carcinoma *Surg Today* 32 12 1035-1041 2002
19. S.Sugimoto, T.Mitka, S.Ikeda, K.Harada, I.Ikai, Y.Yamaoka, Y.Mochizuki Morphological Changes Induced by Extracellular Matrix Are Correlated with Maturation of Rat Small Hepatocytes *Journal of Cellular Biochemistry* 87 16-28 2002
20. K.Yasuchika, T.Hirose, H.Fujii, S.Oe, K.Hasegawa, T.Fujikawa, H.Azuma, Y.Yamaoka Establishment of a Highly Efficient Gene Transfer System for Mouse Fetal Hepatic Progenitor Cells *Hepatology* 36 6 1488-1497 2002
21. 山岡義生 新しい展開に期待 肝胆膵 45-5 471-472 2002
22. 廣瀬哲朗、山岡義生 再生医療はどこまで来たか 外科治療 1-8 86 2002
23. 寫原康行、山岡義生 その他の肝腫瘍 専門医のための消化器外科学レビュー 最新主要文献と解説 181-184 2002
24. 山本雄造、猪飼伊和夫、波多野悦朗、寺嶋宏明、山本成尚、寫原康行、山岡義生 II. 各種機械による肝離断 2. CUSAと水流滴下式バイポーラによる肝離断 臨床雑誌「外科」 530-534 64 2002
- 波多野悦朗、寺嶋宏明、山本成尚、山本雄造、猪飼伊和夫、寫原康行、山岡義生 胆道癌肝胆膵 823-827 44 (6) 2002
25. 波多野悦朗、山岡義生 疾患と手術のここが知りたい! 第5回 肝消化器外科 *NURSING* 77-82 2002年 第7巻8号 2002
26. 山本雄造、山岡義生 肝右3区域切除術 消化器外科 2002年6月臨時増刊号1101-1109 25 2002
27. 藤井英明、廣瀬哲郎、山岡義生 第33回 新しい薬剤耐性因子② *HIF Surgery Frontier* 63-65 別冊 2002
28. 宇山直樹、河田則文、奥山裕照、寫原康行、山岡義生 星細胞による肝細胞増殖制御 日本炎症・再生医学会雑誌 481-487 第22巻第5号 2002
29. 波多野悦朗、山岡義生 肝癌の診断に関する最新のデータ 臨床外科 171-177 57-11 2002
30. 寺嶋宏明、山本雄造、山岡義生 Ante situm肝切除による進行肝癌の治療 臨床雑誌「外科」 1299-1304 64-11 2002
31. 寫原康行、山岡義生 肝切除を伴う肝胆外科領域の術中及び術後血管合併症: pitfallとその対策 日本血管外科学会雑誌 687-692 11 (7) 2002
32. 山本雄造、猪飼伊和夫、寺嶋宏明、山本成尚、山岡義生 CUSAとバイポーラ電気メスを用いた肝切離法 手術 2031-2035 56 2002
- (2) 学会発表
1. Hirose, T., Yasuchika, K., Fujikawa, T., Azuma, H., Oe, S., Fujii, H., Yamaoka, Y.

- Isolation of hepatic progenitor / stem cells from mouse and human. 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (2002. 5. 19-22 San Francisco)
2. Yasuchika, K., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Azuma, H., Fujikawa, T., Naito, M., Baba, S., Hoppe, T., Yamaoka, Y. Efficient gene transfer system of fetal hepatic progenitor cells utilizing developed new isolation and culture system. 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (2002. 5. 19-22 San Francisco)
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. The 48th Annual Meeting of Japan of ICS (2002.6.20 Okayama)
4. Azuma, H., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Yasuchika, K., Fujikawa, T., Yamaoka, Y. Hepatic stem cell candidate from normal adult mouse liver. The 48th Annual Meeting of Japan of ICS (2002.6.20 Okayama)
5. Fujikawa, T., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Hoppe, T., Baba, S., Naito, M., Yamaoka, Y. Combination of green fluorescent protein-transgenic mouse and fluorescence-activated cell sorting enable purification and clonal analysis of adult hepatic stem cells in normal adult mouse. 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (2002. 5. 19-22 San Francisco)
6. 山岡義生「再生医学がめざすもの—その問題点」 第18回創薬セミナー 2002 07
7. 山岡義生「肝臓外科から再生医学へ」 第77回中国四国外科学会総会 2002 09
8. 寺嶋宏明、山本雄造、波多野悦郎、山本成尚、猪飼伊和夫、瀧原康行、山岡義生 Ante-situm肝切除における肝静脈一下大静脈合流部再建の工夫 286 第102回 日本外科学会2002
9. 打波 宇、山本雄造、米沢 圭、田浦康二郎、中島研郎、秦浩一郎、久米真、山岡義生肝虚血再灌流障害時におけるNF- κ B/I- κ B systemと熱ショック前処置が及ぼす影響について 199 第102回 日本外科学会 2002
10. 田浦康二郎、山本雄造、打波 宇、米沢 圭、中島研郎、秦浩一郎、山岡義生 熱ショック前処置によるラット肝虚血再灌流中hemoxygenase-1 (HO-1) 228 第102回 日本外科学会 2002
11. 秦浩一郎、山本雄造、米沢 圭、田浦康二郎、中島研郎、打波 宇、山岡義生 PDTCによる肝へのHO-1の誘導 228 第102回 日本外科学会 2002
12. 山之口賢、猪飼伊和夫、寺嶋宏明、桂長門、杉本真一、塩谷智裕、山岡義生 アロ皮膚移植片拒絶におけるasialo GM1+CD8+T細胞と二次的リンパ組織の重要性 159 第102回 日本外科学会2002
13. 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 153第102回 日本外科学会 2002
14. 杉本真一、三高俊広、猪飼伊和夫、寺嶋宏明、桂 長門、山之口賢、松下貴

和、塩谷智裕、細胞外基質により誘導されるラット小型肝細胞の形態的・機能的成熟化の検討 153第102回 日本外科学会 2002

15. 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 203 第102回 日本外科学会 2002

16. 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区細胞の分離精製と応用に関する基礎的検討659第102回 日本外科学会2002

17. 大江正士郎、廣瀬哲朗、内藤雅人、馬場慎司、北方敏敬、東久弥、藤川貴久、安近健太郎、藤井英明、山岡義生stem cellによる肝再生の検討—特にdHG

Fの効果に関して— 495 第102回 日本外科学会 2002

18. 塩谷智裕、猪飼伊和夫、西舩隆太、桂長門、山之口賢、松下貴和、杉本真一、松尾宏一、佐藤誠二、寺嶋宏明、山岡義生 ヒヒにおけるブタ全肝灌流後のブタ内因性レトロウィルス感染についての検討 第5回日本異種移植研究会2002

19. 猪飼伊和夫、波多野悦朗、寺嶋宏明、山本成尚、山本雄造、寫原康行、山岡義生 高度肝障害を伴う肝細胞癌の外科治療 237 第40回日本癌治療学会総会 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

1. 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」(PCT/JP02/03665)

厚生労働科学研究費補助金(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 三高 俊広 札幌医科大学がん研究所・教授

研究要旨

成熟ラット肝臓より小型肝細胞を分離培養し、形成させたコロニーを培養皿から剥離することにより小型肝細胞に富んだ細胞分散液を得ることができる。この小型肝細胞コロニーをコラーゲンスポンジ上に播種することにより迅速に類肝組織を形成させることに成功した。スポンジ内には大型化した肝細胞からなる組織と管腔構造を形成する胆管上皮細胞が認められた。アルブミン・トランスフェリンなど血清タンパク質の分泌量は増加し、尿素合成能も向上していた。また、新規の培養皿上に再播種したコロニーにMatrigelを投与し成熟化誘導をかけた小型肝細胞において代表的な薬物代謝酵素のチトクロームP450 (CYP)の発現を検討した。3-methylcholanthrene, phenobarbital, pregnenolone, clofibric acid, ethanol投与に反応して、CYP 1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1, 2E1がそれぞれ誘導され、そのうちCYP1A, 2B, 3A, 2Eに関しては酵素活性も認められた。特にCYP 1A活性は約120倍も誘導されることがわかった。小型肝細胞は成熟化すると生体内の肝細胞と同等の機能を持つ細胞に分化することがわかった。この研究結果は、ヒト肝臓より分離される小型肝細胞を用いて、in vitroで生体内と同様の機能を持つ肝組織を形成させられる可能性を示唆している。

A. 研究目的

本年度の研究目的は、1) 小型肝細胞の3次元培養を用いて小肝組織を培養皿状で作製する方法を開発する。2) 小型肝細胞の成熟化を誘導し、特定の薬剤に対するチトクロームP450の発現が誘導されるか検討する。

昨年度に引き続き、ヒト肝臓より小型肝細胞を分離培養する方法の確立と培養皿上で肝組織を形成する方法の確立を目指して研究を進める。

B. 研究方法

(1) 小型肝細胞の3次元培養

- ・成熟雄SDラット肝臓をコラーゲネース液にて灌流し、細胞を分離する。
- ・小型肝細胞が増殖し、コロニーを形成する培養約14日目に小型肝細胞のコロニーを分離する。
- ・小型肝細胞コロニーを濃縮し、コラーゲンスポンジに再播種する。
- ・小型肝細胞コロニーの濃度は、1250～10000個/培養皿の範囲で実験を行う。
- ・培養液中に分泌されるアルブミンなどの血清タンパク質ELISA法やWestern blot法を用いて検討する。
- ・コラーゲンスポンジ中の肝細胞のアミノ酸代謝能や尿素産生を測定する。
- ・コラーゲンスポンジ中に形成される組織の

構成細胞を特異的抗体を用いて免疫染色し、個々の細胞を特定する。

- ・形成された肝組織の超微形態を電子顕微鏡を用いて検討する。

(2) チトクロームP450の発現

- ・成熟雄SDラット肝臓をコラーゲネース液にて灌流し、細胞を分離する。
- ・小型肝細胞が増殖し、コロニーを形成する培養約14日目に小型肝細胞のコロニーを分離する。
- ・約3000個/培養皿の濃度で新しい培養皿に再播種する、
- ・10日間培養後、細胞外基質としてMatrigelを投与する。
- ・Matrigelにより成熟化を誘導された小型肝細胞に3-methylcholanthrene (3MC), phenobarbital (PB), pregnenolone (PCN), clofibric acid (CLOFA), ethanol (EtOH)を投与し、cytochrome (CYP)1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1, 2E1がそれぞれの薬剤に反応して誘導されるかどうか検討する。
- ・それぞれの酵素に対する特異抗体を用いて免疫染色を行う。
- ・酵素活性を測定する。
- ・尿素の産生量を測定する。

(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り、大学の実験許可を受けて実施している。

C. 研究結果

(1) 小型肝細胞の3次元培養

- ・コラーゲンスポンジ中でも小型肝細胞は増殖したが、培養皿上と比較するとその速度は遅かった。
- ・培養経過とともに形態的にも大型の肝細胞へ変化し、その細胞は肝細胞のマーカであるサイトケラチン8, アルブミン陽性であった。
- ・スポンジ内に形成された組織では、一部に管腔構造の形成を認め、その構成細胞は胆管上皮細胞によく発現されているサイトケラチン19が陽性であった。類洞内皮細胞や血管内細胞のマーカを発現している細胞はほとんど認めず、それらの細胞による管腔構造の形成もみられなかった。(図1)

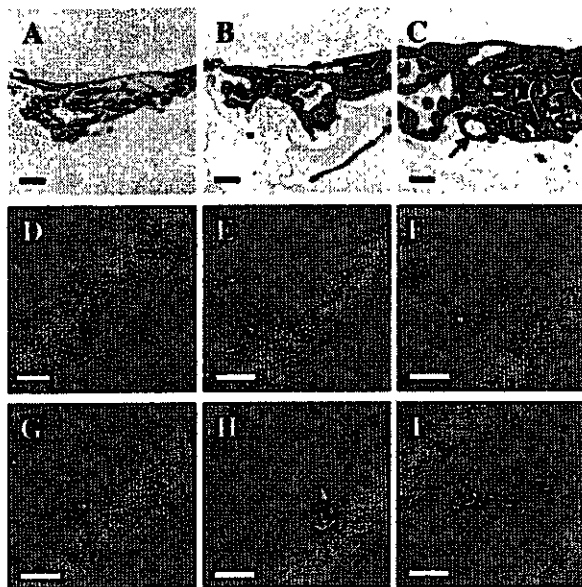


図1 スポンジ内で組織化する小型肝細胞の縦断面: A)培養7日目、HE染色、B)培養21日目、HE染色、C)培養56日目、HE染色、D)アルブミンとEカドヘリン、E)サイトケラチン8とベータカテニン、F)サイトケラチン19とベータカテニン、G)デスミンとベータカテニン、H)ED1/2とベータカテニン、I)SE1とベータカテニン、青は核染色としてDAPIを使い3重染色したもの。

- ・透過型電子顕微鏡を用いた検討では、大型の細胞の細胞質にはミトコンドリアや粗面小胞体、ペルオキシソームが豊富に存在し、細胞間にはタイト結合、ギャップ結合、デスモゾームなどの細胞間接着装置が発達していた。また、毛細胆管の形成がみられた。(図2)

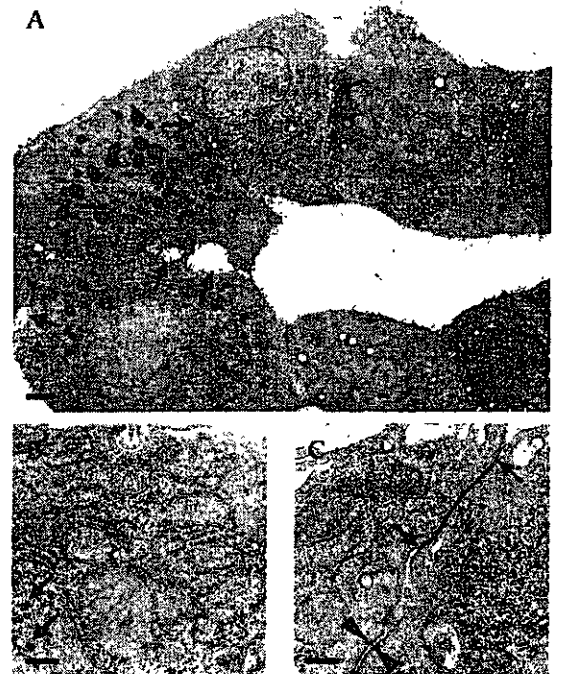


図2 透過型電子顕微鏡写真:A-C)培養21日目のスポンジ内で培養した小型肝細胞、B)矢印はペルオキシソーム、C)矢印はギャップ結合、矢頭はデスモゾームを示している。

- ・アルブミンの培養液中への分泌は培養経過と共に増加し(図3A)、スポンジに培養された細胞では、培養皿上で培養した細胞に比べて約2倍以上分泌していた。(図3B)

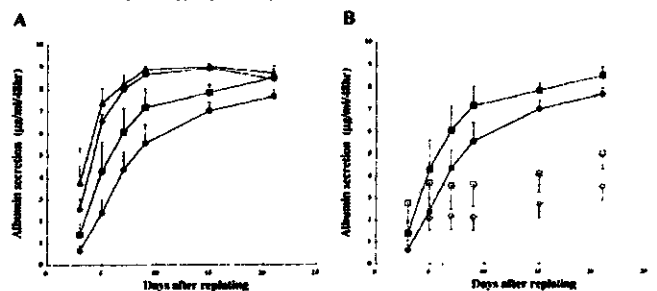


図3 アルブミン分泌

・トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノーゲンなどの血清タンパク質の分泌もスポンジ内で培養した細胞の方でより多く分泌されていた。(図4)



図4 血清タンパク質の培養液中への分泌

・尿素窒素合成能もスポンジ内で培養した細胞の方でより高い合成を認めた。

これらの結果を論文にまとめ投稿中である。

(2) チトクロームP450の発現

・Matrigelを投与した小型肝細胞と投与していないもので 3MC, PB, PCN, CLOFA, EtOHによって誘導されてくるCYP isozymesの濃度依存性を調べた。その結果、それぞれの薬剤によって誘導されてくるCYP1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1, 2E1は濃度依存性にその発現を増した。(図5)

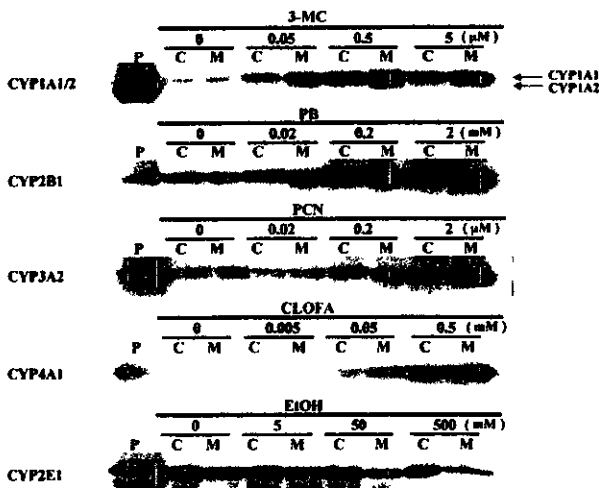


図5 小型肝細胞におけるチトクロームP450タンパク質の薬剤による誘導

・それぞれの薬剤によって誘導されてくるCYP1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1の発現量は、Matrigelをかけてからの培養時間に伴って増してくるが、CYP2E1はMatrigelの投与した細胞でその

発現が減少していった。(図6)

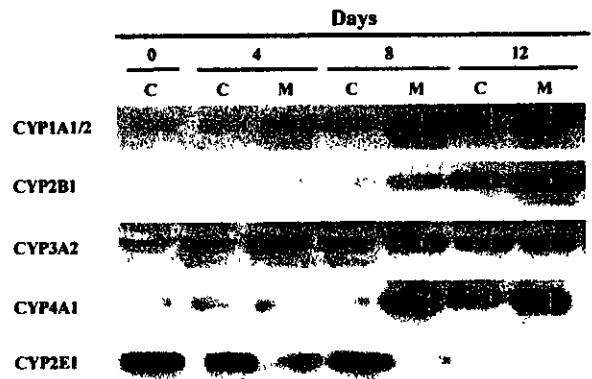


図6 小型肝細胞の培養経過に伴うチトクロームP450タンパク質の薬剤による誘導能

・それぞれのCYPタンパク質に対する特異抗体を用いて染色すると成熟化誘導を受けた肝細胞に強く染まった。

・薬剤によって誘導されたCYP酵素の活性を測定すると、Matrigelをかけて成熟化を誘導した細胞では、薬剤を投与していないコントロールに比べて、CPY1Aで約120倍、CPY2Bで約2倍、CPY3Aで約3.5倍、CYP2Eで約8倍活性が上がった。

・また尿素合成能を測定すると、Matrigelをかけ、成熟化誘導した肝細胞ではコントロールの細胞に比べて約2倍産生量が上がった。(図7)

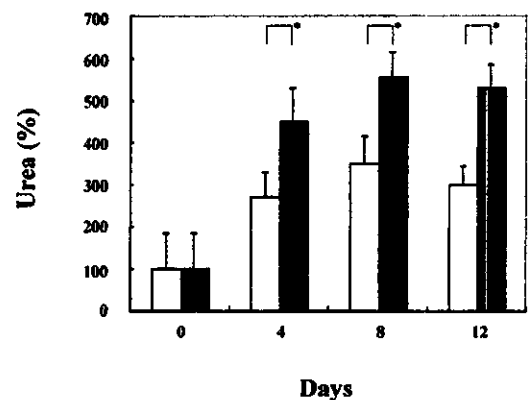


図7 小型肝細胞による尿素産生能

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ことを昨年度報告した。

(1) 小型肝細胞の3次元培養

本年度はその研究を進展させ、小型肝細胞を3次元的に配置することにより、成熟化・組織化が誘導できないか検討した。小型肝細胞は、Matrigelという基底膜成分からなる細胞外基質に接触すると急速に組織化することがわかっている。基底膜がなくても空間的にコラーゲンが配置されたコラーゲンスポンジというscaffoldを利用することにより、成熟化が誘導されるか実験を行った。小型肝細胞コロニーはスポンジの比較的大きな隙間に引っかかり接着する。コラーゲンに接着した細胞はゆっくり増殖し、スポンジの隙間を埋める。それに伴い小型肝細胞は大型の肝細胞に成熟化していく。小型肝細胞はゆっくりスポンジの内部方向に侵入していき、大きな組織塊を形成する。また、スポンジの深部の肝細胞塊に接するところには、胆管上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン19陽性細胞が管腔様構造を形成している。この胆管上皮細胞は、時としてアルブミン陽性のこともあることから、小型肝細胞がtransdifferentiationした可能性がある。本実験では、類洞内皮細胞や血管内皮細胞によって形成された血管様構造は観察することができなかった。形成された類肝組織は、培養経過と共に大きくなり、アルブミンやトランスフェリンなど血清タンパク質の分泌も増加する。アンモニア代謝能も高くなり、尿素合成能も増加する。形態学的に成熟化しているのみならず、機能的にも成熟化しているといえる。胆汁が、形成された胆管様構造と連結して流れているか確認することや薬物代謝機能などの測定は今後の課題である。

(2) チトクロームP450の発現

本年度はまたMatrigelによって成熟化誘導を受けた小型肝細胞が形成する類肝組織の薬物代謝能について検討した。小型肝細胞は、肝臓から分離後、約30日培養しているにもかかわらず、薬剤を投与することなしにconstitutiveに一部のチトクロームP450を発現していた。初代培養肝細胞では、数日の内にほとんどその発現が消失することを考えると画期的である。生体内における肝細胞においては、多数のチトクロームP450分子種を恒常的に発現、また特定の物質により誘導することができるが、小型肝細胞においても同様に誘導可能か検討した。CYP1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1, 2E1に対する代表的な誘導薬剤である3MC, PB, PCN, CLOFA, EtOHを小型肝細胞に投与すると薬剤に対してそれぞれに対応するCYPが誘導された。特にMatrigelで成熟

化した細胞において強い発現がみられた。蛋白質のみならず、酵素活性も同様に強い誘導を受けた。CYP1Aは薬剤を投与しない場合に比べ、約120倍も活性が増加した。2B, 3Aも同様に成熟化を誘導した細胞で蛋白質の発現や活性が増加したが、CYP2E1は成熟化誘導をかけるとEtOHに対する反応が低下していった。活性も増殖中の小型肝細胞の方が高かった。この結果は、以前我々が報告した肝特異的転写因子の発現と相関する。肝特異的転写因子のHepatocyte nuclear factor (HNF)4やCCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α , β は、成熟肝細胞において強く発現していることが知られており、Matrigelで成熟誘導した小型肝細胞においてもこれらの転写因子の発現が増加していることを報告した(論文7)。CYP1A1/2, 2B1, 3A2, 4A1はその発現がこれらの転写因子によって制御されていることから、本結果は以前の結果を裏付けるものである。CYP2E1は、HNF1 α によって発現が制御されていることが知られている。Matrigelで成熟誘導した小型肝細胞においては、HNF1 α の発現が抑制されていることがわかっているので、本実験においてみられたCYP2E1の低下はHNF1 α の発現が低下したためと考えられる。これらの結果は、培養小型肝細胞においても代表的なチトクロームP450分子種の発現を生体内とほぼ同様に誘導することが可能であることを示している。また、本報告では結果を示さないが、凍結保存した小型肝細胞においてもチトクロームP450の発現を誘導可能なことが予備実験よりわかった。

E. 結論

- ・小型肝細胞は、コラーゲンスポンジ中で培養すると細胞外基質のMatrigelを加えること無しに成熟を短期間に誘導することができた。
- ・Matrigelによって成熟化誘導をかけた小型肝細胞においても代表的な肝薬物代謝酵素であるチトクロームP450の発現を蛋白質のみならず、活性においても誘導することが可能であった。

F. 健康危険情報

- ・無し

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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)
2. Takagi C, Ueki K, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kane

- ko Y, Tsukada Y, Maezawa A, Mitaka T, Sasaki T, Nojima Y. Increased Expression of Cell Adhesion kinase β in Human and Rat Crescentic Glomerulonephritis. *Am J Kid Dis* 39(1), 174-182 (2002)
3. Mizuguchi T, Palm K, Hui T, Aoki T, Mochizuki Y, Mitaka T, Demetriou AA, and Rozga J. Effects of bone marrow stromal cells on the structural and functional polarity of primary rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol*, 38(2), 62-65 (2002).
 4. 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*, 106(1), 115-123 (2002)
 5. Ikeda S, Mitaka T, Sugimoto S, Harada K, Mochizuki Y. Proliferation of rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *J Hepatology*, 37(1), 7-14 (2002)
 6. Manase K, Endo T, Henmi H, Hayashi T, Kitajima Y, Nishikawa A, Mitaka T, Sato H, Kudo R. The significance of membrane type 1 metalloproteinase in structural involution of human corpora lutea. *Mol Hum Reprod*, 8(8), 742-749 (2002)
 7. 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. *J Cell Biochem*, 87(1), 16-28 (2002)
 8. Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 9(6), in press (2002)
 9. Ikeda S, Mitaka T, Harada K, Sato F, Mochizuki Y, Hirata K. Tumor necrosis factor- α and IL-6 reduce bile canalicular contractions of rat hepatocytes. *Surgery*, 133(1), 101-109 (2003)
 10. 杉本真一、原田敬介、三高俊広. 肝幹細胞研究の現状～小型肝細胞～. *肝胆膵*, 46(3), 327～333(2003)
 11. 三高俊広、杉本真一、宮本茂樹. *In Vitro*における肝組織形成. *最新医学*, 58(3), 708-718(2003)
- (2) 学会発表
1. 須藤亮、小原洋志、三高俊広、池田満里子、谷下一夫。「再生毛細胆管の収縮に対するA23187とEndothelin-1の影響」第14回バイオエンジニアリング講演会、2002年3月5日、東京(東京大学工学部)
 2. 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ついて考える」(ワークショップ)第91回日本病理学会総会2002年3月26～28日:横浜. *日本病理学会会誌*第91巻第1号、p119.
 3. 三高俊広. 小型肝細胞を用いたin vitro肝組織形成(シンポジウム):第1回日本再生医療学会2002年4月17～18日:京都.
 4. 原田敬介、三高俊広、池田慎一郎、杉本真一、宮本茂樹、望月洋一、平田公一。「長期凍結保存した小型肝細胞の増殖と機能」第1回日本再生医療学会 2002年4月17～18日京都.
 5. Mitaka T. Recontraction of hepatic organoid by small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells (Symposium). In: 5th World congress of the International HepatoPancreato-Biliary Association: 2002 Apr 25-29: Tokyo, Japan.
 6. 須藤亮、小原洋志、三高俊広、池田満里子、谷下一夫。「ラット小型肝細胞による再生毛細胆管の形成と運動解析」第41回日本エム・イー学会大会、2002年5月9日京都.
 7. 須藤亮、小原洋志、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 日本発生生物学会・細胞生物学会合同大会. 2002年5月21～23日、横浜
 8. 三高俊広。「肝再生医療における小型肝細胞の応用」ワークショップ「肝再生医学に最適な細胞源を考える」第9回肝細胞研究会. 2002年7月12～13日、秋田.
 9. Harada K, Miyamoto S, Kanai M, Takeda H, Mochizuki Y, Hirata K, Mitaka T. Reconstruction of hepatic tissues within collagen sponge by using rat small hepatocytes and nonparenchymal cells. FASEB Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, U.S.A. 2002 July 27-August 1.
 10. Miyamoto S, Harada K, Sugimoto S, Takeda H, Hirata K, Mitaka T. Drug metabolic capacities of rat small hepatocytes differentiated by extracellular matrix. FASEB Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, U.S.A. 2000 July 27-August 1.
 11. Sudo R, Kohara H, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Bile canalicular reformation by rat small hepatocytes and its dynamic movement analysis. 4t

h World Congress of Biomechanics. 2002 Aug 4-9, Calgary, CANADA.

12. 三高俊広. 「肝再生医療と肝幹細胞」人倫研セミナー2002年8月24日、札幌.
13. 三高俊広. 特別講演「小型肝細胞を用いた*in vitro* 肝組織形成」第35回北海道病理談話会. 2002年8月31日、旭川.
14. Sudo R, Kohara H, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Functional repolarization of reconstructed hepatic organoid. International Symposium on Cell Biomechanics and Tissue Engineering. 2002 Sep 28, Tokyo.
15. 三高俊広. ワークショップ37「肝再生の分子メカニズムと医学への応用」第25回日本分子生物学会2002年12月13日(金曜日)
16. 長田奈津紀、菅井学、櫻井智徳、岩永飛鳥、杉本真一、倭英司、宮崎純一、三高俊広、

田畑泰彦、井上一知、清水章. 第25回日本分子生物学会年会、2002年12月11~14日、横浜。講演要旨集、p946.

17. 須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「小型肝細胞による毛細胆管の形成とビリルビン代謝機能」第2回日本再生医療学会大会、2003年3月10~12日、神戸
18. 三高俊広. 「小型肝細胞と*in vitro* 肝組織構築」代用臓器研究会 2003年3月21日、札幌。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 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」(PCT/JP02/03665)

厚生労働科学研究費補助金（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 永尾 雅哉 京都大学大学院生命科学研究科・教授

研究要旨

マウス胎仔肝臓をコラゲナーゼ消化して分離される細胞群を浮遊培養すると、胎仔肝未分化内胚葉系細胞（肝前駆細胞、肝幹細胞）を、特異的表面接着分子のhomophilicな結合により形成される細胞凝集塊（cell aggregate）中に簡便に濃縮させることができる。そこで、この細胞凝集塊に含まれる細胞の表面抗原解析を行うことにより、将来ヒト肝幹細胞を蛍光励起セルソーター（FACS）により分離精製する際に必要になると想定される、肝幹細胞特異的表面抗原を同定することを試みた。CD49f、Thy1、c-kit、CD45 を用いた解析により、細胞凝集塊中には少なくとも3種類の細胞群が含まれていることが判明した。これらの細胞群をそれぞれ蛍光励起セルソーター（FACS）により分離精製した上で、各種マーカー発現をRT-PCR、免疫染色により確認すると、一つはアルブミン、サイトケラチン19の共発現を認める胎仔肝未分化内胚葉系細胞（肝前駆細胞、肝幹細胞）であり、他は混入した未分化間葉系細胞および血球系細胞と考えられた。こうして、肝幹細胞の特異的表面抗原候補を同定した。さらに、未分化内胚葉系細胞を未分化間葉系細胞と共培養すると、単離培養に比べ未分化内胚葉系細胞の成熟化が促進されることが確認された。以上より、将来肝不全治療における細胞移植の細胞源として利用するために特異的表面抗原を利用して単離したヒト肝幹細胞を *in vitro* で増殖させた上で、治療目的に応じて要求される細胞機能の成熟化に対しては、今回単離している未分化間葉系細胞との共培養が必要になる可能性があると考えられた。

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）の分離法を利用して肝幹細胞特異的表面抗原を同定することを本年度の主たる研究目的とした。

こうした肝幹細胞特異的表面抗原同定の課程では、分離した細胞の特性解析が必須であることから、蛍光励起セルソー

ターによる細胞分離の上、分離した細胞に対して各種細胞系譜マーカーの発現を検討した。さらに、分離後の培養条件（単独培養、共培養）の違いによる胎児肝構成細胞の機能解析も行った。

特異的表面抗原同定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する。

さらに、未分化内胚葉細胞以外の胎児肝構成細胞の機能解析により、ヒト肝幹細胞を利用した肝不全治療において病態や治療方針に応じて要求される様々な細胞の状態（増殖・成熟）をコントロールする方法の確立に寄与するものと考え

B. 研究方法

(1) 浮遊培養法により形成される細胞凝集塊に含まれる細胞に対する表面抗原解析実験

・マウス胎仔肝臓をコラゲナーゼ液にて消化し、細胞を分離する。分離した細胞群を浮遊培養することにより、細胞凝集塊として採取する。

・採取した細胞塊を24時間接着培養した後、トリプシン-EDTAにて細胞を浮遊させる。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 などを選択し、各種マーカーに対する抗体で細胞をラベルする。ラベルした細胞をフローサイトメーターで解析する。

(2) 表面抗原に基づく細胞分離および分離した細胞群の特性解析実験

・上記解析に基づき同定した細胞群を蛍光励起セルソーターを用いて分離する。

・分離した各細胞群をカラーゲンコート

の培養皿上で培養する。
・内胚葉系の characterization には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発現を RT-PCR、細胞免疫染色を用いて行い、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。また、単離した未分化内胚葉細胞をその他の細胞群と共培養することで、未分化内胚葉細胞以外の胎児肝構成細胞が未分化内胚葉細胞に対して及ぼす影響を検討する。

・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)、tyrosinaminotransferase (TAT) 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。

C. 研究結果

(1) 浮遊培養法により形成される細胞凝集塊に含まれる細胞に対する表面抗原解析実験

胎児肝由来細胞凝集塊 (図1) には表面抗原の組み合わせにより3種類に分類される細胞群が含まれていることを確認した (図2)。3種類とは (A) CD49f+/Thy1-/CD45-/c-kit- (B) CD49f-/Thy1+/CD45-/c-kit- (C) CD49f+/Thy1-/CD45+/c-kit-の各種細胞群であり、CD45は白血球マーカーであることを考慮すると、CD49f+/Thy1-/CD45+/c-kit-の細胞は凝集塊に混入した血球系細胞と考えられるため、その他の (A) および (B) の細胞