

群にまず焦点を当てることとした。

(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

(A) CD49⁺/Thy1⁻/CD45⁻/c-kit⁻の細胞群および(B) CD49⁺/Thy1⁺/CD45⁻/c-kit⁻の細胞群を蛍光励起セルソーターを用いてそれぞれ分離すると、(A)は上皮様細胞形態を示し(図3A)、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の各内胚葉マーカー発現が確認された(図4)。一方(B)は、間葉系細胞の形態を呈し(図3B)、内胚葉マーカーの発現を認めなかった。

(A)、(B)それぞれの単独培養では成熟肝細胞の形態を呈する細胞を認めなかったが、共培養中には成熟肝細胞の形態を呈する細胞群が出現し、RT-PCRにおいて tryptophan dioxygenase (TO)、tyrosinaminotransferase (TAT) の発現が誘導されているのを確認した(図5)。

D. 考察

胎仔肝臓組織中には実質を構成する内胚葉系細胞や間葉系細胞のほか、胎児肝が造血器官であることから多くの血球系細胞が含まれる。こうした他種類の細胞群の中から、蛍光励起セルソーターを用いて、胎児肝に含まれる未分化内胚葉細胞(肝前駆細胞・肝幹細胞)を分離精製したとする報告がすでになされている。それによると、血球系細胞を含めた胎仔全肝の細胞成分 CD49⁺/CD29⁺/CD45⁻/TER119⁻/c-kit⁻で規定される肝幹細胞候補の割合はわずかに3%となっている。一方、我々は胎児肝由来の雑多な細胞群を浮遊培養することで、胎仔肝未分化内胚葉細胞(肝前駆細

胞・肝幹細胞)が、その表面接着分子(E-cadherinなど)のホモフィリックな結合により細胞凝集塊を形成することを見だし、この細胞凝集塊を分取することで、胎仔肝未分化内胚葉細胞を高度に濃縮した状態で簡便に、しかも多数獲得することを可能にした。そこで、この分離システムを利用することにより、造血器官である胎児肝組織中に少数存在する肝幹細胞の特異的表面抗原をさらに詳細に解析することが可能になると考えられた。細胞凝集塊として分取した細胞集団に対する表面抗原解析の結果、これまでに報告された肝幹細胞表面抗原候補と類似の抗原を発現する細胞集団が約45%に濃縮されているのを確認した上で、蛍光励起セルソーターを用いて、肝未分化内胚葉マーカーを発現する細胞を効率よく単離することに成功した。一方、細胞凝集塊に混入してくる未分化間葉系細胞と考えられる細胞集団も単離し得た。この未分化間葉系細胞は共培養によって未分化内胚葉細胞の*in vitro*での成熟化を促進する効果を持つ。これまで、胎仔肝未分化内胚葉細胞の成熟化には間葉系細胞が重要な働きをしていることが推察されており、液性因子としてオンコスタチンMが重要であるとの報告があるが、いまだ不明な点が多い。肝不全治療における移植細胞源を安定して獲得するためには、ヒト肝幹細胞を特異的表面抗原を用いて単離した上で、*in vitro*において増殖および成熟化をコントロールすることが必要であり、今回肝未分化内胚葉細胞を成熟化させる活性を持つ未分化間葉系細胞を単離したことにより、肝幹細胞の*in vitro*成熟化に向けて重要な知見が得られる可能性がある。

E. 結論

マウス胎仔肝内胚葉細胞の表面抗原解析およびこれに基づく細胞単離を行い、肝幹細胞の表面抗原を特定する端緒となった。また、胎仔肝内胚葉細胞を *in vitro* において成熟化させる活性を持つ未分化間葉系細胞を単離し得た。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yasuda, Y., Fujita, Y., Masuda, S., Musha, T., Ueda, K., Tanaka, H., Fujita, H., Matsuo, T., Nagao, M., Sasaki, R., and Nakamura, Y. "Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs." *Carcinogenesis*. 23 (11) 1797-1805 (2002)
2. Fujii, H., Hirose, T., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Fujikawa, T., Nagao, M., and Yamaoka, Y. "Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice." *J. Hepatol.* 36, 653-659 (2002)
3. Yasuda, Y., Okano, M., Nagao, M., Masuda, S., Fujita, Y., and Sasaki, R. "Erythropoietin and erythropoietin-receptor producing cells demonstrated by *in situ* hybridization in mouse visceral yolk sacs." *Anat. Sci. Int.* 77, 58-63 (2002)
4. Kobayashi, T., Yanase, H., Iwanaga, T., Sasaki, R., Nagao, M. "Epididymis is a

novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs." *Biochem., Biophys. Res. Commun.* 296, 145-151 (2002)

5. Morimoto, A., Irie, K., Murakami, K., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. "Aggregation and neurotoxicity of mutant amyloid β (A β) peptides with proline replacement: importance of turn formation at positions 22 and 23." *Biochem., Biophys. Res. Commun.* 295, 306-311 (2002)

6. Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. "Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A β 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at position 21-23." *Biochem., Biophys. Res. Commun.* 294, 5-10 (2002)

7. Kambe, T., Narita, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Hirose, J., Amano, T., Gugiura, N., Sasaki, R., Mori, K., Iwanaga, T., and Nagao, M. "Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, Zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells." *J. Biol. Chem.* 277, 19049-19055 (2002)

8. 神戸大朋、永尾雅哉、佐々木隆造
金属トランスポーター、必須アミノ酸
研究165, 1-8 (2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

图 1

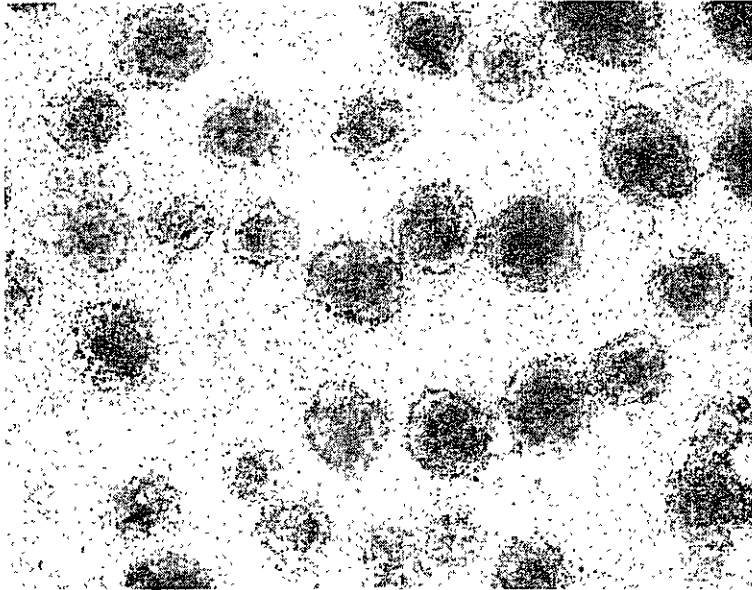
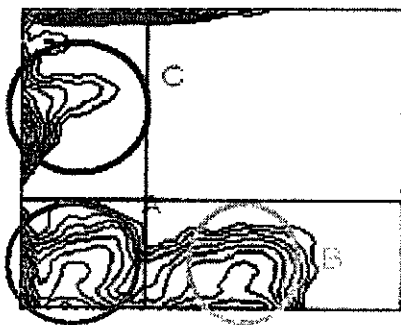
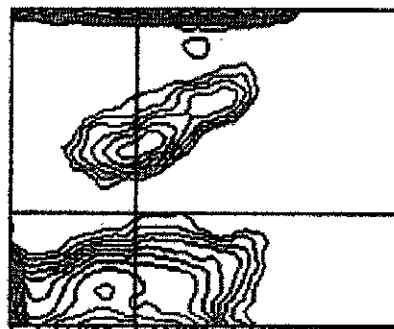
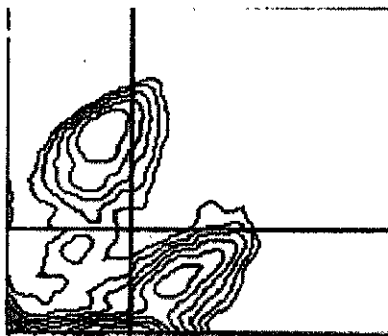


图 2



A) CD49f+/Thy1-/CD45-/c-kit-
B) CD49f-/Thy1+/CD45-/c-kit-
C) CD49f+/Thy1-/CD45+/c-kit-

图 3

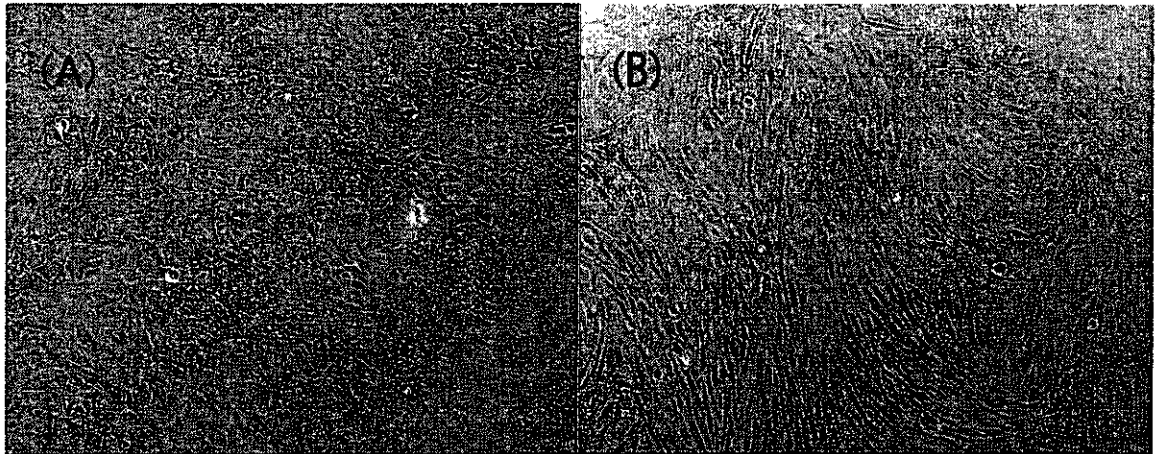


图 4

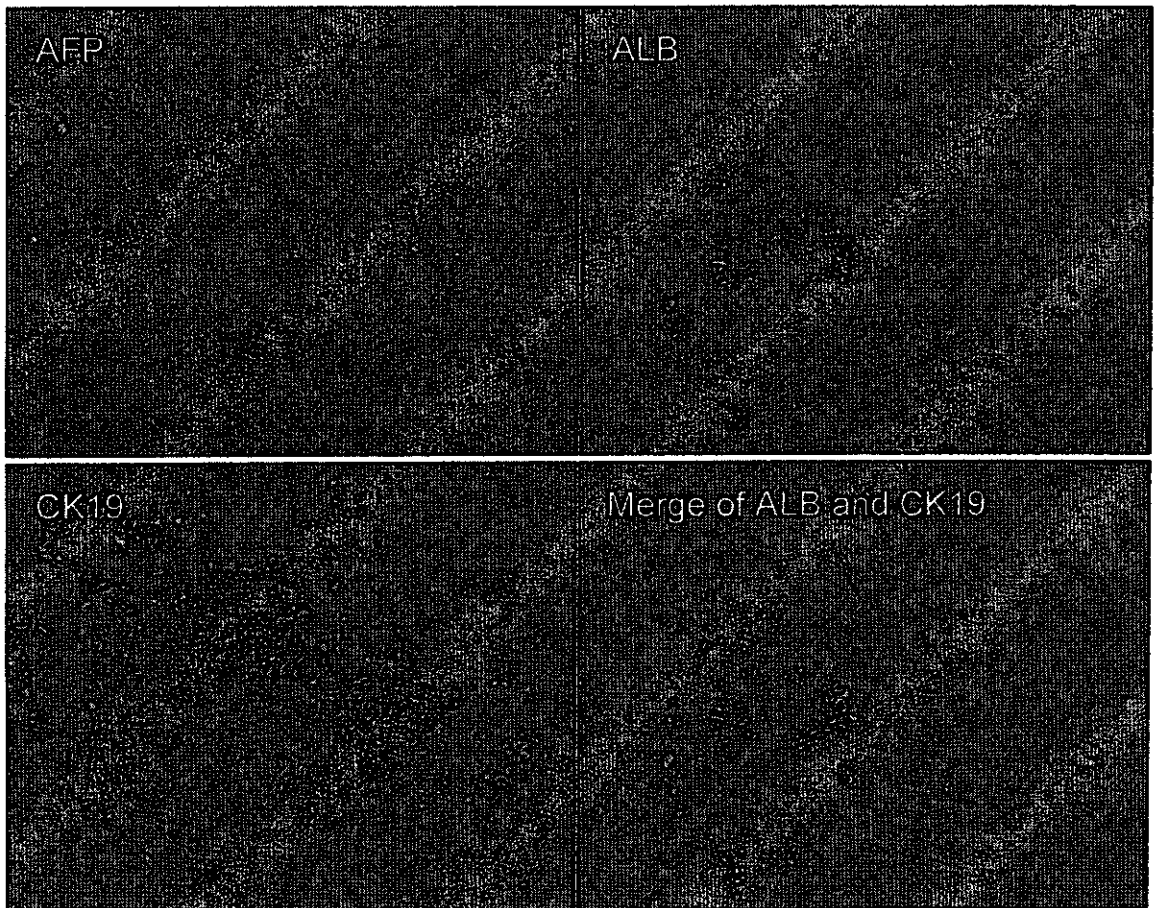
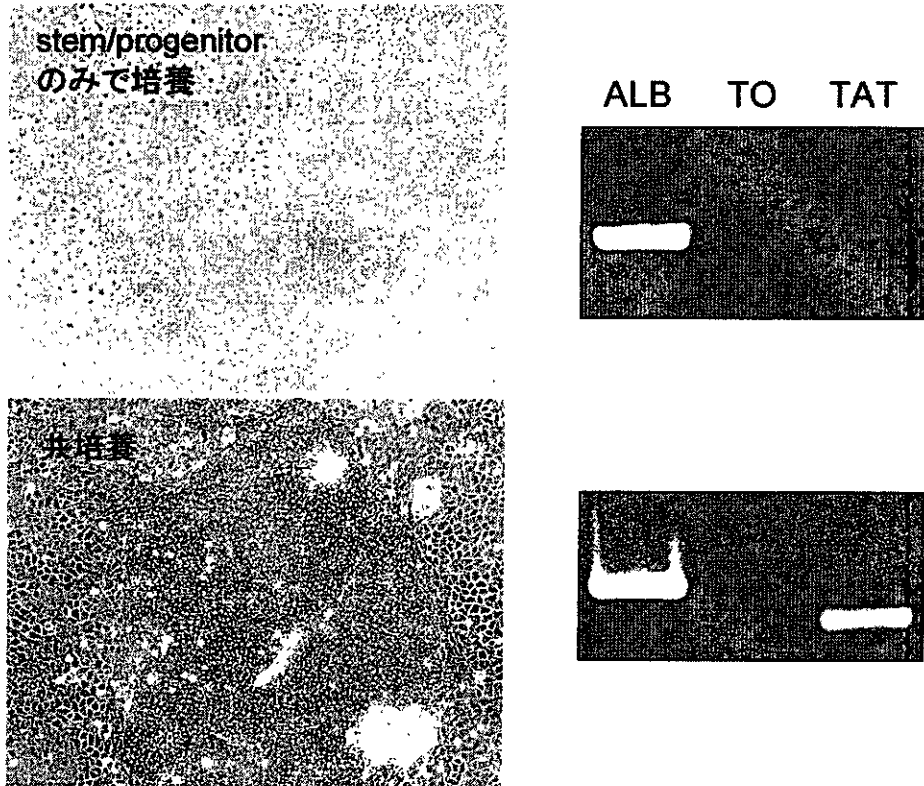


図 5

*stem/progenitor cell*と*Thy1-positive cell*との共培養(14日目)



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 猪飼 伊和夫 京都大学大学院医学研究科・講師

研究要旨

我々はこれまでヒトにおいて長期培養が困難とされてきた成熟肝細胞の分離・長期培養法を確立し、一部に増殖する細胞があることを報告してきてが更に分離・培養法を改良することによりコロニー状に増殖する小型肝細胞の存在を明らかにした。さらにコラーゲンタイプ I シート上で共培養（肝細胞、小型肝細胞、胆管上皮細胞、伊東細胞、血管内皮細胞など）することにより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）を認める三次元を有する類肝組織を形成させることを可能にした。機能的にも albumin の分泌は従来の単層培養に比し著明な増加を示した。高度な肝機能を発揮できる類肝組織を再構築することにより組織移植あるいは人工肝臓のデバイスに組み込むなどの新たな肝不全の治療への応用も可能と考えらる。

A. 研究目的

現在、肝不全に対する治療は肝移植のみである。しかしながら世界的な深刻なドナー不足のため、その需要を満たせるだけの移植を行うことは困難な状況にある。代替療法として細胞移植、人工肝臓などの試みがなされているも十分な成果が得られているとは言い難い。一方、ミニ肝臓（類肝組織）などの利用が考えられている。しかしながら肝臓はその多様な機能、複雑な構造によりこれを人為的に再構築することは困難と考えられてきた。しかし、最近、国内外で再構成肝組織（ミニ肝臓）に関する報告がなされ、その構築の可能性がみえてきた。我々も実験動物においては研究分担者の三高らとの共同研究により成熟ラット肝臓から分離した肝組織幹細胞である小型肝細胞を、非実質細胞との共培養により、毛細胆管構造、腺腔構造を有する三次元類肝組織を形成すること、この小型肝細胞の成熟化、組織化には細胞外基質である基底膜成分の三次元構造が重要な要因として関与して

いること、さらにscaffoldとしてコラーゲンタイプ I シート上で培養することにより、組織構築の促進をすることを明らかにした。一方、ヒトにおいては長期培養が困難とされてきた成熟肝細胞の分離・長期培養法を確立し、一部に増殖する細胞があることを報告してきており、本研究においてはこの増殖力を持つ組織幹細胞の分離同定を進めるとともに、このヒト肝幹細胞を用い、さらに実験動物における類肝組織構築の手法を用いることにより *in vitro* 及び *in vivo* で高度な肝機能を発揮できるヒト肝組織を再構築し、この再構築肝組織が肝不全の治療に有効たるかを検討することを目的とする。

B. 研究方法

I. 小型肝細胞の分離・同定

我々が確立したヒト成熟肝細胞の分離・長期培養法においては長期培養中に、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。そこで、こ

の増殖能を有する細胞群の存在を明確にするため培養法の検討を行った。

1) 正常肝切片よりの細胞分離法の検討

これまで成熟肝細胞分離のため以下のような手法を用いた。正常肝組織片に、27G針と10cc注射器にて4℃EGTA加前灌流液と0.05% collagenase-dispase液の二段階還流を行った。分離された細胞を50gで2分の遠沈を4回行い、得られた分画を実質細胞分画として播種していた。今回、更なる工夫として、50g x 2分の低速遠沈にて得られる上清に加え、穿刺灌流にて得られる残肝切片をさらに30分スターラーを使った振盪にて得られる分離液を加え、50g x 5分にて得られる非実質分画を上記の実質分画に加え共培養を施行することとした。

a) 各々の分画(実質分画、非実質分画)、の細胞数を調整し、増殖能を有する細胞群が発現する最適の播種細胞数を検討した。

b) a)で決定した播種細胞の population を培養1日目の免疫染色にて調べた。

2) 培養液の検討

皮膚角化細胞培養液 Keratinocyte Stimulating Factor Medium (KSFM; Gibco BR L)に、nicotinamide、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ばかりでなく、長期培養中、一部にBrdUを取り込む細胞群を認めることが出来ることは前回報告した通りである。今回、更なる改良を加え、この増殖する細胞群の存在をより明確にすることを試みたが、残念ながら、KSFMをベースに

した medium では進展は見られなかった。元来、KSFMは細胞維持を目的としたものであり、細胞増殖を考慮した培養液を再検討することとした。

a) 位相差顕微鏡にて増殖能を有する細胞群の観察を行った。

b) 増殖能はBrdUの免疫染色にて検討した。

なお、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。

II. 類肝組織の構築に関する検討

細胞を *in vitro* で増やそうと考えても2次元的に増える細胞数には限界がある。また、細胞を重層化し、3次元的にも増やそうとしても培養液の浸透する厚さには自ずと限りがある。そこではじめからscaffoldを用いてその中で細胞を培養することで高密度な、ある一定の大きさを持った細胞塊を作ろうと試みた。足場の材料になるものには、生体内で徐々に分解され、なおかつ免疫原性の少ない材質としてコラーゲン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などがあるが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ため、上記Iの検討結果えられた培養条件を用い、ヘリスタット上に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。

1) 形態的観察;

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、シートの縦断面を観察

できる切片を作成して、H. E 染色し、形態を観察した。

2) 機能的解析;

培養液中へのアルブミンの分泌を ELISA にて検討した。

3) 増殖能の検討;

上記作成した、パラフィン切片を PCNA の免疫染色にて評価した。

C. 研究結果

I; 小型肝細胞の分離・同定

1) 分離法

2) 培養液

分離法、培養液の検討の結果、実質細胞、非実質細胞をそれぞれ、各々 $2 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整して混合、共培養により、長期培養中に小型肝細胞がコロニー状に増殖を確認できた(図 1)。これらのコロニーは BrdU も高率に取り込んでおり、増殖能旺盛な細胞集団であることがわかる(図 2)。なおこの様に調整された population に関しては肝細胞、胆管上皮細胞、伊東細胞、血管内皮細胞、クッパー細胞などが含まれる事がわかった。培養液の組成は表 1 のとうりである。次にこの様なコロニーの単離を試みるも、出現頻度の低さ、個体差、また、この様なコロニー出現時には非実質細胞に強固に囲まれ、さらには、長期培養に伴う細胞外基質の産生などの理由によりコロニー単離には至らなかった。

II; 類肝組織構築

1) コラーゲンシート上での類肝組織構築

図 3 は培養 35 日目の縦断面の H.E 染色である。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。

2) コラーゲンシート上での成熟化

図 4 のごとく、シート上での培養群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。

3) 類肝組織内の増殖能

図 5 のごとく、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。

D. 考察

前回までの報告においては成熟肝細胞の長期培養において出現してくる増殖能を持った細胞群については一部に 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するにはいたらなかったが、今回さらに培養法を工夫することにより、結果に示した如く、コロニー状に増殖する像を確認できた。位相差顕微鏡観察下、形態的にはラットでいうところの小型肝細胞に類似した細胞群であった。この集団が実質分画由来か非実質分画由来かは不明であるが、その出現については、新たに加えられた非実質分画の何らかの因子が重要であると示唆され、その解明はこの細胞群の分離同定に加え引き続き検討中であり、今後の課題といえる。更に本研究においてはこの旺盛な増殖能を有すると考えられるヒト肝幹細胞を用い、高度な肝機能を発揮できるヒト肝組織の再構築を目的としたが、その純化には上記の如く至らなかったため、これらの増殖能を持つ細胞が含まれると考えられる細胞群を用いて、ヒト肝組織の再構築を試みた結果、三次元構造を有する類肝組織を構築することを可能にした。機能的にも従来の単層培養に比し著明な増加を示し、小型肝細胞の組織化に伴う成熟化が示唆された。肝臓はその多様な機能、複雑な構造によりこれを人為的に

再構築することは困難と考えられており、実験動物レベルでの類肝組織の再構築は報告は認めるもヒトに関するの再構築についてはいまだ報告はない。この様な組織化は成熟肝細胞のみではできず、今回、非実質細胞との共培養を要したこと、また結果に示したPCNAの高率な発現、アルブミン分泌増加の結果などを考慮すると、類肝組織の構築には増殖旺盛な小型肝細胞を候補とする組織幹細胞の存在が必要であり非実質細胞との相互作用が重要な働きをしていると考えられ、増殖する過程で肝細胞と一体化し、肝細胞の成熟を促進することにより類肝組織の再構築をにしたのではないかと推測している。今後、この類肝組織の詳細な形態的・機能的解析の検討を行う予定である。高度な肝機能を発揮できる類肝組織を再構築することにより組織移植あるいは人工肝臓のデバイスに組み込むなどの新たな肝不全の治療への応用も可能と考えられる。

E. 結論

これまで、我々はヒトにおいては長期培養が困難とされてきた成熟肝細胞の分離・長期培養法を確立し、一部に増殖する細胞があることを報告してきたが、本年度はさらに分離法、培養法を改良し、コロニー状に増殖する小型肝細胞の存在を明らかにした。さらに、コラーゲンタイプ I シートを Scaffold として用いることにより三次元構造を有する類肝組織の形成を可能にした。

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. *Journal of Cellular Biochemistry* 87(1): 16-28 16-28(2002) 掲載.
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. *Journal of Surgical Research* 106(1): 115-23 掲載
3. 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)
4. 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)
5. keisuke H, Toshihiro M, Shigeki M, Shinichi S, Shinichiro I, Hiroshi T, Yohichi M, Koichi H. Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Journal of Hepatology* in press (2003)

(2) 学会発表

1. 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、池田慎一郎、原田敬介、山岡義生.

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. 第102回日本外科学会総会(京都).日外会誌 103巻、臨時増刊号.

H.知的財産権の出願

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導方法」(PCT/JP02/03665)。

表 1 ; 培養液の組成

Dulbecco's modified Eagles Medium

+	10%	Human serum
+	5%	Fetal bovine serum
+	10mM	Nicotinamide
+	1mM	Ascorbic acid phosphate
+	10ng/ml	Epidermal growth factor
+	20ng/ml	Hepatocyte growth factor
+	500ng/ml	Insuline
+	10 ⁻⁷ M	dexamethasone
+		Antibio

図 1 ; ヒト小型肝細胞コロニーの位相差顕微鏡像

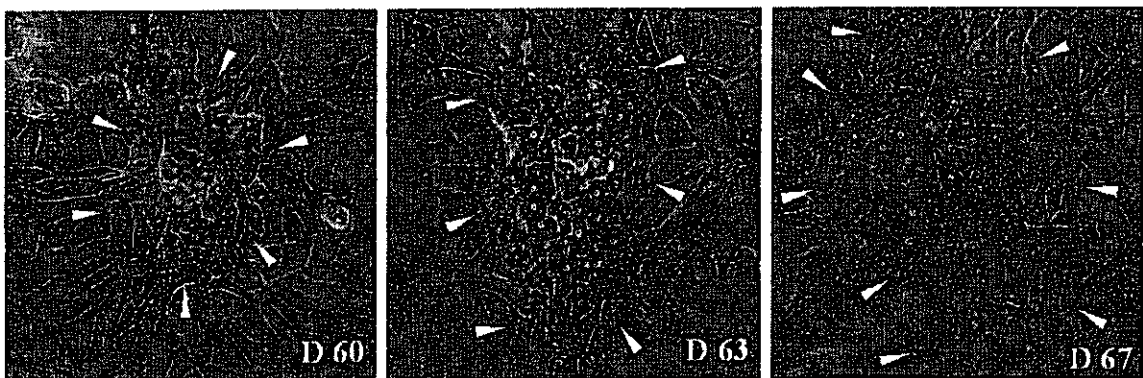


図 2 ; ヒト小型肝細胞コロニーの BrdU 免疫染色

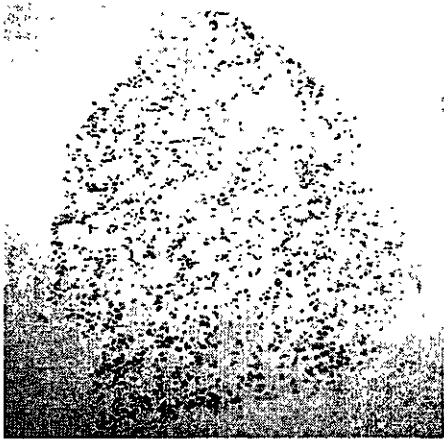


図 3 ; 正常肝切片より得られる細胞を使つてのコラーゲンシート上での類肝組織構築

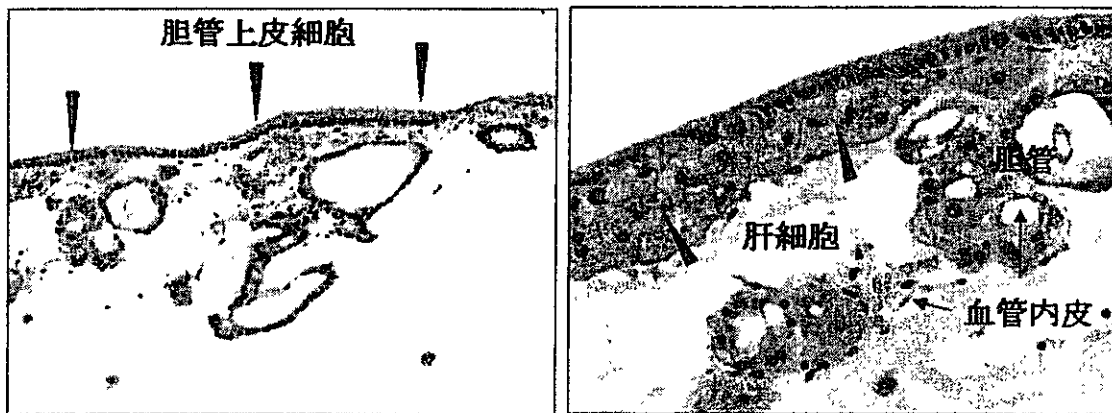


図 4 ; 培養液中へのアルブミン分泌

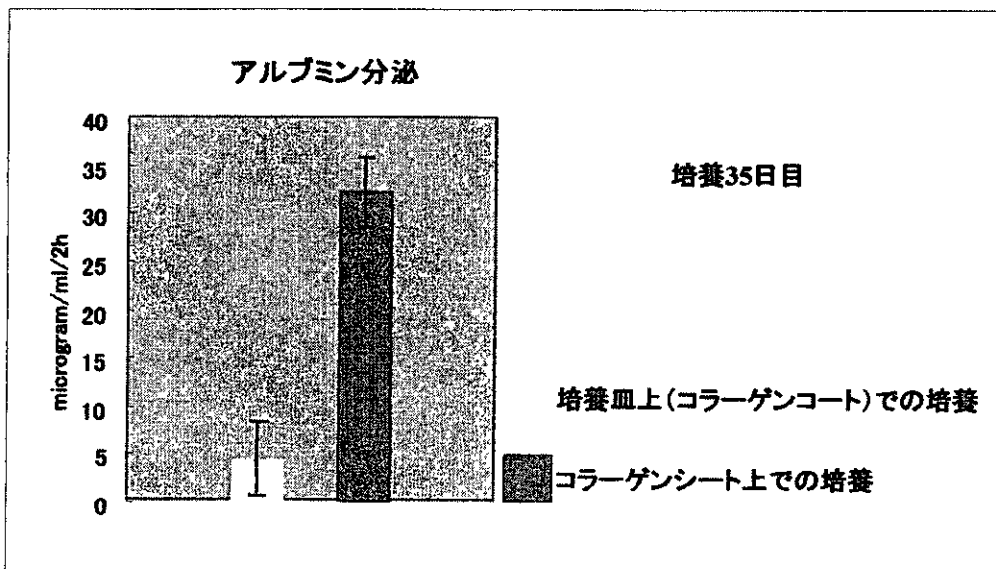


図5；類肝組織の PCNA 免疫染色



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 廣瀬 哲朗 京都大学再生医科学研究所・助手

研究要旨

成体肝に存在する肝幹細胞に特異的に発現している遺伝子を同定するために、我々が昨年度までに確立した分離法によって得た肝幹細胞と、成熟肝細胞との間でcDNA subtraction法を施行した。これによりこれまでに知られていない特異的マーカー遺伝子の候補をいくつか同定することができた。また、高純度に分離した胎児肝幹細胞の培養系を新たに開発することにより、肝幹細胞の分化誘導におけるHGFとOSMの効果を検討して新たな知見を得ることができた。

A. 研究目的

我々は昨年度までに肝幹細胞が同種接着性を有する性質を見だし、これを利用して効率的に肝幹細胞を胎児あるいは成体の肝組織から濃縮する方法を開発した。また内胚葉系細胞に高くgreen fluorescent protein (GFP)を発現するトランスジェニックマウスを利用し、蛍光励起セルソーターを用いて肝幹細胞をさらに高純度に分離することに成功した。本年度はこの高純度に分離された肝幹細胞を試料として、肝組織の中でこの細胞に特異的に発現している表面抗原を同定することを主たる研究目的とした。特異性の高い表面抗原が同定できれば、その抗体を利用することによりヒト肝組織から高純度の肝幹細胞を分離することが可能となり、その有用性は非常に高いものと期待される。

一方、培養液中で分離された肝幹細胞を成熟幹細胞に分化成熟させることはこれまでに可能となっているが、その具体的なメカニズムは、精製された肝幹細胞

を入手する事が困難であったため、現在に至るまで十分に解明されていない。我々が昨年度までに確立した方法を利用し、胎児肝幹細胞が成熟幹細胞に分化するために必要なシグナルを検討することを本年度のもう一つの研究目的とした。分化誘導シグナルが解明されれば、恒常的にヒト肝幹細胞から成熟幹細胞を産生するシステムの作成に大いに寄与することが期待される。

B. 研究方法

(1) 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。

（2）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するとともに、残りの分画から血液系細胞を除い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) を濃度をふって添加し、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である tryptophan 2,3-dioxygenase (TO) と tyrosine aminotransferase (TAT) 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、トランスウエルを用いて肝幹細胞と間葉系細胞を接触系と非接触系にわけて共培養する。

C. 研究結果

（1）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た後に、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GFPを発現する小型の上皮様細胞

であった（図1）。この細胞を高純度に分離するためにセルソーターを用いてSSC^{low}, GFP^{high}分画をソートしたところ（図2）、この分画の細胞はRT-PCR上AFPやalbuminを発現するが、他の肝内細胞成分のマーカーである、CD45, VE-cadherin, T0, desminなどが検出できないことから、高純度に肝幹細胞が濃縮されていることが確認された（図3）。この細胞から得られたcDNAライブラリーから、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クローンをシークエンスしたところ、約300遺伝子が同定された。そのうち3クローン以上が存在した遺伝子が約30同定できた。そのうち膜蛋白ドメインを有するものに注目し、その特異性の確認を行っている。

（2）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

まずこれまで肝幹細胞を分化誘導すると考えられてきたHGFとOSMの効果を純化した肝幹細胞を用いて検討すると、これまでの報告と異なり、HGFは逆に分化誘導を阻害する働きがあることが推測される結果が得られた（図4）。また間葉系細胞の影響を検討するために、肝幹細胞単独培養群と、間葉系細胞との共培養群を比較すると、共培養群ではHGFの分化抑制効果がみられないことから、従来の培養法ではこの効果が検出できなかったものと考えられた（図5）。さらに、この効果が細胞同士の接触によるものかどうかを検討すると、非接触培養群のみにHGFの分化誘導抑制効果がみられることから、HGFの分化抑制効果は間葉系細胞

との接触によって失われるものと推測された。

D. 考察

今回の研究において成体肝幹細胞に特異的に発現する遺伝子がいくつか新たに同定された。この中には機能が未知の遺伝子であるESTが多数含まれており、また既知の遺伝子においても肝内における発現細胞が同定されていないものが多い。われわれはこの中でもGPNMB, GP48B, GP38のような細胞膜上に発現するタンパク質に注目しており、今後これらの遺伝子が実際に肝幹細胞に特異的に発現しているのかどうかを、定量的RT-PCRやIn situ hybridizationにて確認し有望な遺伝子についてはヒト検体においても検討する予定である。さらに抗体を作成してセルソーターにより肝幹細胞を肝組織から分離するシステムの構築をめざすことを今後の目標としている。

一方、胎児肝幹細胞の分化誘導研究においても興味ある知見が得られた。従来HGFは胎児肝をコラゲナーゼ処理して得られた細胞をそのまま使用する培養系においては肝細胞への分化誘導因子として働くと報告されていたが、今回われわれが開発した肝幹細胞を純化した培養系においては、逆に分化抑制に働くという結果が得られた。すなわちこれまでの研究にみられる実験系は幹細胞の分化に関する研究にはむしろ不適であると考えられ、われわれの実験系が今後の分化誘導研究に大いに寄与することが期待される。肝幹細胞が成熟幹細胞に分化する過程において間葉系細胞がどのように関与するのかをさらに解明し、さきの実験で目標とした肝幹細胞の分離法によって得

られた細胞を、試験管内での肝細胞に分化誘導するシステムを開発することが今後の研究目標となる。

E. 結論

(1) cDNAサブトラクション法をもちいて、肝内において成体肝幹細胞に特異的に発現する遺伝子の候補を同定することができた。

(2) 胎児肝幹細胞の分化誘導を解明するうえで有効な実験系を新たに開発し、HGFの肝細胞分化誘導効果において新たな知見が得られた。

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. Fujikawa, T., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Yamaoka, Y. Purification of adult hepatic progenitor cell using green fluorescent protein(GFP)-transgenic mice and fluorescence-activated cell sorting. *J. Hepatology* 2003 (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. *J. Hepatology*. 36: 653-659 (2002).
4. Yasuchika, K., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Azuma, H., Fujikawa, T., Y

amaoka, Y. Establishment of efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells. *Hepatology* 36: 534-543 (2002)

5. 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 (2002)

6. 廣瀬哲朗, 山岡義生: 再生医療はどこまで来たか *外科治療* 86 (1): 1-8 (2002)

7. 藤井英明, 廣瀬哲朗, 山岡義生: 新しい薬剤耐性因子2-HIF (Hypoxia Inducible Factor) *Surgery Frontier* 9(2): 63-65

(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., Hoppo, 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., Na

gao, 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. 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回日本外科学会定期学術総会 (2002. 4. 11-13 京都)

5. 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)

6. 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回日本外科学会定期学術総会 (2002. 4. 11-13 京都)

7. Fujikawa, T., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Hoppo, 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)

図1 成体肝幹細胞（左：位相差顕微鏡像、右：蛍光顕微鏡像。蛍光を発しているのが肝幹細胞と考えられる。）

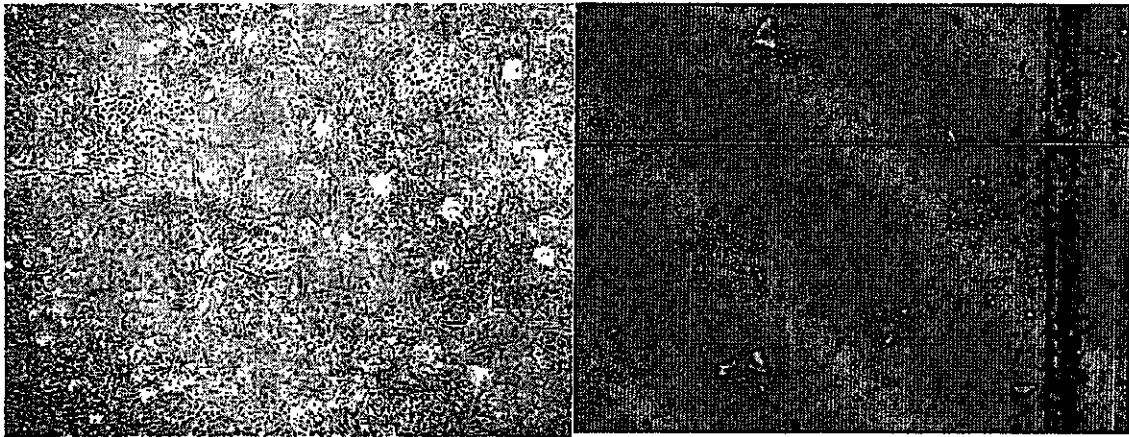


図2 セルソーターによる肝幹細胞の分離。（中央下のSSC^{low} GFP^{high}の分画に肝幹細胞が存在する。）

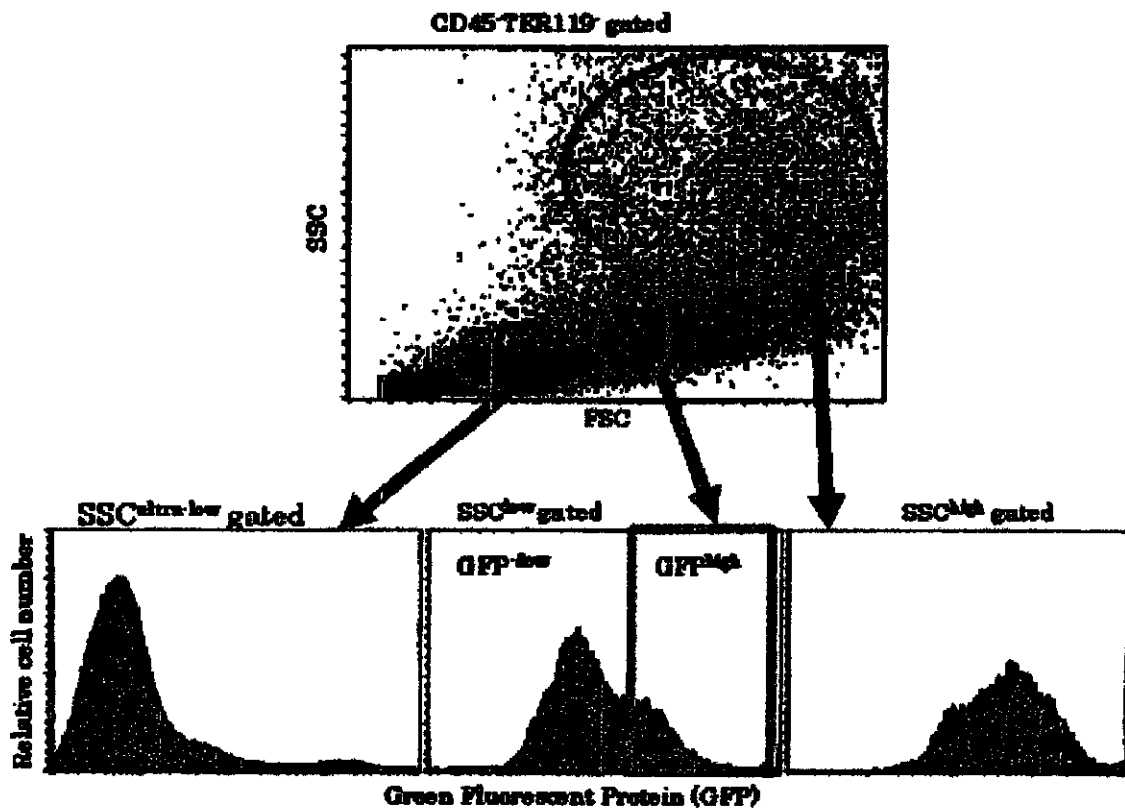


図3 肝幹細胞のRT-PCR。(左:セルソート前、右:セルソート後。 1; albumin, 2; alpha-fetoprotein, 3; cytokeratin-19 4; CD45, 5; alpha-smooth muscle actin, 6; Flk1, 7; CD34, 8; beta-actin)

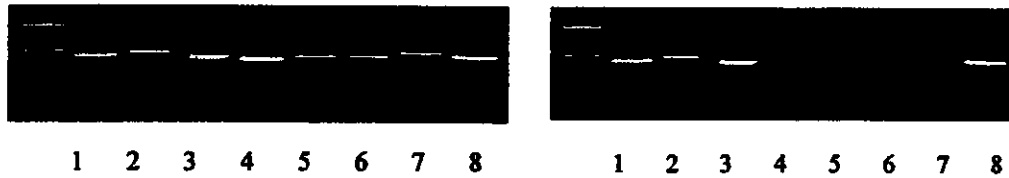


図4 肝幹細胞におけるHGFとOSMの分化誘導効果
(定量的RT-PCRによる肝成熟マーカー発現の検討)

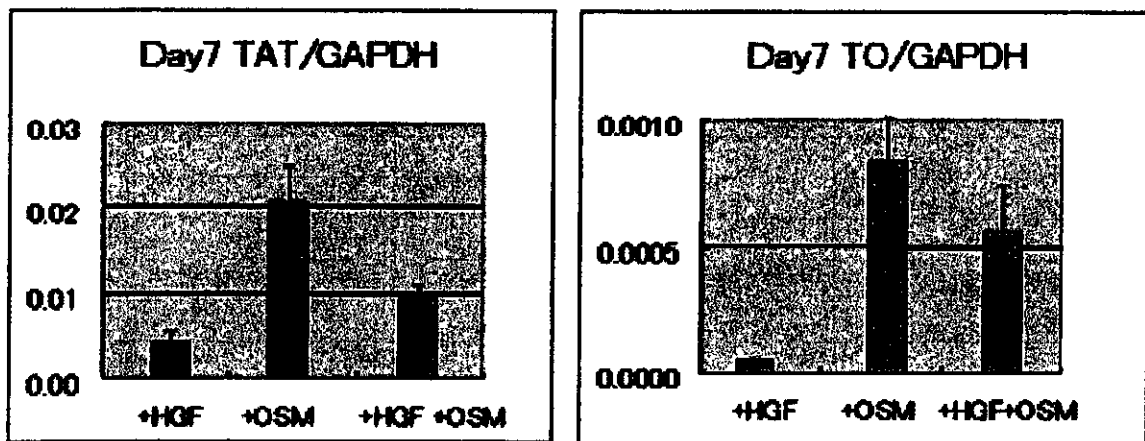
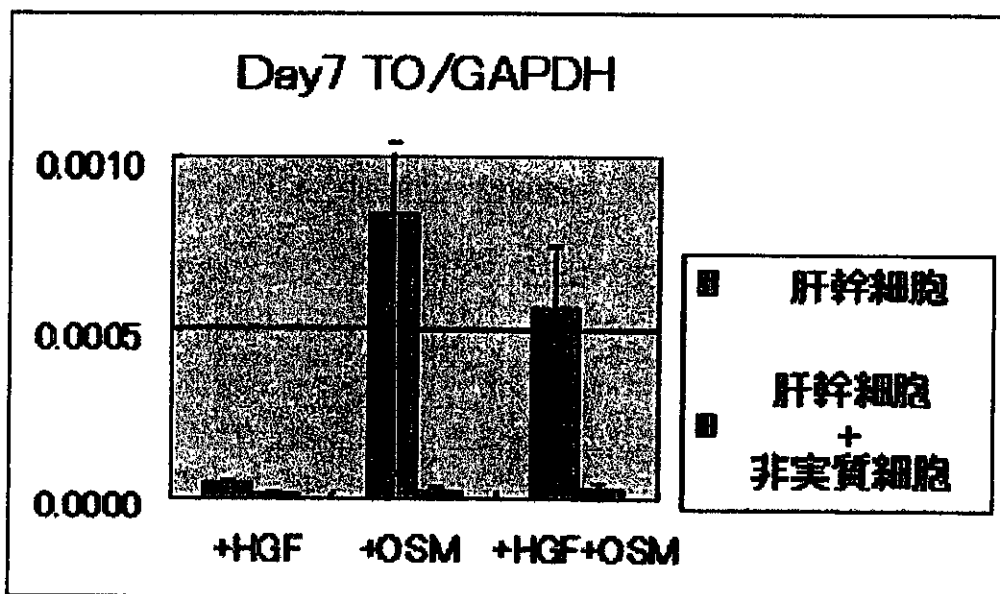
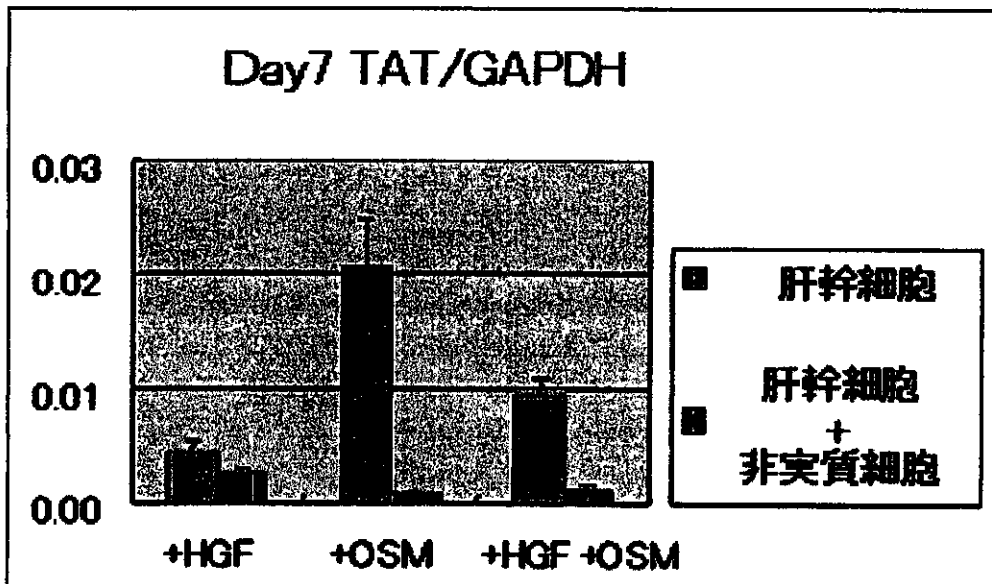


図5 肝幹細胞と非実質細胞との共培養による分化誘導効果



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 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り、現在京都大学再生医科学研究所にて樹立中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と思われる。

A. 研究目的

現在樹立中の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、これに関する情報は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は必要不可欠と思われる。そのため、我々は胎仔期における分化・組織構築の過程における発現遺伝子等の情報提供を通して貢献する。

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や遺伝子発現などに関する情報提供を行い、共同研究者の廣瀬が分離・同定して本年度解析中であるマウス成体肝前駆細胞・肝幹細胞特異的遺伝子発現と比較検

討する。これにより、より安全な分化誘導法の検討を行う。

C. 研究結果

前年度に胎児ヒト肝幹細胞は、その細胞特性が共同研究者の廣瀬が分離している胎仔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事は報告した。本年度は共同研究者の廣瀬が報告するように、成体マウス肝幹細胞に特異的に発現する遺伝子群や利用可能な表面抗原を同定する過程において、胎児ヒト肝幹細胞で得られている情報を提供することにより、その解析を共同でおこなった。

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