

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 14 年度 総括・分担研究報告書  
主任研究者 宮島 篤  
平成 15 (2003) 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に関する研究

宮島 篤 1

### 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

酒井康行 15

2. ES細胞からの肝細胞文化系に関する研究

渡部徹郎 26

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 32

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** 肝臓の細胞治療、遺伝子治療、さらに人工肝臓の開発など肝臓の再生医療においては、肝臓のもととなる肝幹細胞を分離培養し大量の機能的な細胞を調製する必要がある。本研究では、機能的な肝細胞の大量調製法の確立を目指して肝細胞の増殖と分化のメカニズムの解析を行った。具体的には、我々が開発したマウスの胎生肝臓細胞培養系を基盤技術として、未分化肝細胞が成熟肝細胞へと分化する過程を分子レベルでの解析を行った。また、未分化肝細胞を分離してその分化能および造血支持機能の解析を行った。さらに、肝再生過程と肝発生過程には多くの共通点があり、肝再生機構の解析も併せて行った。体外での機能的肝細胞の大量調製を目指して、未分化肝細胞培養システムの改善およびES細胞から肝細胞を分化誘導するシステムの開発を行った。

**分担研究者**

酒井康行  
東京大学生産技術研究所 化学工学 助教授  
渡部徹郎  
東京大学大学院医学系研究科 分子病理学  
助手

**A. 研究目的**

本研究は、肝臓のもととなる幹細胞の分離・培養・移植などを中心に、肝臓の細胞治療、遺伝子治療、さらに人工肝臓の開発など肝臓の再生医療の向上を目指すものである。肝臓は成体における最大の代謝器官であり、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維持に必須の役割を担っ

ている。そのため、様々な原因による肝炎の進行により、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および組織適合性の問題があり、これに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、成体肝臓の肝細胞は休止期にありほとんど増殖しない。成体肝細胞の培養はごく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、無限増殖可能な不死化肝細胞株ではほとんどの

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のが一般的であり、肝細胞の増殖と分化を人為的にコントロールする方法の開発が肝機能を備えた細胞を大量に調製するためには必須である。そのためには、未分化肝細胞が発生・増殖・分化するプロセスを細胞および分子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。すなわち、胎生肝細胞を IL-6 ファミリーのオンコスタチンM (OSM) の存在下で培養することで、未熟な肝細胞を機能的な肝細胞へと効率良く分化させることができることを示してきた。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、オンコスタチンMの分化に対する作用を詳細に調べることにより、肝細胞の分化機構を理解し、それを制御するための知見を蓄積する。また、オンコスタチンM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、オンコスタチンMが成体肝臓の再生における

役割を解明する。

一方、肝細胞のもととなる肝幹細胞を未分化状態に保ちながら増殖をコントロールすることは肝臓の再生医療にとり極めて重要な課題である。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、肝幹細胞は肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を備えた増殖性の細胞とされているが、その研究は血液幹細胞等に比べて著しく遅れており、その実態は不明である。その理由として幹細胞の評価システム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状態の肝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臓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胚性幹（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できるだけ延長し、細胞を十分量確保した後に分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。

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- $\beta$ 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 $\alpha$ フェトプロテイン、アルブミン、TATなどを予定している。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る。

また、肝臓移植では、つなぎの医療として肝臓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て、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。

以下は本研究代表者の研究内容であり、分担者の研究内容については「分担者の研究報告」で述べる。なお、本研究での肝

幹細胞と肝再生に関する研究は神奈川科学技術アカデミーとの共同研究によるものである。

## B. 研究方法

### 1. 胎仔肝初代培養系における肝細胞の機能と分化機構の解析

胎生肝臓は胎生後期における最も中心的な造血器官として機能するが、消化器官としての機能はほとんどもたない。そこで、造血機能の解析とともに肝細胞が消化器官へと分化するメカニズムをマウス胎生肝臓の初代培養系を用いて検討した。

我々はすでにマウス胎生肝臓の培養系に GFP トランスジェニックマウスから分離した造血幹細胞を加えて共培養し GFP 陽性の血球の産生を評価するシステムを開発している。このシステムを用いて、造血幹細胞の増殖と分化に関わる胎生肝臓の支持細胞の同定を目指す。

胎生肝臓の未分化肝細胞は増殖能に優れ、*in vitro* においても増殖するが、代謝機能はほとんどもたない。我々はすでに、オンコスタチンMが未分化肝細胞の分化を誘導し、チロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) やグルコース 6 リン酸ホスファターゼ (G6Pase) など出生時

期に発現する酵素やグリコーゲンの蓄積や脂肪合成などの機能が *in vitro* で発現されること見いだしている。そこで、このシステムを使って、肝細胞の分化過程をさらに詳細に解析するとともに、より成熟した肝細胞へと分化誘導する条件の検討を行うとともに、肝細胞分化の分子機構の解析を行った。

### 2. 肝幹細胞の分離と培養

肝幹細胞は肝細胞と胆管上皮細胞に分化する能力を備えた増殖性の細胞と考えられているが、その性状はほとんど知られてはいない。マウスの胎生肝臓で発現している抗原の検索から Dlk という膜タンパク質が未分化肝細胞に発現しており、これに対する抗体を使って肝幹細胞を分離することができることを神奈川科学技術アカデミーの研究グループが明らかにしている。そこで、このシステムを使って胎生肝細胞の分離を行い、その性状を解析した。とりわけ、分離した未分化肝細胞の分化能を *in vitro* と *in vivo* で検証するとともに造血支持活性を上記の共培養にして検討した。

### 3. 再生のメカニズム

肝臓は様々な原因による傷害から再生することが知られているユニークな組織である。この再生過程と肝臓の発生・分化の過程との類似が以前から指摘されている。事実、我々はオンコスタチンMが胎仔肝のみならず、成体においても肝傷害時に一過的にその発現が上昇することを見いだしている。さらに、四塩化炭素投与による肝再生モデルを我々が作製したオンコスタチンM受容体ノックアウトマウスに適用して、オンコスタチンMの肝再生における役割を検討した。

成体肝臓は肝実質細胞とともに非実質細胞である類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞等から形成されている。肝障害時におけるクッパー細胞以外の肝非実質細胞の役割に関しては明確にはされていない。とりわけ、肝臓細胞の約10%を占める内皮細胞の性状は不明である。内皮細胞を高純度に分離する方法も確立していない。そこで、我々は肝内皮細胞を細胞膜抗原の発現を基に分離し、遺伝子発現プロファイルをSAGE (serial analysis of gene expression) 法により解析した。さらに、四塩化炭素による肝障害時の肝臓から分離した内皮細胞での遺伝子発現と比較した。

### C. 結果

#### 1. 胎仔肝初代培養系における肝細胞の機能と分化機構の解析

すでに、我々は本培養系においてはオンコスタチンMにより活性化されたSTAT3が種々の肝代謝酵素の発現誘導に必要であることK-RasがE-cadherinを介する細胞接着に必要であることを示した。そこで、今回は肝細胞の増殖に関する検討を行った。

胎生肝細胞は増殖期にあり、*in vitro*でも増殖可能であるが、本培養系ではオンコスタチンMが肝細胞分化を誘導し増殖をむしろ抑制する。そこで、サイクリン等の細胞周期制御因子の発現を解析したところ、胎児肝臓ではDサイクリンの高い発現がみられるが、成熟肝臓では肝細胞が休止期にあるために、Dサイクリンの発現は認められなかった。この結果に一致して、胎生肝細胞の培養系ではDサイクリンの発現がオンコスタチンMにより顕著に抑制された。このオンコスタチンMによるDサイクリンの発現抑制は、抑制型STAT3変異体の発現により解除され、逆に4-hydroxytamoxifenで誘導的にSTAT3-ERを活性化するとDサイクリンの発現が抑制されることから、STAT3が胎生肝細胞におけるDサイクリンの発

現制御に必須であることが明らかとなった。

一方、成体肝臓に傷害を与えると D サイクリンの発現が誘導され、肝細胞は増殖期に入り、しかもこの際には STAT3 が必要であることが知られている。そこで、胎生肝細胞の初代培養系と株化された成熟肝細胞での D サイクリンの発現に対する STAT3 の作用を検討したところ、STAT3 は胎生肝細胞での D サイクリンの発現を抑制するが、成熟肝細胞株では抑制しなかった。したがって、STAT3 による D サイクリンの発現制御は肝細胞の分化段階に特異的であると考えられる。

オンコスタチンMによる肝細胞分化は出生時期の肝臓の機能を発現することはできるが、さらに成熟した成体肝臓の機能発現にはいたらない。そこで、肝細胞分化をさらに促進する因子の探索を神奈川県科学技術アカデミーとの共同研究で行い、細胞外基質の混合ゲル (EHS ゲル) の添加により成体肝臓に特有の酵素の発現が誘導されることを見いだした。

肝細胞培養系は造血支持能を示すので、この培養系での造血幹細胞の増殖分化を検討した結果、胎生 11 日の幹細胞の増殖が最も活発であり、その増殖は発生が進むに連れて低下した。これは胎生肝臓

が一時的な造血器官であることを *in vitro* でも再現しているものと考えられる。

## 2. 肝幹細胞の分離と培養

胎児肝臓中の Dlk 陽性細胞が肝細胞と胆管上皮細胞とに分化する能力があることは *in vitro* で示されており、Dlk 陽性細胞は肝幹細胞を含むと考えられている。この Dlk 陽性細胞が *in vivo* でも機能するのかという点を検討した。すなわち、GFP を発現するトランスジェニックマウスの胎生肝臓から Dlk 陽性細胞を磁気ビーズを使って分離し、抗 Fas 抗体により肝傷害を誘導したマウスの脾臓に移植したところ、移植後 8 週間目の肝臓に GFP 陽性の肝細胞を検出した。したがって、Dlk 陽性細胞は *in vivo* でも肝細胞に分化することができることが示された。また、Dlk 陽性細胞に造血支持機能があるかどうかを共培養系にて検討したところ、分化した血球の産生は支持された。しかし、未分化造血細胞の支持機能は細胞を分画しない胎生肝臓培養系に比べて低下しており、Dlk 陽性細胞以外の細胞集団の造血への関与が示唆された。



### 3. 再生のメカニズム

四塩化炭素の腹腔内投与による急性肝傷害モデルを使って、肝再生におけるオンコスタチンMの役割を検討した。まず、肝傷害後のオンコスタチンMとその受容体の発現を経時的に調べたところ、オンコスタチンM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。このことから、肝再生時には、非実質細胞から実質細胞へのオンコスタチンMのパラクリン機構が働いていることが示唆された。オンコスタチンM受容体のノックアウトマウスでの肝再生を検討した結果、ノックアウトマウスでは肝再生が顕著に遅延していた。

再生肝においては肝細胞の増殖にSTAT3が必要であることが知られているので、オンコスタチンMは肝細胞増殖に直接作用するものと思われる。また、ノックアウトマウスではプロテアーゼによる細胞結合組織の破壊が認められ、マトロプロテアーゼ MMP9 の活性が昂進していた。さらに、オンコスタチンMが非実質細胞にも作用するかどうかを *in vitro* culture において調べた結果、オンコスタチンMを添加した場合に、類洞内皮細胞の顕著な形態変化が観察された。また、

非実質細胞からの Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の発現が誘導された。したがって、オンコスタチンMは肝再生過程の組織再構築にも積極的に関与していることが示唆された。

さらに、肝臓の非実質細胞画分から FcR 陽性細胞を分離することで内皮細胞が高純度で得られた。そこで、この細胞を用いて、SAGE による遺伝子発現解析を行った。正常肝臓と四塩化炭素による傷害肝臓から分離した内皮細胞での遺伝子発現を比較して、傷害により発現が上昇していた遺伝子につき PCR や *in situ* hybridization 等により発現の確認を行っている。

### D. 考察

胎生肝臓の初代培養系は *in vitro* で肝細胞分化を誘導することが可能であり、このシステムを使うことで、肝細胞分化の分子機構の解析が可能である。本研究では、細胞増殖に重要な D サイクリンの発現を解析して、肝細胞分化を誘導するオンコスタチンMがその発現を抑制すること、さらに STAT3 がこの抑制に必須であることが示された。これは肝再生過程での成熟肝細胞における STAT3 の機能とは明らかに異なり、分化段階に特異的

な因子が関与する可能性が示唆された。最近、STAT3 に結合する因子が多数報告されているが、肝細胞において STAT3 と共同して作用する因子の同定は今後の興味深い課題である。

Dlk が未分化肝細胞を分離するマーカーとなりうることが示された。これは肝幹細胞の研究を推進するのみならず、胎生肝臓での造血支持機能をもつ細胞を同定する上でも重要なツールとなりうる。今後は、こうした未分化肝細胞マーカーとなる細胞膜抗原をさらに検索し、細胞の分離に利用可能な抗体を作製することで肝幹細胞の解析を進めたい。また、これは同時に造血支持細胞の研究の発展にも寄与するものと期待される。

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。このことを踏まえ、我々は肝傷害モデルマウスを用いて、類洞内皮細胞のオンコスタチンMに対する応答を調べた。その結果、肝非実質細胞がTIMP-1を発現することが明らかとなり、肝再生過程の組織再構築に積極的に関与しているものと考えられた。類洞内皮細胞の役割については、SAGE法で同定された遺伝子の発現と機能の解析を通じて明らかにしたいと考えている。

## E. 結論

我々が開発した胎生肝臓の培養系、Dlk抗体による未分化肝細胞の分離法、さらに造血支持機能解析等を組み合わせることで、胎生肝細胞の増殖・分化および造血支持機能に関する新たな知見が得られた。また、オンコスタチンM受容体ノックアウトマウスでの肝再生の研究からオンコスタチンMの肝再生における新たな機能が明らかになった。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kinoshita T and A. Miyajima (2002) Cytokine regulation of liver development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1592, 303-312.
- Matsui T., T. Kinoshita, T. Hirano, T. Yokota and A. Miyajima (2002) STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J. Biol. Chem.* 277: 36167-36173.
- Nakayama K, K-W. Kim, and A. Miyajima (2002) A novel nuclear zinc finger protein EZI enhances nuclear retention and transactivation of STAT3. *EMBO J.* 21, 6174-6184.
- Matsui T., Kinoshita T., Morikawa Y.,

- Tohya K., Katsuki M., Ito Y., Kamiya A., and Miyajima A. (2002) K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *EMBO J.* 21, 1021-1030.
- Kamiya A., N. Kojima, T. Kinoshita, Y. Sakai and A. Miyajima (2002) Maturation of fetal hepatocytes *in vitro* by extracellular matrices and Oncostatin M; Induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology* 35, 1351-1359.
- Takeuchi M., Sekiguchi T., Hara T., Kinoshita T., and Miyajima A. (2002) Cultivation of AGM-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances homing to the bone marrow. *Blood* 99, 1190-1196.
- Minehata K., Mukoyama Y., Sekiguchi T., Hara T., and Miyajima A. (2002) Macrophage-colony stimulating factor modulates the development of hematopoiesis by stimulating the differentiation of endothelial cells in the AGM region. *Blood* 99, 2360-2368.
- Tamura S., Y. Morikawa, M. Tanaka, A. Miyajima and E. Senba (2002) Developmental expression pattern of oncostatin M receptor b in mice. *Mech Dev.* 115, 127-131.
- Enomoto H., K. Yoshida, Y. Kishima, T. Kinoshita, M. Yamamoto, A. D. Everett, A. Miyajima and H. Nakamura. (2002) Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* 36, 1519- 1527.
- Tamura H, S. Okamoto, K. Iwatsuki, Y. Futamata, K. Tanaka, Y. Nakayama, A. Miyajima and T. Hara. (2002) *In vitro* differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow. *Exp. Hematol.* 30, 957-966.
- Tanimizu N, M. Nishikawa, and A. Miyajima (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1, an EGF-like homeotic protein. *J. Cell Sci.* in press.

## 2. 学会発表

- 1) 田中 稔, 平林 容子, 井上 達, 勝木 元也, 宮島 篤  
 オンコスタチンM受容体ノックアウトマウスの造血機能の解析  
 第25回 日本分子生物学会 (02. 12. 11 ~12. 14 パシフィコ横浜)
- 2) 金 經雲, 中山 恒, 宮島 篤  
 新規 zinc finger タンパク質 EZI は STAT3 による転写を促進する。  
 第25回 日本分子生物学会 (02. 12. 11 ~12. 14 パシフィコ横浜)
- 3) D. Kasahara, M. Takeuchi, T. Sekiguchi, K. Minehata, and A. Miyajima  
 Potential of Dlk+ fetal liver cells to support hematopoiesis  
 American Society of Hematology  
 December, 6-10, 2002 Philadelphia
- 4) Hidenori Nonaka, Koji Nakamura, Takaaki Matsui, Atsushi Miyajima  
 A paracrine mechanism mediated by Oncostatin M in regenerating liver

- 2002 FASEB Summer Research Conferences 'Mechanisms of Liver Growth, Differentiation and Molecular Pathogenesis of Hepatic Diseases' July, 2002, Colorado, USA
- 5) 野中 秀紀, 関口 貴志, 菅野 純夫, 宮島 篤,  
SAGE による肝類洞内皮細胞の遺伝子発現解析  
第 25 回 日本分子生物学会 (02. 12. 11 ~12. 14 パシフィコ横浜)
- 6) 鈴木 香, 田中 稔, 宮島 篤  
胎仔肝細胞に対する細胞表面抗原マーカーの検索  
第 25 回 日本分子生物学会 (02. 12. 11 ~12. 14 パシフィコ横浜)
- 7) 中村 康司, 野中 秀紀, 田中 稔, 斉藤 弘樹, 宮島 篤  
オンコスタチンM受容体遺伝子欠損マウスにおける肝再生の異常  
第 38 回日本肝臓学会総会 (02, 6, 13 ~6, 14 大阪市)
- 8) 谷水 直樹, 宮島 篤  
未分化肝細胞の表面抗原の同定  
第 38 回日本肝臓学会総会 (02, 6, 13 ~6, 14 大阪市)
- 9) 中村 康司, 野中 秀紀, 田中 稔, 斉藤 弘樹, 宮島 篤  
Impaired liver regeneration in oncostatin M receptor knock out mice.  
第 9 回肝細胞研究 (02, 7. 12~7, 13 秋田市)
- 10) 安西 弘子, 紙谷 聡英, 竹内 隆, 宮島 篤  
肝細胞の発生・増殖・分化過程にお
- ける jumonji の機能解析  
第 9 回肝細胞研究 (02, 7. 12~7, 13 秋田市)
- 11) 谷水 直樹, 宮島 篤  
Dlk を用いた未分化肝細胞の分離  
第 9 回肝細胞研究 (02, 7. 12~7, 13 秋田市)
- 12) 小島 伸彦, 紙谷 聡英, 谷水 直樹, 宮島 篤  
胎生肝細胞の分化誘導に関与する分子の機能解析  
第 9 回肝細胞研究 (02, 7. 12~7, 13 秋田市)
- 13) Y. Nakamura , H. Nonaka, M. Tanaka, H. Saito, A. Miyajima  
“Impaired liver regeneration in oncostatin M receptor knock out mice.”  
FASEB Summer Research Conference 2002 02. 7. 27-8. 1, Snowmass, Colorado, U. S. A)
- 14) N. Tanimizu, M. Nishikawa, A. Miyajima  
“Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1”  
FASEB Summer Research Conference 2002 02. 7. 27-8. 1, Snowmass, Colorado, U. S. A)
- 15) A. Miyajima  
“Roles of Oncostatin M in hematopoiesis”  
International Aachen Workshop on cytokine signalin October 5, 2002, Aachen, Germany
- 16) A. Miyajima  
“Interplay between hematopoiesis and hepatogenesis”

Stem Cell Symposium; from basic  
biology to clinical application  
October 25-26, 2002, Taipei,  
Taiwan

17) A. Miyajima

“Development of hematopoiesis and  
liver”

5<sup>th</sup> IMBN Conference.

November 3-5, 2002, Shanghai,  
China

18) A. Miyajima

“Roles of Oncostatin M in  
hematopoiesis”

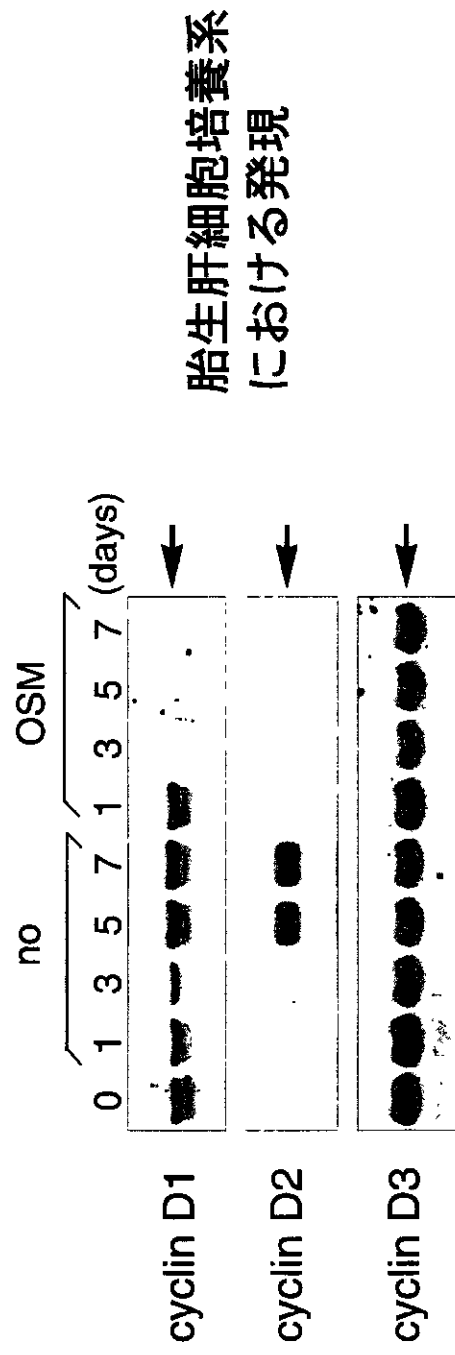
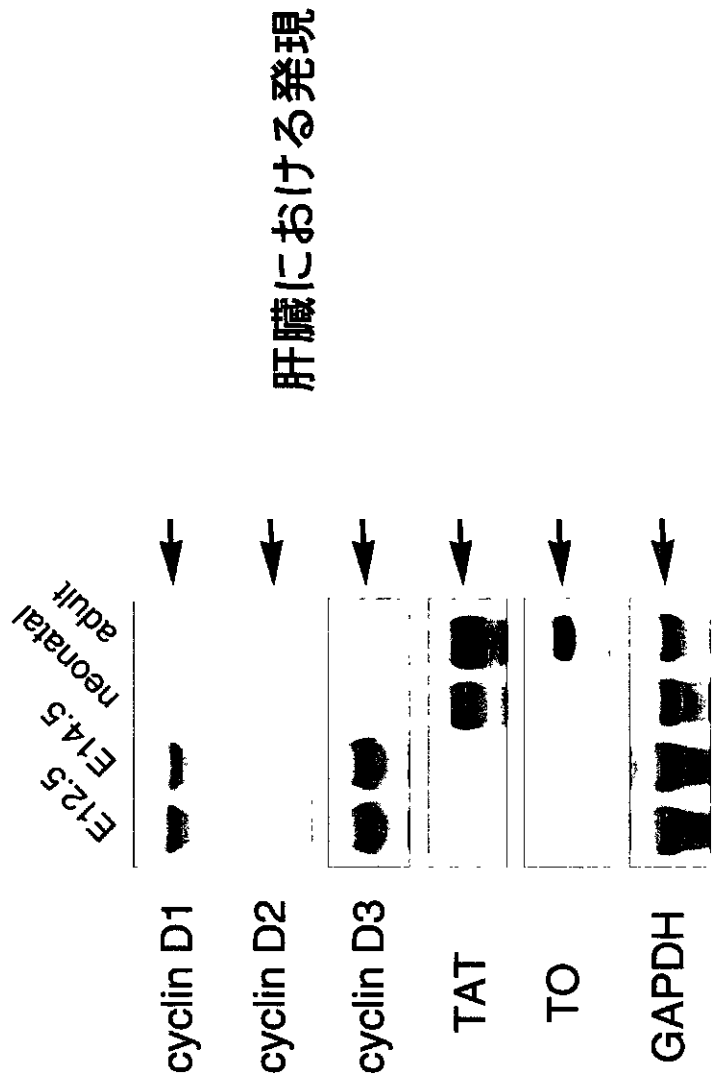
Annual Meeting of the French  
Society of Immunology

27-29 November, 2002, Strasburg,  
France

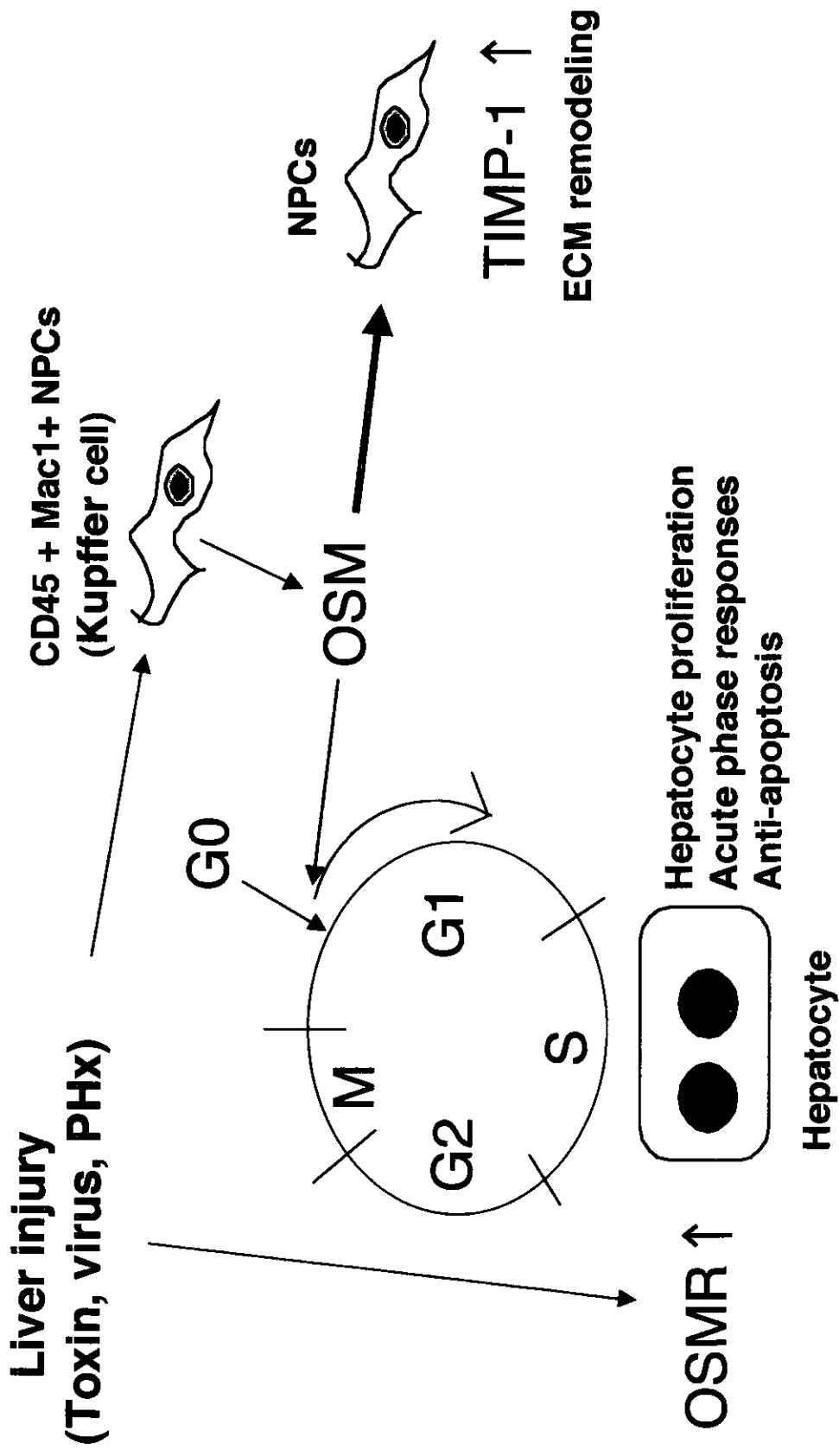
H. 知的財産の出願・登録状況

なし

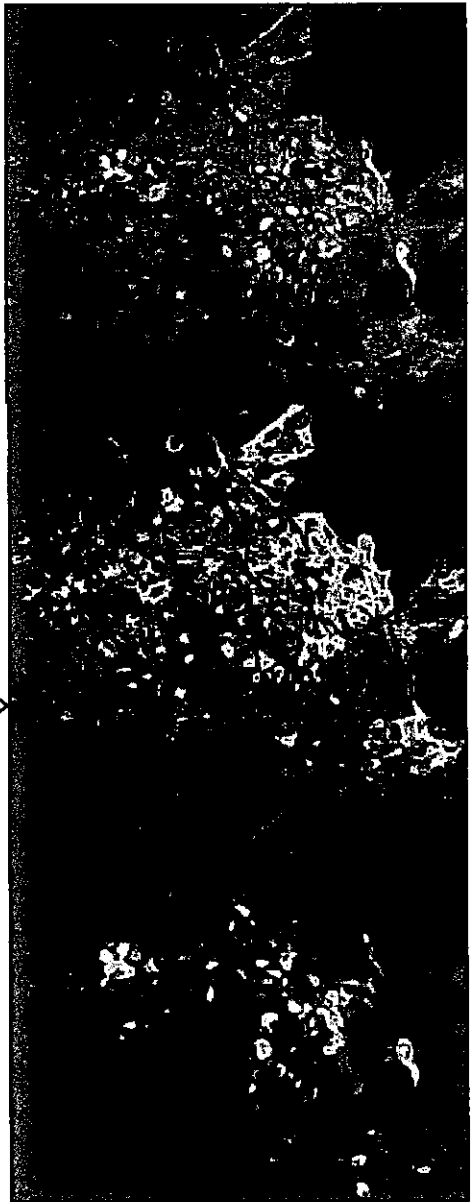
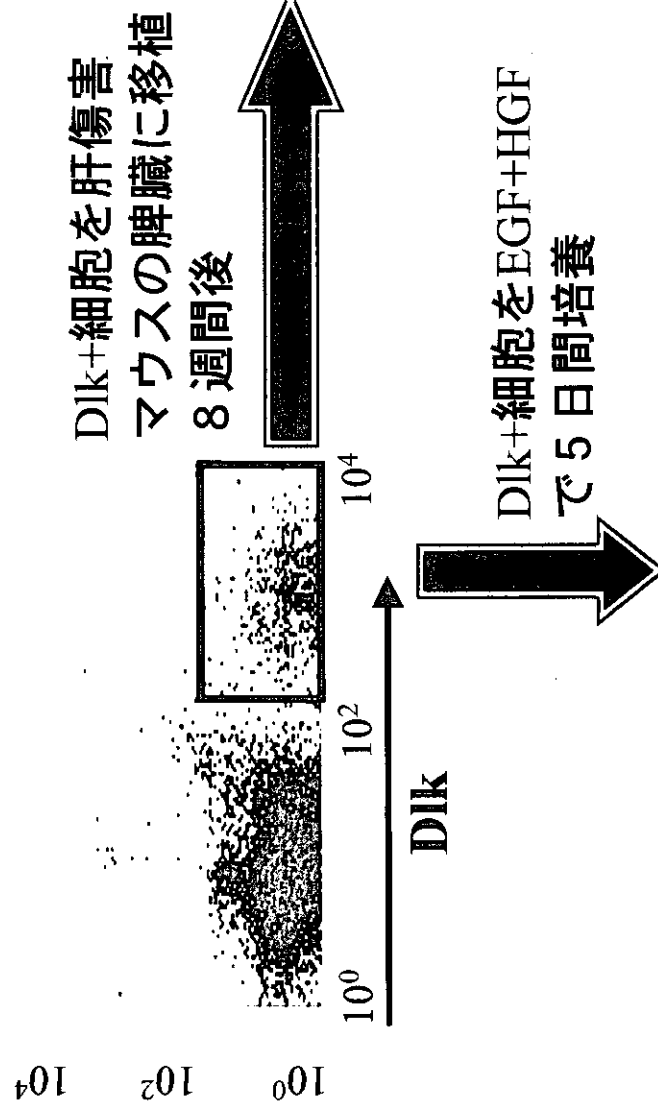
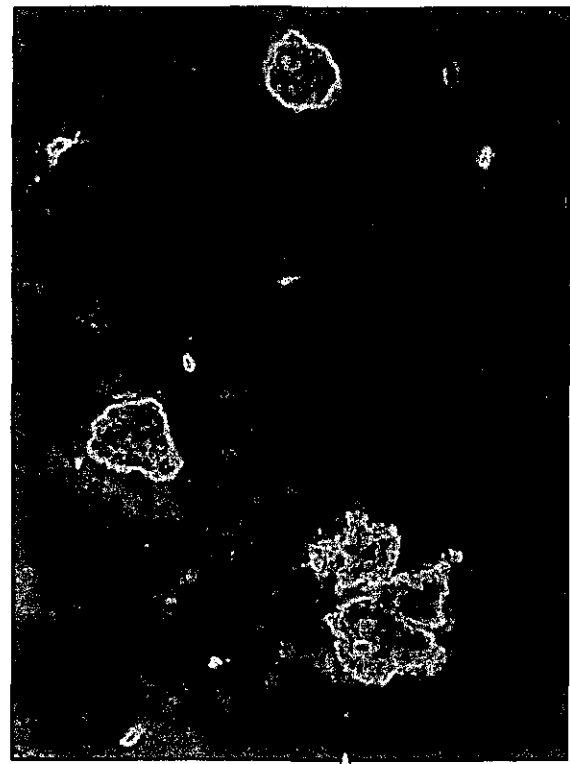
# Dサイクリンの発現は肝細胞の分化とともに抑制される



# Possible functions of OSM during liver regeneration



# 肝幹細胞はDIK+細胞に含まれる





厚生科学研究費補助金（ゲノム・再生医療研究事業）  
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** 肝組織の *in vitro* 再構築を最終目的として、生体吸収性樹脂からなる複雑な構造を持つ臓器テンプレートの作製手法と、マウス胎児肝細胞・ヒト胎児肝細胞の *in vitro* における分化誘導に関する検討を行った。前者については、細胞固定化のためのランダム多孔質部を持つシートを積層しつつマクロ流路を切削する新たな三次元プロセスを検討し、高空隙率ランダム多孔質部とマクロ流路をほぼ確実に成型可能とした。一方後者については、三次元培養したマウス胎児肝細胞の *in vivo* 移植実験を行い、移植後の肝組織再構築能を高めるためには、*in vitro* 分化誘導が決定的とも言える著しい促進効果を持つことを明らかとした。また、わが国で入手可能な継代ヒト胎児肝細胞の *in vitro* 成熟化について検討を開始し、マウス胎児肝細胞で有効であった因子のうち、オンコスタチンMと三次元担体との組合せが、継代によってほぼ完全に失われた肝機能を *in vitro* で回復するために、非常に有効であることを示した。

**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二次元的な構造を持つ組織・臓器と異なり、肝臓や腎臓・肺などのある程度の体積と高度に組織化された内部構造や毛細血管系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、第一の目的として、肝組織再構築用の生体吸収性テンプレートを作製する技術の開発を行った。前年度においては光三次元造型技術の適用を想定して光架橋性かつ生体吸収性を持つ樹脂と、細胞を担持するランダム多孔質部形成のための光発泡に関する研究を行ったが、臓器再構築に適した高空隙率か

つ制御された微細内部構造を持つ担体の製作プロセスとして発展させるためには、限界があった。そこで今年度においては発想を転換し、高空隙率を持つポリ乳酸スポンジシートを積層しつつ多軸機械加工機を用いてマクロ流路構造を切削加工する新規プロセスを提案・検討した(B)。

第二の目的として、前年度に行ったマウス胎児肝細胞分画中に存在する肝前駆細胞の *in vitro* における分化・成熟化促進条件の *in vivo* における効果を検証するために、通常のポリ乳酸スポンジ中でこの条件で *in vitro* で成熟化させたマウス胎児肝細胞の同系・肝切除マウスへの移植実験による評価を行った(C)。

第三の目的として、Cの知見のヒト肝前駆細胞集団における効果を検証するために、わが国において入手可能な継代ヒト胎児肝細胞集団を用いて、*in vitro* における各種因子添加やポリ乳酸担体を用いる三次元培養の効果を評価した。この細胞は、米国について母親へのインフォームドコンセントを得た上で6体の胎児から採取した肝細胞をプールし、3 PDLの増幅を行った上で、販売されているものである(D)。

## B. シート積層と機械加工を併用するモデル肝組織用担体の新規微細三次元造型プロセス

### B-1. 方法

まず、CADによりモデル肝組織のマクロ流路デザインを行った。これを図1(A)および(B)に示す。これは一辺が2 mm

の正四面体の構成単位として、その縦方向の斜辺をマクロ流路とし、正四面体の積み重ねで、円錐を2つ底面で張り合わせるような形としている。各マクロ流路の直径は0.5 mm、担体の体積は約2 cm<sup>3</sup>である。CAD上での数値データ作成は、東京大学生産技術研究所・テクノサポートセンターの西山祐司技術官に依頼した。またこのデザインに基づいて(株)NTTデータシートに作製を依頼した光造型モデルを図1(C)および(D)に示す。これは前年度に合成した生体吸収性樹脂ではなく、既存の光造型システムに対して最適化されたエポキシ系の樹脂を用いて作製されたものである。

このようなデザインに基づいて、積層造型+切削加工プロセスによるモデル担体の造型を、図2に示すような手順で行った。まず、厚さ16 mmのポリ乳酸・炭酸水素アンモニウム複合体を作製する。高分子量ポリ-L-乳酸(PLLA, M.W. = 300,000)をクロロホルムに溶解し、塩と混合、クロロホルムを蒸発させることで、機械加工に耐える強度の複合体シートを得た。図1に示されたCADデザインを加工機制御のためのCAMデータに変換し、これを元に実際の加工を行った。加工は、東京大学生産技術研究所・テクノサポートセンターに設置された多軸加工機を用いて、西山祐司・小西善幸両技術官の協力の下で行った。まず加工台上に一層目のポリ乳酸・塩複合体にマクロ流路を機械加工し、次のポリ乳酸スポンジシートをクロロホルムを用いて積層、

同様の加工を行う。これを6段目まで行い、外縁部を加工することで、内部にマクロ流路を持つ円錐形のポリ乳酸・塩複合体を作製した。同様に製作した別の円錐形と底面で張り合わせ、90°C以上の熱水中で塩を発泡・溶出させ、完成させた。

## B-2. 結果および考察

図3に、担体内部の加工状況を示す。図3(A)より、各層のマクロ流路が、シート積層後も十分に保持されていることが分かる。図3(B)は、特に加工の困難さが予想された流路分岐部の走査型電子顕微鏡写真である。機械加工による周囲のスポンジ構造に多少の乱れがあるものの、おおよそデザインに従った製作が行われていた。この製法によるポリ乳酸スポンジは、空隙率が90%以上であることは予め確かめてあるので、本製作プロセスによって、細胞担持に適した高空隙率のランダム多孔質部とマクロ流路構造とを併せ持つ肝組織再構築用の三次元担体の作製に成功したと言える。

組織再構築用担体の三次元造型プロセスとして、微細ノズル射出法（シンガポール国立大学など）、粒子溶融法（MIT）や光造型技術（九州大学）などが提案されているが、いずれも組織再構築に適した高空隙率の担体作製には成功していない。これは、これらのプロセスが、“加工しない”ことで多孔質部や流路構造を間接的に成型するという基本原理によっているためと考えられた。実際に、市販の光造型システムを用いたモデル担体の作成（図2(C)および(B)）においては、

今回のマクロ流路径(0.5 mm)が限界との指摘を、作製を行った(株)NTT データシーメットの担当者から頂いた。これは造型されなかった高粘度のエポキシ樹脂を完全に取り除くことが極めて困難であるためである。そこで本研究では、多孔質部については従来から生体吸収性多孔質担体の作製法として広く用いられている塩溶出發泡法を、マクロ流路構造については予め調整したシートを積層しつつ積極的に“加工する”ことで、内部においてもほぼデザイン通りの確実な担体を作製することができた。高空隙率が求められる生体組織再構築用の三次元造型プロセスとして優れた手法であると考えられる。

## C. 三次元培養したマウス胎児肝細胞の移植

### C-1. 方法

マウス胎児肝細胞分画中の肝前駆細胞のポリ乳酸スポンジによる三次元培養は、前年度に確立した手法で行った。すなわち、妊娠14日のC57Br/6マウスから採取した胎児肝細胞分画を、上記で用いたものと同じ製法にて製作したポリ乳酸スポンジ（直径10 mm、厚さ2 mm、体積約0.1 cm<sup>3</sup>）中で、2週間培養を行った。培養液は、William's E培地に血清やアスコルビン酸二リン酸、増殖因子・ホルモン、ニコチンアミド（NA, 1 mM）・ジメチルスルフォキシド（DMSO, 1%）・オンコスタチンM（OSM, 10 ng/mL）を加えたものを用いた。このように三次元

培養した細胞を同系の 70%肝切除マウスの腹腔内に移植し、移植後 4 週間で組織を回収し、クライオスタットにて凍結切片を調整、HE 染色やアルブミン染色を行った。

### C-2. 結果および考察

2 週間の三次元培養によって肝前駆細胞を選択的に増幅・成熟化させた群、これを行わずに採取直後にポリ乳酸多孔質担体に固定化後・1 日培養後に移植した群、成熟マウス肝細胞を同様に 1 日の培養で移植した群、ポリ乳酸のみの群、の 4 群について実験を行った。4 週間後の HE 染色像を図 4 に示す。この組織像から明らかのように、2 週間の *in vitro* における選択的増幅・成熟化が 4 週間後の組織再構築能に決定的とも言える差異をもたらすことが判明した。すなわち、前培養なしの系では肝細胞がまばらにしか見受けられないのに対し、2 週間の前培養を行った系では白く見えるポリ乳酸担体以外のほとんどの部分を肝細胞が占めるまでの高度な再構築が見られた。成熟細胞を移植した系では、4 週間後にはほぼ全く肝細胞は見出せなかった。4 群についてのアルブミン染色結果も、HE と同様の結論を与えた。以上の結果は、少なくとも前年度に確立した培養条件下で、予め肝前駆細胞集団を大幅に増幅・成熟化させておくことで、*in vivo* 移植後の肝組織再構築能を著しく高め得ることを示している。

### D. 継代ヒト胎児肝細胞の *in vitro* 成熟

化

#### D-1. 方法

ヒト胎児肝細胞は、米国において ACBRI 社で採取・精製され、最大 3 PDL の増幅を経てわが国で大日本製薬から供給されているものを用いた。増殖用には ACBRI 社で推奨する血清添加 CS-C 培地を、分化用にはヤガイ中央研究所の無血清 KSF 培地に各種増殖因子・ホルモンなどを添加して用いた。単層培養はコラーゲン被覆表面で、三次元培養はマウス胎児肝細胞と同様な手法で行った。機能は、アルブミン合成能 (ELISA 法)、チトクローム P450 1A1/2 活性 (エトキシレゾルフィン脱エチル化 (EROD) 活性)、 $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) 分泌 (ELISA 法)、を測定した。また、培養終了時に培養系の DNA 量を DAPI 蛍光法にて測定し、別途行った初代培養成熟マウス肝細胞やヒト分化型肝ガン細胞 Hep G2 などと、単位 DNA 量当たりの機能比較を行った。

#### D-2. 結果および考察

血清添加の推奨培地中で継代維持したヒト胎児肝細胞は、小型の前駆細胞様の形態を示したが (図 5 (A))、そのアルブミン分泌や EROD 活性は、ほぼ検出下限程度と極めて低いものであった。そこで単層培養にて、別の無血清培地である KSF に各種因子を添加して培養したところ、意味ある機能評価が可能となった。NA/DMSO 条件は小型肝細胞様の形態維持には有効であったが (図 5 (B))、マウスで見られたような積層・大型化や胆管