

20030408

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山岡 義生

平成16(2004)年4月

目 次

I	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		
	山岡 義生	-----	1
II	分担研究報告書		
1	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		
	三高 俊広	-----	9
2	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		
	猪飼 伊和夫	-----	16
3	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		
	永尾 雅哉	-----	23
4	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		
	塩田 浩平	-----	25
III	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	28
IV	研究成果の刊行物・別刷	-----	30

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）
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 北野病院・院長

研究要旨 肝疾患に対する細胞移植治療において、従来用いられてきた成熟肝細胞は、治療に十分な量を供給することが困難であることや、その保存や取り扱いが難しいことから、これにかわる細胞源として肝組織由来の肝幹細胞の利用法を確立することが本研究の目的である。本研究の最終年度である平成15年度は、昨年度までに得られた成果をもとに研究目的の達成へ向けて本事業を推進した。肝幹細胞分離法については、我々が開発した全く独自の細胞凝集塊形成法を利用して、京都大学消化器外科で切除されたヒト肝組織から肝幹細胞を分離する実験を開始した。一方、成体肝組織に存在する肝幹細胞に対する特異抗原はいまだに発見されていないため、我々が昨年度までに遺伝子スクリーニングにより新たに同定した特異抗原の候補遺伝子について、二次スクリーニングを施行し3つの遺伝子までを対象を限定した。2遺伝子については抗体を入手し、1遺伝子についてはモノクローナル抗体の作成を新たに開始した。また本年度からAFPプロモータによってGFPが発現する遺伝子改変細胞を作製し、ES細胞から分化した肝幹細胞を蛍光励起セルソータで分離可能とするシステムの構築を開始した。肝幹細胞の分化誘導については、我々は蛍光励起セルソータを用いた胎児肝幹細胞の分離法を利用して、昨年度までに肝組織に含まれている間葉系細胞が肝幹細胞の分化誘導に必須であることを解明した。本年度はこれとは別の第三の間葉系細胞が逆に肝幹細胞分化誘導の抑制に働くことを新たに見いだした。さらに肝幹細胞の分化に関与する転写因子の機構を解明するためにマイクロアレイを用いた遺伝子スクリーニングを行いいくつかの知見を得た。一方小型肝細胞については、昨年度までにマトリゲルやコラーゲンシートが分化誘導を促進することを見いだしたが、本年度はコラーゲンをコートしたポリカーボネート膜に小型肝細胞を培養し、これを重層して培養することで成熟肝細胞が三次元的に配列した肝組織を試験管内で構築することに成功した。最後に肝幹細胞の有用性の検討を効率的にすすめるためには、マウスを利用した体系的かつ効率的な実験モデルを開発することが必要であると判断し、他の研究者と共同で新たな遺伝子改変マウスを用いた移植モデルの開発をすすめた。同モデルは導入遺伝子の働きによりレシピエント肝細胞のみを選択的に破壊可能であり、現在存在する他のモデルと比較しても非常に優れた移植細胞の導入効率や機能を生物学的に評価可能なシステムと考えられる。3年間にわたる本事業を通じて、これまでは十分に知られていなかった肝組織由来の肝幹細胞についての分離・同定法が確立され、その分化機序の一部が解明された。さらにその有用性を検討するための動物モデルが確立された。以上の結果は今後同細胞を利用した肝不全治療の推進にあたり重要な役割を果たすものと期待される。

A 研究目的

肝移植に必要なドナーの絶対数が不足しているために、肝不全によって多くの救命できるべき命が失われている。本邦では脳死者からのドナー提供が認

められるようになってから久しいが、年に数例の提供があるにすぎないのが現状である。このため、肝移植に替わる治療法の開発が急がれている。全肝移植ではなく肝細胞を血管系より移植する細胞移植治療および生きている細胞成分が肝機能を担うハイブ

リッド型人工肝臓について現在までに研究がすすめられている。いずれの治療においても肝機能を担う細胞が必要とされるが、内因性レトロウイルス等の人畜共通感染症への懸念から動物細胞の利用は現実的とはいえない。そのため、これらの治療を臨床的に用いるためには多量の人肝細胞が今後必要とされることが必定といえる。我々は以前より人肝細胞の利用について研究を続けてきたが、肝移植と同様にドナーの確保は非常に難しいことを痛感している。このため肝細胞を恒常的に供給するためには新たな細胞源を見いだす必要があり、胎児肝細胞、臍帯血細胞、骨髄細胞、ES細胞等を利用する研究が進められている。我々の中でも肝組織由来肝幹細胞に注目している。同細胞は、未分化なES細胞や骨髄細胞等とは異なり、成熟肝細胞への分化誘導が容易であると考えられること、試験管内での培養で旺盛な増殖力を持つことが期待されること、自身の肝組織あるいは肝移植に使用不適な肝臓などからの採取が期待できること等のメリットがあると考えられる。

我々は平成13年度から本事業を開始し、昨年度までにいくつかの知見をまとめている。本年度は昨年度までの成果をもとに、肝幹細胞の分離法の開発および分化誘導法の開発にむけて新たな成果をあげた。もとより肝幹細胞による肝不全治療を臨床応用するまでにはまだいくつかの問題点を解決する必要があるが、3年間にわたる本事業により実用化に向けて一歩前進したと考えている。本年度に得られた知見について以下に報告する。

B 研究方法

(1) ヒト肝細胞による類肝組織構築に関する実験

肝切除時に得られた正常肝組織片をコラーゲナーゼの直接穿刺法によって細胞懸濁液を作成、これを低速遠沈することにより、実質細胞分画と非実質細胞分画に二分する。両分画の細胞を混合してコラーゲンスポンジ内に播種して形成される組織を免疫染色により細胞種を特定、さらにアルブミンの分泌能を検討する。

(2) 小型肝細胞の積層化による肝組織構築に関する実験

ラット小型肝細胞を多く含む分画を採取し、コラーゲンをコートした多孔性ポリカーボネート膜上に播種して培養する。小型肝細胞コロニーが形成された後に2枚の膜を重層して培養し、形成される組織を形態学および機能的に検討する。

(3) 成体肝組織由来肝幹細胞特異抗原の同定に関する実験

昨年までにcDNAサブトラクション法によるスクリーニング実験で同定された17種の表面抗原候補遺伝子について二次スクリーニングを施行した。成体由来肝幹細胞は胎児由来の肝幹細胞と同様の表面抗原を発現していることが考えられるため、胎児より分離した肝幹細胞について他の組織を含めてRT-PCRによる遺伝子発現の検索を施行した。さらに絞り込まれた遺伝子についてはタンパク質レベルでの発現を検討するために、抗体を購入、譲渡、作成することとした。

(4) ヒト肝組織からの肝幹細胞分離に関する実験

京都大学消化器外科学教室で施行された肝切除術のうち、術前にインフォームドコンセントが得られた症例を対象とした。肝門部脈管の処理を完了する前すなわち肝虚血が加わる前に肝組織を約10グラム採取する。切除面に露出した血管より前灌流液をシリンジを用いて灌流し、続いて37度に加温したコラーゲナーゼ液を灌流して用手的に組織を破碎する。未消化物をガーゼで濾過した後に、50G5分の遠沈でコラーゲナーゼ液および破碎された細胞を除く。培養液で再懸濁し、ナイロンメッシュで濾過し50G2分の低速遠沈で実質分画と非実質分画を分離する。両者をそれぞれDMEM/F12メディアウムにHGF、インスリン、ニコチンアミド、アスコルビン酸、プロリン、ヒト血清を加えてコラーゲンコート培養皿上で培養する。

(5) 肝幹細胞の分化誘導に対する間葉系細胞の寄与に関する実験

昨年までの検討で胎児肝由来の細胞を蛍光励起セ

ルソータによっていくつかの集団に分離することが可能となった。同システムを利用して肝幹細胞と間葉系細胞を分取し、これを共培養してアルブミン発現、PAS染色によるグリコーゲン発現、定量的RT-PCRによる成熟化マーカーの発現の検討を施行する。細胞凝集塊形成に参画しなかった細胞をセルインサートに加えて共培養を行い、成熟化の程度を上記の方法で検討する。

(6) ES細胞由来肝幹細胞の分離システムの構築に関する実験

AFP遺伝子プロモータ下流にGFP遺伝子を連結したコンストラクトを作製する。同ベクターを電気穿孔法によりマウスES細胞に導入し、薬剤選択法によって安定組換え体を選別する。同細胞の分化誘導によってGFPの発現に変化が見られるかどうかを検討する。

(7) 遺伝子改変マウスを用いた新たな移植モデルの構築に関する実験

他大学との共同実験により新たな遺伝子改変マウスを導入する。同マウスは肝細胞特異的に毒素受容体を発現しており、毒素を全身投与することにより選択的に肝細胞が破壊される。同マウスに同系のマウスから分離した肝細胞を脾臓に移植したのちに毒素を投与し、ドナー由来の肝細胞がレシピエント肝内で生着しさらに増殖がみられるかどうかを検討する。

(8) マイクロアレイによる肝幹細胞分化による遺伝子発現変化の検討に関する研究

細胞凝集塊形成法によって得られた肝幹細胞を培養し、分化の過程にそって、2日目、3日目、7日目の細胞よりRNAを抽出し、サンプルを蛍光色素で標識した後にマイクロアレイプレート上で反応させて発光強度を測定する。遺伝子発現の比を測定してコンピュータで解析し、検討する。

(倫理面への配慮)

ヒト正常肝組織は、札幌医科大学「医の倫理委員会」及び京都大学医学部「医の倫理委員会」の承認

の上、札幌医科大学付属病院及び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部分を採取した。

動物実験は札幌医科大学動物取扱規程及び京都大学動物取扱規定にのっとり、大学の実験許可を受けて実施している。

C 研究の結果

(1) ヒト肝細胞による類肝組織構築に関する実験

ヒト肝細胞を増殖用培養液中で培養を続けることにより、一部にラット小型肝細胞類似の細胞が出現し活発に増殖することが観察された。一ヶ月後にはスポンジ内部に成熟肝細胞が数層にわたり重なりあう類肝組織が構築された。さらに胆管上皮マーカーを発現する上皮細胞により形成された脈管様構造が構築されていた。

(2) 小型肝細胞の積層化による肝組織構築に関する実験

多孔性ポリカーボネート膜上においても通常の培養皿と同様に小型肝細胞からなるコロニーの形成がみられた。このメンブレンを重層して培養することにより、三次元的に成熟肝細胞が配列する肝組織が構築された。蛍光色素を投与すると、毛細胆管への色素分泌が観察され、さらに単層培養時に比べ1細胞あたりのアルブミン分泌量は2倍となったことから、機能的にもより生体内における成熟肝細胞に近い細胞が維持されることが半明した。

(3) 成体肝組織由来肝幹細胞特異抗原の同定に関する実験

17種の遺伝子についてまずRT-PCRにより胎児肝および成体肝における発現の程度を検討した結果、8種の遺伝子について成体肝よりも胎児肝において強く発現していることが確認された。ついで昨年度までに我々が確立した蛍光励起蛍光励起セルソータによる胎児肝幹細胞の分離法により同細胞における発現の様子を観察すると、3種の遺伝子につ

いて胎児肝幹細胞に強く発現がみられることが推測された。この3種の遺伝子のうち、CD56については市販の抗体を購入、GP38については米国の研究施設より抗体の供与をうけてタンパク質レベルにおける発現解析を開始した。またGPNMBに関してはモノクローナル抗体を作製することとし、業者に作成を委託した。

(4) ヒト肝組織からの肝幹細胞分離に関する実験

昨年度までの予備実験の結果をもとに実験をすすめた。本年度は対象を拡大してウイルス性肝炎症例をも含めることとし、京都大学消化器外科で切除された肝切除術症例のうち、正常部肝組織が充分量切除されうる症例約20例について実験を行った。直接穿刺法によるコラゲナーゼ処理により安定的に細胞を回収することが可能となった。細胞の生存率は安定的に90%以上であった。そのうちの約8割は成熟肝細胞であり、マウスとは異なり非実質細胞は少数であった。また非実質細胞のうちの大部分は胆管上皮細胞であり、マウスで多数を占めた星細胞、クッパー細胞、血管内皮細胞は数パーセント以下とごく少数であった。また増殖力のある小型上皮系細胞はわずかに1例でみられたのみであり、通常的手法では肝幹細胞を回収することは困難であることが判明した。

(5) 肝幹細胞の分化誘導に対する間葉系細胞の寄与に関する実験

昨年度までにCD90陽性の間葉系前駆細胞が肝幹細胞の分化を促進することを見いだしたが、本年度はさらに別の分面に属する間葉系細胞の影響について検討した。細胞凝集塊形成に関与しない細胞を共培養することにより、肝幹細胞における成熟肝細胞マーカーの発現が有意に抑制された。

(6) ES細胞由来肝幹細胞の分離システムの構築に関する実験

本実験で使用したコンストラクトは、AFP遺伝子のプロモータ直下にGFP遺伝子を連結しており、AFPの遺伝子発現と平行してGFPの発現がみられることが期待されるものである。安定組換え体を

約20クローン選択し、胚様体形成法および増殖因子添加による誘導法によってGFPの発現が誘導されるクローンを選択した。

(7) 遺伝子改変マウスを用いた新たな移植モデルの構築に関する実験

毒素投与により遺伝子改変マウスの肝細胞が破壊されることを、血中肝逸脱酵素値の測定および形態学的観察により確認した。脾臓に同系マウスの成熟肝細胞を移植すると、一ヶ月後にはレシピエント肝内にドナー細胞からなるコロニーが観察された。

(8) マイクロアレイによる肝幹細胞分化による遺伝子発現変化の検討に関する研究

我々のシステムは胎児肝幹細胞の含有率が非常に高いシステムを用いているのが特徴である。マイクロアレイ解析の結果発現量が2倍以上に誘導される遺伝子および1/2以下に減弱する遺伝子をそれぞれ数百遺伝子見いだした。発現量のおおきな変化がみられた転写因子に関してその発現量をRT-PCRで確認し、現在同遺伝子の強制発現系などを構築している。

D 考察

平成13年度より開始した本事業によって我々は昨年度までにいくつかの知見を得ることができた。本年度は昨年度までに得られた知見をもとに上記に記した研究を施行し、さらにいくつかの知見を加えることができた。

我々は成熟肝細胞を供給するために組織由来肝幹細胞を利用することに着目し研究を進めてきたが、本事業の結果、実験動物レベルでは成体肝組織内に肝前駆細胞の性質を有する細胞が存在し、これを比較的簡便な方法で分離し、これを試験管内で増殖して成熟化させることが可能となった。これらの結果から同法をヒトに応用することが考えられるが、実際には研究を進める過程においていくつかの問題点が発見された。最大の問題はマウスと同様の手法ではヒト肝組織から肝幹細胞を入手することができなかった点である。その理由に関してまず実験検体の

背景があげられる。実験動物とは異なり手術時に得られた検体は50歳代から70歳代の高齢者のものであり、若年の検体に比べて肝幹細胞の含有量が非常に低いことが推察される。また検体は肝組織の辺縁の一部であり、肝幹細胞が肝内で不均一に分布している場合、特に肝内部の大血管周囲に偏在するのならばやはり回収が困難であった可能性がある。さらに実験動物とは異なり血管からの灌流が不十分であることから、成熟肝細胞以外の細胞が十分に回収されなかったことも考慮に入れるべきであろう。実際非実質細胞の回収率はマウスに比べてかなり劣ることが判明しており、今後研究を進める上でより効率的な細胞回収法の開発が必要とされると考えられる。

我々が以前より進めている小型肝細胞に関する研究については、本年度も新たな進歩が見られた。小型肝細胞をポリカーボネート膜上で培養しこれを重層することで、人工的に三次元構造を取る肝組織を構築することが示された。三次元構築を取ることでよりアルブミン分泌量に代表される肝細胞機能が上昇し、色素分泌輸送機能をもつ毛細胆管が形成された。また肝幹細胞を直接分離するのではなく、ヒト手術検体から得られた細胞を一旦コラーゲンシート内で培養することにより、内部に小型肝細胞からなるコロニーが形成されることが今回の研究で示された。さらに本培養法により、成熟肝細胞からなる細胞集団が形成され、さらに胆管様構造を含む類肝組織構築を作製することに成功した。これら一連の研究で得られた知見は今後人工肝臓補助装置の開発に向けて重要な意義を持つものと思われる。

肝幹細胞の分化誘導に関しては実験動物レベルではあるが新たな知見が得られた。我々は肝幹細胞採取に関して細胞凝集塊形成法を開発したが、同法により得られた細胞は蛍光励起セルソータによる解析により主に3種の細胞より構成されていることが判明した。すなわちCD49F陽性の肝幹細胞、CD90陽性の間葉系細胞およびCD45陽性の血球系細胞である。さらにこのシステムを利用して肝幹細胞の成熟化にCD90陽性細胞が大きく関与していることを証明した。本年度は同研究をさらにすすめ、細胞凝集塊形成に参画しない第三の間葉系細胞が、

逆に肝幹細胞の成熟化を阻害することを見いだした。このことは肝内に含まれる複数の細胞が肝幹細胞の分化を正または負に制御していることを意味しており、これらの細胞と共培養することにより肝幹細胞の分化の程度を調節することが可能となることが期待される。

これらの細胞を利用した治療法に対し、今後その有用性と安全性について検討をしてゆく必要がある。現在までに用いられている動物移植モデルは薬剤投与による肝障害動物あるいは肝切除動物モデルであり、これらのモデルでは一般的にドナー細胞の生着率が非常に悪く、ドナー細胞の生着率や機能改善率を検討するには不相当である。そこで我々は本年度より新たに他施設の研究者と共同で遺伝子改変マウスを用いた新たな動物実験モデルの作成に着手した。同マウスは肝細胞に選択的に毒素受容体を発現しており、毒素投与により受容体発現細胞のみが障害される。同系マウスより移植した細胞は無傷であるためレシピエント肝内で選択的に増殖することが期待される。本システムを用いると、ごく少数の細胞について生体内における増殖率や機能発現を解析でき、非常に効率的に細胞種の違いによる移植効率の検討が可能となり、肝不全治療に向けて前臨床試験を進めることが可能となる。

本年度の研究で得られた知見により、今後は肝組織から得られた肝幹細胞を本モデルに移植しその有用性および安全性を確認のうえ、臨床応用に向かうことを予定している。

E 結論

本事業において肝組織からの肝幹細胞の分離方法の開発、肝幹細胞の分化誘導法の開発に関して多くの貴重な知見を得ることができた。今後さらなる研究を重ねることで肝不全に対する新たな治療法を開発できることが期待される。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

(1) 論文発表

1. Harada K, Mitaka T, Miyamoto S, Sugimoto S, Ikeda S, Takeda H, Mochizuki Y, Hirata K. Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *J Hepatol*. 2003 Nov;39(5):716-23.
2. Takamura A, Adachi M, Wada I, Mitaka T, Takayama S, Imai K. Accumulation of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulator BAG-1 on COPI-coated structures in gastric epithelial cells. *Int J Oncol*. 2003 Nov;23(5):1301-8.
3. Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9(6):697-703. Review.
4. Ikeda S, Mitaka T, Harada K, Sato F, Mochizuki Y, Hirata K. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 reduce bile canalicular contractions of rat hepatocytes. *Surgery*. 2003 Jan;133(1):101-9.
5. Baba S, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Hoppo T, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol*. 2004 Feb;40(2):255-60.
6. Ikai I, Itai Y, Okita K, Omata M, Kojiro M, Kobayashi K, Nakanuma Y, Futagawa S, Makuuchi M, Yamaoka Y. Report of the 15th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepato! Res*. 2004 Jan;28(1):21-29.
7. Shibata T, Yamamoto Y, Yamamoto N, Maetani Y, Shibata T, Ikai I, Terajima H, Hatano E, Kubo T, Itoh K, Hiraoka M. Cholangitis and liver abscess after percutaneous ablation therapy for liver tumors: incidence and risk factors. *J Vasc Interv Radiol*. 2003 Dec;14(12):1535-42.
8. Ueda Y, Iwata H, Paek HJ, Ko IK, Shimooka Y, Katsura N, Ikai I, Yamaoka Y, Ikada Y. Bioartificial liver with whole blood perfusion. *ASAIO J*. 2003 Jul-Aug;49(4):401-6.
9. Hatano E, Ikai I, Shimizu M, Maetani Y, Konda Y, Chiba T, Terajima H, Yamamoto N, Yamamoto Y, Shimahara Y, Yamaoka Y. Resection for hepatocellular carcinoma with duodenal invasion: report of a case. *Hepatogastroenterology*. 2003 Jul-Aug;50(52):1034-6.
10. Matsushita T, Ikai I, Nishitai R, Katsura N, Yamanokuchi S, Matsuo K, Sugimoto S, Shiotani T, Takahashi R, Terajima H, Yamaoka Y. Suppressed complement activation in human decay accelerating factor transgenic porcine liver cross-circulated with nonhuman primates. *Transplantation*. 2003 Jun 15;75(11):1807-12.
11. Ikai I, Yamamoto Y, Yamamoto N, Terajima H, Hatano E, Shimahara Y, Yamaoka Y. Results of hepatic resection for hepatocellular carcinoma invading major portal and/or hepatic veins. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003 Jan;12(1):65-75, ix.
12. Nagao M. Blockade of erythropoietin signal at the early postimplantation period inhibits the development of decidua and embryo in mice. *Congenit Anom Kyoto*. 2004 Mar;44(1):9-17.
13. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jan;61(1):49-68.
14. Murakami K, Irie K, Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. Neurotoxicity and physicochemical properties of Abeta mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):46179-87.
15. Takahara S, Takigawa T, Shiota K. Programmed cell death is not a necessary prerequisite for fusion of the fetal mouse palate. *Int J Dev Biol*. 2004 Feb;48(1):39-46.
16. Chou MJ, Kosazuma T, Takigawa T, Yamada S, Takahara S, Shiota K. Palatal shelf movement during palatogenesis: a fate map of the fetal mouse palate cultured in vitro. *Anat Embryol (Berl)*. 2004 Feb 21
17. Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K, Muso E, Shiota K. Microarray profile analysis of toxic cocaine-induced alterations in the expression of

- mouse brain gene sequences: a possible 'protective' effect of buprenorphine. *J Appl Toxicol*. 2004 Jan-Feb;24(1):15-20.
18. Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K, Muso E, Shiota K, Hayashi T. Similar effects of cocaine and immobilization stress on the levels of heat-shock proteins and stress-activated protein kinases in the rat hippocampus, and on swimming behaviors: the contribution of dopamine and benzodiazepine receptors. *Behav Pharmacol*. 2003 Nov;14(7):551-62.
 19. Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K, Muso E, Shiota K. Stressor-like effects of cocaine on heat shock protein and stress-activated protein kinase expression in the rat hippocampus: interaction with ethanol and anti-toxicity drugs. *Leg Med (Tokyo)*. 2003 Mar;5 Suppl 1:S87-90.
 20. Komatsu S, Sasaki Y, Shiota K. A quantitative study of the facial nerve in mice prenatally exposed to ethanol. *Congenit Anom Kyoto*. 2003 Mar;43(1):41-5.
 21. Saitsu H, Ishibashi M, Nakano H, Shiota K. Spatial and temporal expression of folate-binding protein 1 (Fbp1) is closely associated with anterior neural tube closure in mice. *Dev Dyn*. 2003 Jan;226(1):112-7.
 22. 杉本真一, 原田敬介, 三高俊広. 【肝幹細胞研究の現状】 肝幹細胞 小型肝細胞 肝・胆・膵(0389-4991)46 巻3号 Page327-333(2003.03)
 23. 三高俊広, 杉本真一, 宮本茂樹. 【現代医療の最前線 再生医療と細胞療法】 *In Vitro* における肝組織形成. *最新医学*(0370-8241)58 巻3月増刊 Page708-718(2003.03)
 24. 猪飼伊和夫, 山岡義生. 【EBM に基づいた肝細胞癌の治療】 全国原発性肝癌追跡調査からみた肝細胞癌治療の現状. *消化器科*(0289-8756)37 巻4号 Page385-390(2003.10)
 25. 猪飼伊和夫, 山岡義生. 【肝細胞癌とどう戦うべきか】 切除療法 vs 非切除療法 全国原発性肝癌追跡調査よりみた治療成績の比較. *外科*(0016-593X)65 巻8号 Page869-875(2003.08)
 26. 番匠武蔵, 水田忍, 松田哲也, 塩田浩平. ヒト胎児形態データベースの書誌情報に基づく検索システム. *電子情報通信学会技術研究報告 (ME とバイオサイバネティクス)*103 巻 81 号 Page29-34(2003.05)
 27. 塩田浩平, 才津浩智. 【妊娠と薬物 EBM 時代に対応した必須知識】 薬物の胎児・新生児への影響. *臨床婦人科産科*(0386-9865)57 巻 5 号 Page657-661(2003.05)
- (2) 学会発表
1. 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日、神戸
 2. 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。
 3. 三高俊広. 第59回日本顕微鏡学会ニューマイクروسコープ分科会 シンポジウムBS7「ニューマイクروسコープで捉えた各種病態解析」 「*In Vitro* 肝組織過程の形態学的解析」 2003年6月9日、札幌
 4. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Coordinated contraction of bile canaliculi reconstructed in rat small hepatocytes. 2003 Summer Bioengineering Conference, June 25-29, U.S.A.
 5. 三高俊広, 「肝組織構築と肝細胞機能」 シンポジウム「肝構成細胞の分化と機能発現」 第10回肝細胞研究会、東京、2003年7月12日
 6. 須藤亮, 三高俊広, 池田満里子, 谷下一夫 「毛細胆管の構造と運動に対する cytochalasin B の影響」 第10回肝細胞研究会抄録集 p 110、東京、2003年7月11日
 7. 須藤亮, 池田満里子, 谷下一夫, 三高俊広, 「小型肝細胞が形成する毛細胆管運動とアクチンフィラメントの関係」 第6回肝臓生物学研究会、札幌、2003年7月18日
 8. 三高俊広, 「肝再生医療のための基礎研究: *In Vitro* 肝組織形成」 第一回札幌医科大学研究フォーラム、札幌、2003年7月15日

9. 原田敬介、三高俊広、宮本茂樹、杉本真一、池田慎一郎、竹田寛、望月洋一、平田公一。ラット小型肝細胞と肝非実質細胞によるコラーゲンスポンジ内肝組織迅速形成と肝分化。第7回日本肝臓学会大会、大阪、2003年10月15日。肝臓、44巻 supplement(2), p.A426
10. 宮本茂樹、平田公一、杉本真一、原田敬介、水口徹、三高俊広。Matrigelにより分化誘導したラット小型肝細胞におけるチトクロームP450(CYP)の発現。第7回日本肝臓学会大会、大阪、2003年10月16日。肝臓、44巻 supplement(2), p.A466
11. 三高俊広。「小型肝細胞を用いた in vitro 肝組織形成」第44回日本組織細胞化学会・第35回日本臨床電子顕微鏡学会合同学術集会。シンポジウム2 「再生医学のフロンティア」2003年10月29日、東京
12. 三高俊広 「In Vitro 肝組織構築と肝細胞機能-Ocean collagen-scaffold の可能性」第2回北海道海洋生物学シンポジウム、札幌、2003年10月31日
13. 三高俊広 「小型肝細胞による類肝組織形成とその応用」日本再生医療学会、東京、2004年3月25日
14. 須藤亮、高橋憲生、池田満里子、三高俊広。「他校生膜を用いた小型肝細胞の積層培養」日本再生医療学会、東京、2004年3月25日
15. Tanishita K, Ueda A, Sudo R, Ikeda M, Mitaka T. Cellular biomechanics applied to the tissue engineering. First Asian Pacific Conference on Biomechanics. Mar 25-28, Osaka, Japan
16. Kohara H, Hashimoto W, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of tube-like structure by rat bile duct ular epithelial cells. First Asian Pacific Co
17. 東久弥、猪飼伊和夫。成体マウス肝からの効率的な肝前駆細胞分離法の開発。第6回日本組織工学会。東京。2003年12月5日。
18. 東久弥、猪飼伊和夫。正常成体肝からの肝前駆細胞分離の試み。第16回肝再生研究会。東京。2003年6月12日。
19. 馬場慎司、廣瀬哲朗、藤井英明、安近健太郎、東久弥、藤川貴久、北方敏敬、内藤雅人、待本貴文、山岡義生。Green fluorescent protein(GFP)トランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞由来肝星細胞の検討。第103回日本外科学会総会。札幌。2003年6月4日
20. 馬場慎司、廣瀬哲朗、藤井英明、安近健太郎、東久弥、北方敏敬、内藤雅人、待本貴文、山岡義生。GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞由来肝星細胞の検討。第58回日本消化器外科学会総会。東京。2003年7月17日
21. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Yasuchika K et al. Establishment of enrichment system for immature endodermal cells from adult mouse liver. Digestive Disease Week 2003 (Orlando, FL)

H 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

1. 須藤亮、谷下一夫、池田満里子、三高俊広、「細胞培養法、細胞の三次元培養法、三次元組織及び人工臓器」(特願2003-38567)

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 三高 俊広 札幌医科大学がん研究所・教授

研究要旨 ヒト正常肝臓から分離した肝細胞中には、ラット小型肝細胞と形態的にはよく似た細胞が培養経過に伴い出現するようになる。ゆっくりだが増殖し、時に盛り上がった3次元構造をとることがある。ヒト成熟肝細胞と非実質細胞分画の細胞を同数混合し、コラーゲンスポンジ上に播種すると培養一ヶ月後には、スポンジ表層を分化した胆管上皮細胞が覆い、その下側に細胞外基質の薄い層を挟んでスポンジ中に成熟肝細胞の小組織塊が形成される。また胆管上皮細胞は胆管様構造を構築している。さらに、毛細血管様の構造も認められる。スポンジ表層の胆管上皮細胞の一部に肝細胞マーカーの発現を認めることがある一方、スポンジ内部の胆管上皮細胞には肝細胞マーカーの発現は認められなかった。そのオリジンに違いがある可能性があった。ラット小型肝細胞同士を重層することにより、成熟化が誘導され、細胞間には毛細胆管の発達が見られた。本研究成果は、ヒト肝細胞を使った人工肝臓装置開発に新たな手がかりを与えるものと考えられる。

A 研究目的

本年度の研究目的は、1) 昨年度に引き続き、京大大学山岡・猪飼らとの共同研究によるヒト肝細胞の3次元培養を用いて小肝組織を培養皿上で作成する方法の開発。2) ラット小型肝細胞特異的遺伝子・タンパク質を同定し、その結果からヒトホモログの同定を行い、ヒト小型肝細胞の分離を試みる。3) ラット小型肝細胞の積層化による3次元培養と組織形成とした。

B 研究方法

(1) ヒト肝細胞の3次元培養

・正常ヒト肝組織片に、注射針と注射器を用いて冷やした前灌流液と0.05% collagenase-dispase 加灌流液の2段階肝灌流を行い、肝臓内の細胞を分離した。細胞懸濁液を50 x g 2分の低速遠心を用いて、上清①と沈殿②に分画した。沈殿②は遠心操作を繰り返して肝細胞を得た(③)。
・灌流後の残肝組織を上清①に加え、さらに30分間37°Cにて振盪する。50 x gの低速遠心後の上

清をさらに50 x g 5分間の遠心操作などを加え、最終的に非実質細胞分画④を得た。

・③と④各細胞分画を 1×10^5 細胞/mlに調整し、コラーゲンスポンジ(Helostat)に播種した。培養液は、下記の様に調整した。

DMEM +20 mM HEPES
+25 mM NaHCO₃
+30 mg/L proline
+10% human serum
+5% fetal bovine serum
+10 mM nicotinamide
+1 mM ascorbic acid 2-phosphate
+10 ng/ml EGF
+20 ng/ml HGF
+10⁻⁷ M dexamethasone
+0.5 mg/L insulin
+antibiotics

・播種した細胞の同定とその割合をそれぞれの細胞に対する特異抗体を用いて調べた。
・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、個々の細胞を特定した。

- ・PCNA抗体を用いて、細胞の増殖を調べた。
- ・アルブミンの分泌量をELISA法を用いて測定した。

(2) 小型肝細胞特異的遺伝子・タンパク質の同定とその特異抗体の作成

- ・ラット小型肝細胞と成熟肝細胞からそれぞれmRNAを調整し、DNA microarrayを用いて小型肝細胞特異的遺伝子の候補を1次選択した。
- ・その中で、細胞膜タンパク質で細胞外にドメインを持つものを2次選択した。
- ・それぞれの候補遺伝子に対するプライマーを設定し、PCR法を用いて小型肝細胞特異的かどうか検討した。その結果、いくつかの特異的遺伝子が見つかった。
- ・それぞれの遺伝子から推定される細胞外ドメインのアミノ酸配列からペプチドを合成し、ウサギに免疫して抗体を作成した。
- ・免疫染色法を用いて増殖する小型肝細胞に特異的に染色されるか検討した。

(3) ラット小型肝細胞の積層化による3次元培養と組織形成

- ・成熟ラット肝臓から小型肝細胞を多く含む細胞分画を分離し、ラット尾コラーゲンをコートした多孔性ポリカーボネート膜上に播種し培養する。
- ・小型肝細胞コロニーが形成された時に、2枚の膜を重ねる。
- ・形成される組織を形態学的また超微形態学的に検討した。
- ・Fluorescein diacetate (FD)やCellTrackerなどの蛍光色素を用いて細胞形態・毛細胆管の形成等を検討する。
- ・培養液中へのアルブミン分泌をELISA法を用いて測定する。

(倫理面への配慮)

ヒト正常肝組織は、札幌医科大学「医の倫理委員会」及び京都大学医学部「医の倫理委員会」の承認

の上、札幌医科大学付属病院及び京都大学医学部付属病院で手術が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部分を採取した。

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) ヒト肝細胞の3次元培養

- ・ヒト肝細胞を増殖用培養液にて培養を継続すると一部ではあるが、ラット小型肝細胞に類似した細胞群の増殖が見られる(図1)。図2で示すようにBrdUを取り込む核が多数認められ、増殖していることがわかった。

図1 培養50日目の位相差顕微鏡写真

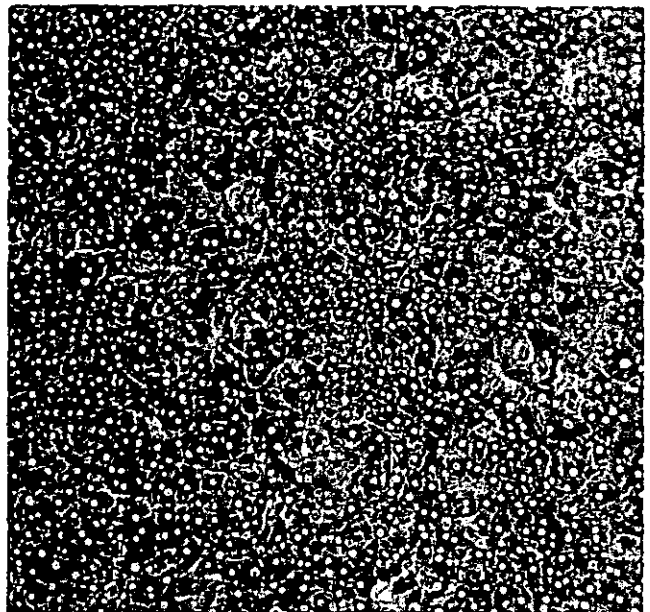
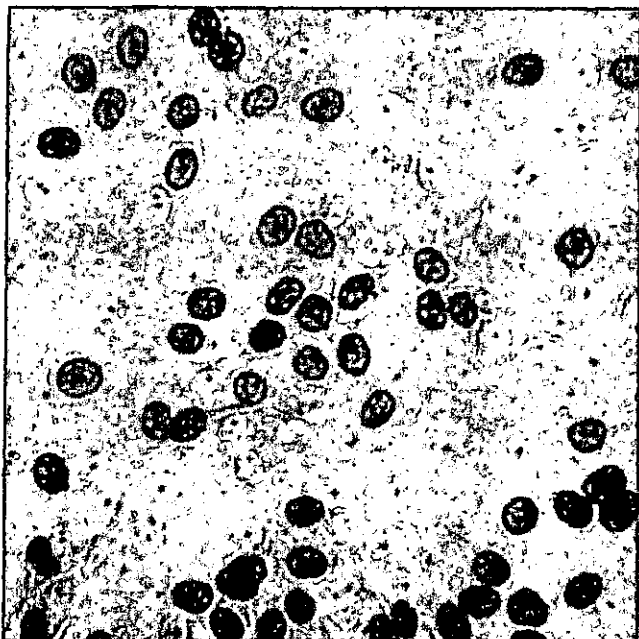
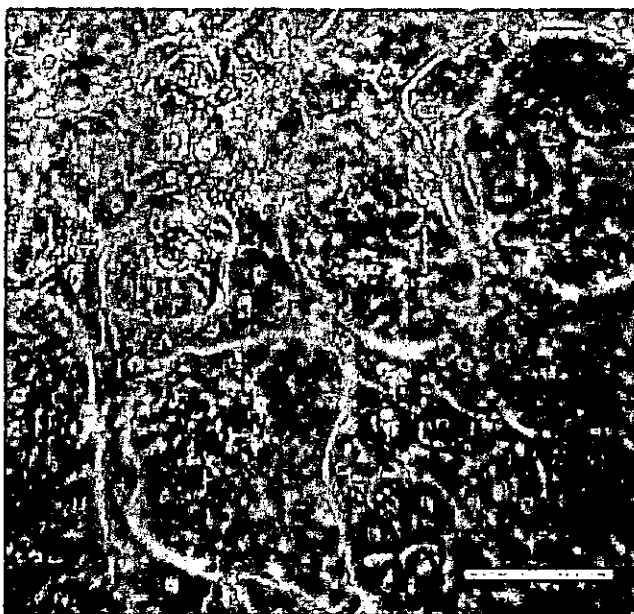


図2 BrdUに対する免疫染色像 (培養63日)



・この細胞群の一部から細胞が盛り上がり3次元的な組織塊を形成する (図3)。

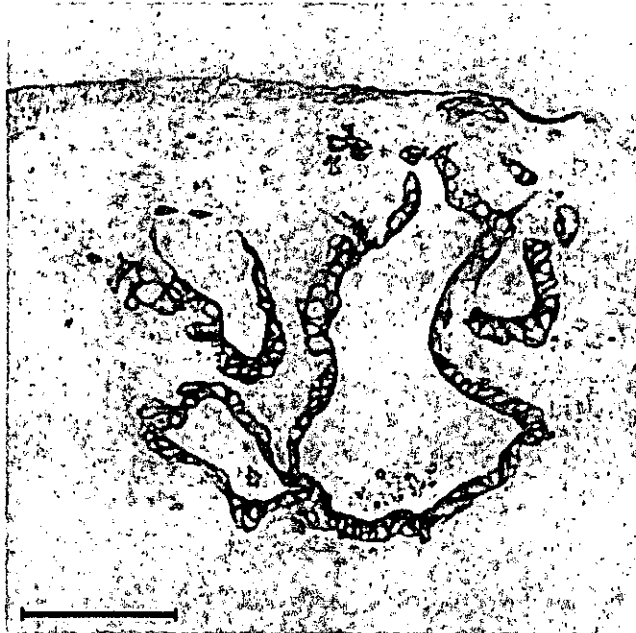
図3 盛り上がった細胞の位相差顕微鏡写真 (培養60日)



・肝細胞分画と非実質細胞分画の細胞を等量混合し、コラーゲンスポンジ上に播種すると、スポンジ表層に接着した成熟肝細胞は、2週間ほどたつと徐々にその数を減らしていく。その後、表層は小型の上皮

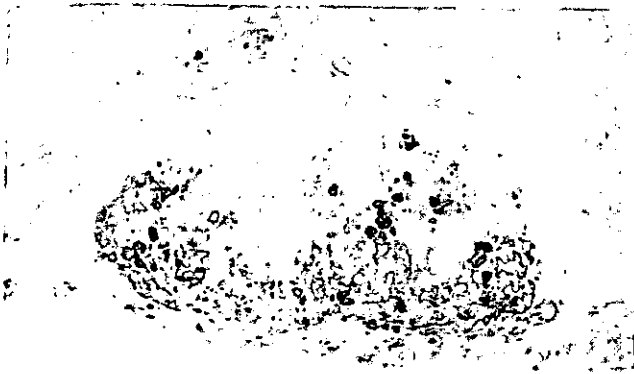
細胞に置換されていく。1ヶ月後、スポンジを固定しその断面を組織学的に検索すると、スポンジ表層には、極性を持つ良く分化した胆管上皮細胞(CK7, CK19 陽性細胞)が一行に並んで増殖していた (図4)。

図4 胆管上皮細胞マーカー (抗CK7抗体) で免疫染色



・またスポンジ内部に胆管上皮細胞の管腔形成を多数認めた。表層に並んだ胆管上皮細胞の下には、薄い結合組織層を隔てて、数層~10層程度の厚さがある成熟肝細胞の一塊が認められた (図5)。それらの構造を構成する細胞の多くは、PCNA陽性の核を持ち増殖していた。

図5 肝細胞マーカー (抗 Hep 抗体) で免疫染色 (培養34日)



100um

・薄い細胞質を持つ細胞からなる、形態学的には毛細血管に類似した管腔形成も見られたが、類洞内皮細胞や血管内細胞のマーカーを発現している細胞はほとんど認められなかった。

図6 肝細胞マーカータンパク質を発現している胆管上皮細胞 (培養34日)



A : HE 染色、B : 抗 Hep 抗体、C : 抗 CK19 抗体 矢印は肝細胞マーカーを発現している胆管上皮細胞

・スポンジ表層に一層に配列する細胞の一部は、胆管上皮細胞のマーカーである、CK7およびCK19を発現しているばかりではなく、肝細胞マーカーである抗 Hep 抗体や抗アルブミン抗体陽性であった。

(2) ラット小型肝細胞特異的遺伝子・タンパク質の同定

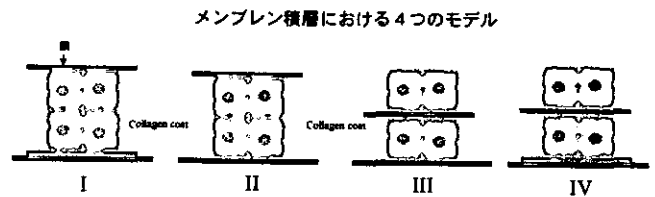
研究結果については、現在特許出願準備中であり、本報告書への記載は差し控える。

(3) ラット小型肝細胞の積層化による3次元培養と組織形成

・通常の培養皿において見られる小型肝細胞のコロニー形成は、多孔性ポリカーボネート膜上においても同様に認められた。形態学的また生物学的な変化は認められなかった。

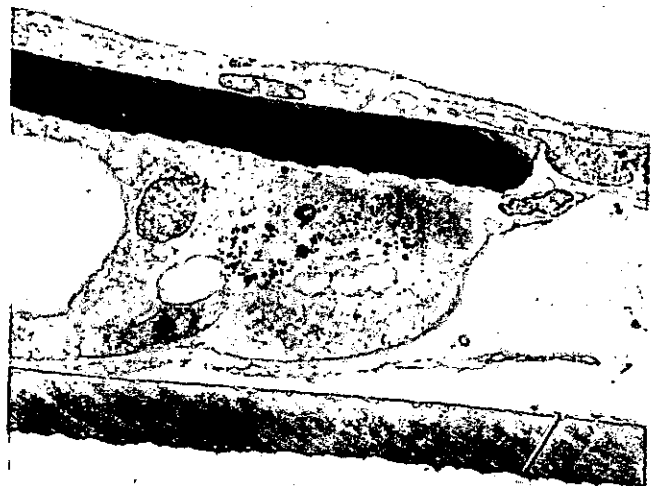
・培養30日目の活発に膜上に小型肝細胞の増殖を確認して膜を図7のように重ねる。

図7 膜の積層方法



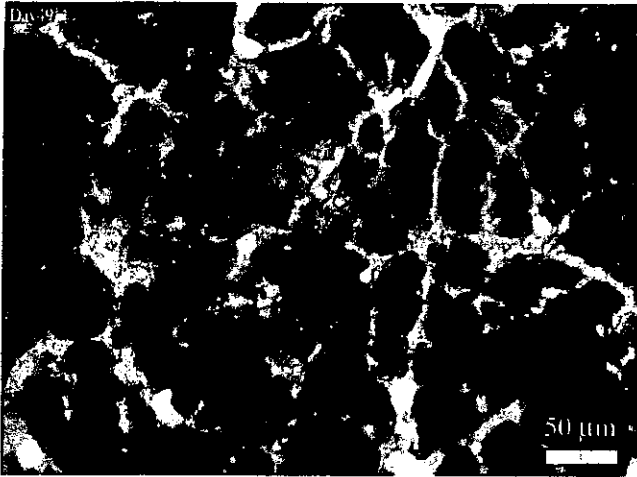
・I及びIIの方法では、上下の細胞同士が接着した。接着した細胞間に毛細胆管が形成されていることを透過電子顕微鏡を用いて膜の断面を観察することにより確認した (図8)。

図8 透過電子顕微鏡写真 (積層後7日)



・肝細胞内で代謝され、蛍光色素となり毛細胆管内に分泌されることが知られているFDを培養液中に投与した。その結果、膜に挟まれた細胞から筋状に蛍光色素が分泌されていることがわかった (図9)。この毛細胆管への蛍光色素の分泌は、積層後3日目の細胞から観察された。

図9 FDを投与した後の蛍光顕微鏡写真



・積層後、アルブミン分泌は細胞数が2倍になっているのに対して、約4倍に増えた。

この細胞群の一部から細胞が盛り上がり3次元的な組織塊を形成する(図3)。

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一昨年度報告した。昨年度はその研究を進展させ、ラット小型肝細胞をコラーゲンスポンジを用いて3次元的に配置することにより、成熟化・組織化を早期に誘導できることを報告した。本年度は、昨年度より引き続いて研究を行っていたヒト肝細胞を用いた組織構築について研究した。

(1) ヒト肝細胞の3次元培養

ヒト肝細胞の初代培養を続けていくとラットで見られるのと形態学的には極めて類似した小型肝細胞が出現してくる。この細胞は、周りの成熟肝細胞と比較すると増殖能は高く、図2でも示すように多くの小型肝細胞にBrdUの取り込みが見られる。これらの増殖している小型肝細胞群の一部に細胞が盛り上がってくるように見える部分が現れる。これはラットの場合、小型肝細胞が分化し成熟肝細胞になる過程であるのだが、ヒト細胞でも同様な現象が見られた。実際盛り上がった細胞は徐々にコロニー状に増えてきて、細胞は大型化し、細胞間には毛細胆

管様の構造が認められるようになる。

正常肝の比較的高齢者から採取された肝細胞の中に小型肝細胞が存在することが確かめられたので、ラットの場合と同様にコラーゲンスポンジ中で類肝組織構築をするか検討した。肝細胞分画と小型肝細胞が多く含まれていると考えられる非実質細胞分画を同細胞数混合してコラーゲンスポンジ上に播種すると、成熟肝細胞はスポンジ内には入らず、スポンジ表層に接着する。しかしながら、2週間ほどはその数が維持されるようであるが、培養経過に伴い、表層の肝細胞ははげ落ちていく。その後、胆管上皮細胞が徐々に細胞表層を被覆していく。一方、スポンジ内部には成熟肝細胞がほとんど見られなかったが、培養後1ヶ月ほど経過すると所々に肝細胞が塊状に存在することがわかった。培養初期には見られず、PCNA陽性であるので増殖していると思われるが、経過観察が難しいため小型肝細胞が増殖し成熟化したものか、元々存在していた肝細胞なのか今のところ断定することができない。しかしながら、成熟肝細胞のみをコラーゲンスポンジに播種し、培養してもこのような増殖する肝細胞集を見ることのできない事やアルブミンの分泌が培養経過と共に徐々に減少するが培養後2~3週間すると再び分泌が増加する。これらの結果を考慮すると小型肝細胞が増殖し成熟化したと推測する事に大きな矛盾は無いと考えられる。一方、スポンジ内部に形成された胆管様構造では、構成する胆管上皮細胞に肝細胞マーカーの発現は認められなかったが、表層を被覆する胆管上皮細胞の一部に肝細胞マーカーが共発現していた。この実験系では播種時にCK19陽性細胞が約18%含まれている。その細胞が増殖し胆管様構造を形成し、スポンジ表層を被覆した可能性があるが、肝細胞がtransdifferentiationした可能性もある。特に、CK19陽性細胞は小型の細胞のため、表層よりはスポンジ内部に接着すると考えられる。そのため、内部にできる胆管様構造は播種時のCK19陽性細胞が増殖し形成したと思われるが、表層の上皮細胞は、成熟肝細胞のtransdifferentiationの可能性も考えなければならない。さらなる研究が必要である。

(2) ラット小型肝細胞特異的遺伝子・タンパク質の同定

研究結果の考察についても、現在特許出願準備中であり、本報告書への記載は差し控える。

(3) ラット小型肝細胞の積層化による3次元培養と組織形成

成熟肝細胞のみを重ねて培養するためには、これまではスフェロイド形成を行うか、線維芽細胞との共培養を行うかなど限られていた。しかしながら、スフェロイド形成の場合には、細胞増殖は見られず、時間と共に内部の細胞が壊死するなどの問題があった。また、共培養の場合は上下に肝細胞同士が接着するわけではなく、線維芽細胞や細胞外基質を介して多層化している。我々の積層方法を用いると、肝細胞同士が接着する。成熟肝細胞を培養して積層しようとしてもこれまではできなかった。それは、肝細胞が既に細胞膜の極性が完成しており、培養液に面する sinusoidal domain 同士が、接着して basolateral domain に変換するのが難しいからと考えられる。一方、小型肝細胞を積層すると接着するのは、小型肝細胞の分化が十分に進んでいないため肝細胞同士が新たに接着し、basolateral domain 形成する能力を持っている事に起因すると考えられる。細胞膜が接着することで接着装置が発達し、apical domain が作られ、毛細胆管が形成されるようになる。膜を直接小型肝細胞に重層しても、小型肝細胞の多層化が促進されるわけではないので小型肝細胞同士が接触することが必要と考えられる。しかしながら、我々の実験条件では小型肝細胞のみが培養されているのではなく、非実質細胞も共に培養されているのでそれらの細胞の影響も除外できない。しかしながら、ハイブリット型人工肝臓装置の作製を考えると細胞密度を高め、肝細胞の分化機能を長期間維持させるためには肝細胞の多層化は必須の要件と考えられる。本研究成果は、ヒト肝細胞を使った人工肝臓装置開発に新たな手がかりを与えるものと考えられる。

E 結論

ヒト肝細胞中に小型肝細胞と考えられる細胞が存

在し、コラーゲンスポンジ中にて組織形成を行う。肝細胞は塊状に増殖し、肝細胞機能を長期間維持することができた。また、同時に分離した胆管上皮細胞も胆管様構造を構築し、またスポンジ表層では分化した細胞になり被覆する。ラット小型肝細胞は、重層することが可能で、細胞同士接着し、成熟肝細胞に分化する。細胞間には毛細胆管がよく発達し、アルブミン分泌は促進される。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

(1) 論文発表

1. 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. 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)
3. Ikeda S, Mitaka T, Harada K, Sato F, Mochizuki Y, Hirata K. Tumor necrosis factor- α and IL-6 reduce bile canaliculi contractions of rat hepatocytes. *Surgery*, 133(1), 101-109 (2003)
4. Takamura A, Adachi M, Wada I, Mitaka T, Takayama S, Imai K. Accumulation of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulator BAG-1 on COPI-coated structures in gastric epithelial cells. *Internat J. Oncol.*, 23(5), 1301-1308 (2003)
5. Harada K, Mitaka T, Miyamoto S, Sugimoto S, Takeda H, Mochizuki Y, Hirata K. Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *J. Hepatology*, 39, 716-723 (2003)
6. Sudo R, Mitaka T, Ikeda S, Sugimoto S, Harada K, Hirata K, Tanishita K, Mochizuki Y. Bile canaliculi formation in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *J. Cell. Physiol.*, 199(2), 252-261 (2004)
7. 原田啓介、三高俊広. 肝臓の再生医学. 顕

(2) 学会発表

1. 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日、神戸
2. 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。
3. 三高俊広、第59回日本顕微鏡学会ニューマイクロスコープ分科会 シンポジウムBS7「ニューマイクロスコープで捉えた各種病態解析」 「In Vitro 肝組織過程の形態学的解析」 2003年6月9日(月)、札幌
4. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Coordinated contraction of bile canaliculi reconstructed in rat small hepatocytes. 2003 Summer Bioengineering Conference, June 25-29, U.S.A.
5. 三高俊広、「肝組織構築と肝細胞機能」シンポジウム「肝構成細胞の分化と機能発現」第10回肝細胞研究会、東京、2003年7月12日
6. 須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫「毛細胆管の構造と運動に対する cytochalasin B の影響」第10回肝細胞研究会抄録集p110、東京、2003年7月11日
7. 須藤亮、池田満里子、谷下一夫、三高俊広、「小型肝細胞が形成する毛細胆管運動とアクチンフィラメントの関係」第6回肝臓生物学研究会、札幌、2003年7月18日
8. 三高俊広、「肝再生医療のための基礎研究：In Vitro 肝組織形成」第一回札幌医科大学研究フォーラム、札幌、2003年7月15日
9. 原田敬介、三高俊広、宮本茂樹、杉本真一、池田慎一郎、竹田寛、望月洋一、平田公一。ラット小型肝細胞と肝非実質細胞によるコラーゲンスポンジ内肝組織迅速形成と肝分化。第7回日本肝臓学会大会、大阪、2003年10月15日。肝臓、44巻 supplement(2), p.A426
10. 宮本茂樹、平田公一、杉本真一、原田敬介、水口徹、三高俊広、Matrigel により分化誘導したラット小型肝細胞におけるチトクロームP450(CYP)の発現 第7回日本肝臓学会大会、大阪、2003年10月16日。肝臓、44巻 supplement(2), p.A466
11. 三高俊広、「小型肝細胞を用いた in vitro 肝組織形成」第44回日本組織細胞化学会・第35回日本臨床電子顕微鏡学会合同学術集会、シンポジウム2 「再生医学のフロンティア」 2003年10月29日、東京
12. 三高俊広 「In Vitro 肝組織構築と肝細胞機能-Ocean collagen-scaffold の可能性」 第2回北海道海洋生物科学シンポジウム、札幌、2003年10月31日
13. 三高俊広 「小型肝細胞による類肝組織形成とその応用」 日本再生医療学会、東京、2004年3月25日
14. 須藤亮、高橋憲生、池田満里子、三高俊広、「他校生膜を用いた小型肝細胞の積層培養」 日本再生医療学会、東京、2004年3月25日
15. Tanishita K, Ueda A, Sudo R, Ikeda M, Mitaka T. Cellular biomechanics applied to the tissue engineering. First Asian Pacific Conference on Biomechanics. Mar 25-28, Osaka, Japan
16. Kohara H, Hashimoto W, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of tube-like structure by rat bile duct ular epithelial cells. First Asian Pacific Conference on Biomechanics. Mar 25-28, Osaka, Japan

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

須藤亮、谷下一夫、池田満里子、三高俊広、「細胞培養法、細胞の三次元培養法、三次元組織及び人工臓器」(特願2003-38567)

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 猪飼 伊和夫 京都大学大学院医学研究科・講師

研究要旨 我々が開発した細胞凝集塊形成法を利用して本年度は約20例のヒト肝組織より肝幹細胞の分離を試みたが、安定的な結果が得られなかった。このため同細胞の分離システムを構築するためには特異的な表面抗原を同定する必要があると判断し、昨年度にスクリーニングされた遺伝子より表面抗原の候補を3遺伝子同定した。ES細胞から分化誘導された肝幹細胞を分離するために、新たにAFPプロモータによりGFP発現が誘導されるES細胞株を樹立した。肝幹細胞の分化誘導に関してはある種の間葉系細胞が肝幹細胞の分化誘導を阻害する作用を有することを見いだした。また肝不全治療への応用に向けて新たな動物モデルが必要と考えられたために、遺伝子改変マウスを利用した移植実験動物モデルの作成に着手した。本年度における以上の成果は肝幹細胞を利用した肝不全治療の臨床応用に向けて重要な意義を持つものと考えられる。

A 研究目的

我々は本研究の初年度までに、成体肝にも肝前駆細胞の性質を有する細胞が存在することを証明し、これを濃縮して分離する手法を確立した。さらにGFPトランスジェニックマウスのある一ラインが肝内においては他の細胞系に比べて肝細胞系の細胞に比較的強く発現することを見いだした。これらの事実を応用することにより、蛍光励起セルソータを利用して肝組織由来肝前駆細胞を純度よくソーティングできるシステムを確立した。昨年度はこのシステムによって分離された肝前駆細胞からメッセンジャーRNAを抽出し、成熟肝細胞由来のメッセンジャーRNAとの間でサブトラクションを行い、肝前駆細胞に特異的に発現する遺伝子の候補を約30遺伝子同定した。本年度はこの30遺伝子をさらに解析して、表面抗原マーカーとして利用可能かどうかの検討を加えた。次に、ヒト由来肝細胞の供給源として今後の研究の進展が期待されているES細胞を用いて、肝細胞への分化誘導を効率的に促進できる条件の検索を試行した。肝細胞への分化の確認は従来は肝細胞マーカー遺伝子の発現を免疫染色で確認することが必要であるが、同法は一旦細胞を固定しな

くてはならないことから連続的な観察が不可能である。このため、我々は蛍光タンパク質の発現を継続的にモニターすることで肝細胞系への分化が確認できるシステムを構築することとした。ヒト細胞を用いる研究については、昨年度までは倫理委員会により承認を得たプロトコールではウイルス性肝炎の症例が除外されていたために、ごく少数例での予備実験を施行し得たのみであった。このため本年度は新たに京都大学医学部倫理委員会に実験計画を提出し、ウイルス性肝炎を含む手術例について実験の承認が得られた。そこでヒト肝組織から実際に肝幹細胞/前駆細胞を分離する試みを、約20例の手術検体を用いて施行した。最後に昨年度までに我々は蛍光励起セルソータを用いて胎児肝より肝幹細胞を分離し、同細胞が、CD90陽性の間葉系細胞により分化が誘導されることを証明した。本年度はさらにCD90陽性細胞以外の第三の間葉系細胞が肝幹細胞の分化制御に関与していることを見だし、同細胞による分化制御機構について研究をすすめた。

B 研究方法

- (1) 肝前駆細胞特異的表面抗原マーカーの同定

昨年度までにcDNAサブトラクション法によるスクリーニングによって選択された30遺伝子のうち、ESTを除く17遺伝子について成体および胎児における発現臓器および発現時期を、RT-PCRにより確認する。さらに胎児肝幹細胞をCD49F (+) / CD90 (-) 分画として蛍光励起セルソータを用いて分取し、同細胞における発現を確認する。これらの2次スクリーニングにより、胎児肝幹細胞に発現する遺伝子を同定した後、同遺伝子に対する抗体を購入、若しくは作製して免疫染色によりタンパク質レベルでの発現様式を解析する。

(2) AFPプロモーターGFP遺伝子導入による肝細胞系分化検出システムの構築

PCRによりマウスAFP遺伝子のプロモータ部を増幅してクローニングし、この下流にGFP遺伝子を連結したコンストラクトを作製する。同コンストラクトを京都大学再生医科学研究所において樹立されたマウスES細胞株に電気穿孔法により導入する。薬剤セレクションにより安定遺伝子組込み体を選択し、同細胞を胚様体形成法により内胚葉系に分化誘導をかけてGFP発現を確認する。また分化誘導に関しては接着培養系についてもFGF、オンコスタチンMなどの添加による誘導法などを検討する。

(3) ヒト肝組織よりの肝前駆細胞の分離/同定

京都大学消化器外科において肝切除術を施行された症例のうち、インフォームドコンセントが得られた症例を対象とする。肝門部の脈管処理前に正常部肝組織を約10グラム採取する。切除後の組織についても同様に採取する。切離面に露出した脈管よりEGTA液を灌流後コラゲナーゼ液を灌流し手手的かつ鈍的に組織を破碎して細胞浮遊液を作製する。ガーゼ濾過により未消化物を除去した後に50G5分の遠沈で細胞を回収、これを50G1分の低速遠沈で実質分画と非実質分画に二分し、それぞれを1型コラーゲンコート培養皿上で培養する。培養液はDMEM/F12を基礎培地とし、重炭酸ナトリウム、ニコチンアミド、アスコルビン酸、DMSO、HGFを添加し、ヒト血清を10%加える。

(4) 肝幹細胞の分化誘導における間葉系細胞の関与に関する実験

胎生13日目の胎児肝よりコラゲナーゼ処理によって細胞浮遊液を作製し、細胞凝集塊とその他の間葉系細胞を分取する。細胞凝集塊については蛍光励起セルソータによりCD49F陽性の肝幹細胞とCD90陽性の間葉系細胞を分取しこの2種類の細胞を共培養する。これにさきほど採取した第三の間葉系細胞をセルインサートを用いた非接触共培養系において培養し、肝幹細胞に成熟肝細胞マーカーが発現するかどうかを定量的RT-PCRを用いて検討する。さらに尿素産生能の検討、グリコーゲン産生能の検討を加える。

(5) 遺伝子改変マウスを用いた新たな移植モデルの構築に関する実験

他大学との共同実験により新たな遺伝子改変マウスを導入する。同マウスは肝細胞特異的に毒素受容体を発現しており、毒素を全身投与することにより選択的に肝細胞が破壊される。同マウスに同系のマウスから分離した肝細胞を脾臓に移植したのちに毒素を投与し、ドナー由来の肝細胞がレシピエント肝内で生着しさらに増殖がみられるかどうかを検討する

(倫理面への配慮)

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、京都大学医学部附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部分を採取した。

動物実験は京都大学動物取扱規定にのっとり、大学の実験許可を受けて実施している。

C 研究結果

(1) 肝前駆細胞特異的表面抗原マーカーの同定

昨年度までに同定された30遺伝子のうち、ESTを除く17遺伝子についてまずその発現様式を成体マウスの各臓器(脳、心、肺、腎、肝、小腸)に

において確認した。RT-PCRの結果からこの17遺伝子は上記の臓器の少なくとも一つ以上において発現していることが確認された(図1)。続いて発生過程における発現の変化を見るため、胎生14日の全肝組織、CD49F陽性の胎児肝幹細胞およびCD90陽性の間葉系細胞について同様の実験を行った。その結果、3遺伝子について胎児肝幹細胞に特異的に発現していることが判明した(図2)。CD56については市販の抗体を購入、GP38については米国の研究者より抗体の供与を受け、現在タンパク質レベルでの発現様式を検討している。さらにGPMNBについてはモノクローナル抗体を作製することとし、業者に委託して現在抗体作成が進行中である。

図1 候補遺伝子の各臓器での発現解析

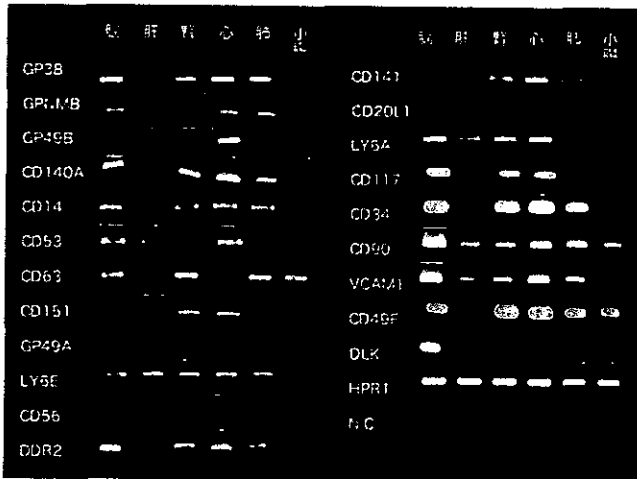
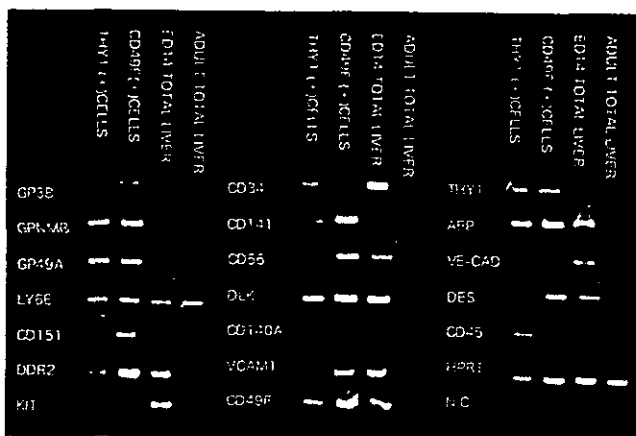


図2 胎児肝幹細胞における候補遺伝子の発現解析



(2) AFPプロモーター-GFP遺伝子導入による肝細胞系分化検出システムの構築

使用したコンストラクトを図3に示す。AFP遺伝子にはスプライスバリエントを生ずる2種類のプロモータが存在するため、2種類のベクターを作製した。電気穿孔法あるいはリポフェクション法によって効率的にES細胞に遺伝子導入が可能であった。安定組み込み体を約20クローン選択し、接着培養条件で分化誘導をかけると、いくつかのクローンについては培養開始時には発現がみられなかったGFPが、培養5日目より発現がみられるようになった(図4)。線維芽細胞に導入した場合には発現が全くなかったことから、AFPプロモータの働きによりGFPが発現していることが推察された。

図3 ベクターの構造

