

研究成果

報道発表資料の配付日時 2019年11月25日(月)15時00分

小型肝細胞の親に相当する前駆細胞の長期間培養機序の解明

ラット成体肝臓からの自己複製能を有する肝前駆細胞の分離と
生体外増幅・分化誘導による機能的肝細胞の創生

<研究の概要>

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門 大学院生・木野潤一と市戸義久助教らの研究グループ(教授 三高 俊広)は、ラット小型肝細胞の親細胞に相当する前駆細胞が、Laminin(LN)111上で自己複製能と肝細胞としての基本機能を維持しながら継代培養可能であることを解明しました。また、継代培養した前駆細胞はマトリゲル積層培養で成熟化誘導可能なことから、成熟肝細胞を体外で増幅する手法の確立に繋がると考えています。

この研究は、本学医学部 鈴木拓(分子生物学教授)との共同研究であり、文部科学省科学研究費補助金のもとで行われました。その研究成果は、国際科学誌 *Hepatology communication* のオンライン版で発表されました。

Kino J, Ichinohe N, Ishii M, Suzuki H, Mizuguchi T, Tanimizu N, Mitaka T

Self-renewal capability of hepatocytic parental progenitor cells derived from adult rat liver is maintained long term when cultured on laminin 111 in serum-free medium

Hepatology communication, 2019. DOI 10.1002/hep4.1442

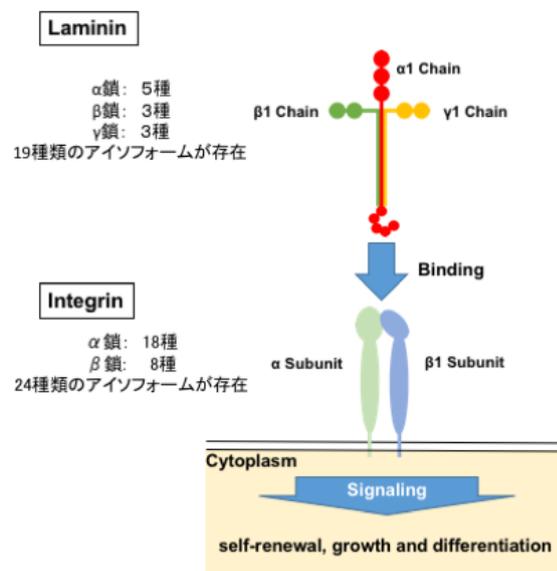
URL: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep4.1442>

<研究のポイント>

- 肝臓は、血清タンパク質の合成や薬物などの代謝・解毒、胆汁分泌など多くの機能を持つ、生命維持に欠かせない臓器です。
- 重篤な肝疾患を治療するためには、機能的な肝細胞を補うことが必要ですが、成熟肝細胞を生体外で増やすことはとても困難でした。
- 肝前駆細胞の1つである小型肝細胞は高い増殖能を持ち、効率よく機能的な肝細胞に分化する能力を持っていますが、これまで継代培養が出来ず、大量増幅ができませんでした。しかしながら、我々は最近、マトリゲルコートディッシュ上で小型肝細胞の一部の細胞が自己複製能を維持しながら継代培養できることを見出し、その細胞を小型肝細胞の親細胞(Hepatocytic parental progenitor cells; HPPCs)と名付けました(Ishii M, Kino J et al, *Sci Rep* 2017)。
- しかしながら、マトリゲルはマウス肉腫由来で、主成分であるラミニン(Laminin; LN)の他に、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン(ニドゲン)などの多くの細胞外マトリックス(Extracellular matrix; ECM)を有しており、小型肝細胞の継代培養においてどの成分が重要な役割を果たしているのか不明でした。

図1. ラミニンとインテグリンの概略図

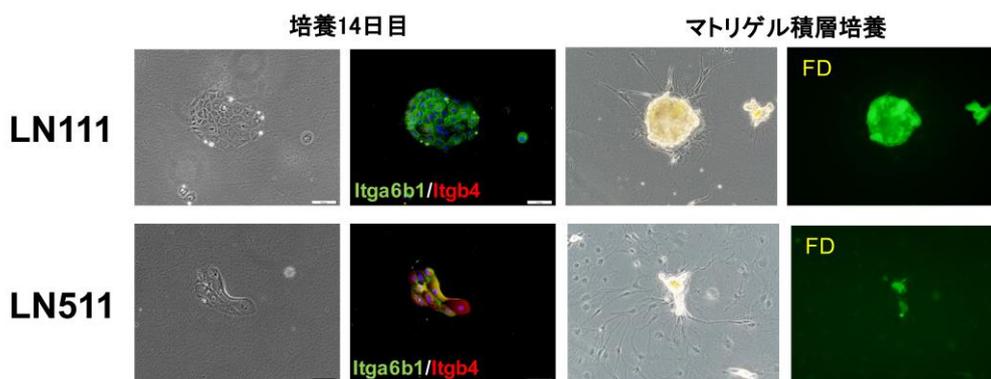
● LNは図1に示すように、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖をそれぞれ1本ずつ持つヘテロ三量体構造をとり、 α 鎖で5種、 β 鎖で3種、 γ 鎖で3種あり、その組み合わせで19種のアイズフォームが存在します。マトリゲルの主成分は $\alpha 1$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の3つのポリペプチド鎖からなるLN111です。一方、肝臓の主に胆管の基底膜の主要成分は $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖からなるLN511です。また、ラミニンのレセプターであるインテグリン(Integrin; Itg)は、細胞膜上で α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーを形成します。LN111に接着するItgとして $\alpha 6\beta 1$ と $\alpha 7\beta 1$ が、LN511に接着するItgとして $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ が知られています。



● そこで、本研究の目的はHPPCsの自己複製能の維持に關与するECMについてLN111とLN511について検討し、その分化能についても検討を行いました。

● マトリゲルで継代培養した小型肝細胞をLN111及びLN511を塗布した培養皿に播種し、コロニー形成とマトリゲル積層培養による成熟化を検討しました(図2上)。結果、LN111上では小型な細胞からなるHPPCsのコロニーが形成され、 $\alpha 6\beta 1$ を発現していました。このコロニーにMatrigelを積層培養するとコロニーの細胞は3次元的な構造を形成し、細胞間には毛細胆管が発達していました。Fluorescein diacetate (FD)を投与すると、毛細胆管内に代謝産物である蛍光色素のFluorescenceが分泌され、胆汁排泄能を獲得していることが分かりました。一方、LN511上では大型な細胞からなるコロニーが形成され、Itg $\alpha 6\beta 1^{low} \alpha 6\beta 4^{high}$ を発現していました。このコロニーを形成する細胞は、マトリゲル積層培養しても3次元構造は形成せず、毛細胆管は見られませんでした(図2下)。

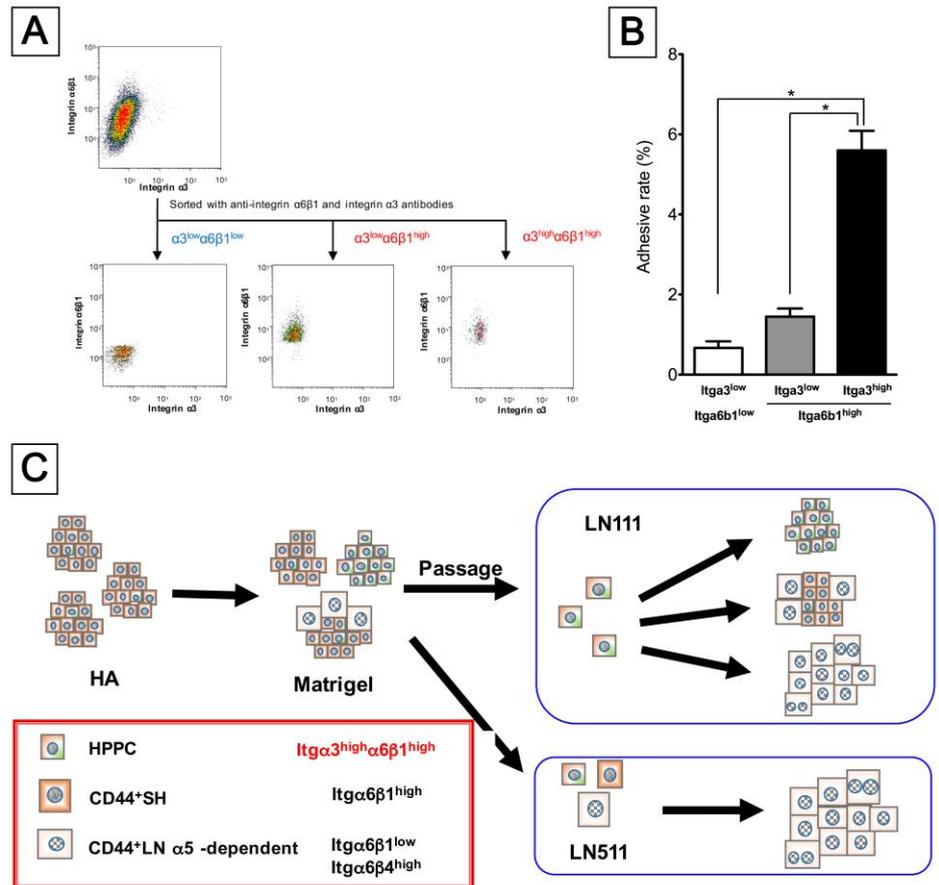
図2: LN111とLN511のコロニー形成と成熟化誘導



● Fluorescence-activated cell sorting (FACS)を用いてItg $\alpha 6\beta 1^{high} \alpha 3^{high}$ 細胞、Itg $\alpha 6\beta 1^{high} \alpha 3^{low}$ 細胞、Itg $\alpha 6\beta 1^{low} \alpha 3^{low}$ 細胞を単離し(図3-A)、LN111上に播種したところ、Itg $\alpha 6\beta 1^{high} \alpha 3^{high}$ 細胞がもっとも接着率が高く、コロニー形成能が高かった(図3-B)。この結果は、HPPCsがItg $\alpha 6\beta 1^{high} \alpha 3^{high}$ を発現し、LN111上で継代培養が可能であることを示しています(3-C)。

図3: インテグリンによる解析

(A) FACSによる細胞単離。(B) 単離した細胞の接着効率。(C) HPPCs 増殖機序の概略図



<研究の背景、実施期間など>

肝臓は再生能力の高い臓器として知られており、肝臓の2/3を切除しても、10日程でほぼ元の大きさに回復します。しかしながら、慢性的に障害された肝臓では成熟肝細胞の機能が低下し、再生能力も悪くなります。外から機能的な肝細胞を補充することができれば、肝疾患の治療に繋がると考えられますが、成熟肝細胞は生体外に取り出すと、増殖せず急速に分化機能を喪失することが問題でした。iPS細胞やES細胞からの肝細胞への分化誘導が報告されていますが、腫瘍化の制御や肝細胞機能が充分ではないなどの問題があります。

我々は、従来から肝臓に存在する前駆細胞（小型肝細胞）に着目し研究してきました。小型肝細胞は増殖能が高く、凍結保存可能なことから細胞移植のソースとして有用であると考えていましたが、唯一の弱点が継代培養できないことでしたが、我々は2年前に高い増殖能と肝細胞機能を安定して長期間維持する小型肝細胞の親細胞の培養方法を確立しました。今回の論文は、そのメカニズムを解明しました。

<研究の意義、これからの可能性、今後への期待、今後の展開など>

本研究から、分化機能を有する肝細胞からHPPCsを分離培養することが可能になりました。小型肝細胞は未熟細胞が含まれず腫瘍化の懸念はありません。また、小型肝細胞は肝細胞を分離する際に捨てられている非実質画分に多く含まれていることから、効率良く摘出肝臓を利用することにも繋がり、その応用は極めて広いことが予想されます。ヒト肝臓にも小型肝細胞が存在していることが分かっています。本法と同様に増殖能の高い前駆細胞をヒト肝臓組織片から分離・同定することができれば、薬剤スクリーニングや細胞移植に用いることが可能な機能的ヒト肝細胞を大量に作出できる可能性があり、ドナー不足の解決に繋がると考えています。

PRESS RELEASE



<https://web.sapmed.ac.jp/>

<本件に関するお問い合わせ先>

所属・職・氏名： 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門・教授・三高俊広
TEL：011-611-2111（23900）
FAX：011-615-3099
E-メール：tmitaka@sapmed.ac.jp