

4002251

肝多能性幹細胞株樹立及びその脾臓内肝細胞移植への応用
-肝細胞増殖因子トランスジェニックマウスを用いて-

(研究課題番号：10671090)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金 [基盤研究(C)(2)] 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 坂田博美

(旭川医科大学医学部助手)

I. はしがき

1) 研究の目的と意義

外科治療の歴史は今世紀になり、病巣を含む臓器の切除療法から、機能快復を目的とした置換外科としての臓器移植へと変遷をとげてきた。本邦でも漸く臓器移植法案の施行により、臓器移植が行われ初めているが、ドナー臓器不足が緊急課題になっている。事実、臓器移植が医療として定着した米国でさえ、肝臓移植の適応患者は年間約 1 万人に上るが、ドナー臓器不足のために実際に移植を受けられるのはその 1/3 にすぎない。

1985 年、Massachusetts General Hospital の Dr. Russel により、選択的移植という新しい概念が提唱された。それは、移植は臓器全体ではなく、各臓器の機能を司る組織や細胞単位で行うべきとの考え方である。即ち、肝機能不全の治療は、肝臓移植よりもむしろ肝細胞移植が優れていることを示唆している。さらに 1993 年、Harvard 大学の Dr. Vacanti らにより Tissue Engineering (医再生工学) の概念が発表された。これは、失われた臓器の機能を細胞工学、遺伝子工学、医用工学を駆使した医再生工学により代償しようとする概念である。これには、細胞移植及び人工臓器による治療が含まれる。米国移植ネットワーク (UNOS) によれば、米国における肝臓移植待機患者は、大部分が成人の慢性肝不全患者で、ついで小児期の重大な疾患である肝臓代謝性疾患、そして劇症肝炎患者等からなっている。従って、全肝移植にとってかわる肝機能補助と

しての細胞移植や、肝移植待機中の bridge use としての人工肝臓が開発されれば、これらの患者さん全てに肝臓移植は必ずしも必要でなくなり、ドナー臓器不足は解決できるかもしれない。

我々の研究グループは、1970 年代後半より、肝細胞移植及び人工肝臓の開発研究に着手しており、前述の選択的移植及び医再生工学の概念を先取りしてきたと言える。そして、遊離肝細胞の脾臓内移植の成功、肝細胞を用いたハイブリット型人工肝臓の開発等の成果をあげてきた。しかし、これらの先駆的治療法をもってしても、本来強い再生能力を持つ肝細胞の増殖には限界があり、十分な肝機能補助となりえないことが明らかになってきた。

一方、肝幹細胞は、自己複製能と多分化能をあわせ持つ細胞と定義される。そして、肝幹細胞は、肝臓の発生、分化、増殖、再生、癌化に重要な役割を果たしているだけでなく、造血幹細胞移植がそうであるように、肝機能不全治療に対する細胞移植治療にも応用できる可能性を秘めた細胞で、近年注目を集めている。もし、この肝細胞株を分離して肝細胞移植に応用できれば、臓器不足という肝移植の問題点を解決できるかもしれない。

HGF/SF は、細胞分散、器官形成、細胞保護、そして増殖促進活性を示す多機能増殖因子である。これらの機能は単一の受容体 Met により発揮される。我々は、HGF/SF の機能を *in vivo* で解明するため、アルブミンプロモーターより更に強力なメタロサイアニンプロモーターに、マウス由来の HGF/SF を組み込み、トランスジェニックマウスを作成した。従来ハーバード大学の研究グループにより、アルブミンプロモーターにヒトの HGF/SF を肝臓特異的に発現させ

たトランスジェニックマウスが報告されているが、このマウスでは十分に HGF/SF の *in vivo* での機能を再現できなかった。しかし我々のマウスは、肝臓は約 2 倍に腫大、DNA 合成率も約 5 倍に増加、肝部分切除後の肝再生も 3 倍に促進し、HGF/SF の強力な肝細胞増殖促進活性を *in vivo* で初めて証明した。また興味深いことに、肝幹細胞の一つである oval cell が、肝細胞様の形態を保って中心静脈周囲に多数存在していた。この肝幹細胞は、HGF/SF を高発現し受容体も保持しているため、自己複製能力があり、細胞株樹立が容易である可能性が高い。

本研究の目的は、第一に、肝細胞増殖因子(Hepatocyte growth factor/Scatter factor; HGF/SF)トランスジェニックマウス肝臓から肝細胞を分離して、肝幹細胞を選別して培養し、肝幹細胞株を樹立する。第二に、肝細胞増殖因子(Hepatocyte growth factor/Scatter factor; HGF/SF)トランスジェニックマウス肝臓から分離された肝細胞を、マウス脾臓内に移植して、肝細胞分化の再構築を検討することにある。

2) 研究組織

研究代表者：坂田 博美 (旭川医科大学医学部助手)

研究分担者：松田 年 (旭川医科大学医学部助手)

研究分担者：小野寺 一彦 (旭川医科大学医学部講師)

研究分担者：葛西 眞一 (旭川医科大学医学部教授)

3) 研究経費

平成 10 年度	2,900 千円
平成 11 年度	500 千円
計	3,400 千円

4) 研究発表

ア. 学会誌等

- (1) Kazuya Kato, Kazuhiko Onodera, Hiromi Sakata, Masato Imai, Junji Kato, W. John B Hodgson, Nader G. Abraham, Shinichi Kasai, Michio Mito. Fatty Acid ω and (ω -1)-Oxidation within Intrasplenically Transplanted Feral Hepatocytes. *Transplantation*, 66 (4) 441-445, 1998.
- (2) 加藤一哉 小野寺一彦 坂田博美 葛西真一 水戸廻朗。急性肝不全における hHGF の効果—ラット 90%肝部分切除モデルにおいて—。肝臓。 48, p358-359, 1998
- (3) Castagnino, P., Lorenzi, M. V., Yeh, J., Breckenridge, D., Sakata, H., Munz, B., Werner, S., and Bottaro, D. P. Neu Differentiation Factor/Heregulin Induction by Hepatocyte and Keratinocyte Growth Factors. *Oncogene*. In press.

イ. 口頭発表

- (1) Hiromi Sakata, H. Takayama, WJ LaRochelle, G Merlino, K.

- Onodera, K Kato, S Kasai, M Mito and JS Rubin. Establishment and Characterization of Hepatoblast Cell Line from Hepatocyte Growth Factor /Scatter Factor Transgenic Mouse. FASEB Summer Research Conference. 1998, July 12-16, Snowmass Village, Colorado, UAS.
- (2) Hiromi Sakata, H. Takayama, WJ LaRochelle, G Merlino, K. Onodera, K Kato, S Kasai, M Mito and JS Rubin. Survival of Transgenic Hepatocytes Expressing HGF/SF in Mouse Spleen. World Congress of Transplantation. 1998, 7 12~17, Montreal, Canada
- (3) Hiromi Sakata, H. Takayama, K. Onodera, K Kato, S Kasai, WJ LaRochelle, G Merlino, and JS Rubin. Establishment and Characterization of a Hepatoblast Cell Line Derived from Hepatocyte Growth Factor /Scatter Factor Transgenic Mouse. AASLD 49th Annual Meeting. November 6-10, 1998, Chicago, UAS.
- (4) 坂田博美 小野寺一彦 加藤一哉 葛西眞一。HGF/SF トランスジェニックマウスを用いた、長期間にわたる脾臓内肝細胞移植の検討。日本外科学会総会。1999年4月。福岡。
- (5) Sakata, H., Takayama, H., LaRochelle, W. J., Merlino, G., Onodera, K., Kato, K., Kasai, S., Mito, M. and Rubin, J. S. Transgenic expression of HGF/SF enhanced survival of transplanted hepatocytes in the spleen. 34th Congress of the European Society of Surgical Research (ESSR). April 22-24, 1999, Bern, Switzerland.

II. 研究成果

1) HGF/SF トランスジェニックマウス肝臓から肝細胞株の樹立

既に当教室で確立しているラットのコラゲナーゼ肝灌流法に準じて、約 10 週齢の HGF/SF トランスジェニックマウス肝臓より肝細胞を分離した。検討した中で、ラミニン処理したプレート上で最も分離肝細胞の生着が良好であったので、以下の培養にはラミニン処理プレートを用いた。細胞は継代すると同時に、限界希釈法およびクローニングシリンダーでクローナルな細胞株を得て、適宜、凍結し、液体窒素に保存した。現在約 60 種類の細胞株を樹立し、約 6 ヶ月間継代した。

2) 樹立肝細胞株の形質の解析

a) 位相差顕微鏡、電子顕微鏡による、肝細胞株の形態解析。

ほとんどの肝細胞株は、多角形で上皮由来の細胞形態を示した。電子顕微鏡による観察で、gap junction, bile canaliculi 等の肝細胞特異的な構造を有していた。

b) 肝細胞株の形質の解析

ほとんどの細胞株は、継代約 6~7 代目までは、肝細胞特異的蛋白質であるアルブミン、transgene である HGF/SF、HGF/SF 受容体である c-Met を高発現した。しかし、その後継代と共にアルブミンおよび HGF/SF の発現は漸減した。しかし、ある肝細胞株は、約 60 代に及ぶ長

期間培養においてもアルブミン産生を認めた。さらにこの細胞は、HGF/SF, c-Met, cytokeratin 18, cytokeratin 19, alpha-fetoprotein の mRNA も発現していた。また、二重免疫組織染色でこの細胞株は、同一細胞において、albumin 蛋白質、cytokeratin 19 蛋白質、alpha-fetoprotein 蛋白質を発現していることが確かめられた。以上からこの細胞株は、肝細胞の形質を有しているしながら、同時に胆管細胞の形質を持つ、肝前駆細胞株である可能性が示唆された。一方、いずれの細胞株も、ヌードマウスにおける腫瘍形成能を認めなかった。

3) HGF/SF トランスジェニックマウス肝細胞を用いた脾臓内肝細胞移植

(1) 分離肝細胞における、遺伝子発現

まず、FVB/N 野生型 (WT) マウス及び HGF/SF トランスジェニック (TG) マウスから分離された、新鮮分離肝細胞及び 24 時間培養肝細胞における、Endogenous HGF/SF, Transgene HGF/SF, Albumin, Cytokeratin18 の発現を Northern blot で検討した。その結果、WT 肝細胞は、Endogenous および Transgene HGF/SF を発現しないが、HGF/SF の受容体 Met と Albumin を発現していた。一方 TG 肝細胞は、6.0 kb の Endogenous HGF/SF を発現していないが、2.4 kb の Transgenic HGF/SF を高発現し、さらに Met 及び Albumin も発現していた。以上の結果から、この細胞分画が主に肝実質細胞からなっていること、さらに TG 肝細胞は HGF/SF を自身で産生して autocrine で増殖していることが

示唆された。

(2) 脾臓内肝細胞移植の形態と機能（移植後 2-64 週間の観察）

これらの WT 及び TG 肝臓から分離された新鮮分離肝細胞 2×10^6 個を、同系マウス脾臓内に移植して 64 週間の長期間、生着を検討した。その結果、WT 肝細胞は、移植後 2~32 週間の間、ほとんど脾臓内で生着、増殖を示さなかった。一方、TG 肝細胞は、脾臓に細胞塊を形成して生着増殖しているのが観察された。

この脾臓内に生着増殖した肝細胞の機能を検討するために、肝細胞移植後、4、12、32 週間後に脾臓を摘出して、HGF/SF、Albumin、Cytokeratin 18 の発現を Northern blot で検討した。その結果、TG 肝細胞を移植した脾臓にのみ、Transgene HGF/SF と Albumin が発現しており、移植後経過を経るに従いその発現が増強した。このことから、脾臓内の移植肝細胞が、HGF/SF と肝細胞特異的タンパク質である Albumin を発現しながら経過を追うごとに脾臓内に生着増殖していることが示唆された。

さらに移植後 64 週間まで観察したところ、肝細胞は脾臓内で著明に増殖生着し、PAS 陽性、免疫組織染色で Albumin 陽性であった。高倍率でさらに検討すると、肝細胞は類洞様構造を伴っており、脾臓内で移植肝細胞が組織構築していることが示唆された。しかし、経過中に移植肝細胞の癌化や、胆管系の細胞の増殖は認めなかった。

(3) NIH/Image による、脾臓内移植肝細胞数の定量化

次に、脾臓内肝細胞移植に対する HGF/SF の生着効果を定量化するために、画像解析装置と NIH/Image を用いて、移植後、2~64 週までの脾臓内での生着肝細胞数を計測解析した。その結果、WT 肝細胞は、ほとんど生着、増殖を示さなかったが、TG 肝細胞は、移植当初より脾臓内での生着肝細胞数が WT に比べて有意差をもって多く生着していた。以上から、マウスにおいて、HGF/SF の autocrine の系で増殖する肝細胞は、脾臓内で長期間にわたり、生着することが示され、HGF/SF の脾臓内移植肝細胞に対する、長期間の生着促進効果が示唆された。

(4) 脾臓内移植肝細胞の DNA 合成能

肝細胞増殖因子の移植肝細胞に対する mitogenic effect を検討するために、脾臓内に移植された TG 肝細胞の DNA 合成率を PCNA 染色で検討した。その結果、WT 肝細胞は、全く PCNA で染色されなかったが、TG 肝細胞の DNA 合成は、移植後 8 週間で約 8% と最高値を示し、その後漸減するものの、移植後 64 週間目でも、約 2% の DNA 合成率を示した。

(5) 移植肝細胞の宿主肝臓への迷入

脾臓内肝細胞移植後に、移植肝細胞が門脈系を介して宿主肝臓へ迷入したか否かを検討するために、宿主肝臓における Transgene HGF/SF の発現を、Northern Blot 及び Transgene HGF/SF に対する primer を用いて RT-PCR を行った。その結果、Northern Blot および RT-PCR でも、宿主肝臓にトランスジェ

ニック由来の肝細胞の迷入を検出しなかった。

III. 考察と今後の展望

平成9年度は、主に HGF/SF トランスジェニックマウス肝臓から、多数の肝細胞株を樹立し、その形質の解析で研究期間が終了した。その結果、樹立された肝細胞株は少なくとも継代約7代目までは、肝細胞として機能して増殖することが示唆された。通常、初代肝細胞培養では、せいぜい約3代以上の継代は不可能である。また、この時点では、アルブミン産生能も低下していることが知られている。しかし、我々が HGF/SF トランスジェニックマウスから分離した肝細胞株は、継代7代目でもアルブミン産生能を維持していたことから、HGF/SF 遺伝子を肝細胞に強制発現させることで、機能を保った肝細胞を大量に調整できる可能性が示唆された。また、肝細胞株の中に、肝細胞と胆管細胞の両方の形質を有する、いわば肝幹細胞の形質を有する細胞株も見い出された。この細胞群の純化を試みたが、この細胞群特異的な細胞表面マーカーが存在しないために、当初予定していた、マグネチックビーズによる細胞の選別はできなかった。

平成9~10年度は、HGF/SF トランスジェニックマウス肝臓から分離された肝細胞を同系マウスの脾臓内に移植して、脾臓内肝細胞移植モデルにおける HGF/SF の効果を長期間にわたり検討した。その結果、HGF/SF トランスジェニック肝細胞は脾臓内で64週間、生着及び増殖して、肝細胞としての機能を

果たすことが確認された。従って、遺伝子導入された HGF/SF は、脾臓内移植肝細胞の生着及び増殖を促進することが示唆された。

次のステップとして、現在、実際に肝細胞移植で肝疾患が治療できるかを検討している。我々が、注目した疾患は、Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) である。この疾患は、胆汁産生及び分泌の異常により、胆汁うっ滞がおこり、肝硬変及び肝不全となる、常染色体劣性の遺伝性肝疾患である。最近、この疾患の病因が、multidrug resistance 3 (MDR3) の遺伝子変異でおこることが報告され、さらに、マウスの MDR3 にあたる multidrug resistance 2 (mdr2) の遺伝子ノックアウトマウスが、PFIC の疾患モデルであることが発見された。幸いなことに、このノックアウトマウスは、我々の HGF/SF トランスジェニックマウスと同じ strain を使用しており、移植に関わる免疫学的な問題を回避できる。現在このノックアウトマウスを開発したオランダの研究グループと共同研究を進めている。

現在、肝細胞移植は、米国で臨床治験が始まろうとしている。既に Crigler Najjar 症候群 I 型の患者に、同種の肝細胞移植が行われ、黄疸が軽減したと報告されている。しかし、その効果は一時的で、現在再移植が検討されているほどである。このことは、正常肝細胞移植は一定の効果を示すものの、その効果に限界があることが示唆される。従って、本研究で示されたように、何らかの方法で肝細胞の増殖を調節する方法の技術開発が不可欠である。この点で、HGF/SF を人の肝細胞に遺伝子導入して移植することは、肝細胞移植の臨床応用の推進に大きく貢献できると思われる。