

Hepatocytic parental progenitor cells of rat small hepatocytes maintain self-renewal capability after long-term culture

Scientific Reports 7:46177 DOI: 10.1038/srep46177

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

要旨 ラット小型肝細胞の前駆細胞は、長期培養後も自己複製能を維持し、肝細胞としての基本機能を維持していることがわかった。また、肝前駆細胞は生体内において肝細胞と胆管細胞への二分化能を有していることも示された。

1. 小型肝細胞の特性

致死的肝不全の治療法に肝移植があるがドナー不足の問題がある。そのため、肝移植に代わる治療法として細胞移植療法が期待されている。細胞移植療法には大量の肝細胞が必要だが、未だ正常肝細胞の恒常的供給は難しく、安定供給に向けては大量培養法の確立が必要である。肝臓には小型肝細胞と呼ばれる増殖能力の高い細胞が存在する¹⁾。この細胞は肝細胞として基本的な分化機能を有し、長期間培養すると成熟化し、毛細胆管網を持つ類肝組織を形成する。CD44を発現しておりヒアルロン酸コートディッシュで培養すると高純度に小型肝細胞コロニーが作成できる。一定の条件下では、小型肝細胞は自己成熟化するため増殖し続けることは出来ず長期培養は困難だった。細胞数確保には継代培養が必要だと考えられるが、その方法は確立されていなかった。本研究では、肝細胞移植療法に向けた継代培養法の確立とその特性解析を目的とした。

2. 形態と増殖能

初代小型肝細胞コロニーを分離し CD44 抗体を用いた MACS 法で CD44 陽性小型肝細胞をソートし、マトリゲルコートディッシュに播種し継代培養を行った。コロニーは経時的に増大した (図 A)。各継代後 21 日目のコロニーあたりの平均細胞数は、 218.1 ± 429.6 個、 149.2 ± 233.1 個、 83.7 ± 139.9 個、 32.9 ± 45.9 個であった (図 B)。28 日目に採取された細胞数は、生着した細胞数のそれぞれ 12 倍、11 倍、4 倍、4 倍であった。継代されたコロニーの一部で増殖の高いコロニーが存在していた。各継代時の細胞数の多いコロニー上位 10% を抽出しコロニーあたりの細胞数を解析したところ、培養 21 日目で 1249.2 ± 454.5 個、 722.3 ± 198.5 個、 366.2 ± 176.1 個、 99.3 ± 41.8 個であった (図 C)。これらの細胞の分裂回数は培養 28 日目で 13.5 回、12.7 回、11.0 回、9.1 回であった。

3. 継代培養で得られた細胞の機能解析

各継代時の免疫染色ではコロニーのほぼ全ての細胞

で CD44 陽性であった。肝細胞特異的マーカーの HNF4 α と C/EBP α を発現し、Alb の発現も見られた (図 D)。一部の細胞では胆管特異的マーカーである CK19 を発現していた。Real-time PCR で遺伝子発現解析したところ、免疫染色で陽性であったタンパク質全ての遺伝子発現を確認したが、発現量は継代毎に低下していた。

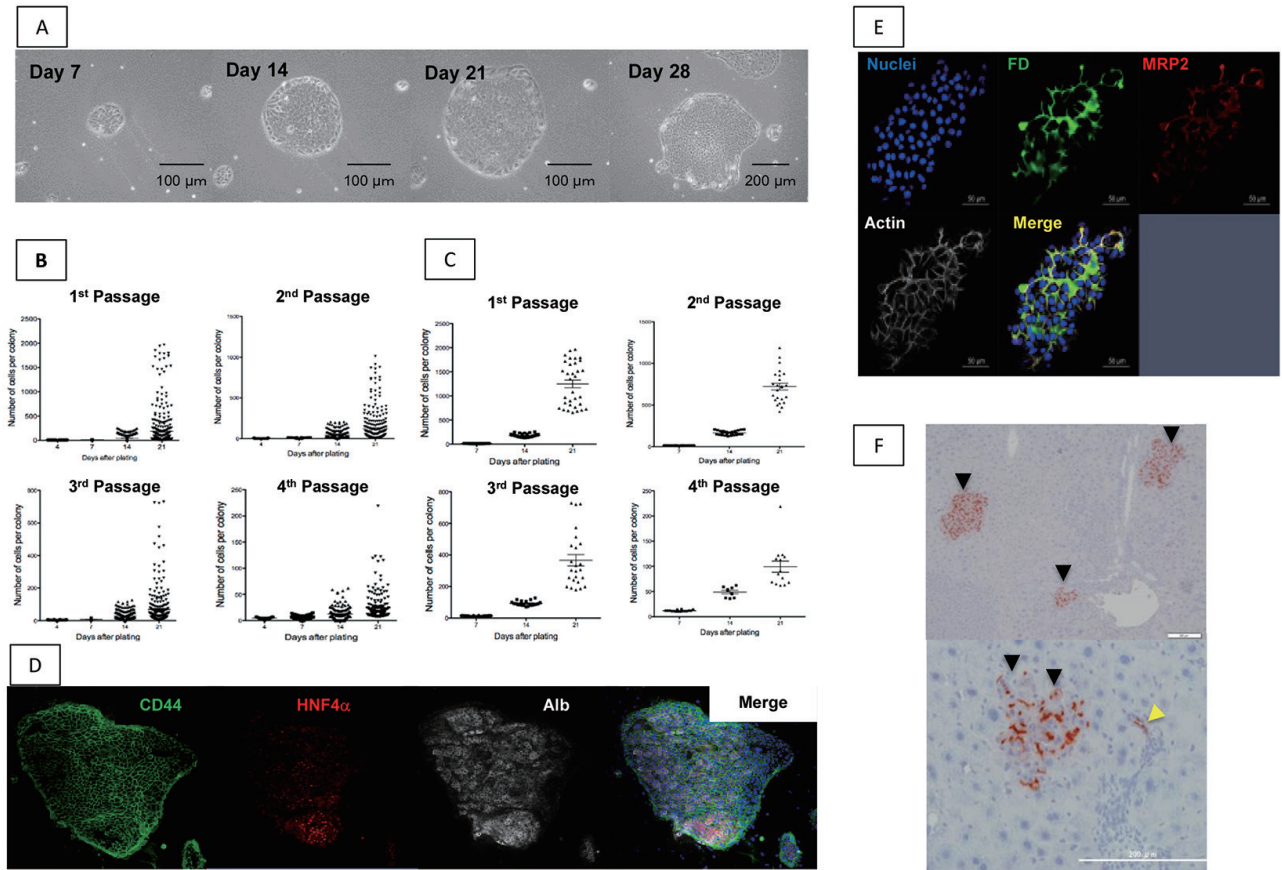
マトリゲルを投与した細胞では成熟肝細胞と比較すると低値ではあるが、成熟肝細胞のマーカーである Alb, Tdo2, Tat, Cyps, Oatp2 の遺伝子発現が増大していた。特に Alb と Tdo2 の発現は有意に増大していた。また、CYP3A 活性、アルブミン産生能、グリコーゲン産生能が有意に増大していた。マトリゲル投与群では 3 次元構造を示し、毛細胆管形成が見られた。FD 投与により胆汁排泄能を確認した。胆汁トランスポーターである MRP2 や BSEP の発現も毛細胆管面に見られた (図 E)。

4. 細胞移植

ドナー細胞は雄由来 DPP IV 陽性細胞を用いた。レシピエントは雌由来 DPP IV 陰性の retrorsine 投与/部分肝切除モデルラットを用いた。初代 CD44 陽性小型肝細胞移植では、DPP IV 陽性細胞巣が見られたが、継代培養した細胞移植では移植細胞巣は認められなかった。マトリゲルを投与し、成熟化誘導した 3 代目の細胞移植では DPP IV 陽性細胞巣が認められた。また、DPPVI 陽性細胞が胆管にも認められた。 (図 F)。

5. 肝細胞移植療法とヒトへの応用

肝組織内幹細胞が肝切除後の肝再生や肝修復にどの程度関与しているのか現時点では十分に分かっていない。しかし、肝前駆細胞の持つ旺盛な増殖能力を如何に臨床治療や臨床研究へ応用できるかが重症肝疾患の治療の鍵になると考えられる。未分化な肝細胞は肝分化機能を失う事、高分化な肝細胞は増殖できない事が問題である。肝前駆細胞として知られる小型肝細胞は肝細胞機能を維持しながら高い増殖能を持つこと、凍



- A: 培養 7, 14, 21, 28 日目のコロニー写真。細胞は増殖しコロニーは増大した。
- B: コロニーあたりの細胞数：継代毎に増殖能は低下したが、細胞数は増大した。
- C: 細胞数の多い上位 10% のコロニーの細胞数：継代毎に増殖能は低下したが、細胞数は増大した。
- D: 3 代目の細胞の免疫染色：CD44 はほぼ全てで陽性で、多くの細胞で HNF4 α と Alb を発現していた。
- E: マトリゲルを投与した 3 代目の免疫染色：FD 投与により胆汁排泄能も認められ、MRP2 の発現が毛細胆管面にみられた。
- F: マトリゲルを投与した細胞の移植後 30 日目の組織写真：DPP IV 陽性細胞が見られた（黒矢印）。細胆管に DPP IV 陽性細胞が見られた（黄矢印）。

結保存が可能なことから細胞移植治療の細胞源として有用と考えられる。これまでは継代培養が出来ず細胞を増やすことは出来なかったが、本研究により小型肝細胞の前駆細胞の継代培養法が確立できた。

本研究から、iPS 細胞・ES 細胞などの多能性幹細胞から分化誘導すること無く、既に分化機能を有する肝細胞から小型肝細胞の前駆細胞を分離培養することが可能になった。多能性幹細胞は有効な機能発現に課題が多い。また未熟な細胞が存在すると腫瘍化の可能性がある。一方、小型肝細胞は未熟細胞が含まれず腫瘍化を懸念する必要はない。加えて、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る。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る²⁾。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られる。

6. 参考文献

- 1) Mitaka T, Mikami M, Sattler GL, Pitot HC, Mochizuki Y. Small cell colonies appear in the primary culture of adult rat hepatocytes in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 1992; 16: 440-447.
- 2) Sasaki K, Kon J, Mizuguchi T, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of hepatocyte progenitor cells isolated from adult human livers in serum-free medium. *Cell Transplantation* 2008; 17: 1221-1230.

Ishii Masayuki

略歴

2009 年 札幌医科大学医学部 卒業

2012 年 札幌医科大学消化器・総合、乳腺・内分泌外科 入局

2017 年 札幌医科大学大学院 卒業