

肝臓の組織構築と再生

三高俊広, 谷水直樹, 市戸義久

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

Reconstruction and Regeneration of Liver Tissue

Toshihiro MITAKA, Naoki TANIMIZU, Norihisa ICHINOHE

Department of Tissue Development and Regeneration

Research Institute for Frontier Medicine

Sapporo Medical University School of Medicine

ABSTRACT

In this review we summarize recent studies that have been performed in our laboratory. We has focused our researches on the issue of the “liver”, i.e., development, stem/progenitor cells, regeneration, and *in vitro* reconstruction of hepatic tissues. Our researches were mainly divided into 4 themes; (1) liver development, especially, biliary duct formation, (2) stem/progenitor cells related in normal and pathophysiological conditions of liver diseases, (3) cell transplantation for the treatment of liver diseases, and (4) *in vitro* reconstruction of hepatic tissues. To elucidate the unresolved issues of each theme, we have been investigating by using embryological, molecular biological, and pathological methods. In the near future, we hope that our approaches will lead to the development of new effective medicines and treatments for intractable liver diseases and of an artificial liver device in which the reconstructed hepatic tissues are incorporated.

(Accepted October 23, 2013)

Key words: small hepatocytes, stem/progenitor cells, liver development, reconstructed hepatic tissues, differentiation, bile duct cells

はじめに

肝臓は、組織学的には中心静脈を中心とする六角形の各頂点に門脈と胆管を含むグリソン鞘を配置し、肝細胞は辺から中心に向かって1~2細胞の厚さで索状に隙間無く配列している。また肝細胞に沿って一層の内皮細胞が類洞を形成し、腸から運ばれた栄養素と老廃物、肝動脈からの酸素を肝細胞に供給し、肝細胞の産生物を全身に運ぶために機能的且つ効率的な組織形態をとっている。我々の研究目的は、この構造が肝臓発生過程においてどのように形成されるか、またそれらの細胞を供給するシステムについて、更に病的状態からどのように再生されるかについて、発生生物学、分子生物学、組織学的、工学的手法を用いて明らかにすることである。その研究成果は、難治性肝疾患の新たな治療法や人工肝臓の開発に繋がると考えている。

そのために、(1) 肝臓発生 - 胆管形成、(2) 肝臓の幹・前駆細胞と細胞供給、(3) 細胞移植による肝組織再生、(4) *In vitro* 肝組織形成、と、4つの切り口から研究を進めてい

る。本論文では、我々の最近の研究成果を中心に紹介することにする。

(1) 肝臓発生 - 胆管形成

肝内胆管は、胎生中期（マウスではE14~15）に門脈周囲から形成される。胆管上皮細胞は肝細胞と同様に肝芽細胞から分化するが、その過程は主にNotchシグナルを介

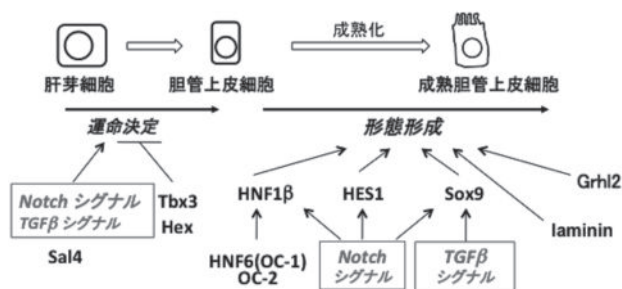


図1 胆管上皮細胞の運命決定、形態形成には様々な因子が関わっている (参考文献 29: 図6を改変)

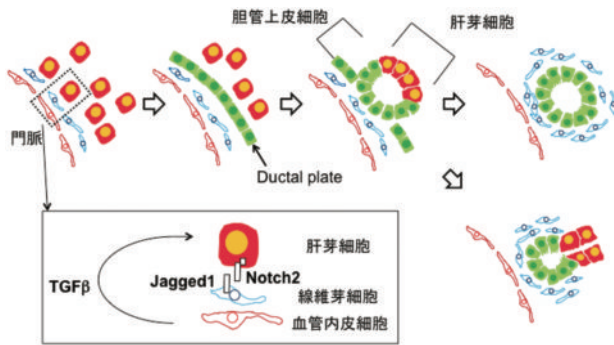


図2 マウス胎仔肝臓における胆管形成過程. 門脈近傍では Notch シグナルを介した線維芽細胞と肝芽細胞の相互作用や血管内皮細胞/線維芽細胞からの TGF β の作用によって胆管上皮細胞が分化する. Ductal plate は, 胆管上皮細胞と肝芽細胞が形成する非対称的な構造を経て, 胆管構造を形成する (参考文献 31; 図3 改変).

した線維芽細胞と肝芽細胞の相互作用と血管内皮細胞・線維芽細胞の分泌する TGF β の作用によって制御されている (図1) (1, 2). 胆管の形態形成の過程では, 運命決定された胆管上皮細胞が門脈周囲に形成する一層の細胞層 (ductal plate) が, 最終的に管状・樹枝状の構造へと再構成される. 最近の研究では, 胆管形成の遅延を認める転写因子の Sox9 のノックアウトマウスの解析 (3) や Notch シグナル関連分子のノックアウトマウスの解析 (4) などから, 胆管発生初期には門脈側に胆管上皮細胞のマーカを持つ細胞が, 実質側には肝芽細胞を配置する非対称的な構造を持った未熟な胆管構造が最初に形成され, その後近傍の肝芽細胞に TGF β や Notch シグナルが作用して胆管上皮細胞に分化し, 対称な胆管構造が形成されることが明らかにされた (図2).

また, Sox9 発現細胞を YFP でラベルできるように遺伝子改変したマウス (Sox9-CreERT: ROSA-YFP マウス) を用いて, 胎仔期の肝臓で ductal plate を構成する細胞をラベルし, それらの細胞がどのような細胞に分化するかが検討された. その結果, ductal plate の細胞は, 胆管, Hering 管, 門脈周囲の肝細胞の 3 種類の細胞に分化することが明らかになった (5). この結果は, 一旦胆管系に分化した細胞からも肝細胞が供給されていることを示し, 胎仔期の胆管に二分能を持つ肝幹細胞が存在していることを示唆している. しかしながら, 非対称構造を構成する肝芽細胞が胆管上皮細胞に分化して胆管形成が起こるとすると, 胆管の中に YFP でラベルされた細胞 (胎仔期に既に胆管上皮細胞に運命決定した細胞) と誘導後に胆管上皮細胞に分化したラベルされない細胞で構成される胆管が見られるはずであるが, 現在のところ, このような胆管構造が存在しているのかについては検討されておらず, 不明である.

我々は, 肝発生過程における胆管形成機序を明らかにするために肝芽細胞由来の細胞株 Hepatic Progenitor cells Proliferating on Laminin (HPPL) (8) を用いて研究を

行っている. この細胞は, 培養条件を変えることで肝細胞または胆管上皮細胞に分化する性質を持っている. HPPL を laminin をコートした dish で培養し, Matrigel を重層すると肝細胞に分化し, collagen gel に包埋して培養すると胆管上皮細胞に分化する. 単層に増殖した HPPL に type I collagen と Matrigel を混合したゲルを重層すると, 中央に管腔構造を持った cyst が形成される (9). サンドウィッチ培養における管腔形成には, Akt シグナルや胆管上皮細胞に強く発現している HNF1 β が関与している. Matrigel の主成分は laminin111 (α 1 β 1 γ 1) と type IV collagen であるが, 我々は, Laminin111 が管腔形成に必須であり, HPPL は, β 1-Integrin を介して laminin と相互作用していることを見出した (7, 10). 一方で, HPPL は laminin521 を発現しており, cyst の周囲には laminin521 を含む細胞外マトリックス層が観察される. 成体マウスおよびヒト肝臓においては, laminin 511 (α 5 β 1 γ 1) と 211 (α 2 β 1 γ 1) の発現を認めるが, 再生肝においては一過性に laminin111 が発現する (11). また, laminin α 5 鎖のノックアウトマウスの肝臓では, 残存する α 1 鎖を含む laminin111 が存在するために肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化に異常を認めないが, その後の胆管構造形成に遅延を認める (12). 生体内においては, 線維芽細胞と胆管上皮細胞がそれぞれ laminin α 1 と laminin α 5 を発現しているため, 胆管発生初期には線維芽細胞の産生する laminin α 1 依存的に胆管上皮細胞の分化が進行するが, その後胆管上皮細胞の産生する laminin α 5 に依存して胆管の形態形成が進行するのではないかと考えている.

HPPL が形成する cyst 構造は成体の胆管上皮細胞が形成するものと比べると管腔が小さく未熟であることから, 管腔サイズを調整する因子に問題があると考え, その同定を試みた. その結果, 転写因子 grainyhead-like 2 (Grhl2) が, 管腔のサイズの調整に関与していることが判った (13). Grhl2 は, 胆管上皮細胞に発現しており, HPPL に Grhl2 遺伝子を導入すると管腔形成が促進される. また Grhl2 のターゲット遺伝子として同定した Claudin (Cldn) 3, Cldn4 及び Rab25 は, 管腔構造の発達に関わっており, Rab25 は Cldn4 のタイト結合への局在を促進していた (13). 我々は, Grhl2 が Cldn 分子の発現及び局在を制御することで胆管上皮細胞のタイト結合を機能化し, 管腔構造形成を促進していると考えている (14).

(2) 肝幹・前駆細胞と細胞供給

1) 肝組織形成過程での肝幹・前駆細胞

肝幹・前駆細胞は, in vitro で clonal に増殖してコロニーを形成する能力を持ち, in vivo 及び in vitro で肝細胞及び胆管上皮細胞に分化する二分能を持つ細胞として同定され, 解析が行われてきた. これまでの研究から, マウスの胎仔期には実質領域にある肝芽細胞画分に, 生後には胆管上皮細胞画分に肝・前駆細胞が含まれていることが判っている (6). そこで我々は, 胎生後期から成体にいたる肝発

生過程における胆管上皮細胞の肝幹・前駆細胞としての能力について検討を行った。まずコラゲナーゼ肝灌流法を応用し、出生後の肝臓から胆管上皮細胞と肝細胞画分の細胞を分離培養した。その結果、生後1週目の胆管上皮細胞は、胎生17日や生後2週目以降の細胞と比較して、高頻度にアルブミン陽性細胞を含むコロニーを形成したことから、この時期の胆管上皮細胞中に胆管上皮細胞と肝細胞への二分化能を有する細胞が多く存在することを見出した(谷水ら, 論文投稿中)。EpCAM陽性の胆管上皮細胞を分離し、コラーゲンゲル上で増殖させた後、oncostatinMを添加しMatrigelを重層して肝細胞への分化を誘導すると、新生仔期の細胞は、肝特異的代謝酵素やcytochrome P450 (CYP)を発現するようになり、アンモニア代謝能を獲得し、毛細胆管様構造を形成するなど、成熟肝細胞様の細胞に分化した。一方、成体由来の胆管上皮細胞では、遺伝子レベルでのアルブミン遺伝子の発現上昇は認めるが代謝酵素の誘導は認められなかった。この結果から、新生仔期の胆管上皮細胞は、肝細胞への分化能を持っているが、成体に至るとその能力を失うと考えられた。EpCAM陽性細胞を単層培養して低分子の透過性を測定すると、成体由来の胆管上皮細胞の方が新生仔由来の細胞より高いバリア機能を示すことから、新生仔期の胆管上皮細胞は成体の細胞と比較して上皮細胞としての成熟度が低いと考えられた(7)。興味深いことに、上皮細胞の成熟化を促す因子として同定した転写因子Grhl2は、新生仔より成体の胆管上皮細胞での発現が高かった。Grhl2を新生仔胆管上皮細胞に導入して培養を行うと、HNF4αやC/EBPαの発現誘導が抑えられるために、肝細胞への分化が抑制される。したがって、Grhl2は胆管上皮細胞の成熟化を促すとともに胆管上皮細胞としてのLineageを安定化する役割も担っていると考えられた(7)。

2) 成体肝臓における肝幹・前駆細胞

成体肝臓における幹・前駆細胞として oval 細胞 (ductular reaction に伴って出現する小型の細胞) と我々が見出した小型肝細胞が知られている。これまでに成体肝臓から表面膜抗原に対する抗体を用いて二分化能を持つ細胞が単離されているが、組織学的にその存在は病的状態においても確認できておらず、その生理学的な意義も判っていない。我々は、胆管上皮細胞 - 幹細胞 (oval 細胞) - 小型肝細胞 - 成熟肝細胞の関係を明らかにすべく研究を進めている。

1. Oval 細胞 (Ductular reaction)

Oval 細胞は、Farber E (15) が肝化学発癌過程で門脈周囲領域に出現する楕円の核を持ち N/C 比の高い細胞として報告して以来、様々な肝障害時に出現することが報告され、ラットにおける肝幹・前駆細胞と考えられている。幼若な胆管様構造を呈し、グリソン鞘域から小葉内に突出するように増生することが多い。Oval 細胞は、α-fetoprotein や胆管上皮細胞マーカーである cytokeratin (CK) 7, 19, 骨髄幹細胞

マーカーである c-kit, CD34, Thy1 を発現し、その形態的類似性や存在部位から Hering 管由来と考えられている。障害肝において Oval 細胞の出現は一時的で、その消失と相前後して好塩基性の小型の肝細胞がその部位に出現し、その後大型の肝細胞に置き換わっていくことから、Oval 細胞は好塩基性小型肝細胞を介して成熟肝細胞に分化すると考えられてきた。

ガラクトサミン (GalN) は、ラット腹腔内に投与すると、中心静脈周囲の肝細胞を壊死させ急性肝炎を起こすことが知られている薬剤で、遺伝子を損傷することはなく、投与されたラットは一週間程度で回復する。この GalN を投与して2日目のラット肝臓を組織学的に検討すると、門脈周囲領域に Thy1 陽性 Oval 細胞を認め、3日目には Thy1 陽性細胞と肝細胞との境界部分に CD44 陽性小型肝細胞が出現していた。そして Thy1 陽性細胞は4日目頃に、CD44 陽性細胞は6日目頃にはほとんど見られなくなり、小葉構造は正常化する(16)。つまり、Oval 細胞の一部は小型肝細胞を介して成熟肝細胞に分化するのではないかと考えられた。Thy1 陽性細胞及び CD44 陽性肝細胞が成熟肝細胞に分化することを証明するために、我々は GalN 投与ラット肝臓から Thy1 陽性細胞及び CD44 陽性細胞を分離し、in vitro での分化誘導を試みた(17)。GalN 投与後、2日目から分離した Thy1 陽性細胞は極めて少数の CD44 陽性細胞コロニーしか形成できないが、3日目からの Thy1 陽性細胞は2日目に比較し多数のコロニーを形成した。また、Thy1/CD44 両陽性細胞が多数存在し、CD44 を発現している細胞はより多くのコロニーを形成することができた。このことは、Thy1 陽性細胞の肝細胞への分化の方向性は Gal 投与後 2~3 日に決まり、肝細胞分化に CD44 の発現が重要であることを示唆している。我々は肝細胞への運命決定に関与する因子を検討するために、2日目から分離した Thy1 陽性細胞に様々な増殖因子やサイトカインを添加し、CD44 陽性コロニー形

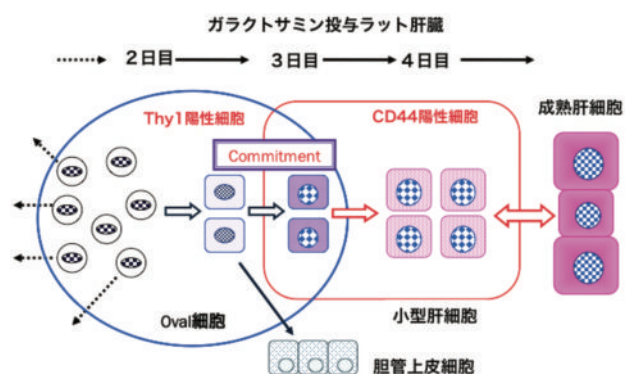


図3 ガラクトサミン投与ラット肝臓における肝幹細胞 (Oval 細胞) の分化過程。Thy1 陽性 Oval 細胞は、2~3 日目に肝細胞への運命決定が起こり、CD44 を発現し、Thy1/CD44 両陽性細胞となる。CD44 単独陽性細胞の肝前駆細胞 (CD44 陽性細胞) に分化し、CD44 の発現を失い成熟肝細胞と分化する (参考文献 30 ; 図 6 を改変)

成を誘導する因子の同定を試みた (18). その結果, EGF, basic FGF, HGF がコロニー形成に必要であることがわかった. すなわち, Thy1 陽性細胞は, EGF, basic FGF, HGF などの作用によって, まず, Thy1/CD44 両陽性細胞に分化し, 続いて CD44 単独陽性細胞に分化し, 最終的に CD44 の消失と共に成熟肝細胞に分化すると考えられる (図 3).

Thy1 陽性細胞はまた, コラーゲンゲルにサンドイッチし, HGF 添加, dexamethasone-free で培養すると胆管上皮細胞に分化し cyst を形成する. しかしながら, CD44 陽性細胞を同様に培養しても胆管上皮細胞への分化はほとんど見られなかった (16). つまり, Thy1 を発現している細胞には二分化能が保持されているが, CD44 単独陽性になると胆管細胞への分化能は低下する. この結果は, Thy1 陽性 Oval 細胞は幹細胞であり, 小型肝細胞は前駆細胞であることを示している. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果も, Thy1 陽性細胞, Thy1/CD44 両陽性細胞, CD44 陽性細胞, 成熟肝細胞の順に肝細胞分化が進んでいることを示している (18). ヒト慢性肝炎患者において, 血中の HGF や FGF などの増殖因子やヒアルロン酸が増加していることはよく知られている. Oval 細胞の肝細胞への分化に HGF, FGF などの増殖因子が関係し, また小型肝細胞の出現にヒアルロン酸が関与していることを考慮すると (18), ヒト慢性肝炎も肝幹・前駆細胞が誘導されやすい環境にあると考えられる. しかしながら, ヒトの病的肝臓にラットで見られたような小型肝細胞が増えているかどうかは現時点では不明である.

2. 小型肝細胞 small (intermediate) hepatocytes

ピロリジジナルカロイド (pyrrolizidine alkaloid ; PA) の一種である retrorsine (Ret) は, 肝細胞の DNA とクロ

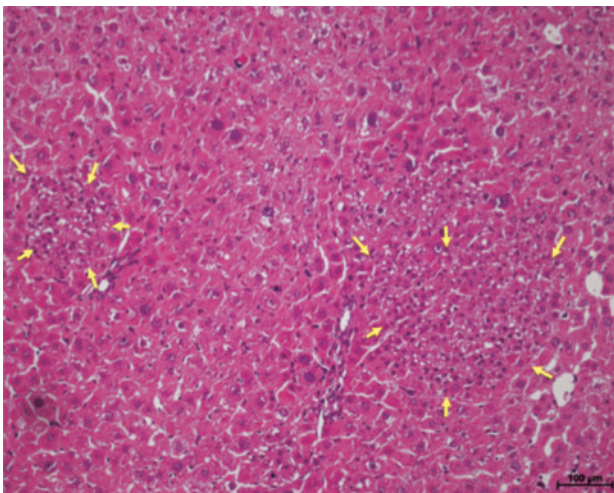


図 4 Retrorsine/PH モデルラット肝臓に出現する Small hepatocyte-like progenitor cells (SHPCs). PH 後 14 日目の肝臓の H & E 染色写真.

スリンクし, 長期にわたり細胞分裂を抑制することが知られている. ピロリジジナルカロイドを投与された肝臓においては, 2/3 部分肝切除 (Partial Hepatectomy ; PH) などにより増殖刺激が加わると, 肝細胞は S 期には入るが, M 期に入ることができない. 核分裂できないために大きな核を持つ大型の肝細胞 (megalocytes) が形成される. Retrorsine を 2 週毎に 2 度腹腔内投与し 4 週後に 2/3PH を行ったラット肝臓 (Ret/PH model) には, megalocytes に混じり小型肝細胞様前駆細胞 (small hepatocyte-like progenitor cells, SHPCs) と名付けられた細胞が出現する. SHPCs は, 小型の形態を保ちながら増殖しクラスターを形成することが知られている (図 4).

SHPCs を構成する細胞は, 肝細胞としての特徴を有し時間と共に成熟肝細胞になり, PH 後 1 ヶ月以上経つと周囲の肝細胞と区別がつかなくなる. ヒト肝臓においてもラット SHPCs に似た小型肝細胞を見ることがある. 劇症肝炎から回復する過程において大型の肝細胞に囲まれて出現する. また慢性肝炎の後期, 線維化が見られるようになる頃の肝組織をみると, 小型の肝細胞からなる集族が散見される. 肝硬変症における小型の肝細胞からなる再生結節の出現はよく知られている. 小児や成人の胆管病変を伴う疾患である原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎においては, Oval 細胞マーカーである OV6 や胆管細胞マーカーである CK7 を発現する肝細胞が見られる. さらに急性肝炎後や C 型慢性肝炎や肝硬変症においても胆管細胞の表現型を持つ肝細胞が出現する. 形態的には肝細胞だが胆管細胞の表現型も有する比較的小型の細胞を small (intermediate) hepatocyte-like cells, intermediate hepatobiliary cells などと称し, 従来の Ductular reactions とは区別している (19).

我々は, 正常成熟ラット肝臓から分離した肝細胞を培養すると肝機能を持ちながら強い増殖能を持つ形態的に小型の肝細胞が出現することを見出し, 小型肝細胞と名付けた (図 5A) (20). 小型肝細胞は, 基底膜様構造が存在すると成熟化し組織化する (図 5B) (21). 増殖しコロニーを形成するこの小型肝細胞は CD44 や D6.1A, BRI3 を特異的に発現する (22). また小型肝細胞は, follistatin を分泌することで成熟肝細胞の分泌する増殖抑制因子 activin A 活性を中和し, 選択的に増殖することができる (23). CD44 や follistatin の発現は, 小型肝細胞の成熟化に伴い消失する. また CD44 のリガンドであるヒアルロン酸をコートした培養皿を用いると, ラット小型肝細胞をほぼ純粋に分離培養できることが判った (24). この方法を用いると正常ヒト肝組織からも小型肝細胞の分離培養が可能であり, 高齢者の肝臓にも小型肝細胞が存在することが判っている (25). 最近我々は, マウス小型肝細胞の分離に成功した. ラットとは異なり, CD44 の発現が弱く, Sox9 を発現していた. 0.1% DDC を一週間投与した Sox9-EGFP マウスから分離した EpCAM⁻/Sox9⁺細胞はクローナルに増殖し, コロニーを形成する. 構成細胞は形態的には小型肝細胞に類似

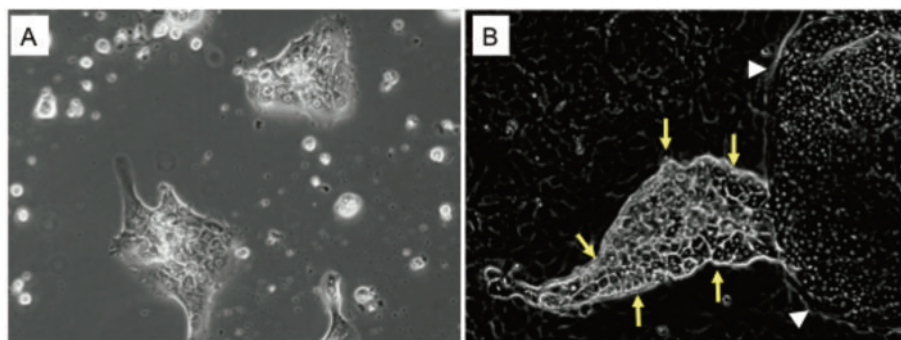


図5 ラット肝臓から分離した小型肝細胞の位相差顕微鏡写真。(A) ヒアルロン酸コート培養皿上に播種し、5日間培養した。(B) 小型肝細胞を含む非実質画分の細胞を培養し、30日目の小型肝細胞コロニー(矢頭)と盛り上がって3次元構造を作る小型肝細胞(矢印)。

し、肝細胞機能を持つが胆管上皮細胞の特徴は持っていない。成熟化誘導により肝細胞の高分化機能の一つでアミノ酸代謝酵素の tyrosine aminotransferase や tryptophan dioxygenase, 薬物代謝酵素である CYP 分子種を発現し、また毛細胆管形成をし、胆汁を分泌することが判っている。成熟化に伴い Sox9 の発現は低減する(谷水ら, 論文投稿中)。成体肝臓において、胆管上皮細胞には発現しているが肝細胞に通常発現を認めない CD44 であるが、我々は先に述べた SHPCs やコリン欠乏食を投与し肝線維化を誘導した肝臓において CD44 陽性肝細胞が一時的に出現することを見ている。これらの細胞は、先に述べた small hepatocyte-like cells や intermediate hepatobiliary cells と同等の細胞であると思われ、これらの結果は、少なくとも小葉内肝細胞の一部は肝前駆細胞としての機能を有していることを示している。

(3) 肝幹細胞・前駆細胞の移植による肝再生

重篤な肝疾患における根治的な治療方法は、肝移植しかない。しかしながら、世界的にドナー肝は圧倒的に不足しており、日本においては脳死肝移植が少ないこともあり必要患者数の1割も移植治療を受けていないのが現状である。その代替方法として細胞移植が考えられている。高い増殖能を有し、肝細胞への分化能力を持っている幹・前駆細胞はその有力な候補であると考えられている。我々が見出し、研究してきた小型肝細胞も十分にその能力を持つだろうと期待し、モデルラットに細胞移植実験を行った。我々はまず、In vitro で増殖させ細胞数を増やしてから小型肝細胞を同系ラットに移植する実験を行った。肝細胞を正常肝臓に移植しても生着して宿主の肝細胞索に組み込まれることはなく、部分肝切除を加えて一時的な増殖刺激を与えても生着しないことが知られている。今のところ、移植した肝細胞が肝細胞索に組み込まれて長期間生存し且つ増殖するためには、移植前に宿主肝細胞に対して増殖抑制をかけた上でドナー細胞に対して増殖刺激を与えるか、慢性的に強い増殖刺激を肝臓に与え続けることが必要と考えられている。そこで

我々は、ラット肝臓に直接放射線を照射し肝細胞の増殖を抑制した後に、脾臓経由で平均30個ほどの細胞からなる小型肝細胞コロニーを移植した(26)。脾臓でトラップされ脾臓の中で増殖する小型肝細胞も認められたが、移植した細胞の一部は肝臓に生着し肝細胞索に組み込まれ増殖した(図6A)。

我々はまた、ガラクトサミン投与ラット肝臓から分離した Thy1 陽性細胞と CD44 陽性細胞を Ret/PH model ラット肝臓に移植した(27)。この系では、成熟肝細胞を移植すると移植細胞数にも依るが宿主肝細胞の80%以上が移植した細胞に置換される。F344 ラットには先天的に dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) を発現しない系統があり、その雌ラットに DPPIV 陽性雄ラットの肝細胞を移植すると、生着した肝細胞は DPPIV タンパク質を発現しており、また Y 染色体の存在を調べれば宿主の肝細胞と区別することができる。成熟肝細胞をコントロールに、肝幹・前駆細胞を移植したところ、肝幹細胞である Thy1 陽性細胞は、肝細胞に分化し増殖巣を形成することはできたがその頻度は著しく低く、移植後2ヶ月目には移植した細胞のほとんどは消失した。一方、CD44 陽性細胞を移植した場合には、生着率は Thy1 陽性細胞よりも高く、1年経っても生着し増殖する細胞も存在したが、移植後2ヶ月を過ぎると多くの移植細胞は消失した。以上の結果から、肝前駆細胞の移植が長期的に見た場合、移植に適した細胞であるとは必ずしも云えないことがわかった(図6B)。しかしながら、移植後1ヶ月以内で見ると成熟肝細胞に比較して生着した細胞の増殖率は高いことから、急性期の肝疾患に対する移植治療には適しているかもしれない。小型肝細胞は、新鮮分離肝細胞を用いた場合より置換率は落ちるが、体外で一旦増やして移植することが可能であることから、コロニーの細胞を単離する方法などを改良することにより肝細胞移植の新たなソースになると考えられる。しかしながら、肝疾患を有する患者に肝切除や肝障害を起こす薬剤の投与などを行うことはできないので、放射線照射による一時的な肝増殖抑制は臨床応用可能な方法の一つかもしれない。

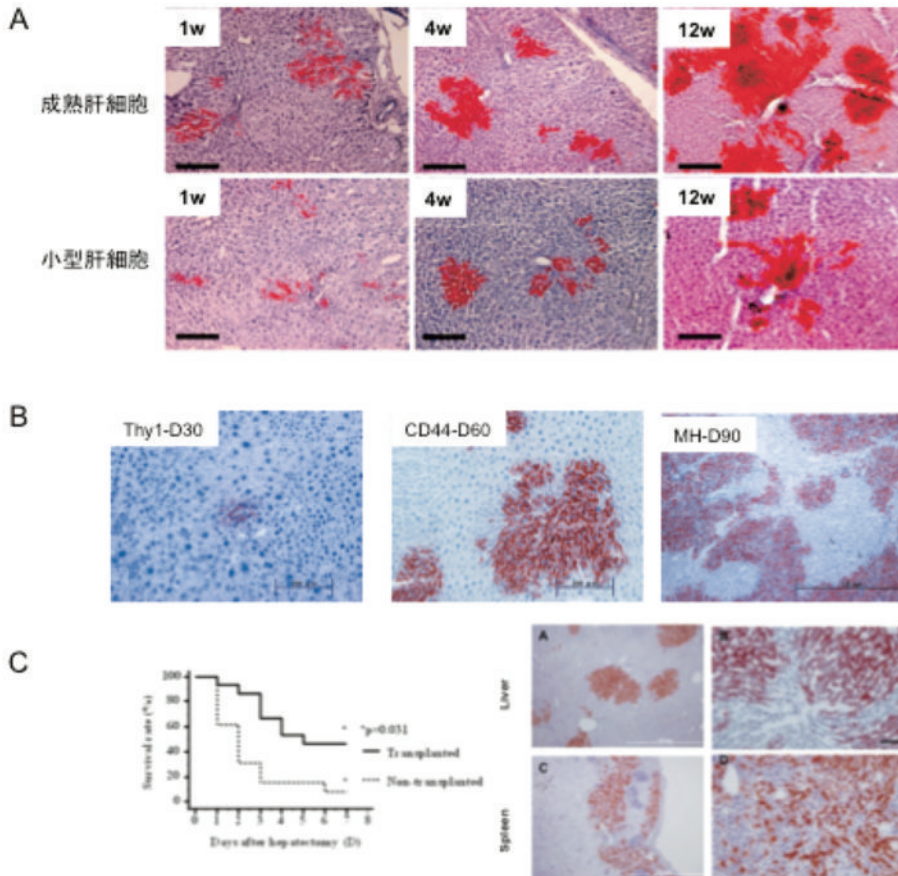


図6 細胞移植. DPPIV⁺ F344 雄ラット肝臓から分離した細胞を同系 DPPIV⁻ 雌ラットに脾臓経由で移植した. 移植した細胞は DPPIV に対する組織化学的染色により赤褐色に染色される. (A) ラット肝臓に X 線を照射し, 48 時間後に成熟肝細胞 (2×10^7 cells/0.5ml) 及び 12 日間培養した小型肝細胞 (約 1×10^6 cells/0.5ml) を移植した. 移植後, 1w, 4w, 12w 目に肝臓を摘出し, 標本を作成した. Bar は 100 μ m. (参考文献 26) (B) 正常ラット肝臓から成熟肝細胞 (MH; 5×10^5 cells/0.5ml) を分離し, D- ガラクトサミンを投与し 2 日目の肝臓から分離した Thy1 陽性細胞 (5×10^5 cells/0.5ml) と 4 日目から分離した CD44 陽性肝細胞 (5×10^5 cells/0.5ml) を脾臓経由で肝臓に移植した. Thy1 は 30 日目, CD44 は 60 日目, MH は 90 日目の肝組織である (参考文献 27). (C) CDE 食を 12 週投与したラット脾臓に 1×10^7 個の肝細胞を移植し, 24 時間後に 2/3 部分肝切除を行った. 移植 6 ヶ月後の肝臓と脾臓の組織像を示す (参考文献 28).

肝硬変患者に対する肝切除術は, 肝不全を起こしやすいことが知られている. そのため, 肝予備能を考慮して切除を限定するか手術不能になる場合が多い. そのような患者に対しても安全に手術できる治療法を検討するために, ラットに肝硬変症を誘導し, 成熟肝細胞を移植して肝機能を高めてから肝切除することで術後死亡率を改善できるか検討した. コリン欠乏食を 12 週間投与すると肝線維化が著明になり (非アルコール性脂肪肝炎のモデル), 2/3 部分肝切除を行うと 90% 以上のラットが 1 週間以内に死亡する. このモデルラットに対して肝細胞を脾臓経由で移植して 24 時間後に 2/3 部分肝切除を行った (28). 術後死亡率は劇的に向上し 50% 以下となり, 加えてドナー細胞が生着し, 既存の肝細胞の一部は置換されていることがわかった. 移植後 1 ヶ月においては肝線維化も改善していた (図 6C).

これまで正常肝細胞を移植し生着させるためには, レシピエント動物の肝細胞の増殖が抑制される状態で増殖刺激が入るか, 強い肝細胞壊死が継続するような状態である必要があると考えられていたが, 細胞老化に陥っている肝細胞が多いと考えられる肝硬変症のような病態においても肝細胞置換を起こし得ることがわかった. 重篤な肝疾患の根治的治療法は肝移植であるが, 現状ではドナー肝が圧倒的に不足しているため, 細胞移植による代替が期待されている. しかしながら, 長期間生着させ病的肝細胞と置換することには成功していない. 我々のこれまでの研究結果から, 幹・前駆細胞の移植は必ずしも期待通りにレシピエント肝臓における生着・分化・増殖を起こさないことがわかった. 前駆細胞である小型肝細胞も一旦培養し分化させてから移植の方が生着率が高まることから, 今後期待される iPS

細胞や多能性幹細胞による治療においても、成熟肝細胞への分化を誘導してから移植する方法の確立が求められるであろう。

まとめ

我々は「肝臓を創る」という大きな目標に向かって幾つかの研究を並行して進めている。本編においては、最近5年ほどの間に得られた成果を中心に我々の研究を概説したが、4) *In vitro* 肝組織形成、については紹介できなかった。現在、慶應大学理工学部との共同研究を進めており、成果も出始めている。我々は、別の総説においても研究成果を紹介しているので参照して欲しい (14, 29-31)。新たに進めている研究も少しずつではあるが成果が出始めている。またの機会に紹介したい。

謝辞

これらの研究は、教室に在籍した吉川大和助教 (当時)、今純子助教 (当時)、大栄秀和助教 (当時)、陳其潔博士研究員、本学第一外科の大学院生または研究生であった柴田智尋先生、西陰重紀先生、川崎浩之先生、大島秀紀先生、佐々木寿誉先生、柴田稔人先生、中村幸雄先生、東京大学分子生物学研究所宮島研究室の大学院生であった千賀一徳先生ら多くの研究者の研究成果をまとめたものである。研究を補助して頂いた桑野美奈子さん、塚本由美子さんには深く感謝いたします。また、本学平田公一教授 (旧第一外科)、水口徹准教授 (旧第一外科) にはヒト手術材料の提供、助言など様々な支援をしていただきました。この場を借りて深謝いたします。

参考文献

1. Tanimizu N, Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci* 2004; 117:3165-74.
2. Tanimizu N, Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. *Int Rev Cytol* 2007; 259:1-48.
3. Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, Stanger BZ, Jacquemin P, Pierreux CE, Clotman F, Lemaigre FP. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* 2009; 136:2325-33.
4. Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre FP, Stanger BZ. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 2009; 136:1727-39.
5. Carpentier R, Suñer RE, van Hul N, Kopp JL, Beaudry JB, Cordi S, Antoniou A, Raynaud P, Lepreux S, Jacquemin P, Leclercq IA, Sander M, Lemaigre FP.

- Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology* 2011; 141: 1432-8.
6. Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology*. 2009; 137: 1114-1126.
7. Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes during development. *J Cell Sci* 2013; 126: 5239-46.
8. Tanimizu N., Saito H, Mostov K, Miyajima, A. Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk+ hepatoblasts. *J Cell Sci* 2004; 117: 6425-6434.
9. Tanimizu N, Miyajima A, Mostov KE. Liver progenitor cells fold up a cell monolayer into a double-layered structure during tubular morphogenesis. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 2486-2494.
10. Tanimizu N, Miyajima A, Mostov KE. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1472-1479.
11. Kikkawa Y, Mochizuki Y, Miner JH, Mitaka T. Transient expression of laminin alpha1 chain in regenerating murine liver: restricted localization of laminin chains and nidogen-1. *Exp Cell Res* 2005; 305: 99-109.
12. Tanimizu N, Kikkawa Y, Mitaka T, Miyajima A. α 1- and α 5-containing laminins regulate the development of bile ducts via β 1-intergrin signals. *J Biol Chem* 2012; 287: 28586-28597.
13. Senga K, Mostov K, Mitaka T, Miyajima A, Tanimizu N. Grhl2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol Cell* 2012; 23: 2845-2855.
14. Tanimizu N, Mitaka T. Role of Grainyhead-like 2 in the formation of functional tight junctions. *Tissue Barriers* 2013; 1: 1-6.
15. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethyl aminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16: 142-149.
16. Kon J, Ichinohe N, Ooe H, Chen Q, Sasaki K, Mitaka T. Thy1-positive cells have bipotential ability to differentiate into hepatocytes and biliary epithelial cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. *Am J Pathol* 2009; 175: 2362-2371.
17. Ichinohe N, Kon J, Mitaka T. Isolation of hepatic progenitor cells from the galactosamine-treated rat liver. *Methods Mol Biol* 2012; 826: 49-58.
18. Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H, Nakamura Y, Mizuguchi T, Hirata K, Kon J, Mitaka T. Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from

- D-galactosamine-treated rat livers. *Hepatology* 2013; 57: 1192-1202.
19. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004; 39: 1739-1745.
 20. 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.
 21. Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29: 111-125.
 22. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J Hepatol* 2006; 45: 90-98.
 23. Ooe H, Chen Q, Kon J, Sasaki K, Miyoshi H, Ichinohe N, Tanimizu N, Mitaka T. Proliferation of rat small hepatocytes depends on follistatin expression. *J Cell Physiol* 2012; 227: 2363-2370.
 24. Chen Q, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective Proliferation of Rat Hepatocyte Progenitor Cells in Serum-free Culture. *Nat Protoc* 2007; 2: 1197-1205.
 25. 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 Transplant* 2008; 17: 1221-1230.
 26. Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Nobuoka T, Oshima H, Kawasaki H, Kawamoto M, Katsuramaki, T, Mitaka T, Hirata K. Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transplant* 2006; 12: 78-87.
 27. Ichinohe N, Kon J, Sasaki K, Nakamura Y, Ooe H, Tanimizu N, Mitaka T. Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant* 2012; 21: 11-22
 28. Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ooe H, Ichinohe N, Hirata K, Mitaka T. Preoperative hepatocyte transplantation prevents cirrhotic rats from receiving the fatal damage by a liver resection. *Cell Transplant* 2014, in press.
 29. 谷水直樹, 三高俊広. 肝上皮細胞による組織構造形成. *生化学* 2012; 84: 658-665.
 30. 三高俊広, 市戸義久, 谷水直樹. 肝再生における幹細胞の機能. *肝胆膵* 2012; 65: 37-46.
 31. 谷水直樹, 宮島篤. 胆管の発生と制御機構. *肝胆膵* 2012; 65: 73-82.
-
- 別刷請求先： 三高俊広
〒 060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目
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
E-mail : tmitaka@sapmed.ac.jp