

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

Hepatol commun. 2020; 4(1): 21-37. doi: 10.1002/hep4.1442

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

要旨 ラット小型肝細胞の前駆細胞は、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がわかった。また、継代培養した前駆細胞はMatrigel積層培養で成熟化する。

1. 肝臓における肝前駆細胞研究

致死的肝疾患患者に対して行われている肝臓移植の代替医療として細胞移植に期待が寄せられている。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だが、成熟肝細胞は一度生体外に取り出すと急激に増殖能が落ちてしまうことから、肝細胞を生体外で増殖させることは困難であった。肝細胞中には小型肝細胞 (Small Hepatocytes: SHs) と呼ばれる増殖能力の高い細胞が存在する。この細胞は特異マーカーとして CD44 を発現し、肝細胞としての基本的な分化機能を有している。また長期間培養すると成熟化し、類肝組織を形成する。しかしながら継代培養はこれまで困難であった。我々は最近、Matrigel コートディッシュ上で SHs の一部の細胞は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) と名付けた¹⁾。Matrigel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、SHs 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あった。本研究の目的は HPPCs の自己複製能の維持に関与する ECM の同定とその分化能について検討した。

2. ラミニンと肝前駆細胞

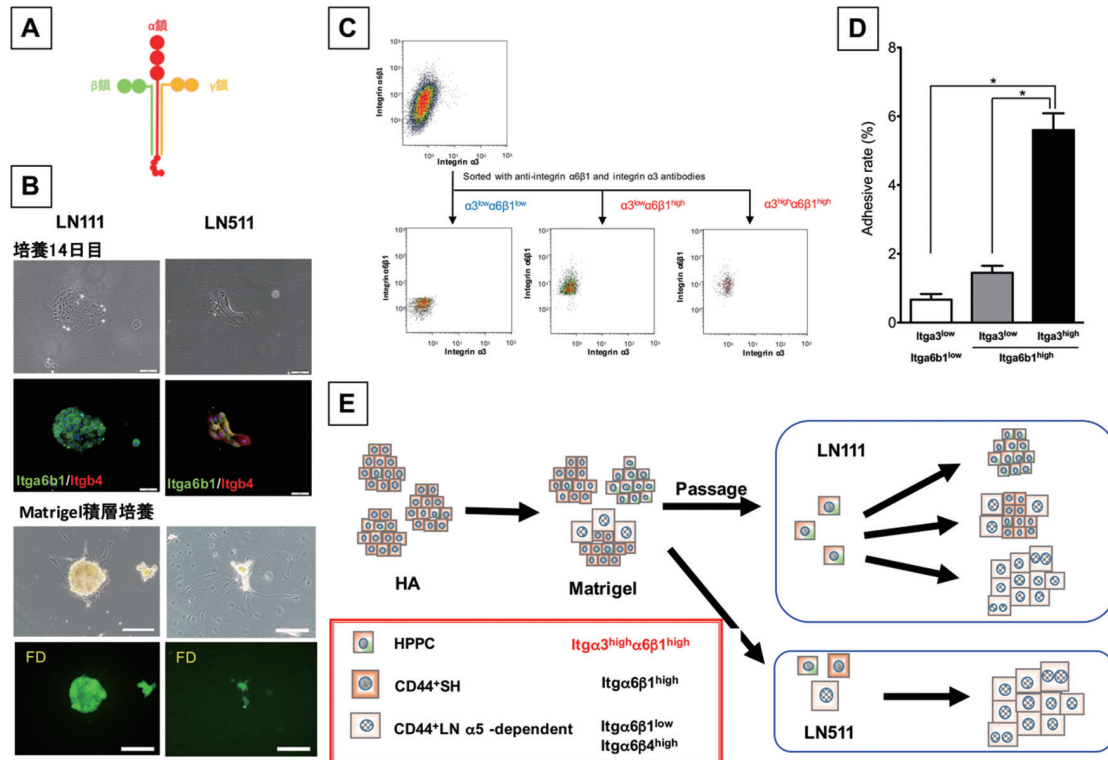
LN は図 A に示すように、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖をそれぞれ1本ずつ持つヘテロ三量体構造をとり α 鎖で5種、 β 鎖で3種、 γ 鎖で3種ある。その組み合わせで19種のアイソフォームが存在する。Matrigelの主成分であるLN111は、 $\alpha 1$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の3つのポリペプチド鎖からなる。また肝臓の主に胆管の基底膜の

主要成分であるLN511は $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖からなる。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する。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 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ が知られている²⁾。Matrigelで継代培養したCD44⁺SHsをLN111及びLN511を塗布した培養皿に播種し、コロニー形成とMatrigel積層培養による成熟化を検討した (図B)。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、Itg $\alpha 6\beta 1$ を発現していた。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った。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 $\alpha 6\beta 1^{low}\alpha 6\beta 4^{high}$ を発現していた。このコロニーを形成する細胞は、Matrigel積層培養しても3次元構造は形成せず、毛細胆管は見られなかった。

3. インテグリンとコロニー形成

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C)、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D)。この結果は、HPPCsがItg $\alpha 6\beta 1^{high}\alpha 3^{high}$ 発現し、LN111上で継代培養が可能であることを示している (図E)。

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った。SHsは未熟細胞が含まれず腫瘍化の懸念はない。また、SHsは肝細胞



- A. ラミニンのアイソフォームの概略図
 B. LN111 と LN511 上でのコロニー形成と Matrigel 積層培養による成熟化
 C. FACS による $Itga6\beta1^{high}\alpha3^{high}$ 細胞, $Itga6\beta1^{high}\alpha3^{low}$ 細胞, $Itga6\beta1^{low}\alpha3^{low}$ 細胞の単離
 D. $Itga6\beta1^{high}\alpha3^{high}$ 細胞, $Itga6\beta1^{high}\alpha3^{low}$ 細胞, $Itga6\beta1^{low}\alpha3^{low}$ 細胞の LN111 上での接着率
 E. LN111 と LN511 上での HPPC 増幅機構の概略図

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 SHs が存在していることが分かっている³⁾。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。

4. 文献

- Ishii M, Kino J, Ichinohe N, Tanimizu N, Ninomiya T, Suzuki H, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatocytic parental progenitor cells of rat small hepatocytes maintain self-renewal capability after long-term culture. *Scientific Reports* 2017; 7:46177. doi: 10.1038/srep46177.

- Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$ and $\alpha6\beta4$ integrins. *Matrix Biol* 2006; 25: 189-197.
- 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.

市戸 義久

略歴

平成 19 年 札幌医科大学大学院卒業

平成 19 年 札幌医科大学医学部

フロンティア医学研究所組織再生学部門 研究生

令和元年度 同研究室助教