

運営している。

また、県内を高速・大容量の光ファイバーで結ぶ情報通信基盤として「広島メイプルネットワーク」を整備し、平成 13 年度から運用しているが、広島・呉・東広島については、「情報トライアングル」として先行的に整備し平成 12 年度に運用開始した。

1-2-4 . サイエンスネットひろしま

平成 10 年 2 月に、研究分野や組織を越えた研究交流組織「サイエンスネットひろしま」が設立され、ホームページの開設を通じて相互の交流や情報の共有化を行うなど、地域の研究者の連携が図られている。

登録会員数約 1, 2 0 0 名

1-3 . 今後の予定

広島県産業科学技術研究所を中心として、組織再生プロジェクトの成果をはじめとする地域の研究シーズ及び人材を活用し、本年度から「知的クラスター創成事業」に取り組むなど、同研究所の地域型 COE としての機能をより充実させるとともに、(財)ひろしま産業振興機構を中心として、広く県内の大学に門戸を開いた「地域型 TLO」の設立を検討し、研究開発を基盤とした地域産業の活性化を図っていきたい。

2 . 新技術・新産業の創出に関する報告

2-1 . 人工肝臓の開発

我が国では、肝疾患による死亡者は毎年 4 万人といわれ、そのうち 60 歳以下の肝移植適応患者は年間約 3,500~5,000 人と見積もられている。その一方で、臓器提供者の不足は深刻な問題となっている。最近、肝細胞移植が、全肝移植までのブリッジや、肝不全の際の代謝補助に有効と考えられている。また、単一遺伝性疾患の中には、本人の肝臓幹細胞に欠損遺伝子を導入し、本人の肝臓に戻す方法が有効と考えられるものもいくつかある。さらに、宿主の肝細胞死の割合が高い特別な状況においては、移植肝細胞が増殖して置き換わることも期待される。しかし、臓器移植と同様、肝細胞移植に用いるための肝細胞の不足は明らかである。また、医薬品開発研究におけるヒト肝細胞の需要は大きく、脳死患者からの移植不適合臓器の研究への利用が禁じられている我が国にとっては、主に米国からの輸入ヒト肝細胞に頼っているのが現状である。しかし、医薬品開発にとって重要な肝細胞の代謝機能は、動物種間のみならず、人種間においても異なることが知られている。したがって、切除肝より得た日本人の少量の肝細胞を増殖させる技術や凍結保存の技術開発が必要とされている。

肝臓は成体においてもなお再生力の強い臓器として知られているが、一旦体の外に取り出し、シャーレの中で培養するとほとんど増殖しないとされてきた。そこで、私達は、ヒトの肝細胞を増殖させる目的で、まずラットの肝細胞を増殖させる技術の開発研究を吉里再生機構プロジェクト (ERATO, JST, 1992-1997)において実施した。その結果、私達はラットの肝細胞がコロニーを形成しながら増殖する培養系を開発した。ラットの肝細胞を私達が開発した HCGM 培地を用いて肝非実質細胞 (NPC) や Swiss 3T3 細胞と混合培養する方法である。この培養系の中で、肝細胞はクローン性に増殖し、大きささまざまなコロニーを

形成したことから、肝細胞の増殖能は不均一であると考えた。このことを確かめるために、肝細胞を低速遠心分離 (50g, 1分) により、比較的サイズの小さい肝細胞 (Small hepatocyte, SH, 直径約 22 μm) と大きい肝細胞 (Parenchymal hepatocytes, PH, 直径約 27 μm) に分離した。それぞれの肝細胞の増殖能を上にした培養系により調べたところ、SH が PH に比べて、約 2 倍高い増殖能を示した。これらのことから、私達は、ラットの肝細胞には増殖能の高い小型の肝細胞が存在することを示した。

広島県組織再生プロジェクトでは、吉里再生機構プロジェクトにおける増殖能が高い小型の肝細胞の研究をさらに発展させた。フェーズ I では、SH 画分からより純度の高い小型の肝細胞 (SH-R3) を FACS (fluorescence-activated cell sorter) を用いて分離する方法を開発した。SH-R3 は直径約 17 μm で自家蛍光と細胞内顆粒密度 (granularity) が共に小さいという性質を持っていた。これらの画分の *in vitro* における増殖能を調べたところ、SH-R3 が他の大型の肝細胞画分 (SH-R2) に比べて、約 4 倍高い増殖能を示した。さらに、*in vitro* で高い増殖能を示した肝細胞が、*in vivo* においても高い増殖能を示すかどうか Laconi らが開発した動物実験モデルを用いて調べた。このモデルは、まずジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPiV) 陰性 (DPPiV-) ラットにレトロロシン (retrorsin) というピロロジンアルカロイドを投与することにより肝細胞特異的に細胞分裂を阻害する。次にそのラットに 2/3 肝部分切除を行い、肝臓に DPPiV+ のラットの正常肝細胞を移植するものである。DPPiV は肝細胞の毛細胆管に発現しているため、DPPiV 酵素抗体染色によりレシピエントとドナーの肝細胞を染め分けることができる。移植したラット肝細胞は分裂を繰り返す、最終的にはドナー肝細胞で置き換わることが示されている。私達は、この肝細胞移植系を用いることにより、移植した肝細胞の *in vivo* における増殖能力を判定した。その結果、SH-R3 の増殖能は SH-R2 に比べて 3~4 倍高いことが明らかとなった。したがって、*in vivo* においても、*in vitro* と同様 SH-R3 が高い増殖能を持つと考えられた。私達は、この約 17 μm の小型の肝細胞は、肝臓において幹細胞的な役割をしており、肝細胞移植などの再生医療に利用できるのではないかと考えている。

フェーズ II では、SH-R3 と SH-R2 を分離し、遺伝子発現の違いを遺伝子差し引き法 (RDA 法) と DNA マイクロアレイにより調べた。その結果、SH-R3 には Cdc2 等の細胞増殖期に関与する遺伝子の発現が高いことがわかった。また、SH-R3 は門脈域に局限している遺伝子の発現が高く、SH-R2 には中心静脈域に局限している遺伝子の発現が高いことがわかった。門脈域と中心静脈域の肝細胞を分離し、それぞれの増殖能を *in vitro* と *in vivo* において比較したところ、*in vitro*、*in vivo* 共門脈域の肝細胞の方が中心静脈域よりも高いことがわかった。門脈域と中心静脈域の肝細胞を FACS により解析したところ、自家蛍光と細胞内顆粒密度が低い SH-R3 は門脈域に観察された。以上のことから、SH-R3 は門脈域に存在しているのではないかと考えられた。したがって、フェーズ II では、SH-R3 の性質と存在場所を明らかにした。

私達は、吉里再生機構プロジェクトにおいて、Swiss 3T3 細胞が肝細胞の増殖を促進することを報告し、Swiss 3T3 細胞の培養上清から肝細胞を増殖させる因子としてプレイオトロフィンと同定した。それまで、プレイオトロフィンの肝臓の再生における役割は知られていなかったため、フェーズ I では、ラットの発生過程と肝再生モデルにおけるプレイオトロフィンの発現様式について明らかにした。フェーズ II では、四塩化炭素により誘発された線維肝において、NPC および前癌病変にプレイオトロフィンの発現が認められた。プレ

イオトロフィン¹は肝臓の発生、再生、線維化、癌化において重要な役割を果たしていると考えられた。

医薬品開発のための薬物代謝試験や毒性試験に利用できる肝細胞キットおよび肝細胞バイオリアクターの開発を行った。肝細胞の機能発現には、間葉系細胞との相互作用と3次元構築が必要と考えた。そこで、吉里再生機構プロジェクトにおいて開発された人工血管代替物としてガーゼを細胞と共に包埋したコラーゲンゲル培養系を用いた。間葉系細胞としてラット肝臓より分離・増殖させた星細胞を用いた。その結果、この培養系で肝細胞のみを培養したときよりも、肝細胞と星細胞を共に培養した時の方が、アルブミン分泌能、糖代謝能、尿素合成能、リドカイン代謝能において優れていた。この培養系を環流培養システムで培養することにより、バイオリアクターの開発をめざした。つり下げ型と傾斜培養を行ったが、培地の流れによる肝細胞の傷害に関して改善の見込みが立たなかったため、この研究に関してはフェーズIで終了した。

最近、ブタの内在性ウイルス感染の危険性から、ハイブリッド型人工肝や細胞移植におけるブタの肝細胞の使用が懸念されている。さらに、ハイブリッド型人工肝や細胞移植の材料として、肝不全患者の肝再生を誘導させるヒトタンパク質の供給が期待されるヒト肝細胞の利用が望ましいと考えられる。また、ヒト肝細胞は、医療および製薬業の領域で大きな可能性と需要が見込まれている。しかし、国内においては移植不適臓器の使用は法律で禁止されているため、主に米国からの輸入に頼っている。新薬開発における薬物代謝試験に日本人の肝細胞を使用出来れば、日本人にあった新薬の開発や、日本人への適切な投薬量を予測することができる。このような理由から、ヒト肝細胞の凍結保存法の確立が必要とされてきた。吉里再生機構プロジェクトでは、切除肝に含まれる正常肝組織からヒト肝細胞を効率良く分離する方法を確立した。フェーズIでは、倉敷紡績株式会社と共同研究でヒト肝細胞凍結保存法の確立を行った。フェーズIIでは、凍結融解したヒト肝細胞がハイブリッド型人工肝や薬物代謝試験に利用できるかどうか、ヒト新鮮肝細胞とヒト凍結融解肝細胞の機能を比較した。その結果、適切な凍結保存液とプログラムフリーザーを用いても、凍結融解操作後の生存肝細胞の数が凍結前に比べて半分に減少することから、凍結方法の根本的な改良が必要と考えられた。しかしながら、生き残った肝細胞のアルブミン分泌量、アンモニア代謝能、リドカイン代謝能において、新鮮肝細胞と凍結融解肝細胞の間に大きな差はなかった。したがって、今後、長崎大学との共同研究で、凍結保存ヒト肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝の臨床応用をめざす予定。

吉里再生機構プロジェクトにおいて、私達はヒトSHとヒトNPCの混合培養系でヒトSHがコロニーを形成しながら増殖する培地を開発し、ヒトの肝細胞の中にもラットと同様な増殖能が高いSHが存在することを示した。フェーズIではこの技術をさらに改良して、コロニーを形成しながら増殖する肝細胞を継代培養する技術を開発した。この肝細胞は増殖期では胆管上皮細胞と肝細胞のマーカーを発現しているが、細胞密度が高くなると、胆管上皮細胞のマーカーは消失し成熟肝細胞のマーカーを発現した。私達は、この培養ヒト肝細胞は、増殖能が高く二方向に分化する能力がある肝臓の幹細胞様の細胞ではないかと考えている。フェーズIIでは、この継代培養肝細胞を抗原として、増殖性肝細胞表面を認識するモノクローナル抗体を作製した。この抗体を用いることにより、肝細胞の中からコロニーを形成する増殖性肝細胞のみを分離することが可能となった。現在、この抗体の抗原蛋白を同定しようと試みている。

ドナーが子供の場合、増殖性肝細胞は 6-7 回継代できるが、60 才以上の場合は 3-4 回継代した後増殖が停止し senescence な状態となる。この現象と同時期に肝細胞のテロメラーゼ活性が低下することから、細胞の老化と関係しているのではないかと考えた。そこで、フェーズ II では、継代培養肝細胞に hTERT 遺伝子を導入することにより、肝細胞の延命化を試みた。その結果、テロメラーゼ活性が増加し、20 回以上の継代が可能となった。この肝細胞は将来的に、肝細胞キットやバイオリアクターに利用できるのではないかと考えている。

上に示した *in vitro* でヒト肝細胞を増殖させる方法に加えて、*in vivo* でヒト肝細胞を増殖させる方法として、ヒト肝細胞キメラマウスの開発を行った。Dandri らは、uPA マウスと免疫不全の性質を持つノックアウトマウス Rag2 マウスを掛け合わせ、uPA/Rag2 マウスを作製した。uPA (+/-) /Rag2 マウスにヒト肝細胞を移植し、このマウスへの B 型肝炎ウイルスの感染に成功した。また、最近、Mercer らは、uPA/SCID (重症免疫不全症) マウスを作製し、ヒト肝細胞を移植した。彼らは、このマウスへの C 型肝炎ウイルスの感染に成功した。しかしながら、彼らの移植実験では、ヒト肝細胞による置換率は最高で 15~50%程度であった。私達はマウスの肝臓のほとんどがヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスを作製するために、Mercer らと同じく uPA/SCID マウスを用いた。フェーズ I では、uPA マウスと SCID マウスの掛け合わせ実験を広島大学医学部附属動物実験施設に委託した。フェーズ II で uPA/SCID マウスが完成し、uPA/SCID マウスの維持・広島県組織再生プロジェクトへの供給を広島大学医学部附属動物実験施設に委託した。uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植後、補体抑制剤をマウスに投与することによりマウス肝臓の約 90%がヒト肝細胞で置換したキメラマウスを作製することに成功した。マウスに移植した 5×10^5 個のヒト肝細胞が、移植後 50 日で約 100 倍に増殖したと考えられた。キメラマウスの肝臓よりヒト肝細胞を分離しさらに 100 匹の uPA/SCID マウスに移植すると、最初の移植から 100 日で約 10,000 倍に増えるという計算になる。キメラマウスより分離した肝細胞からヒト肝細胞のみを選択するために、ヒト肝細胞表面を認識しマウス肝細胞表面を認識しないマウスモノクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて、分離直後純度 80%であったヒト肝細胞を 96%に濃縮することが可能であった。また、キメラマウスの肝臓、およびキメラマウスから分離した肝細胞は、ヒト型 P450 の分子種を発現していた。このキメラマウスおよびキメラマウスにより増殖させたヒト肝細胞は、医薬品開発研究における薬物代謝試験や毒性試験の材料として利用できるのではないかと考えている。

肝星細胞が、何らの刺激により活性化され、多くのコラーゲン等の ECM を合成・分泌することにより、肝臓の線維化が進むと考えられている。フェーズ II で、私達はプロテオームグループと共同でラット活性化星細胞に特異的な新規な蛋白として、STAP (stellate cell activated protein)を同定した。ラット STAP の発現は、*in vivo* や *in vitro* で活性化した肝星細胞において増加した。肝臓において STAP の mRNA およびタンパク質の発現は肝星細胞に見られ、Thioacetamide により誘導した傷害肝において発現量は増加した。またヒト STAP cDNA を RT-PCR によりクローニングした。ヒト STAP は正常なヒト肝臓において肝星細胞に発現するが、C 型肝炎や自己免疫性肝炎の肝臓においては発現量は増加せず、ラットとヒトにおいて発現パターンが異なることが明らかになった。大腸菌によりラットおよびヒト組み換え STAP タンパク質を生産したところ、STAP はヘムタンパク質で、過酸化水素やリノール酸過酸化物に対してパーオキシダーゼ活性を示した。過酸化物は肝星細胞の活

性化を引き起こす原因分子であり、STAPは肝臓において過酸化物のスカベンジャーとして、抗肝線維化分子として機能していることが推定される。現在、STAPの *in vivo* における役割を明らかにするために、STAPトランスジェニックマウスの作製を行っている。

フェーズ I、フェーズ II では、ラットの小型肝細胞の性質を明らかにし、*in vitro* でヒト肝細胞を継代培養する方法を確立した。また、マウス肝臓でヒトの肝細胞を生着・増殖させ、本来の肝臓をヒトの肝細胞によって置換する技術に世界に先がけて成功した。このヒト肝細胞キメラマウスで増殖させたヒト肝細胞は、機能面ではマウスの生存を維持していることから、各種肝機能を喪失することなく保持していると考えられる。また、ヒト特異的な薬物代謝酵素の発現も認められている。このことから、このキメラマウスやキメラマウスから分離したヒト肝細胞は薬物代謝試験、毒性試験などの産業用に充分有効であるといえる。特に人種差が指摘されている薬の有効性や体内動態に関して、日本人の肝細胞を使用することで、従来なかった日本人専用の試験系を確立できる大きな利点がある。また、生きたヒトの肝細胞にしか感染しない肝炎ウイルスなど、従来は研究すらできなかった領域での新薬開発における実験需要にも答えられる。

フェーズ III においては、キメラマウスの改良研究、キメララットの開発、およびヒト培養肝細胞のキット化の研究を知的クラスター創生事業により実施する。また、製薬企業や大学にキメラマウスの供給を行う株式会社ヘパトフェニックスを設立する予定である。この企業はこれらの技術革新を基に新たなバイオ産業創出を目指す。

2-2．組換えヒトコラーゲン生産系の開発

コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する代表的タンパク質であり、生体のタンパク質の約 1/3 を占める程多量に存在する。特に真皮、腱、骨等には高い割合で存在し、これらの組織や器官の構造を維持する機能を担っている。また、細胞にとっては、その足場となるタンパク質であり、さらに細胞の移動、増殖、分化等を制御する機能も有している。このような機能をもったコラーゲンは、正常組織においてはもちろんのこと、損傷した組織が修復・再生する際にも重要な役割を果たしている。またコラーゲンは、バイオマテリアルとして見た場合、優れた強度と高い組織適合性をもつことから極めて有用であり、医療分野等において広く利用されている。特に再生医療においては、人工組織を構築するための生物由来素材として必要不可欠なタンパク質である。しかし、現在用いられているコラーゲンの大部分は、ウシの真皮等から抽出した動物組織に由来するものであり、ヒトに移植した場合、アレルギー反応を引き起こす危険性や、動物由来の病原体が混入する危険性が指摘されている。特に狂牛病の病原体であり、ヒトに感染した場合クロイツフェルト・ヤコブ病を引き起こす異常プリオン混入の危険は近年非常に大きな問題となっている。従って、抗原性がなく病原体混入の危険性のない安全なコラーゲンを安価に生産することが可能な組換えヒトコラーゲン生産系を開発することは、社会的に極めて重要な意味をもちつつある。

海外では組換えヒトコラーゲンの大量生産を目指す幾つかのベンチャー企業が設立されている。アメリカの Fibrogen Inc. は酵母を、Cohesion Inc. はトランスジェニック動物（ウシ）を、またフランスの Meristem therapeutics はトランスジェニック植物をそれぞれ宿主系に用い開発を進めている。この中で最も実用化に近い段階まで開発が進んでいるのは酵母を用いた Fibrogen のシステムである。しかし、このシステムでは、コラーゲンは菌体内に合成