

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09354

研究課題名(和文) 肝細胞キメラマウス作製系における移植肝細胞モニタリングとGVHD応答の解析

研究課題名(英文) Monitoring of transplanted hepatocytes and analysis of immune rejection responses in the hepatocyte chimeric mouse system.

研究代表者

石川 哲也 (Ishikawa, Tetsuya)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授

研究者番号：10288508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞あるいは幹細胞由来肝様細胞移植治療のモデルとして肝細胞キメラマウス作製系を確立した。ヒト単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼを肝細胞で発現するトランスジェニックマウス、HSVtkではガンシクロビル(GCV)投与により自己肝細胞が死滅し、他家の肝細胞移植が可能となる。GCV投与後のHSVtkに対するアロ肝細胞移植では強い拒絶応答により全ての細胞が排除された。外来抗原を発現する同系肝細胞移植では、生着はしたが移植細胞周囲に炎症細胞浸潤を認め、外来抗原に対する細胞性免疫応答が確認された。肝細胞キメラマウス作製系は、細胞移植時の免疫拒絶の機序の解明、治療法構築への有用なモデルとなり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症な急性・慢性肝不全に対する治療として、生体肝移植、脳死肝移植が実施されているものの、ドナーの絶対的な不足により、適応症例に対しても治療の提供が困難な状況が続いている。肝細胞あるいは幹細胞由来肝様細胞の移植治療はこの状況を改善し得る有力な治療法と考えられるが、その有用性を検証できる動物モデルは確立されていない。本研究で用いた肝細胞キメラマウス作製系は、そのモデルとなり得るとともに、他家由来肝細胞移植に伴う免疫拒絶の病態解明、それに対する治療法確立のための有用なモデルともなり得る。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte-chimera mouse system was established as a model for the cell transplantation treatment with hepatocytes or stem cell-derived cells. In the transgenic mice, HSVtk that express the thymidine kinase of human herpes simplex virus in their hepatocytes, administration of ganciclovir (GCV) kills autologous hepatocytes, enabling transplantation of hepatocytes of other origin. In the case of allogeneic hepatocyte transplantation into HSVtk, all the transplanted cells were eliminated by a strong immune-rejection response. In the case of syngeneic hepatocytes expressing foreign antigens, efficient engraftment of transplanted cells was observed, while inflammatory cells infiltration around the engrafted cells and cellular immune response to the foreign antigens were confirmed. The hepatocyte-chimeric mouse system can be a useful model for elucidating the mechanism of immune rejection in the cell transplantation in the liver and for studying a therapeutic method for immune rejection.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞キメラマウス 細胞移植 免疫拒絶 肝不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

劇症肝不全においては肝移植が単独で予後を改善する唯一の治療法であるが、脳死移植でのドナー不足、生体移植での倫理的問題などにより一般的な治療とはなり得ていない。また、末期の非代償性肝硬変においても肝移植を巡る状況は同様である。このような現状に対して、実験段階ではあるものの、体性幹細胞、iPS 細胞から肝様細胞を誘導し、それらを移植に用いる細胞移植、iPS 細胞から分化させた肝様細胞に血管内皮細胞、間葉系細胞を加えてミニ肝臓 (liver bud) を構成し、それを用いるミニ臓器移植などが検討されている。

肝臓は恒常的に多様な食餌性抗原、微生物由来抗原に曝されており、それらの外来抗原に対して過剰な免疫応答を起こさぬように抑制的な免疫環境が構築されている。実際に、肝移植では、他の臓器移植とは異なり、MHC が異なる場合でも移植片に対する免疫寛容が誘導されることが実験的に証明されており、臨床においても MHC の一致率は予後との相関がみられない。しかし、移植片に対する実際の免疫拒絶の程度と経過、免疫寛容誘導機構の詳細はまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

ヒト肝細胞キメラマウスモデルの確立により、肝組織の骨格が維持されていれば、移植した肝細胞は効率よく生着し活発な増殖を示すことが明らかになった。肝臓は細胞移植などによる再生医療のよい標的臓器であり、iPS 細胞、体性幹細胞を分化させた肝様細胞移植、ミニ肝臓 (liver bud) 移植などが検討されている。しかし、現在の実験系のほとんどは重度の免疫不全マウスにヒト肝様細胞を移植する異種移植系であり、移植時の免疫拒絶などの解析は困難である。また、臨床的には、多くが障害肝における移植となることも十分に考慮されていない。本研究においては、免疫不全を伴わない新たな肝細胞キメラマウス作製系を用い、移植後細胞のモニタリングを行うとともに、移植効率と免疫拒絶、背景肝に存在する炎症との関連を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

HSVtk-tg (アルブミン・プロモーター制御下に単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を発現するトランスジェニックマウス、ガンシクロビル (GCV) 投与により自己肝細胞が死滅し、移植肝細胞の生着が可能となる、遺伝的背景は C57BL/6 あるいは Balb/c、免疫系は正常) を用いた肝細胞キメラマウス作製系を確立し、移植後マウス肝細胞のモニタリング、免疫拒絶の詳細についての解析を行った。

### (1) HSVtk-tg の作製

TK-NOG マウス (H-2b) を野生型マウス (C57BL/6, H-2b; Balb/c, H-2d) に 9-10 世代戻し交配し、正常な免疫機構を持つ HSVtk-tg を作製した (TK-NOG と C57BL/6、Balb/c との F1 が実験動物中央研究所より供与された)。

### (2) 同系 (auto)・異系 (allo) 肝細胞移植時の生着・増殖効率の評価

GCV 投与後の HSVtk-tg (C57BL/6 あるいは Balb/c バックグラウンド) に GFP トランスジェニックマウス (GFP-tg, C57BL/6 バックグラウンド) より分離した肝細胞を移植し、体重、ALT 値を経時的に測定、移植後 2 週、4 週、8 週に移植肝細胞の生着率 (GFP 陽性肝細胞比率) 組織像、肝組織中の mRNA 発現 (サイトカイン、細胞表面抗原など)、レシピエントマウスとドナー側マウスの脾細胞を用いた MLR を実施した。

## 4. 研究成果

(1) GCV 投与後の HSVtk-tg への肝細胞移植後の体重、血液生化学検査の経時的変化  
GFP-tg 由来肝細胞を移植した C57BL/6 バックグラウンドを有する HSVtk マウス (auto モデル) および GFP-tg 由来肝細胞を移植した Balb/c バックグラウンドを有する HSVtk マウス (allo モデル) において移植後 8~11 週目まで体重、血液生化学検査データを経時的に測定した。Auto モデルでは移植後 4 週で体重の増加傾向を認めしたが、allo モデルでは変化を認めなかった。ALT 値は auto モデルで正常値レベルまで低下したが、allo モデルでは ALT 値の高値が持続した。

### (2) 移植後の組織像と肝細胞置換率

移植後 4 または 8~11 週のマウスにおいて、肝組織像を評価した。Auto モデルでは、GFP 陽性肝細胞の比率は、移植後 4 週で 24.1%、8 週で 48.7% であった。やや小型の肝細胞の集簇を認めるものの、肝細胞の形状はほぼ正常であった。しかし、GFP 陽性肝細胞に隣接した領域に散在する軽度の炎症細胞浸潤も認めた。Allo モデルでは、移植後 4 週でも GFP 陽性肝細胞は認めなかった。また、肝細胞は核、細胞質ともにやや腫大し胞体は好酸性を呈していた。肝細胞移植を実施しなかった sham モデルと類似した組織像であったが、allo モデルでは炎症細胞の浸潤がより高度であり、さらに大血管に隣接してやや広範な線維化

領域が観察された。

(3) 肝組織におけるサイトカイン及び細胞表面抗原の mRNA 発現解析

リアルタイム PCR 法により、auto、allo モデル及び Sham モデルにおいて、8~11 週時点での肝内 mRNA の発現パターンを解析した。Auto モデルでは、IL-6、IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインの mRNA 発現は Sham モデルと比較してやや減少していたが、両モデル間の差は明白ではなかった。一方、allo モデルでは、炎症性サイトカインの発現は auto 及び sham モデルと比較しても高い傾向を認めた。細胞表面抗原の mRNA 発現の解析では、CD11b、CD11c が auto モデルにおいて allo 及び sham モデルより低下していた。Auto モデルでは他の細胞表面抗原の発現も allo 及び sham モデルと比較して低い傾向を認めた。

(4) MLR (混合リンパ球反応) による allo 及び抗原特異的免疫応答の解析

Allo モデル (レシピエント) から分離した脾細胞をエフェクター細胞として、C57BL/6 及び GFP-tg (C57BL/6 バックグラウンド) から分離した脾細胞 (MMC 処理) に対する増殖反応を解析した。Allo モデル脾細胞は、C57BL/6、GFP-tg 脾細胞に対して強い増殖反応を認めたが、GFP-tg 脾細胞に対する増殖反応がより強い傾向を認めた。MLR を行った細胞を回収し、炎症性サイトカインの mRNA 発現を qRT-PCR により評価したところ、エフェクター細胞 (allo モデル) の IFN- $\gamma$  産生が亢進していることが確認された。

結論：肝障害に対する細胞移植治療のモデルを確立した。肝細胞移植時の免疫拒絶を評価するのに適当なモデルであり、免疫拒絶に対する治療モデルへの展開を検討している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (ア) Okumura H, Nanizawa E, Nakanishi A, Yukawa H, Hashita T, Iwao T, Baba Y, Ishikawa T, Matsunaga T. Effective transplantation of 2D and 3D cultured hepatocyte spheroids confirmed by quantum dot imaging. *Advanced Biosystems*. 査読有, 2:1800137, 2018.
- (イ) Yukawa H, Suzuki K, Aoki K, Arimoto T, Yasui T, Kaji N, Ishikawa T, Ochiya T, Baba. Imaging of angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by uptake of exosomes secreted from hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep*. 査読有, 8:6765, 2018.
- (ウ) Ogihara Y, Yukawa H, Kameyama T, Nishi H, Onoshima D, Ishikawa T, Torimoto T, Baba Y. Labeling and in vivo visualization of transplanted adipose tissue-derived stem cells with safe cadmium-free aqueous ZnS coating of ZnS-AgInS<sub>2</sub> nanoparticles. *Sci Rep*. 査読有, 7:40047, 2017.
- (エ) Yoshizumi Y, Yukawa H, Iwaki R, Fujinaka S, Kanou A, Kanou Y, Yamada T, Nakagawa N, Ohara T, Nakagiri K, Ogihara Y, Tsutsui Y, Hayashi Y, Ishigami M, Baba Y, Ishikawa T. Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells on concanavalin A-induced acute liver injury in mice. *Cell Med*. 査読有, 9:21-33, 2016.
- (オ) Ogiso H, Ito H, Ando T, Arioka Y, Kanbe A, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Hara A, Moriwaki M, Shimizu M, Seishima M. The deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates the CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *PLoS ONE*. 査読有, 11: e0162183, 2016.
- (カ) Zaitzu K, Hayashi Y, Murata T, Ohara T, Nakagiri K, Kusano M, Nakajima H, Nakajima T, Ishikawa T, Tsuchihashi H, Ishii A. Intact endogenous metabolite analysis of mice liver by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its preliminary application to in vivo real-time analysis. *Anal Chem*. 査読有, 88:3556-61, 2016.

### 〔学会発表〕(計 11 件)

- 山本万智、名仁澤英里、今井田藍、山崎花那子、園玲華、玉置優貴、宮下凜太郎、林由美、石川哲也。マウス肝障害モデルにおけるトロンボモジュリン遺伝子導入脂肪由来肝細胞の炎症軽減効果について。第 65 回日本臨床検査医学会学術集会。2018.11.17。(東京)
- 林由美、財津桂、村田匡、土橋均、石井晃、緒方是嗣、石川哲也。探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (PESI/MS/MS) を用いた in vivo リアルタイム・モニタリングシステムの構築。第 43 回日本医用マスペクトル学会年会。2018.9.6。(札幌)
- 名仁澤英里、林由美、湯川博、石川哲也。iPS 細胞由来肝様細胞に対する量子ドット

を用いたラベル化手法の確立と移植後の in vivo イメージング. 第 39 回日本炎症・再生医学会. 2018.7.11. (東京)

湯川博、佐藤和秀、有本知子、小野島大介、石川哲也、馬場嘉信. 量子ドットイメージング技術を用いた移植幹細胞と免疫細胞の interaction 機構解明. 第 17 回日本再生医療学会総会. 2018.3.23. (横浜)

Hayashi Y, Zaitzu K, Murata T, Baba S, Ohara T, Moreau S, Kusano K, Nakajima H, Tanihata H, Tsuchihashi H, Ishii A, Ishikawa T. High-throughput Intact Metabolome Analysis of Mouse Biological Specimens by Probe Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry (PESI/MS/MS). 65th Conference of American Society for Mass Spectrometry. 2017.6.4-8. (Indianapolis, U.S.A.)

湯川博、吉住寧真、有本知子、石川哲也、馬場嘉信. 量子ドットによる移植幹細胞 in vivo 蛍光リアルタイムイメージング. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017.3.7. (仙台)

奥村啓樹、名仁澤英里、中西杏菜、坂下真大、湯川博、馬場嘉信、石川哲也、松永民秀. 量子ドットを用いた移植肝細胞の蛍光イメージング. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.11.28-30. (横浜)

名仁澤英里、湯川博、荻原裕祐、平野文香、林由美、齋藤弘明、加藤一郎、石川哲也、馬場嘉信. 新規磁性ナノ粒子による幹細胞 in vivo イメージング技術の確立. 第 40 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会. 2016.9.10. (名古屋)

Hayashi Y, Zaitzu K, Murata T, Nakajima H, Kusano M, Tsuchihashi H, Ishii A, Ishikawa T. Intact metabolome analysis of mice biological tissues by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS) and its application to real-time analysis. Royal Society of Chemistry Tokyo International Conference 2016. 2016.9.9. (千葉)

湯川博、石川哲也、馬場嘉信. 量子ドットによる高効率幹細胞ラベリング手法の構築. 第 37 回日本炎症・再生医学会. 2016.6.17. (京都)

名仁澤英里、吉住寧真、平野文香、林由美、湯川博、馬場嘉信、石川哲也. マウス急性肝障害モデルにおける脂肪由来幹細胞移植後の生体内動態解析. 第 37 回日本炎症・再生医学会. 2016.6.17. (京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

伊藤 弘康 (ITO, Hiroyasu)

岐阜大学大学院・医学系研究科・准教授

研究者番号：80373075

### (2)研究協力者

湯川 博 (YUKAWA, Hiroshi)

松永 民秀 (MATSUNAGA, Tamihide)

末水 洋志 (SUEMIZU, Hiroshi)

林 由美 (HAYASHI Yumi)