

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02991

研究課題名(和文) 神経血管ネットワークを有するヒトiPS細胞由来高次肝組織の生体内での再構築

研究課題名(英文) In vivo reconstruction of human iPS cell-derived human three dimensional hepatic tissue with neurovascular network

研究代表者

小池 直人 (Koike, Naoto)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：50301081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：胆管、血管、神経が伴走する肝の門脈域を構築するため、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞からなる肝芽を、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞より作成した神経線維の上に添加し培養した。その結果、門脈域の細胆管を思わせる神経線維に伴走した突起形成が肝芽に出現した。しかし、蛍光胆汁酸アナログによる毛細胆管の確認や、胆管、肝細胞マーカーの標識で、この突起は神経線維に伴走するヒト型の肝細胞索と思われた。これをマウスクラニアルウィンドウ内に移植すると、宿主からの血流を有し、長期生存する微小肝組織が観察された。以上より、神経線維がヒト型の肝実質の形態形成や、その維持に有用であることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内の自律神経は糖代謝、サーカジアンリズム等に関与する他、肝血流や肝再生に関与しているとも言われている。しかし、神経系の肝発生に関する意義ははっきりしていない。今回の研究で神経線維が肝細胞索などの肝実質の形態、及び生体内でその維持に関与している可能性を示唆する新たな知見を得ることができた。今回の方法でできた神経線維を有するヒト型高次肝組織は、創薬における極めて有用なプラットフォームとなる可能性がある。更にこのモデルが生体内で成熟し長期安定化できれば、肝疾患に対する再生医療に利用可能であり、本研究の究極の目的である絶対的に不足している移植臓器に取って代わる革新的な医療技術となりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：The liver buds prepared from human iPS cell (hiPSC)-derived hepatic progenitor cells, vascular endothelial cells, and mesenchymal stem cell, were cultured on nerve fibers obtained from hiPSC derived neural stem cells in order to regenerate a micro-hepatic tissue having a portal area consisting of bile ducts, vessels and nerves. In the result, protrusions accompanied by nerve fibers reminiscent of bile canaliculi in the portal area appeared in the liver bud. However, confirmation of bile canaliculus using fluorescent bile acid analogs and labeling of cholangiocyte and hepatocyte markers suggested that these protrusions were human-type hepatic cords accompanying nerve fibers. This construct generated microscopic hepatic tissue with blood flow from host after transplant into the mouse cranial window, and this tissue survived for a long time. In conclusion, nerve fibers suspected to be play important roles for the morphogenesis of human-type liver parenchyma and its maintenance.

研究分野：肝胆道外科

キーワード：高次肝組織 神経 血管 門脈域 ヒトiPS細胞 肝細胞索

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マサチューセッツ総合病院放射線治療科において、マウスCranial Window (CW)モデル(頭蓋骨の一部を外科的に除去し、ガラス板を介して頭蓋内部をライブ観察するための手法)を用いて血管新生の過程をライブ観察・評価する技術を学んできた。そして、このCW内にHuman umbilical vein endothelial cell (HUVEC)とマウス間葉系前駆細胞であるC3H10T1/2細胞を3次元共培養したフィブロネクチンコラーゲンゲルの微小片を移植することにより、宿主の循環系と交通し、血流を有する3次元血管網の開発に成功しNature誌に発表した(Koike N, et al; Nature 428: 138-9, 2004)。この技術を基盤とし、当研究室では、その後マウス間葉系細胞をhuman mesenchymal stem cell (hMSC)に変え、更に、肝細胞に分化させたhuman induced pluripotent stem cells (hiPSC)-肝細胞 (hiPSC-HE)を加え、肝芽(liver bud (LB))を*in vitro*で作成し、これをマウスに移植したところ、血管網を有し、良好な機能を有するヒト型微小肝組織を生体内で再構築することに成功し、再びNature誌に発表した(Takebe T, et al; Nature 499: 481-3, 2013)。その後、微小肝組織を構築するための細胞のソースをhiPSCから作成した肝細胞(hiPSC-HE)以外に、内皮細胞(hiPSC-EC)、間葉系幹細胞(hiPSC-MSC)とともにhiPSC由来のものを使用した肝組織を作成した。しかし、この間、肝外に胆汁を導出する胆管を再現することはできなかった。肝細胞索を構成する毛細胆管からつながる正常の細胆管や小葉間胆管が存在するのは動脈、門脈、胆管からなる門脈域である。この中には、動脈、門脈、胆管以外に豊富な自律神経が含まれる。臓器発生において血管と神経のクロストークが非常に重要と考えられているが、これまでのモデルではこの神経細胞が欠落していた。肝内の自律神経は糖代謝、サーカジアンリズム、食欲に参与するほか、肝血流や肝再生に参与しているといわれている。しかし、神経の肝発生に関する意義ははっきりしない。肝の再生医療において肝組織を構築するための要素として神経細胞を用いる事はこれまで報告がなかった。

2. 研究の目的

日本には40万人にも及ぶ肝硬変患者がいる。肝硬変は慢性肝炎の終末像であり、肝不全の際には肝移植が唯一の治療方法である。現在、慢性的なドナー不足で、肝移植の待機中に死亡する患者数が、移植先進国の米国でも、年間約2000人という現状である。肝臓のような大型臓器を再構成する試みを達成するためには、その前段階として、血管網を有する微小組織の再生研究が必要となる。これまで、hiPSC-HE、EC、MSCから宿主からの血流を有する微小肝組織を生体内に構築することができたが、この肝組織から胆汁を導出する胆道を構築する事はできなかった。本研究では神経に焦点をあて、hiPSCより新たに神経幹細胞(hiPSC-NCC)を作成し、ここから分化させたneural progenitor cell(NPC)をhiPSC-HE、EC、MSCから成るLBに作用させ、胆管を含んだ門脈域を構築し、宿主からの血流を有し胆汁分泌の観察が可能な長期安定なヒト型微小肝組織の生体内での再構成を目指した。本研究で構築された高次肝組織が成熟し長期安定化できれば、本技術は肝疾患に対する再生医療に利用可能である。また、この肝組織は全てhiPSCから作成する事により、安定した品質管理が容易となり、本研究の究極の目的である、絶対的に不足している移植臓器に取って代わる革新的な医療技術となりうると思われる。さらに、肝臓の構築過程をライブ観察する技術は、それのみにとどまらず、肝硬変にいたる恐れのある慢性肝炎に対する線維化抑制を目的とした創薬のプラットフォームとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*での微小肝組織の再構築: LBはこれまでの先行研究同様作成した。肝組織と神経との間に、産生物質や接触による相互作用があるか確認するために、まず、図1AのごとくNPCの塊の横にいくつかのLBをfusionして大きく作ったfLBを添加し、fLBからNPCへ肝組織が、逆にNPC塊からfLBへ神経線維(nerve fiber (NF))が伸展するか観察した。次に先に行ったマウスの肝組織発生における神経系の評価で得た知見(Koike N et al. World J Hepatol; 14:2022)で、神経が肝発生の途中で肝門部から肝の末梢に向かって発育伸展する事を考慮し、Bのごとく、NPC塊から伸展したNFの上に複数のLBを添加培養した。コントロールとしてNPCのないものを同様に作成した。先行研究同様、生体蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡で観察できる様、各細胞

に viral vector で GFP、Kusabira orange(KO)等の蛍光色素を遺伝子導入した。

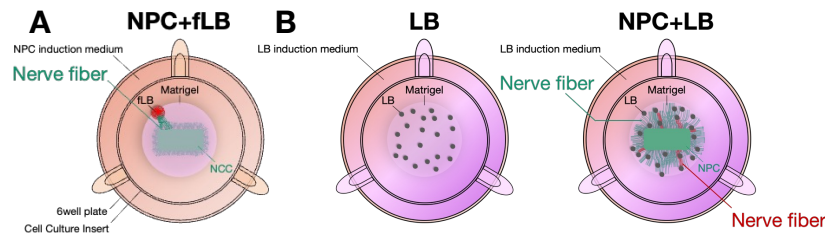


図1 神経系を有する肝組織培養法

(2) 生体内での微小肝組織構築過程のライブ観察:(1)B法で共培養後3日目の肝組織をNPCの塊と共にスキパンチで切り取り、マウスのCW内に移植した。これにより、これまで我々が観察を行ってきたヒト型肝組織とその血管網の再構築過程のみならず、微小胆管周囲に伴走するはずである神経血管網の構築過程をレーザー顕微鏡下で経時的に観察し、NPCを加えていない群との肝組織構築を比較した。最終的に組織のサンプリングを行い、in vivo imagingの結果を組織でも再評価した。

(3) 胆汁分泌の観察:肝細胞で代謝された産物が胆管構造に流れるか確認するため、まず谷水らのプロトコール(Tanimizu N et al. Nat Commun; 12: 2021)を用いて、vitroで構築された肝組織の培地中に蛍光胆汁酸アナログcholyly-lysine fluorescein (CLF)を添加培養後、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡でCLFの輸送を画像化定量した。CW中に移植した肝組織に対しても、肝組織がCW内で宿主との血流を獲得したのちに、カバーガラスを外し、CLFを一定時間暴露させた後、カバーガラスで再度密閉し、レーザー顕微鏡でCLFの流れを確認した。vitro、vivo共にNPCを加えた群と加えない群とで胆管網の形成の程度を比較検討した。

(4) 構築組織の組織標本による検討: vitro各ポイント、vivoでは移植後21日目で組織を固定し、パラフィン包埋薄切組織標本を作成した。ヘマトキシリンエオジン染色による組織の形態を確認すると共に、神経、血管、肝細胞、胆管系のマーカーの免疫染色を行い、構築された高次肝組織の成り立ちを評価した。

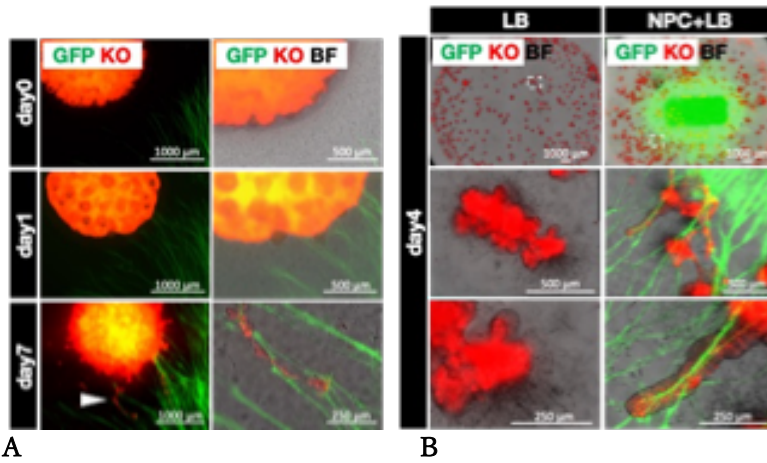
文献的に肝内の神経は交感神経が主体であることが報告されている。今回作成したNPCはPCRで自律神経マーカーPHOX2A, PHOX2Bが共に陽性、交感神経系マーカーtyrosine hydroxylase (TH)、副交感神経系マーカーcholine acetyltransferase (ChAT)も共に陽性であることがわかっている。図1Bのごとく、NPC塊から伸展したNFの上にLBを添加培養したが、LBを添加した後は培地を神経培地から肝芽用培地に変更したので、特に神経に関しては自律神経の性質が変化しないか交感、副交感神経マーカーを各ポイントで免疫染色を用い評価した。

(5) 神経幹細胞を加えた高次肝組織の分化度や肝機能の評価と神経線維の特性評価: NPCを加えた群と加えていない群とで、培養上清を用いて、アンモニアクリアランス、ヒトアルブミン(ALB)、フィブリノーゲン(Fib)、 $\alpha 1$ アンチトリプシン(A1AT)等の産生量を比較し、肝機能の評価した。構築された肝組織の蛍光標識細胞をFACSで分離後、肝細胞の分化度のマーカーであるAFPやCYP3A7の遺伝子量を定量的PCRで比較した。また、肝細胞の増殖因子Hepatocyte growth factor (HGF)、神経の成長に重要なnerve growth factor (NGF)とbrain-derived neurotrophic factor (BDGF)の培養上清中の量も比較した。

4. 研究成果

(1) vitroでの微小肝組織の再構築:

図1AのごとくNFのないNPCの塊の横にLBを添加、共培養した結果、時間経過と共に図2AのようにNPCからNFがfLBに向かって伸長し、fLBと接触後、LBからHEがNFに沿って伸長する様子が確認された。また、NF上にLBを多数播種した培養系B(図2B)では、LBがNFとの接触後、LB内のHE+MSCがNFに沿って伸長し、一部ではLB間を繋ぐような像が見られた。このHEは蛍光免疫染色するとCK19陽性で、この時点ではHEから細胆管が構築されたかと思われた。また、我々はECがMSCと3D共培養することにより長期安定した密度の高い血管網を構築したことを報告してきたが、今回も、図3のごとくNPCを加えることにより、更に血管総長が延長し、血管再生に神経も関与すると思われた。しかし、LBから伸展したHEと伴走する所見は僅かで、基本的に門脈域の血管と異なりHEと関連なく伸長していた。



A B
 図 2 LB と nerve との相互作用 GFP: NPC, KO: hiPSC-HE, BF: MSC

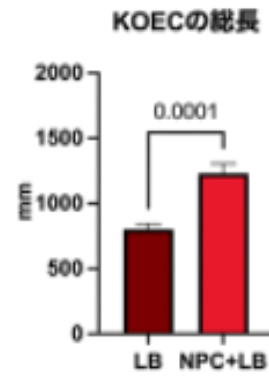


図 3 総血管長

(2) 生体内での微小肝組織構築過程のライブ観察：

今回 EPC の塊と共に CW 内に移植した LB は、先行研究と同様に移植後 3 日程度で Rhodamin-dextran で血流を可視化すると、hiPSC-EC からなる微小血管網に宿主よりの血流が観察できた。今回は移植後 21 日まで観察後、組織を摘出し、パラフィン包埋薄切切片での観察に回したが、EPC を共培養しなかったコントロール群では KO を導入した LB 内の HE は急速に消退していた。ただし、n が少なく、EPC を加えることによる LB の生存率の向上に関し統計学的な有意差を確認することはできなかった。

(3) 胆汁分泌の観察：

in vitro で CLF を培地に添加した後、観察すると、30 分後には HE より構築された肝細胞索の毛細胆管と思われる構造に蛍光胆汁が分泌された。LB 間を繋ぐ細胆管と思われた管腔も、蛍光胆汁の分泌が認められ、その太さから、細胆管というより、肝細胞索内の毛細胆管様に観察された。EPC のないコントロール群でも胆汁分泌は観察されたが、画像解析の結果、毛細胆管様構造の分岐数と総長は NPC のある群で有意に大きかった (図 4)。vivo でも CW に移植後 21 日目の移植肝組織に対し CLF を作用させた。その結果、図 5 のように NPC と共に移植した群では肝細胞索の毛細胆管様構造に蛍光胆汁の分泌が観察された。NPC のない群では HE が消退し、観察できなかった。

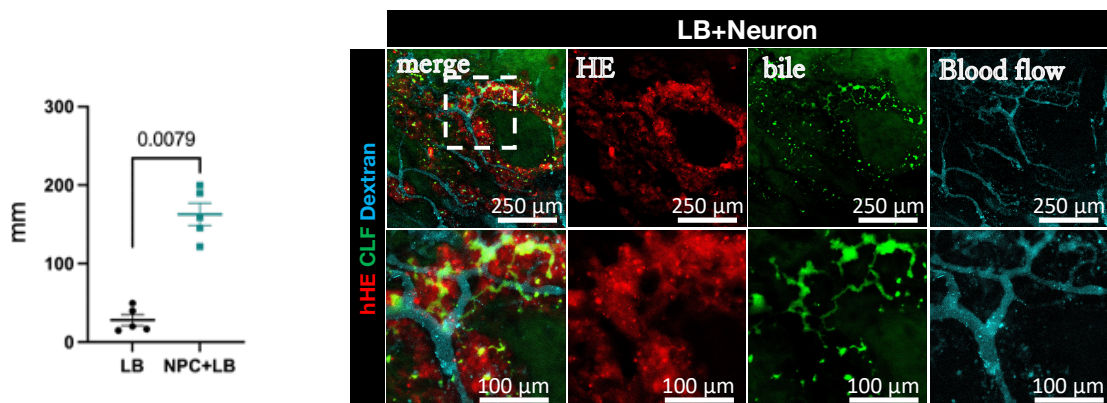


図 4 毛細胆管長の比較 図 5 CW に移植した LB 内での胆汁分泌の観察 Dextran : 血流

(4) 構築組織の組織標本による検討：

in vitro で 7 日間培養した LB の組織標本を作成した。EPC と共培養した LB は (図 6A) 共培養していないコントロール (Cont) (図 6B) に比べ、HE がより索状に配列していた。NF のマーカーである β III tubulin の免疫染色を行うと、ヒトの肝組織で見られるように、NF が索状に配列した HE に伴走して走行していた (図 6C)。CD31 陽性の EC からなる血管網は、この索状構造とは関連なく、再生された肝組織内外を走行していた。EPC と共培養した LB も Cont の LB も共に、HE と思われるほぼ全ての細胞は胆管細胞マーカー CK19 と肝細胞マーカー HNF4 α (図 6D) の共陽性で、CLF で毛細胆管の構築を確認したとき同様、LB 間を繋ぐ様に見えた部分も肝細胞

索に近い構造と思われた。HNF4 α 陽性の細胞では胆管細胞マーカーSOX9 (図 6E) は弱陽性であったが、ごく一部で HNF4 α 陰性で SOX9 強陽性の胆管様構造が認められた (図 6D,E 矢印)。*vivo* では今回 EPC と共培養した群のみに HE の残存が見られた。これまで *vivo* に移植した LB は早期から不規則な胆管様構造を形成することが多かったが、EPC と共培養した LB では残存 HE はほぼすべて HNF4 α 陽性で (図 6F)、索状の肝実質様の構造を残している部分が多かった。CK19 も共陽性であった (図 6G)。SOX9 は僅かに見られる胆管様の構造のみに陽性であったが (図 6H)、*vitro* と異なり、HNF4 α はここでも陽性であった (図 6FGH 矢印)。ヒト CD31 陽性の血管周囲には SMA 陽性の MSC からなる壁細胞が確認できた。残念ながら、EC は類洞、門脈域の動脈、門脈や中心静脈様の構造をとることはなかった。これらの結果から、NF は HE が胆管を構築するのに役立つのではなく、肝実質細胞の索状構造の構築やその維持、長期安定化する役割を担っている可能性が考えられた。

今回作成した EPC は神経用の培地内では免疫染色でも、交感神経マーカー (TH) (図 6I)、副交感神経マーカー (ChAT) いずれか陽性であった。LB と共に肝細胞用の培地で培養後、及び、*vivo* に移植後の NF の性質を免疫染色で確認した。その結果、すべての神経線維のマーカーである β III tubulin はどの時点でも陽性であった。しかし、肝細胞用の培地内では TH 陽性の割合が減少し、LB と共培養しているうちにほぼすべての NF は ChAT 陽性となった (図 6J)。*vivo* に移植後も TH 陽性になることはなく、副交感神経マーカー ChAT 陽性が主体であった。

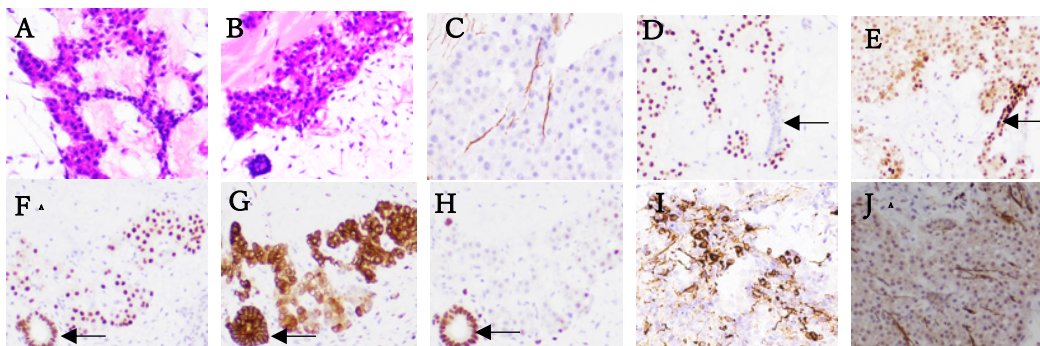


図 6 組織像 A (+EPC), B (Cont):ヘマトキシリンエオジン染色、C: β III tubulin、D, E (+EPC): HNF4 α 、SOX9、F,G,H (*vivo*): HNF4 α 、CK19、SOX9、I: TH、J: ChAT

(5) 神経幹細胞を加えた高次肝組織の分化度や肝機能の評価と神経線維の特性評価 (図 7) :

培養上清中に産生される肝機能マーカー、ALB、Fib、A1AT、補体 C3 は EPC を加えた群で有意に上昇した。アンモニアクリアランスも上昇した。構築された肝組織から FACS で KO-HE を分離後、分化度マーカーである AFP や CYP3A7 を定量的 PCR で比較すると、EPC を加えた群で AFP、CYP3A7 は低下する傾向が見られたが、有意差は見られなかった。以上より EPC を加えることにより構築された高次肝組織の機能は向上することが示唆された。また、この培養上清では NGF、BDGF、HGF がコントロールに比べ EPC 共培養群で有意に多かった (データ未掲載)。これは、成果 (1) で得られた、神経と肝組織との相互作用を裏付ける結果となった。

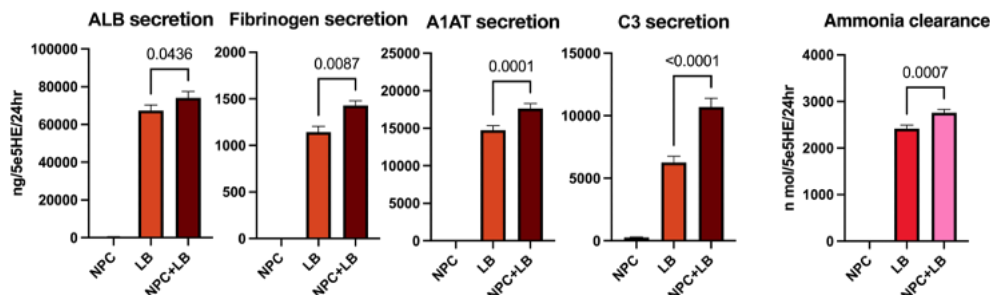


図 7 ELISA による培養上清への分泌物質の評価とアンモニアクリアランス

今回の研究は hiPSC 由来のヒト型高次肝組織に神経を導入することにより、細胆管、血管、神経よりなる門脈域を構築することを目的とした。しかし、予想外に神経を加えることにより、マウスでは見られない、神経線維を有する、より分化し高機能を有するヒト型肝細胞索を構築することに成功した。今後、神経を加えることにより形態が変化し、機能が向上したメカニズムを追究すると共に、*vivo* での実験を増やし再検討予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Koike Naoto, Tadokoro Tomomi, Ueno Yasuharu, Okamoto Satoshi, Kobayashi Tatsuya, Murata Soichiro, Taniguchi Hideki	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of the nervous system in mouse liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4254/wjh.v14.i2.386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口英樹
2. 発表標題 体外灌流を用いたヒト臓器創出への挑戦 ヒト iPS 細胞オルガノイドの新展開
3. 学会等名 第49回日本臓器保存生物医学学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口英樹
2. 発表標題 固形臓器の再構成には何が必要か？
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田所 友美 (Tadokoro Tomomi) (20507644)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 達哉 (Kobayashi Tatsuya) (60837839)	横浜市立大学・医学研究科・共同研究員 (22701)	
研究分担者	谷口 英樹 (Taniguchi Hideki) (70292555)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	
研究分担者	村田 聡一郎 (Murata Soichiro) (40436275)	横浜市立大学・医学研究科・客員准教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関