

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16008

研究課題名（和文）幹細胞由来肝類洞内皮細胞の作製と肝線維化治療への応用

研究課題名（英文）Generation and application of stem cell-derived liver sinusoidal endothelial cells for liver fibrosis therapy

研究代表者

三谷 成二 (Mitani, Seiji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70850212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト幹細胞（人工多能性幹細胞[iPS細胞]、骨髄由来間葉系幹細胞）から機能的な肝類洞内皮細胞（liver sinusoidal endothelial cell; LSEC）を分化誘導する技術の開発に成功した。また、開発した手法でヒトiPS細胞から分化誘導したLSEC前駆細胞を移植すると、マウス肝臓に生着し分化することが示唆された。さらに、LSECが障害を受けた際に発現が増加するVWF（von Willebrand factor）が肝線維化において重要な肝星細胞の活性化に関与することが示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の線維化は現在有効な治療法がない。肝臓の微小血管を形成する肝類洞内皮細胞（LSEC）が障害を受けることが肝線維化を促進することから、肝類洞内皮細胞を起点とした治療技術開発や病態解明が新たな肝線維化治療法確立に重要と考えられる。その点から、本研究で開発したヒト幹細胞からLSEC様細胞を作製する技術は、in vitroモデルや細胞移植源としての有用性が期待される。また、本研究で得られたVWFの肝星細胞活性化に関する知見は、肝線維化治療法開発における新しい標的の発見につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we successfully established methods of generation of functional liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) from human stem cells (induced pluripotent stem cells [iPSCs] and bone marrow-derived mesenchymal stem cells). And then, the results of cell transplantation suggested that human iPSC-derived LSEC progenitor cells induced by our established method could engraft in mouse liver and differentiate into LSECs. Furthermore, we also obtained the results suggesting that von Willebrand factor might affect activation of hepatic stellate cells plays an important role in liver fibrosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝臓 幹細胞 肝類洞内皮細胞 線維化 iPS細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓の線維化(肝線維化)は、肝硬変や肝がんなどの重篤な肝疾患へと進展するが、その治療法は確立されていない。肝臓の微小血管を形成する肝類洞内皮細胞(liver sinusoidal endothelial cell; LSEC)が障害を受けると肝線維化が促進される報告から、細胞移植により、障害を受けたLSECを正常なLSECへと置換することが肝線維化の治療法になりうるのではないかと考えた。しかし、生体由来のLSECを細胞源とすることは、LSECを単離するためのドナー肝臓の不足の問題から難しいと考えられ、ヒト幹細胞からLSECを効率よく分化誘導できれば細胞移植源として有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

ヒト幹細胞からのLSECの効率的な分化誘導技術開発、およびヒト幹細胞由来LSECの細胞移植による肝線維化治療法開発に向けた検討を実施する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト間葉系幹細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術開発

ヒト間葉系幹細胞からLSECへの分化誘導法の開発のため、過去の発生学的な知見から、血管内皮細胞や肝類洞内皮細胞の分化ならびに肝臓(肝類洞内皮細胞が分化する組織)の発生に重要とされるシグナル伝達系に着目して必要な因子の探索を実施した。その後、分化誘導細胞の遺伝子発現をqPCR、タンパク質発現をフローサイトメトリーや免疫染色により評価した。また、LSECの有する機能の解析としてLDLやヒアルロン酸の取り込み能を評価した。

#### (2) ヒトiPS細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術開発

ヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)からLSECへの分化誘導法開発のため、中胚葉分化誘導法の改良を実施した。中胚葉分化に関与するシグナルに関して、サイトカインや低分子化合物の作用条件をLSEC前駆細胞誘導に適するように条件検討を実施した。さらに、LSEC前駆細胞をLSEC様細胞へと分化誘導し、qPCRによりLSECマーカーの遺伝子発現を、FCMや免疫染色によりタンパク質発現を評価した。また、LSECの有する機能である血液凝固第VIII因子の産生能などの機能評価を実施した。

#### (3) 分化誘導細胞を用いたマウスへの細胞移植実験

分化誘導したヒトiPS細胞由来LSEC前駆細胞(CD34陽性細胞)をマウス肝臓へと移植し、移植細胞源としての有用性を評価した。肝臓への生着は、組織切片を作製しヒト抗原に対する免疫染色により評価した。また、LSECへの分化はマウス血中へのヒトFVIII産生により評価した。

#### (4) 肝星細胞活性化におけるVWFの機能解析

LSECが障害を受けることによる肝線維化促進の機序解明を目的に、LSECが障害を受けると発現が増加することが知られているVWFが肝星細胞の活性化へ与える影響を評価した。ヒトVWFを加えた培地でヒト肝星細胞株であるLX2細胞を培養し、肝星細胞活性化マーカーの遺伝子発現変動をqPCRにより評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト間葉系幹細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術開発

まず、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)をLSEC様細胞へと分化誘導するために、骨髄由来MSC(bone marrow-derived MSC; BM-MSC)を用いて、サイトカイン、化合物のスクリーニングを実施した。候補として、LSECの分化に関与することが報告されているTGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )シグナル阻害剤とcyclic AMP(cAMP)、肝臓の発生に関与するFGF(Fibroblast growth factor)およびBMP(bone morphology protein)に着目し、LSEC分化に適した組み合わせを検討した。その結果、TGF- $\beta$ シグナル阻害剤(A-83-01)、cAMP、FGF8b、BMP4の4因子を含む血管内皮細胞培養用培地を用いて骨髄由来間葉系幹細胞を10日間培養すると、肝類洞内皮細胞マーカーであるLYVE1、CD36等の遺伝子発現量が有意に増加することが明らかとなった。さらに、MSCは様々な組織に存在し、由来組織によって分化指向性が異なることから、本分化誘導法で、BM-MSCに加えて、脂肪組織由来MSC、臍帯血由来MSCを分化誘導したのちに、肝類洞内皮細胞マーカーの遺伝子発現量を比較すると、BM-MSCから分化誘導した細胞で最も高い遺伝子発現量を示した。このことから、本分化誘導法による肝類洞内皮細胞への分化誘導にはBM-MSCが適していることが明らかとなった。続いて、フローサイトメトリー(Flow cytometry; FCM)を実施し、LYVE1、CD36のタンパク質発現を評価した結果、分化誘導後の細胞はLYVE1とCD36共陽性細胞が約44%認められた。また、免疫細胞染色においても、LYVE1ならびにCD36陽性の細胞集団が確認された。以上の検討から、作製した分化誘導法によってタンパク質レベルで肝類洞内皮細胞マーカーを発現する細胞を作製できることが示されたため、続いて、

分化誘導細胞の機能評価を実施した。まず、肝類洞内皮細胞を含む血管内皮細胞に共通する機能として LDL 取り込み能の評価を実施した。内皮細胞の control として臍帯静脈内皮細胞である HUVEC を用いた。その結果、色素標識 LDL を作用させた細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、未分化の間葉系幹細胞とは異なり、分化誘導細胞では HUVEC と同様にベシクル状のシグナルが多数観察され、LDL の取り込み能を有していることが明らかとなった。続いて、肝類洞内皮細胞の機能の評価として、色素標識されたヒアルロン酸を作用させたのちに、蛍光顕微鏡で観察すると、未分化の間葉系幹細胞と HUVEC とは異なり、分化誘導細胞でベシクル状のシグナルが多数観察された。これらの結果から、分化誘導細胞がヒアルロン酸取り込み能を有することが明らかとなった。加えて、異なるドナー由来の初代培養 BM-MSC でも同様の結果を得た。以上から、作製した分化誘導法によって、骨髄由来間葉系幹細胞から機能的な肝類洞内皮様細胞を分化誘導可能であることが明らかとなった。本研究で作製した分化誘導法では、既報の方法と比較して、より短時間で、より効率的に、機能的な肝類洞内皮様細胞を間葉系幹細胞から作製することが可能となった。

## (2) ヒト iPS 細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術開発

ヒト iPS 細胞から LSEC 前駆細胞への分化誘導効率の向上を目的に、中胚葉分化誘導法の改良を実施した。既報の分化誘導法を参考に、ベースとなる条件を設定後、中胚葉分化過程における WNT/b-catenin シグナルの活性化剤である CHIR99021、および BMP4, Activin A, FGF2 の作用条件を改変したプロトコールを複数設定した。設定した各プロトコールで中胚葉分化後に LSEC 前駆細胞まで分化誘導後、CD34 および PECAM1 の遺伝子発現を比較することで改変の有用性を評価した。最終的に最も CD34 および PECAM1 の遺伝子発現を誘導可能であった条件 (改変プロトコール) では CD34・CD31 共陽性細胞を平均して約 65%の効率で分化誘導可能であることが FCM による解析で明らかとなった (改変前の条件と比較して有意に高い効率であった)。さらに、この細胞を LSEC まで分化誘導後に LSEC としての性質および機能評価を実施した。まず、LSEC 分化誘導に適するように基礎培地の検討を実施した。その結果、LSEC 前駆細胞までの分化に使用した培地で分化誘導する場合よりも、血管内皮培養用培地である EGM2 で分化誘導した場合が LSEC マーカー (CD32, CD31) 陽性率が高く、前駆細胞から LSEC への分化に適していることが明らかとなった。また、LSEC へと分化誘導後の CD32・CD31 共陽性率は平均して約 54%であった。また、各種 LSEC 関連因子の遺伝子発現量を qPCR により解析した結果、未分化 iPS 細胞や肝臓非特異的な内皮細胞である HUVEC (臍帯静脈内皮細胞) よりも高い値を示した。さらに、改変プロトコールで分化誘導した細胞はマトリゲル上での tube 様構造の形成能、LDL 取り込み能や FVIII 分泌能を示した。これらの結果から、改変プロトコールで得られる CD34・CD31 共陽性細胞が LSEC 分化能を有し、かつ分化後の LSEC 様細胞が機能的な細胞であることが明らかとなった。以上から、本研究で作製した分化誘導法では、より効率的に LSEC 前駆細胞および LSEC 様細胞を作製することが可能となった。

## (3) 分化誘導細胞を用いたマウスへの細胞移植実験

上述の分化誘導法でヒト iPS 細胞由来 LSEC 前駆細胞まで分化誘導後、Magnetic Cell Sorting (MACS) により CD34 陽性細胞をソーティングし移植細胞とした。計画時には、LSEC を移植細胞源とする予定であったが、他のグループから多能性幹細胞由来 LSEC よりも LSEC 前駆細胞の段階での移植の方が肝臓への生着効率が高く、かつ LSEC 前駆細胞は生着後に LSEC へと分化することが報告されたため (Gage et al., Cell Stem Cell 2020)、移植細胞を LSEC ではなく LSEC 前駆細胞とした。モノクローリンを術前に腹腔内投与して LSEC に障害を与えた免疫不全マウスに対して、経脾臓的に肝臓へと CD34 陽性細胞を移植した。その後、採血および組織を回収して組織学的な解析を実施した。移植後 4 週のマウス血漿サンプルにおけるヒト FVIII の発現を ELISA により測定したところ、FVIII が検出された。また、移植後 6 週目のマウス肝臓において、ヒト CD31 陽性細胞の生着が組織切片の免疫染色により確認された。以上の結果から、移植した CD34 陽性細胞がマウス肝臓に生着後、分化して FVIII を産生していることが示唆された。一方で、分化誘導細胞の宿主 LSEC を置換するための移植細胞源としての有用性を評価するためには、さらに多角的で長期的な評価が必要である。また、肝線維化治療への有用性については、今後の検討課題である。

## (4) 肝星細胞活性化における VWF の機能解析

背景に記載した通り、LSEC が障害を受けることが肝線維化を促進することが報告されているが、その全様は明らかとなっていない。そのため、その機序を解明できれば新たな肝線維化治療に寄与する知見が得られると考えられる。そこで、研究開始時の計画には予定していなかったが、LSEC が障害を受けると発現が増加する因子の中に肝星細胞の活性化に寄与する因子が存在するのではないかと仮説を立てて検証を実施した。von Willebrand Factor (VWF) は、血管内皮細胞が産生する血液凝固に関与する因子であるが、炎症病態にも寄与することが報告されている。LSEC は血管内皮細胞の一種であるが定常状態では VWF の発現が低く、一方で障害を受けると発現が増加することが知られている。このことから、VWF が肝星細胞の活性化に関与すると考え、

ヒト VWF を添加した培地でヒト肝星細胞株である LX2 細胞を培養し、活性化マーカーの遺伝子発現を qPCR により調べた。その結果、VWF を高濃度で作用させると LX2 細胞における ACTA2 遺伝子の発現が有意に増加した。また、既知の肝星細胞活性化因子である TGF- $\beta$ 1 と VWF を組み合わせて作用させると、それぞれの単独作用群よりも有意に ACTA2 遺伝子の発現が増加した。以上の結果から、VWF が TGF- $\beta$  シグナルと独立した経路で肝星細胞を活性化する可能性が示唆された。活性化肝星細胞はコラーゲン等の高い産生能を有し、肝線維化において重要な役割を担っている。そのため、本知見は、さらに詳細な機序を解明していくことで新たな標的を介した肝線維化治療法開発に貢献できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitani Seiji, Onodera Yu, Hosoda Chihiro, Takabayashi Yoko, Sakata Asuka, Shima Midori, Tatsumi Kohei	4. 巻 24
2. 論文標題 Generation of functional liver sinusoidal endothelial-like cells from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 274 ~ 281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2023.07.006	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三谷 成二、小野寺 悠、細田(古川) 千裕、嶋 緑倫、辰巳 公平
2. 発表標題 間葉系幹細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術開発
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷 成二、小野寺 悠、細田 千裕、嶋 緑倫、辰巳 公平
2. 発表標題 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術の開発
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三谷 成二、細田 千裕、小野寺 悠、嶋 緑倫、辰巳 公平
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から機能性肝類洞内皮細胞への効率的な分化誘導法の開発
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三谷 成二、細田 千裕、小野寺 悠、嶋 緑倫、辰巳 公平
2. 発表標題 血液凝固第VIII因子の分泌能を有するヒトiPS細胞由来肝類洞内皮細胞の効率的な分化誘導
3. 学会等名 第46回日本血栓止血学会学術集会
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

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