

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号： 22701
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23659620
 研究課題名（和文） ヒト肝幹細胞を起点とした肝臓組織再構築過程の三次元イメージング
 研究課題名（英文） *In vivo* imaging of liver organogenesis from human liver bud
 研究代表者
 小池 直人 (KOIKE NAOTO)
 横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
 研究者番号：50301081

研究成果の概要（和文）： 本研究では、肝幹細胞を起点とした肝臓組織の構築過程の可視化系を確立することを目的とし、肝幹細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の三次元共培養法の開発、および、超高速型共焦点顕微鏡を用いた 4D イメージング系の確立を試みた。ヒト胎児由来肝臓細胞を HUVEC、hMSC とともにマトリゲル内で三次元共培養を行い、マウス頭部に作製した観察窓（クラニアルウインドウ）内へ移植することにより、マウス血管からの血流を伴う、ヒト血管網を持つヒト肝臓組織を再構成した。また、共焦点型超高速ライブイメージング顕微鏡によるイメージング系を構築した。これにより、ヒト固形臓器の形成過程を細胞レベルで解析するための基盤解析技術を確立した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to establish a visualization system to monitor liver organogenesis from liver bud *in vivo*. To this end, we developed a liver bud generation method according to the three-dimensional co-culture of human liver stem cells, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human mesenchymal stem cells (hMSC). Next, we established a 4D imaging system using ultra-high-speed confocal microscope system. Then we transplanted the human liver bud into the cranial window and observed visualized and reconstituted human liver tissue with human vascular network. We have established an imaging technology to visualize and analyze the formation of human solid organs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・外科学一般

キーワード： 外科総論、肝組織再構築、微小血管網、イメージング

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は組織を構成する細胞社会の頂点に位置し、組織の発生や恒常性維持を担っている。組織幹細胞を起点とした組織構築過程を理解することは、固形臓器を対象とし

た再生医学の開発において極めて重要な課題である。固形臓器の発生プロセスにおいては、血管ネットワーク形成が重要な役割を担っていると考えられているものの、その理解は限定的であった。組織幹細胞を起点とし、

固形臓器の人為的な再構成法を確立するためには、固形臓器の発生プロセスにおける幹細胞システムと血管ネットワークの相互作用を明らかにする必要がある。

我々の研究グループはこれまでに、免疫不全 (NOD/SCID) マウスの頭蓋部に作製したクラニアルウインドウの内部で血管網を異所性に再構成する技術を確立し、血管系を有する固形臓器の発生過程を観察するための要素技術を確立している (Koike N et al.; *Nature* 428: 138-9, 2004)。

2. 研究の目的

本研究では、特に高度な血管網を有する肝臓を例に取り、申請者が独自に確立したクラニアルウインドウ内部での血管網の人為的再構成系において、肝幹細胞を起点とした肝臓器官形成過程を再現しながら、三次元的にライブイメージングを行う為の基盤技術の開発を試みる。これにより、肝臓の組織構築過程において、各々の細胞の動態を三次元的に捉えることが可能な解析基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) クラニアルウインドウ内部におけるマウス胎児肝臓組織の再構成

クラニアルウインドウ内において、肝細胞が分化誘導されるか否かを検証するため、胎生 13.5 日目の EGFP マウスの肝臓細胞をカラーゲン/フィブロネクチンゲル内に包埋した後、NOD/Scid マウスの頭部に作製したクラニアルウインドウ (観察窓) 内部に移植した。移植後、クラニアルウインドウ内で血管網が再構成されるか否か、また、肝臓細胞の分化が誘導されるか否かを検討した。

(2) クラニアルウインドウ内におけるヒト肝幹細胞からの肝臓組織の再構成とイメージング系の確立

クラニアルウインドウ内において、ヒト血管網を持つヒト肝臓組織を再構成することが可能か否かを明らかにするため、ヒト肝幹/前駆細胞をヒト血管内皮細胞 Human

Umbilical Vascular Endothelial Cells

(HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) とともにゲル内で共培養した後、NOD/Scid マウスの頭部に作製したクラニアルウインドウ (観察窓) 内部に移植した。移植後、クラニアルウインドウ内を経時的に観察し、肝臓組織の再構成過程を検討した。これらのプロセスを可視化することが可能な超高速型共焦点顕微鏡による三次元的メーキングの条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) クラニアルウインドウ内部におけるマウス胎児肝臓組織の再構成

胎生 13.5 日目のマウス胎児肝臓細胞を移植後、血流を有した血管ネットワークを持つ肝臓組織の形成が観察された。再構成された組織は、血管のほか、成体肝臓で特徴的な類洞構造、胆管構造などの高次構造を有していた (図 1a-c)。組織解析の結果、移植後 30 日目において、多核の肝細胞の存在が確認され (図 1b)、また、サイトケラチンを発現する胆管上皮細胞も観察された (図 1c)。

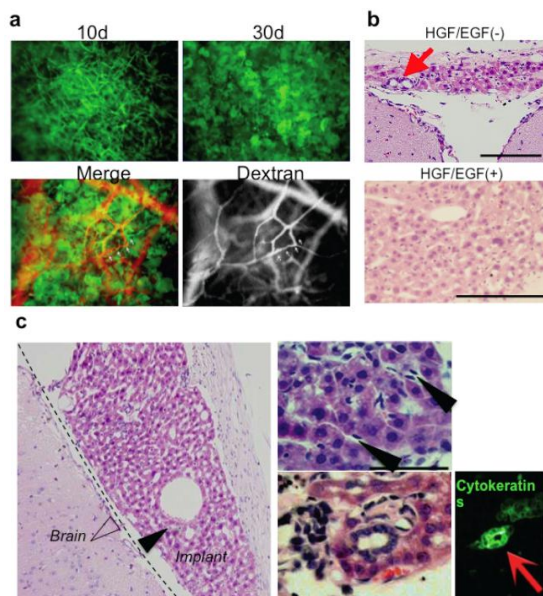


図 1. クラニアルウインドウ内でのマウス肝臓組織の再構成

これらのことから、胎児肝臓細胞は、クラニアルウインドウ内で成熟した肝細胞あるいは胆管上皮細胞へと分化誘導されることが確認された。

(2) クラニアルウインドウ内におけるヒト肝幹細胞からの肝臓組織の再構成とイメージング系の確立

ヒト肝幹/前駆細胞、HUVEC、hMSC をゲル内で短期間共培養を行い、クラニアルウインドウ内に移植したところ、移植後 3 日目より HUVEC から成るヒト血管網が形成されることが明らかとなった (図 2a)。超高速型共焦点顕微鏡システムを用いてクラニアルウインドウ内のライブイメージングを行ったところ、形成されたヒト血管網は長期に渡って維持されており、さらに、ホストマウスからの血流を有することが明らかとなった (図 2b)。また、ヒト血管網の中にヒト肝臓組織が再構成されることを確認した。

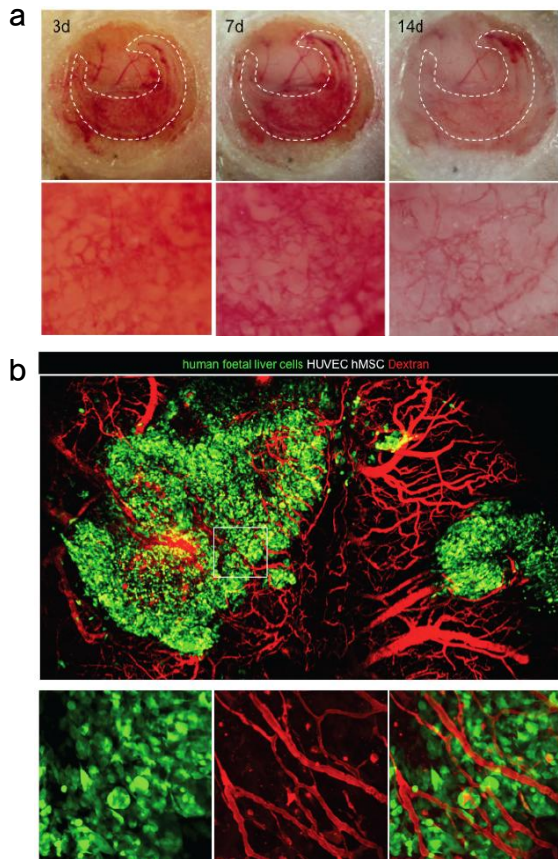


図 2. クラニアルウインドウ内でのヒト肝臓組織の再構成

再構成された肝臓組織には、アジアロ等タンパク質レセプター等のマーカーを発現する肝細胞が多数存在していた。また、これらの組織中で、基底膜成分である IV 型コラーゲ

ンの発現が確認された。このことから、クラニアルウインドウ内においてヒト肝幹/前駆細胞、HUVEC、hMSC よりヒト肝臓組織が再構成されることが明らかとなった。また、これらの肝臓組織の再構築過程のイメージング系を確立することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H., Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, in print. (査読有り)
2. Tanaka H, Tanaka S, Sekine K, Kita S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J, Taniguchi H., The generation of pancreatic beta-cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials*. 34(23):5785-9, 2013 (査読有り)
3. Koike N, Onaya H. Gd-EOB-DTPA-Enhanced MRI versus Extracellular Contrast Medium-Enhanced MRI in Differentiation of Metastatic from Benign Liver Lesions. *Ann Gastroenterol Hepatol*. 3, 57-62, 2012. (査読有り)
4. Motosugi U, Yamaguchi H, Furukawa T, Ichikawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Motoi F, Kanno A, Watanabe T, Koike N, Koyama I, Kobayashi J, Shimizu M., Imaging Studies of Intraductal Tubulopapillary Neoplasms of the Pancreas: 2-Tone Duct Sign and Cork-of-Wine-Bottle Sign as Indicators of Intraductal Tumor Growth. *J Comput Assist Tomogr*

36, 710-717, 2012. (査読有り)

5. Koike H, Kubota K, Sekine K, Takebe T, Ouchi R, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H., Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells. *BMC biotechnology*, 12(1), 81. 2012 (査読有り)
6. Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H., Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc*, 44(4) 1018-1020, 2012. (査読有り)
7. Takebe T, Koike N, Sekine K, Enomura M, Chiba Y, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H., Generation of human vascular network in vitro. *Transplant Proc*, 44(4) 1130-1133, 2012. (査読有り)
8. Kobayashi S, Takebe T, Inui M, Iwai S, Kan H, Zheng YW, Maegawa J, Taniguchi H. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 1479-1484, 2011. (査読有り)
9. Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H. Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with arotating wall vessel bioreactor. *J Biosci Bioeng*. 111, 711-718, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 17 件)

1. Koike N, Our treatment strategies for liver metastases from colorectal cancers, *IASGO 2012(招待講演)*, 2012

年 12 月 05 日～2012 年 12 月 08 日,
Shangri-la Hotel (Bangkok,
Thailand).

2. Ueno Y, Sun L, Ouchi R, Nakata S, Zheng YW, Terasaki T, Kurata M, Yamamoto N, Morinaga S, Miyagi Y, Yokose T, Endo I, Taniguchi H., Quantitative targeted absolute proteomics of transporters in the pancreatic cancer treated with neoadjuvant chemoradiation therapy、**第 71 回日本癌学会学術総会** 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、札幌市教育文化会館(北海道)
3. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Yuta O, Isono K, Koseki H, Taniguchi H, Polycomb group protein Ezh2 regulates the expansion of murine hepatic stem/progenitor cells、**第 71 回日本癌学会学術総会** 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、札幌市教育文化会館(北海道)
4. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Suzuki Y, Koike H, Zhang R, Koike N, Ueno Y, Zheng Y, Taniguchi H: Creation of vascularized human organ from induced pluripotent stem cells. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
5. Enomura M, Takebe T, Sekine K, Koike N, Taniguchi H, Tanaka H, Generation of islet like structures with human functional vascular networks, *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*, 2012 年 06 月 13 日～012 年 06 月 16 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
6. Zheng Y, Li B, Zhang R, Kimura M, Tsuchida T, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H:Self-renewal versus

- differentiation as well as the liver repopulation capability of human hepatic stem cells. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
7. Zhang R, Zheng Y, Tsuchida T, Takebe T, Kimura M, Li B, Takiguchi K, Sekine K, Ueno Y, Taniguchi H: Construction of chimeric mice with human immatured hepatocytes. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 8. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shina T, Ouchi R, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Polycomb group protein Ring1B regulates proliferation and differentiation of mouse hepatic stem/progenitor cell by repressing cyclin-dependent kinase inhibitors. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 9. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Shiina T, Obana Y, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Role of the polycomb group protein EZH2 in the murine hepatic stem/progenitor cells. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 10. 武部貴則、関根圭輔、江野村允宏、小池博之、張冉冉、三橋優澄、上野康晴、鄭允文、谷口英樹 : 多能性幹細胞を用いた機能的なヒト臓器の創出 *第11回日本再生医療学会* Jun.12-14, 2012 パシフィコ横浜(神奈川).
 11. Koike H, Ueno Y, Shiina T, Naito T, Ouchi R, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B Regulates Proliferation of Hepatic Stem/Progenitor Cells by Repressing Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川).
 12. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Obana Y, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. The functional analysis of polycomb group protein Ezh2 in the self-renewal of the fetal mouse hepatic stem/progenitor cell. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川).
 13. Takebe T Generation of islet-like structure with functional human vascular network、*12th Islet Transplantation Symposium*, Nov 26, 2011, Seoul, Korea.
 14. 武部貴則, 関根圭輔, 江野村允宏, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, In vitroでの自己組織化肝オルガノイド形成、*第47回日本移植学会総会*, 2011年10月5日、仙台国際センター(宮城)
 15. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Zheng YW, Taniguchi H, Self-assembling hepatic organoid formation in vitro, *The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation*, Sep 28, 2011, Seoul, Korea.
 16. Enomura M, Sekine K, Fujiwara R, Tanaka H, Matsui C, Takebe T, Koike N, Taniguchi H, Vascularization of pancreatic beta-cells inside the transparency cranial window. *The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation*. Sep 25, 2011, Seoul, Korea.
 17. Koike N, Ohshima Y, Arita S, Takeuchi T, Ohkohchi N. Evaluation of drainage fluid amylase level after pancreatojejunostomy using our

method in pancreatoduodenectomy.
International Surgical Week 2011、
2011年8月31日、パシフィコ横浜（神
奈川）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~sais
ei/](http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~sais
ei/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 直人 (KOIKE NAOTO)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50301081

(2) 研究分担者

上野 康晴 (UENO YASUHARU)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60375235

(3) 連携研究者

武部 貴則 (TAKEBE TAKANORI)

横浜市立大学・医学部・助手

研究者番号：20612625