

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689040

研究課題名(和文) ウイルス性慢性肝炎モデルのための免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスの作成

研究課題名(英文) Establishment of human liver chimeric mice with normal immune system for hepatitis viral infection

研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：30321904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,300,000円、(間接経費) 4,890,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス性肝疾患に対する治療法研究が困難な理由として、ウイルスの種特異性によりマウス、ラットといった簡便な実験動物による研究が不可能な点が挙げられる。そこで本研究では免疫機能を保持したヒト肝細胞キメラマウスの作製を目指して研究を行った。その結果、(1)ヒトiPS細胞を用いた肝幹・前駆細胞の純化・長期培養系を確立し、移植用のヒト肝細胞の有力な候補として考えられた。(2)肝障害誘導マウスを用いた、生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築として、マウス新生仔への肝前駆細胞の移植法の検討などを行った。

研究成果の概要(英文)：Viral hepatitis is a very severe liver disease. Studies for therapies of this disease are difficult because Hepatitis viruses cannot infect to normal experimental animals such as mouse and rat. Thus, we have a plan to establish a new mouse model for the studies of viral hepatitis. (1) We established a new culture method for the purification and expansion of hepatic progenitor cells derived from human pluripotent cells. These cells are candidate of donor cells into human liver chimera mice. (2) We tried to transplant primary hepatic progenitor cells derived into neonatal mice. Small numbers of donor cells were detected in the recipient liver and lung.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝炎ウイルス 肝幹細胞 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性肝炎は B 型、C 型肝炎ウイルス (HBV、HCV) の感染に起因し、肝硬変・肝癌への進行に伴う重篤な症状を伴う。ウイルス性肝疾患に対する治療法研究が困難な理由として、ウイルスの種特異性によりマウス、ラットといった簡便な実験動物による研究が不可能な点が挙げられる。ヒト肝癌由来培養細胞株と、HBV および HCV ゲノムの複製に必要な部分で構成されたレプリコン RNA を利用したウイルスの複製機構の解析・インターフェロン等への反応性の研究が行われているが、in vivo モデルを用いた解析は長年不可能であった。近年、免疫不全マウスに肝障害を誘導する遺伝子を組み込んだモデルが作成され、成体肝臓にヒト成熟肝細胞を移植した後に肝障害を誘導することで、肝臓内の肝細胞 (肝臓の機能細胞であり肝炎ウイルスの標的細胞) を 9 割以上ヒト由来細胞へと置換する技術が構築された (Tateno et al., *Am. J. Pathol.*, 2004 等)。作成したヒト肝細胞キメラマウスに、HBV または HCV を感染させることで、マウス体内での肝炎ウイルスの増殖機構等を再現できる (Tsuge et al., *Hepatology*, 2005 等)。しかし、この手法ではヒト細胞を移植するために免疫不全マウスを使用する必要があり、慢性肝炎の原因である肝臓へのウイルス感染に伴う免疫応答により誘導される炎症反応が再現できない重大な欠点が存在する。免疫系の能力を保持したまま肝細胞をヒト化する系の確立が、肝炎ウイルスによる慢性肝炎の分子機構の解明・治療法の開発のために急務となっている。

(2) 動物体内でヒト臓器を作成する基盤技術の開発のため、申請者の所属する研究室では臓器欠損を誘導する遺伝子改変マウス由来の胚盤胞へ多能性幹細胞を注入し、体内で多能性幹細胞由来の臓器を形成させる研究を行った (Kobayashi et al., *Cell*, 2010)。ラット-マウスといった近縁の異種間でも可能なことを証明しているが、この方法では動物胚や全能性の幹細胞を使用するために意図しない細胞 (神経系や生殖系) への分化誘導が避けられない問題点がある。そこで本研究では、免疫系の完成していない胎生期のマウス肝臓に同様の発生段階にあるヒト肝幹・前駆細胞を移植し、生体環境内でヒト肝細胞への成熟化を誘導する。肝細胞死を誘導できる遺伝子変異マウスをレシピエントに使用することで、細胞移植後にマウス肝細胞を除去し移植したヒト肝細胞を選択的に増殖させる。移植用ヒト肝幹・前駆細胞のソースには、多能性幹細胞 (ES, iPS 細胞) からの分化誘導系を用いる。以上の方法で免疫系を保持しつつヒト肝細胞が生着したマウスを作成し、ウイルス感染での慢性肝炎を再現できる動物モデルの構築を目指す。

2. 研究の目的

肝癌は癌による死因の上位であり、主要な原因である C 型肝炎の患者および持続感染者 (キャリア) は日本で 150-200 万人いると推定され、その対策は消化器内科学領域における重要課題である。本研究では、幹細胞生物学や発生学といった申請者が現在まで行ってきた研究成果を元にして、免疫系を有するヒト肝細胞キメラマウスを作成し、上記の課題解決に必須であるウイルス性慢性肝炎を in vivo で再現する病態モデルを構築する。

この目的のために以下の研究を遂行する。

1. ヒト iPS 細胞からの肝幹・前駆細胞の純化・培養系の構築
2. 肝障害誘導マウス胎仔の肝臓への生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築
3. ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞のマウス胎仔肝臓への移植系を用いた、免疫機能を持つヒト肝細胞キメラマウスの作成
4. 作成したヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝炎ウイルスの感染・増殖能の解析

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞からサイトカイン刺激により肝臓系細胞を誘導する。表面抗原抗体の網羅的探索により、ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞に特異的な細胞表面マーカーを同定し、申請者が樹立した肝幹・前駆細胞と MEF の共培養系を用いた in vitro expansion を行う。

(2) 肝障害誘導マウスの胎仔肝臓に正常マウスの胎仔肝幹・前駆細胞を移植した後に肝障害を誘導することで、ドナー細胞により肝障害が補完され成体までの成長が可能になる移植条件を検討する。

(3) ヒト iPS 細胞由来の肝幹・前駆細胞を用いて、2 で設定した条件で移植を行い、ヒト細胞の生着・増殖による肝障害の補完・成体マウスへの成長が可能か解析する。

(4) 作成したヒト肝細胞キメラマウスにおいて、ヒトドナー肝細胞の生着率や機能レベルを解析する。また、免疫細胞数や機能が正常か確認する。以上の結果が良好であれば、HBV や HCV の感染を行い、生体内での増幅や持続感染の成立、さらには炎症反応の誘導が見られるか検討する。

4. 研究成果

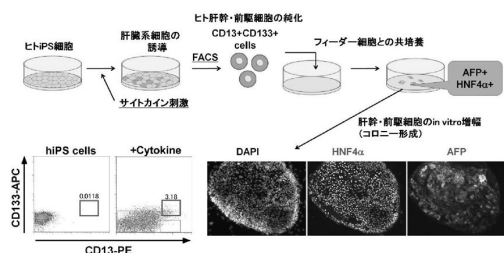
(1) ヒト iPS 細胞を用いた肝幹・前駆細胞の純化・長期培養系の構築の試み

ヒト肝幹・前駆細胞の in vitro での増幅系を構築する目的で、ヒト iPS 細胞由来細胞をモデルとして研究を行っている。

平成 23 年度の研究成果としてヒト iPS 細胞を既報に従って肝臓系細胞へと分化誘導を行い、肝幹・前駆細胞マーカー CD13 および CD133 の表面抗原抗体を用いて細胞分画した。

FACS を用いて分画した各細胞をマウス線維芽細胞をフィーダーとして低密度培養を行い、フェトプロテイン (AFP)、HNF4 陽性のコロニー形成能を同定した。

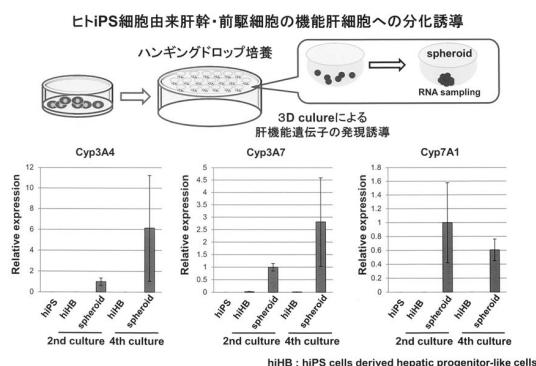
ヒト ES 細胞または iPS 細胞にアクチビン、Fibroblast Growth factor および Bone morphogenetic protein-4, Hepatocyte growth factor とサイトカインを連続的に添加することで、AFP 陽性の肝臓系細胞へと分化誘導できる。この細胞集団をさまざまな表面抗原マーカーで染色し検討した結果、CD13+CD133+分画に高いコロニー形成能が見られ、この分画に高増殖性の肝幹・前駆細胞様の細胞が濃縮されていることが分かった。



形成されたコロニーをトリプシンにより酵素的に分散し新たなフィーダー細胞上に播種する継代培養を繰り返すことで、1 月以上にわたる長期培養が可能である。さらに数代の継代培養後に形成されたコロニーでも、初代のコロニーと同様に AFP、FoxA2、HNF4 陽性を示すことから、継代培養後も肝幹・前駆細胞様細胞としての形質を維持していた。

平成 24 年度は CD13+CD133+細胞から得られた肝前駆細胞の肝臓系機能細胞 (成熟肝細胞および胆管細胞) への分化能について検討を行った。

幼弱な肝細胞は浮遊培養によるスフェロイド形成などによって成熟化し、肝機能遺伝子の発現が上昇することが知られている。そこで、継代培養によって得られた iPS 由来肝幹・前駆細胞を浮遊培養 (ハンギングドロップ法) によってスフェロイド形成させた後に、肝機能遺伝子 (CYP など) の発現をリアルタイム PCR を用いて解析した結果 CYP 系遺伝子の発現上昇がみられることが分かった。



また、同様の細胞をラミニン・コラーゲン等の細胞外マトリクスゲルに包埋培養し、Wnt 等のサイトカインを添加することで上皮系の Cyst 構造を形成することを見出した。この Cyst は Apical 側、Basolateral 側それぞれに特異的なタンパク質を発現する極性を持つ上皮細胞シートから形成されており、胆管のマーカー遺伝子である Cytokeratin 7 の発現が見られた。つまり、この培養系により iPS 由来肝幹・前駆細胞から胆管系細胞構造への分化誘導が確認できたと考えている。

平成 25 年度では、ヒト多能性幹細胞由来の肝前駆細胞の in vitro での継代培養における性状変化について検討を行った。

ヒト肝前駆細胞の表面抗原マーカー CD13 および CD133 のマーカーの継代培養時における発現変化を解析した結果、一部の細胞で CD13 の発現が低下することを見出した。さらに CD13 陽性細胞からは CD13 陽性細胞が、CD13 陰性細胞からは CD13 陰性細胞が自己複製することを見出した。CD13 陰性細胞からは多数の胆管様 Cyst 構造が得られることから、CD13 陽性細胞が肝前駆細胞であり、そこから CD13 陰性の胆管前駆細胞が分化すると考えられる。

以上の結果によって、ヒト iPS 由来肝幹・前駆細胞の長期培養系で、ヒト肝芽細胞が自己複製能を持ち維持されていることが示唆された。

(2) 肝障害誘導マウス胎仔を用いた、生体由来肝幹・前駆細胞の移植系の構築

マウス胎仔・新生仔への移植系構築の目的で、まず胎仔肝臓由来の肝幹・前駆細胞のマウス新生仔への移植を行っている。マウス胎生 13 日肝臓より分離した Dlk+肝幹・前駆細胞を新生仔マウスの肝臓に直接、または眼底静脈を通じた経静脈的な移植によって移植を行い結果を比較した。

Dlk+肝幹・前駆細胞を新生仔マウスの眼底静脈より移植し、各臓器における生着を観察した結果では、移植直後ある程度の期間で肝臓への生着を検出する一方で肺等への異所性の細胞の沈着や増殖が見られることが分かった。一方、肝臓に直接移植を行った場合には、移植したマウス個体の一部で肝臓に移植細胞が検出されるものの、個体間のばらつきが観察された。今後、移植後の時間経過に従って肝臓やその他の異所性の移植細胞の生着・増殖の過程を解析する予定である。

また移植後に肝障害の誘導できる別のマウスモデルとして、ジフテリアトキシン受容体を肝細胞特異的に発現するマウスの開発を行った。Cre 依存的にジフテリアトキシン受容体を発現する iDTR マウスは JAX マウスより購入した。また、肝細胞特異的に Cre を

発現する AlbA⁺Cre マウスは Dr. Kaestner より供与されたものを使用している。両トランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスでは、ジフテリアトキシン刺激による肝障害を発症する。そこで、まずさまざまな濃度でジフテリアトキシンを注射し肝障害の程度を観察することで、適切な濃度を設定した。次に、GFP トランスジェニックマウス由来の肝前駆細胞を分離し、脾臓経由で移植したのちにジフテリアトキシン添加により肝障害を誘導した(図 10)。その結果、ジフテリアトキシン添加によりレシピエント肝細胞の細胞死が誘導されることで、ドナーの肝前駆細胞の増殖・生着が促進されることを見出した。

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 5 件)

(1) Ito K, Yanagida A, Okada K, Yamazaki Y, Nakauchi H, Kamiya A*. Mesenchymal progenitor cells in mouse fetal liver regulate differentiation and proliferation of hepatoblasts. Liver Int. in press 2013. (*Corresponding Author)
査読有

(2) Yanagida A, Ito K, Chikada H, Nakauchi H, Kamiya A*. An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. PLoS One, 8, e67541, 2013 (*Corresponding Author)
査読有

(3) Oikawa T, Kamiya A*, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, Wauthier E, Tajiri H, Miller LD, Wang XW, Reid LM*, Nakauchi H*. SALL4, a stem cell biomarker in liver cancers. Hepatology 57, 1469-83, 2013. (*Corresponding Authors)
査読有

(4) Okada K, Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Ito H, Kondou H, Nishina H, Nakauchi H*. Prospective Isolation and Characterization of Bipotent Progenitor Cells in Early Mouse Liver Development. Stem Cells Dev. 21(7):1124-33. 2012 (*Corresponding Authors)
査読有

(5) Ito H, Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Okada K, Nakauchi H*. In vitro expansion and functional recovery of mature

hepatocytes from mouse adult livers. Liver Int. 32(4):592-601. 2012 (*Corresponding Authors)
査読有

[学会発表](計 18 件)

・国内学会発表

(1) 近田裕美、坂本明美、徳久剛史、紙谷聡英

「肝臓における薬物代謝の性差を制御する分子メカニズム」

第 13 回日本再生医療学会

京都国際会館 2014 年 3 月 4-6 日

(2) 紙谷聡英、近田裕美、鶴谷康太、柳田 絢加、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの in vitro 胆管組織誘導系の構築」

第 13 回日本再生医療学会

京都国際会館 2014 年 3 月 4-6 日

(3) 柳田 絢加、伊藤 慶一、近田裕美、中内 啓光、紙谷 聡英

「In vitro generation and expansion of bi-potent hepatic progenitor-like cells from human iPS cells.」

第 20 回 肝細胞研究会

大阪国際会議場 2013 年 9 月 26-27 日

(4) 伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光、紙谷 聡英

「Mesenchymal progenitor cells in mouse fetal liver regulate differentiation and proliferation of hepatoblasts.」

第 20 回 肝細胞研究会

大阪国際会議場 2013 年 9 月 26-27 日

(5) 紙谷聡英、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの二方向性分化能を有する肝前駆細胞の誘導」

第 49 回日本肝臓学会総会

京王プラザホテル 2013 年 6 月 6-7 日

(6) 近田裕美、紙谷聡英

「HLH型転写因子による胎生肝幹・前駆細胞の分化誘導」

第 12 回日本再生医療学会

パシフィコ横浜 2013 年 3 月 23 日

(7) 紙谷聡英、伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光

「An in vitro expansion system in generating purified hepatic stem/progenitor-like cells derived from human iPS cells.」

第 35 回日本分子生物学会

福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日

(8) **紙谷聡英**、伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光

「MEK-ERK シグナル経路による肝幹・前駆細胞の増殖制御機構」

第 19 回肝細胞研究会

札幌医科大学 2012 年 6 月 29 日

(9) **紙谷 聡英**

「肝幹・前駆細胞の長期増殖を制御する細胞内シグナル伝達機構」

第 11 回日本再生医療学会

ランチョンセミナー・招待講演

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日

(10) **紙谷聡英**、中内啓光

「MEK-ERK シグナル伝達系による胎生肝幹・前駆細胞の増殖制御機構」

第 48 回日本肝臓学会総会

ホテル日航金沢 2012 年 6 月 7 日

(11) **紙谷聡英**、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの肝幹・前駆細胞分化誘導系の構築」

第 15 回肝臓学会大会 (JDDW2011)

福岡国際会議場 2011 年 10 月 20-23 日

(12) 伊藤 慶一、**紙谷 聡英**、岡田 健、柳田 絢加、伊東 秀典、中内 啓光

「胎仔肝幹細胞の自己複製を制御する新規分子の探索とその機能解明」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

(13) 柳田 絢加、**紙谷 聡英**、岡田 健、伊藤 慶一、伊東 秀典、中内 啓光

「発生過程における cdk 抑制因子 p57 による肝増殖制御機構」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

(14) **紙谷聡英**、柳田絢加、岡田 健、伊藤 慶一、中内啓光

「ヒト多能性幹細胞からの長期増殖可能な肝前駆細胞の分化誘導」

第 18 回肝細胞研究会

東京ガーデンパレス 2011 年 6 月 24-25 日

・国際学会発表

(15) Hiromi Chikada, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hiromitsu Nakauchi, **Akihide Kamiya**

「REGULATION OF CYTOCHROME p450 3A11 EXPRESSION IN MOUSE HEPATIC PROGENITOR CELLS BY BCL-6」

The 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research

Boston Convention and Exhibition Center, USA, June 12-15, 2013

(16) 柳田 絢加、**紙谷聡英**、伊藤 慶一、中内 啓光

「The Application of Human iPS cells as an in vitro expansion system in generating purified Hepatic stem/progenitor-like cells to determine the molecular mechanisms regulating human liver organogenesis」

The 10th International Society of Stem Cell Research

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日

(17) **紙谷聡英**、伊藤 慶一、柳田 絢加、中内 啓光

「MEK activity regulates stem/progenitor potential of fetal hepatoblasts through induction of cell cycle arrest」

The 10th International Society of Stem Cell Research

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日

(18) Okada Ken, **Kamiya Akihide**, Ito Keiichi, Yanagida Ayaka, Ito Hidenori, Kondou Hiroki, Nishina Hiroshi and Nakauchi Hiromitsu

「Prospective isolation and expansion of hepatoblast during early-fetal liver development in mice」

The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research

Toronto, June 15-18, 2011

〔図書〕(計 1 件)

(1) **紙谷聡英**、近田裕美 「肝臓の再生医療に向けた幹細胞研究の進展」

In The Frontiers in Life Sciences “幹細胞研究と再生医療” (中内博光 編), 183-191, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)

東海大学・創造科学技術研究機構・特任准教授

研究者番号 : 30321904

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

柿沼 晴 (KAKINUMA, Sei)

東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座・特
任講師
研究者番号： 30372444