

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650244

研究課題名(和文)小児生体肝移植時に摘出される病態肝組織を用いたヒト病態肝型マウスの作成と病態解明

研究課題名(英文)Development of humanized-liver mice using hepatocyte derived from pediatric liver/biliary tract diseases and investigation of pathological mechanism of liver/biliary tract diseases.

研究代表者

田上 昭人(Tanoue, Akito)

独立行政法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・部長

研究者番号：60301800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、手術摘出肝組織より分離した肝細胞を用いて、病態肝由来のヒト肝細胞を持つヒト肝型マウスの作成を試み、複数の疾患に由来する肝細胞を用いて、ヒト肝型マウスの作成に成功した。本研究では、胆道閉鎖症より単離した肝細胞の移植を中心に検討し、マウス肝内において胆道閉鎖症由来肝細胞はヒトアルブミン陽性像を示し、薬物代謝酵素の発現も認められた。これら結果から、胆道閉鎖症においても肝細胞は正常機能を有していることが示された。本研究により、各種肝疾患由来ヒト肝細胞を用いたヒト肝型マウスの作成が可能であることが示され、対象疾患における細胞障害等の病態検証への応用が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried for development of humanized-liver mice in which the liver is reconstituted with human hepatocyte derived from some liver/biliary tract diseases. We demonstrated that we could produce some humanized-liver mice which have disease derived hepatocyte. Especially, we tried for producing humanized-liver using hepatocyte derived from biliary atresia. We showed that hepatocyte derived from biliary atresia produced human albumin and expressed drug metabolism enzymes in mouse liver. These results indicated that hepatocytes have normal hepatic functions even in biliary atresia. The results of this study indicated the possibility for development of humanized-disease liver mice and these mice may be useful for investigating pathological mechanism of liver/biliary tract diseases.

研究分野：小児科学・分子薬理学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：疾患モデル ヒト肝型マウス 胆道閉鎖症

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は先天性代謝疾患や胆道閉鎖症、肝硬変およびウイルス感染症など様々な疾患の標的となる臓器である。そのため病態解明や治療法の開発の上において肝組織や肝細胞を用いた研究は必要不可欠である。肝組織や肝細胞を用いた研究は、組織入手等の問題により主に動物を用いて行われている。しかしながら、動物の肝細胞・組織を用いた解析は、種差の問題やウイルス感受性(感染性)の問題等により動物実験の結果をそのままヒトに外挿するのが困難な場合がある。この問題を克服するために、近年ヒト肝細胞を持つマウス(ヒト肝型キメラマウスやヒト肝型マウス)が作成され、ヒト肝疾患の病態解明、治療法の開発や創薬研究に応用が図られつつある。特にヒト肝炎ウイルスであるHBVおよびHCVは生きているヒトやチンパンジーの体の中の肝細胞にしか感染しないことが知られているため、ヒト肝細胞を持つマウスはウイルスの感染のメカニズムの解明や抗ウイルス剤の開発に有用な動物ツールになると考えられている。このようにヒト肝細胞を持つマウス(ヒト肝型マウス)は病態の解明や治療法の開発研究において非常に有用と考えられ、国内外を含めて多くの研究者・研究機関が作成に取り組んできている。これまでにヒト肝型マウスの作成には、海外で凍結保存された肝細胞を用いることが多くその大部分は重篤な肝胆道疾患を持たない成人由来の肝組織が用いられている。国立成育医療研究センターでは、年間約50件の小児生体肝移植手術が行われ、約6割が胆道閉鎖症、3割が先天代謝疾患(尿素サイクル異常症など)の患者である。通常レシピエント肝組織は摘出後一部病理組織診断用に保存され、その他の組織は廃棄されている。この廃棄予定のレシピエント肝組織より肝細胞を分離することにより、胆道閉鎖症や先天代謝異常症の患者由来の肝細胞が入手可能となる。これらの病態肝由来の肝細胞を用いてヒト肝型マウスを作成することにより、病態肝細胞を有するヒト肝型マウスが作成できる可能性がある。ヒト病態肝細胞を持つ動物を解析することにより、病態解明や治療法の開発も可能となる。

### 2. 研究の目的

胆道閉鎖症や先天代謝異常症由来の肝細胞を持つヒト肝型マウスを作成することにより病態肝由来の肝細胞の生着増殖能を検討する。さらに作成したヒト肝型マウスにおけるヒト肝細胞の形態や機能について検討を行い、病態解明や治療法の開発に応用を図る。

### 3. 研究の方法

#### (1)肝組織からの肝細胞の分離保存

摘出された肝組織の研究用提供部分の採取  
国立成育医療研究センターにて行われた小

児生体肝移植手術の際生じる摘出肝組織(レシピエント肝組織)より肝細胞の採取を行った。生体肝移植手術で摘出されたレシピエント肝組織は、病理検査室に搬送され病理検査に必要な処理をした後の組織を研究用として提供を受けた。提供されたレシピエント肝組織は研究所に移送し、一部を肝組織として凍結保存あるいは組織観察用に固定し、残りを肝細胞分離に用いた。

#### 肝組織からの細胞の調製

肝細胞分離は、コラゲナーゼ液による肝消化により行った。手術で摘出された肝臓の肝組織切断面より門脈または中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入した。カニューレ挿入後血管周囲とともにカニューレを結索することによりカニューレを固定し、灌流路を確保した。挿入したカニューレより前灌流液をシリンジにより肝組織内へ灌流し、組織内の残留血液を除去した。次いでカニューレをペリスタポンプに接続し、37℃保温条件下でコラゲナーゼ液にて30分間灌流し、組織構造を消化した。コラゲナーゼ液処理後、組織を分散し、ガーゼとナイロンメッシュにて濾過することにより大型の細胞塊を除去し、肝細胞懸濁液を得た。

#### ヒト肝細胞分離・凍結保存

得られた肝細胞懸濁液を低速遠心により、肝実質細胞と非実質細胞へ分画した。概ね湿細胞体積の20倍の氷冷緩衝液を加えた細胞懸濁液を50xg、3分、4℃で遠心し、沈殿した細胞を再懸濁した。同遠心を計3回繰り返し最終的な肝実質細胞懸濁液を作成した。一部の細胞は市販の細胞凍結保存液等を用いて凍結処理を行い、液体窒素中において保管・管理した。分離した肝細胞の生存率は凍結前と凍結・解凍後に細胞懸濁液極少量を用いて、細胞数および生細胞率を血球計算板にて測定した。生細胞率はトリパンブルー排除能により評価を行った。

#### (2)ヒト肝型マウスの作成

本研究では、国立成育医療研究センターにて分離保存された新鮮非凍結・凍結肝細胞を用いて、ヒト肝型マウスの作成を行った。9~12週齢の重度肝障害複合型免疫不全マウス(uPA-NOGマウスあるいはTK-NOGマウス)の脾内へ最大 $10^6$ 個の肝細胞の注入を行った。移植した肝細胞の生着およびその効率については移植後4週以降に末梢血ヒトアルブミンの測定や組織学的解析にて判定を行った。ヒト肝細胞が生着したヒト肝型マウスは、動物飼育施設にて飼育および解析を行った。一定値以上のヒトアルブミン値を有するマウスは、肝組織におけるヒト肝細胞生着率についてヒトアルブミンによる免疫染色を行いコロニー数の算出を行い、ヒト肝型マウスの作成効率並びに生着率の解析を行った。

#### (3)ヒト肝型マウスを用いた解析

ヒト肝型マウスを用いた肝胆道疾患の病態解明

移植細胞由来の肝胆道疾患については、疾患肝細胞を9～12週齢の重度肝障害複合型免疫不全マウスに移植し、疾患モデルマウスの作出を行った。国立成育医療研究センターでは、様々な肝胆道疾患の患者で生体肝移植手術を行っているが、本研究では特に胆道閉鎖症に対する検討を行った。

なお、本研究実施において、採取された肝組織を本研究に用いることは、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会にて承認を得た(「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」(受付番号385平成21年12月8日承認))。国立成育医療研究センター病院臓器移植センターにおいて主治医から説明を受け同意を得た後に提供されたドナー余剰肝およびレシピエント摘出肝を用いた。提供して頂いた組織は、生体肝移植手術を行った方から提供されたものであり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。肝組織は国立成育医療研究センター病院にて匿名化された後に国立成育医療研究センター研究所に搬送され、肝組織の一部の保存と肝細胞分離の処理を行った。国立成育医療研究センター研究所においては、連結可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れた。本研究は、平成10年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」に従い研究を遂行した。ヒト肝細胞を用いてヒト肝型マウスを作成する研究は、国立成育医療研究センター倫理審査委員会(「ヒト肝型マウスを用いた肝胆道疾患の病態解明と新規治療法の開発研究」(受付番号411平成22年7月1日承認))にて承認を得ている。動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼養および保管の改善にも最大限努力した。

#### 4. 研究成果

24年度は、ドナー9検体、胆道閉鎖症20検体、肝線維症3検体、糖原病Ib2検体およびCPS1欠損症、カロリーー病、糖原病IIIa、アラジール症候群等より細胞単離を行い合計41検体より、肝組織の保存・肝細胞単離を行った。単離した肝細胞を肝傷害重度免疫不全マウスであるuPA/NOGマウスへ移植し、健常ドナーおよび複数の疾患に由来する肝細胞を用いて、ヒト肝型マウスの作成に成功した。生着したヒト肝細胞は、アルブミン産生などの肝機能を有していた。これにより、代謝性疾患をはじめとする疾患肝由来の肝細胞を用いてもヒト肝型マウスの作成が可能であることが示された。ヒト肝細胞の生着は、マウス肝内において局所的にコロニー様に散見された(図1)。この結果から、本研究では遠心分離により肝実質細胞分画としたものを移植細胞として用いたが、用いた細胞分画内に存在する肝幹(前駆)細胞が生着後増殖し、肝細胞への分化を経て、コロニー様

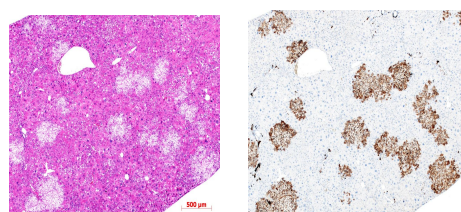


図1. ヒト肝型マウスにおけるヒト肝細胞のクローナルな増殖。(左)H&E染色、(右)抗HLA抗体による免疫組織化学像。

に局在した可能性が考えられた。一方、同じ疾患でも由来する患者が異なる肝実質細胞分画間で生着性の差異が認められた。この結果が、病態の差異を反映しているか今後の検討が必要である。

25年度は、ドナー9検体、胆道閉鎖症14検体等より組織保存・細胞単離を行い、合計33検体より肝組織の保存・肝細胞単離を行った。単離した肝細胞を肝傷害重度免疫不全マウスであるuPA-NOGマウスまたはTK-NOGマウスへ移植し、特に胆道閉鎖症より単離した肝細胞の移植を中心に検討した。胆道閉鎖症肝は肝線維化が進行し硬変している場合が多いが、このような検体からもコラゲナーゼ灌流法により肝組織を消化し、肝細胞の単離を行うことに成功した。得られた肝細胞はuPA-NOGマウスまたはTK-NOGマウスへ移植することにより、マウス肝内への生着が確認された。生着したヒト肝細胞はヒトアルブミン陽性像を示し、薬物代謝酵素の発現も認められ、また細胞増殖を示すKi-67発現も散見された(図2)。これら結果から、胆道閉鎖症に

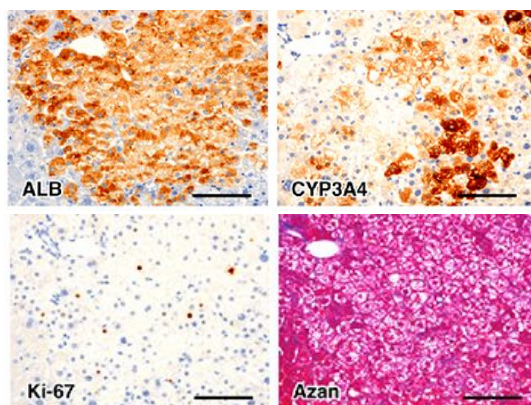


図2. 胆道閉鎖症由来肝細胞のuPA-NOGマウス移植後の病理像。生着したヒト肝細胞はヒトアルブミン陽性像(ALB)を示し、薬物代謝酵素(CYP3A4)の発現も認められ、また細胞増殖を示すKi-67発現も散見された。

おいても肝細胞は正常機能を有していることが示された。また、胆道閉鎖症由来肝細胞を移植されたマウスにおいては、胆道閉鎖症様症状の所見は得られなかった。この結果は、胆道閉鎖症の病因に肝細胞が関与していないことを示すとともに、胆道閉鎖症において、早期の肝門部空腸吻合手術(葛西手術)の施

行と肝内病変進行の抑制が胆道閉鎖症の予後を良好にする上で重要であることを示している。本研究により、各種肝疾患由来ヒト肝細胞を用いたヒト肝型マウスの作成が可能であることが示され、また、ヒト肝細胞の由来する疾患の表現型を示すかどうかを検討することにより、疾患モデルマウスとしての有効性の検証とともに、対象疾患における細胞障害等の病態検証が可能であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

Suemizu H<sup>§</sup>, Nakamura K<sup>§</sup>, Kawai K, Higuchi Y, Kasahara M, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura M. <sup>§</sup> contributed equally to this work. Hepatocytes buried in the cirrhotic livers of biliary atresia patients proliferate and function in the liver of uPA-NOG mice. *Liver Transplantation*. 査読有、In press. DOI: 10.1002/lt.23916

Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. *Liver Transplantation*. 査読有、2014 20, 391-393. DOI: 10.1002/lt.23800

Nakamura K, Tanoue A. Etiology of biliary atresia as a developmental anomaly: Recent advances. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 査読有、2013, 20(5):459-464. DOI: 10.1007/s00534-013-0604-4

Nakamura K, Kato N, Aizawa K, Mizutani R, Yamauchi J, Tanoue A. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *Journal of Toxicological Science*. 査読有、2011 36, 625-633. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.36.625>

中村和昭、田上昭人、胆道閉鎖症の病因に関する最近の知見 - 特に発生異常説に関して -、*Organ Biology* 2011, 査読有、18 (3), 5-10.

### [学会発表](計2件)

Matsui A, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K,

Umezawa A, Matsubara Y, Kasahara M. HEPATOCYTES TRANSPLANTATION FOR AN INFANT OF ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE DEFICIENCY USING CELLS ISOLATED FROM LIVING DONOR REDUCED-GRAFT TISSUE. 47th Annual Meeting of The European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2014年6月9日~2014年6月12日、The Jerusalem International Convention Center.

Tanaka K, Nakamura K, Nozaki K, Terashita A, Tanoue A, Teramura T. IN VITRO DRUG METABOLITE PROFILING USING HUMAN HEPATOCYTES FRESHLY ISOLATED FROM TRANSPLANT DONORS. 第26回日本薬物動態学会、2011年11月16日~2011年11月18日、広島国際会議場.

[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]  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田上 昭人 (TANOUE, Akito)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所薬剤治療研究部・部長  
研究者番号: 60301800

### (2)研究協力者

中村 和昭 (NAKAMURA, Kazuaki)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所薬剤治療研究部・実験薬理研究室・室長  
研究者番号: 80392356