

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02874

研究課題名(和文) 神経系を有するiPS細胞由来ヒト型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 iPS cell-derived human three dimensional hepatic tissue including neural 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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの肝発生を再検討することにより、肝内神経系は出生前後に肝外から肝内に入り門脈域の形態形成維持に関与することが推察された。そこで、胆管、動静脈、神経からなる門脈域を有する微小肝組織構築するために、ヒトiPS細胞由来の肝前駆細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞のみから作成した肝芽を、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞を3次元培養して得られた神経線維の上で培養した。その結果、肝芽において、CK19陽性の胆管細胞に分化した集団が、神経、血管の伴走した胆管状の突起を形成し、門脈域様の形態を構築することが観察できた。この肝芽をマウスクラニアルウインドウに移植し、その形態形成を生体下で観察した。

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、食欲に関与するほか、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内門脈域構築やその形態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高次肝組織が生体内で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 hepatic nerve fiber was observed to infiltrate into the liver from porta hepatis just before birth under histological examination using pre and postnatal mouse liver. And we speculated the intrahepatic nerve system play important roles in the maintenance of morphogenesis of the portal area of the liver. Therefore, the liver buds prepared from human iPS cell (iPSC)-derived hepatic progenitor cells, vascular endothelial cells, and mesenchymal stem cell, were cultured on nerve fibers obtained from three-dimensional culture of iPSC derived nerve progenitor cells in order to regenerate a micro-hepatic tissue having a portal area consisting of bile ducts, vessels and nerves. In the result, portal area like morphology (CK19-positive biliary epithelial cells formed bile ductal processes accompanied by nerves and blood vessels) were observed in the liver bud. The liver bud was implanted into the cranial window of the mouse and the process of development was observed under the microscope.

研究分野：肝胆道外科

キーワード：高次肝組織 神経系 門脈域 iPS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (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、これにhuman fetal liver cell (hFLC)をこれに加えることにより、マウス生体内で微小なヒト肝臓様の組織を構築することに成功した。更にhFLCを、肝細胞に分化させたhuman induced pluripotent stem cells (iPSC)-HE (iPSC肝細胞)に置換した肝芽を*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、より良好な機能を有する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としてiPSCから作成した肝細胞(iPSC-HE)以外に、内皮細胞(iPSC-EC)、間葉系幹細胞(iPSC-STM)ともにiPSC細胞由来のものを使用したが、宿主と交通でき、胆汁分泌ができる胆管を構築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が存在するのは動脈、門脈、胆管からなる門脈域である。いくつもの門脈域は合流し、肝実質外でグリソン鞘に包まれ、最終的には一本の肝十二指腸間膜となり肝外に向かう。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、食欲に関与するほか、肝血流や肝再生に関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に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。本研究ではこの神経に焦点をあて、iPSCより新たに神経幹細胞(iPSC-NCC)を作成し、iPSC-HE、EC、STMに加えた肝芽を作成し、胆管を含んだ門脈域を構築し、宿主との交通を有し胆汁分泌が可能な微小肝組織の構築を目指した。

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、肝硬変等で肝移植の待機中死亡患者数が全世界で少なくとも年間25,000人超という現状である。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、血管網構築を伴った微小組織の再構築研究が必要となる。本研究は、この主要な問題点を克服するために最先端の血管網再構築技術を取り入れるものである。また、肝組織を構築するために要素として神経幹細胞を追加し、共培養に用いる各細胞ソースを、最終的にはiPSCのみで行うことにより、品質の安定した、神経系を含んだ門脈域を有する高次肝組織の構築を目指す。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) マウスの肝組織発生における神経系の評価

加えるiPSC-NCCの割合、タイミングや、混入法を検討するために、生体肝組織内での神経及び門脈域の構築過程を胎生期のマウスから成熟期のマウス(C57BL/6マウスE10.5からP56)を用いHE組織標本と神経、胆管、肝細胞のマーカー(神経:PGP9.5、 β III-tubulin(Tuj1)、胆管:CK19、SOX9、肝細胞:HNF4 α)に対する免疫染色を行うことにより再検討した。

(2) 細胞培養

iPSC からの iPSC-HE の作成、及び retrovirus vector を用いた Enhanced green fluorescent protein (EGFP)、Kusabira orange (KO) の各細胞への蛍光標識方法は Nature 誌(2013)で報告したとおり。iPSC からの iPSC-EC、iPSC-STM の作成は Takebe ら等の方法を改変して行った (Takebe T. et al., Cell Rep 2017) 。iPSC-NCC に関しては、Menendez らの方法 (Menendez L. et al., PNAS. 2012) を参考とし、神経細胞(iPSC-NCC)の作成に到った。

(3) 肝芽作製法

オリジナルでは iPSC-HE、iPSC-EC、iPSC-STM を、それぞれ 1×10^6 、 8×10^5 、 2×10^5 cells/ml (またはこの比率で) をマトリゲル上で共培養し、4-6 日後収縮し立体構築した肝芽を実験に使用した。これに iPSC-NCC を加えて神経系を有する肝内門脈域を構築するために、種々に細胞比や培地、細胞を加えるタイミング等の条件を変え肝芽作成を行った。

(4) 生体内への肝芽の移植

①Cranial window(CW)の作製：NOD/SCID マウス (Sankyo Labo Service Co., Tokyo, Japan) を用い、CW 作製は Dellian らの方法(Dellian M et al., Am J Pathol 1996)に従って行った。

②肝芽の移植法：作成した肝芽を塩酸メデトミジン、ミゾダラム、ブトルファノールを混合した 3 種混合麻酔を腹腔内注射麻酔下でカバーガラスを外した CW 内の脳表面に留置し、カバーガラスを再度閉じて固定し移植した。CW 内の肝芽は微小肝組織や血管網の計時的変化を生体顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) マウスの肝組織発生における神経系の評価

肝における神経ネットワークは、ヒトにおいては肝細胞策まで広がっていることがわかっているが、マウスでは門脈域までに留まっていた。マウスでは E12.5 で門脈周囲に SOX9 陽性の胆管前駆細胞が出現し、徐々にその陽性細胞数は増えていった。肝門部近傍では E16.5 で胆管と思われる管腔を形成した SOX9 陽性細胞は徐々に CK19 も陽性となった (図 1 A)。生後も CK19 陽性の胆管数は増加し、肝門部と末梢の門脈周囲の CK19 陽性胆管数をカウントしたところ、図 2 のように肝門部から末梢に向かって徐々に増加し、P28 で成体レベルとなることがわかった。PGP9.5 陽性の神経線維も E16.5 に肝門部近傍の門脈周囲組織に出現し (図 1 B)、CK19 陽性の胆管同様肝門部と末梢とそれぞれ PGP9.5 陽性神経数をカウントしたところ、胆管同様 P28 まで肝門部から末梢の門脈周囲組織に向かってその数は増えていった (図 2)。動脈も P0 に胆管、神経同様、肝門部近傍の門脈周囲に出現し (図 1 E)、末梢に向かって増えていった。肝内神経ネットワークは肝門部から肝内に侵入し肝全体に広がるという仮説が報告されているが、本研究でも、神経を含む門脈域は肝門近くではじめに構築し、末梢に向かってその構築が徐々に進んでいくことが示された。また、門脈域における神経線維の走行を観察すると胆管よりも門脈、動脈に伴走して走行することが多く、肝内血管系の形態形成に関わる可能性が示唆された。

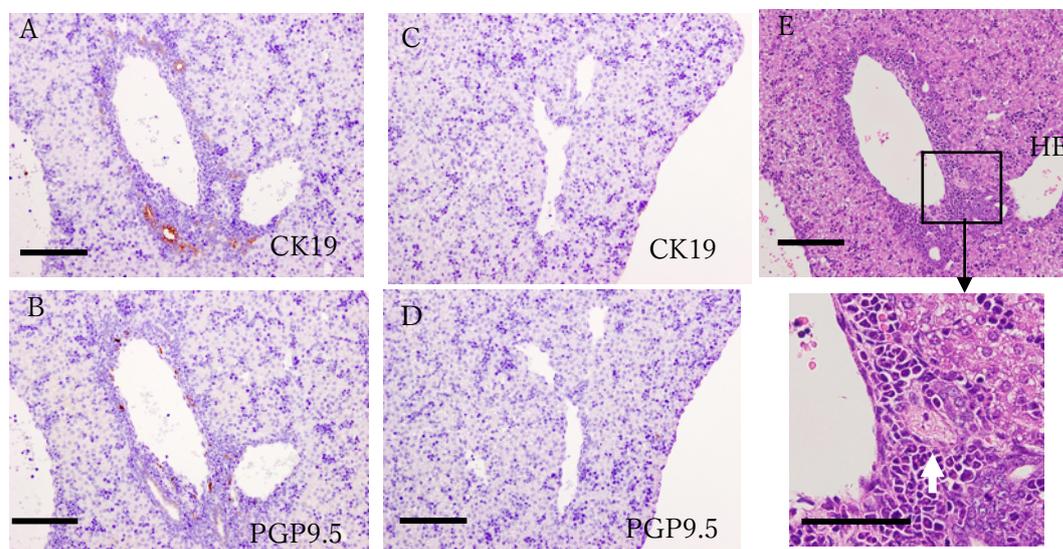


図 1 P0 における門脈域。A, B, E 肝門部。C, D 末梢。肝門部では門脈周囲組織に CK19 陽性

の胆管(A)、PGP9.5 陽性の神経(B)、動脈(E 白矢印)が認められるが、まだ末梢では認められない。

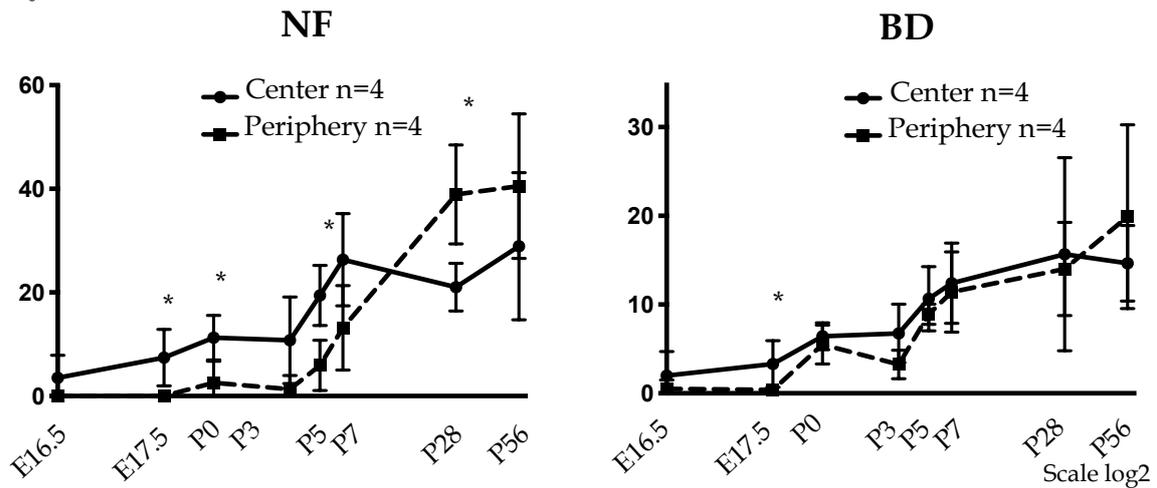


図2 1 門脈域あたりの PGP9.5 陽性神経線維(NF)数、CK19 陽性胆管(BD)数の移り変わり。肝門部(Center)と末梢(Periphery)でそれぞれカウントしたところ、NF, BD ともに肝門部で出現し、徐々に末梢でも数が増えている。*: $p < 0.05$

(2) 細胞培養 (iPSC-NCC の作成)

iPSC をまず DMEM F12 を基本とした 14 から 27 日の培養で neural plate に分化させた。その後、Neurobasal medium を加えた培地に交換し、7-14 日で 97.5% の効率で CD57、CD271 陽性の neural crest への分化に成功した。最終的に neuron induction medium に交換し、神経線維を構築できる neuron の性質を持つ細胞に分化できるプロトコールを作成した。図 3 に iPSC-NCC の免疫染色を示す。

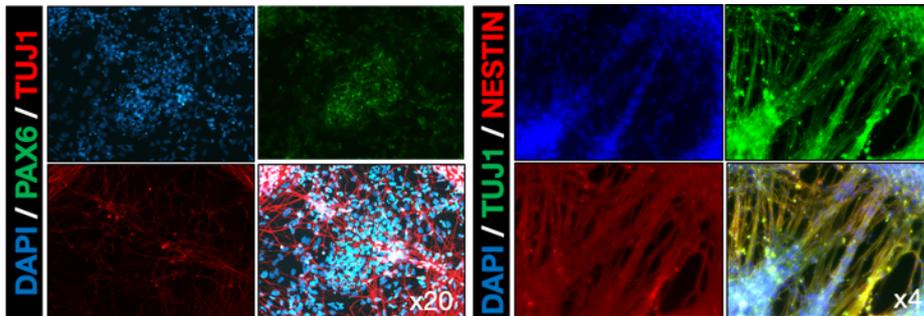


図3 iPSC-NCC の免疫染色。Neuron マーカー PAX6、NESTIN、 β III-tubulin (TUJ1) が陽性である。

(3) 神経系を有する肝芽作成

iPSC-HE, EC, STM, NCC の混合比率を種々に変えて肝芽作成を行った。オリジナルから条件を変え、HE, EC, STM の比率を 10:2:2 にした肝芽が vitro ではアルブミンの産生が良好であったため、これに EC、STM と同量の NCC を加えた肝芽を作成した。しかし、この比率ではアルブミン産生量が少なく、かつ、EC が早期に消退した。NCC の量を少なくすれば結果はやや良くなるものの、HE, EC, STM の 3 種から作成した肝芽のアルブミン産生能を凌駕する肝芽の作成はできなかった。NCC が EC の発育を阻害する可能性も検討されたため、NCC:EC=1:1 で 3 次元共培養をしたところ、EC の発育は阻害されることはなく、NCC が EC からなる毛細血管網に伴奏して走行し、STM が EC のまわりで pericyte に変化し、血管網を安定化させた際と同様の像が観察された (図 4)。そこで、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をもとに、神経が肝内血管系の安定に関わる可能性や神経が肝発生の途中から肝門部から肝の末梢に向かって発育進展することを考慮し、iPSC-NCC が構築した神経線維の上で iPSC-HE, EC, STM の 3 種から作成した肝芽を培養する試みを行った (図 5A)。

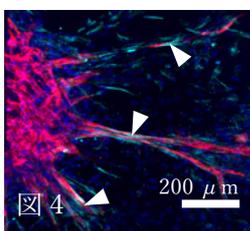


図4

図4 共培養開始後 10 日目。EC が構築した毛細血管様の管腔の周囲に NCC が伴奏している (白矢頭)。EC / NCC / DAPI

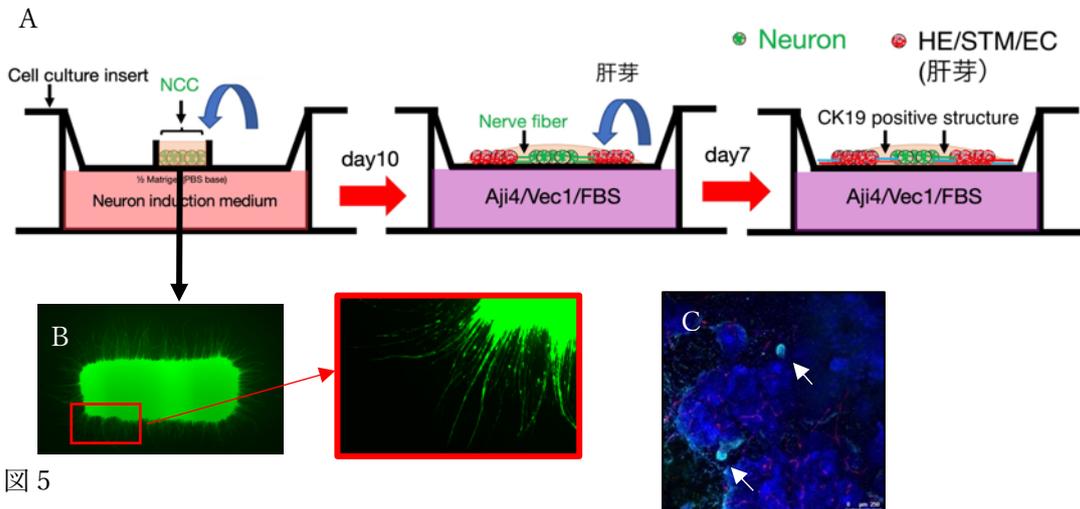
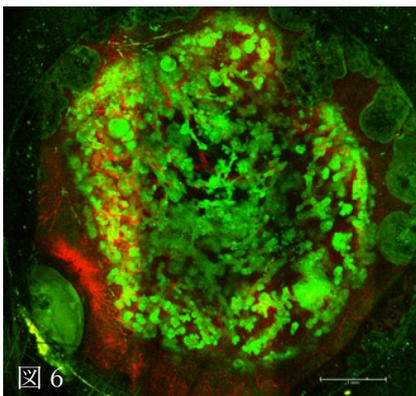


図 5

6well plate にセットした cell culture insert 上にマイクロチャンバーを置く。この中に NCC を NCC maintenance medium に懸濁し播種し、37°C で 1 晩培養した。その後マイクロチャンバー外枠を外し、マトリゲルを培養した NCC 上に添加して、薄く広げた。そして、6well plate に Neuron induction medium を添加して、10 日間培養した。すると NCC が外方に向かって神経線維を伸ばすようになる (図 5B)。この伸びている神経線維上にマトリゲル 100uL で懸濁した肝芽をのせて薄く広げた。ゲルが固まった後、培地を肝細胞用の培地 (Aji4/Vec1/FBS 培地) に交換して、7 日間培養した。その結果、肝芽より CK19 陽性の突起が出現した (図 5 白矢印)。コントロールとして行った神経線維のない群ではこの突起の形成は認められなかった。この肝芽を CK19、 β III-tubulin、CD31 の抗体で 3 重染色を行い蛍光顕微鏡下で観察したところ、正常肝組織の門脈域で観察される、胆管、神経、動脈が伴奏している形態を模倣しているように認められた。また、神経線維上で培養した肝芽の培養上清では、神経線維のない場合に比べ、統計学的に有意に多くのアルブミンの含有を認めた。

(4) 生体内への肝芽の移植

EGFP 等で標識し、iPSC-HE: EC: STM = 10:2:2 で作成した iPSC 肝芽を CW 内に移植し、蛍光色素で血流を可視化することにより、血管網を有するヒト型高次肝組織再構築過程における細胞間相互作用や血流因子の観察を蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡で経時的にライブ観察にて行った。移植した肝芽の中で iPSC-HE は増殖し、互いに接着し、8 日目までに 1 個 1 個の細胞を識別できない程になった。同時に iPSC-EC は血管網をこの中で形成し、血管網の密度は徐々に上昇した。移植後 3 日以内に iPSC からなる微小血管網に宿主よりの血流が観察できた。図 6 は移植後 2 週間の肝芽の高次肝組織構造を共焦点レーザー顕微鏡で 3 次元構築した像である。Green が EGFP で可視化した HE、赤は Rhodamin-dextran で血流を可視化した血流である。iPSC-HE よりなる肝実質は策状を呈し、一部で類洞のような血管網 (赤) が走行している所見が認められた。一部では分枝した胆管構造を疑わせる部分も認められる。しかし、(3) で作成した神経線維上で培養した肝芽は微小なものしか構築できておらず、CW 移植までには到っていない。CW 内は神経である脳表面であり、神経の上への移植と思われたが、脳表面は軟膜で覆われており、これまでの実験では神経線維が肝芽内に入り込む像は得られていない。今後脳表に小さな傷をつけ、脳内の浅い部位に移植する実験を試みる予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Naoto Koike | 4. 巻 なし |
| 2. 論文標題 The Role of Stem Cells in the Hepatobiliary System and in Cancer Development: a Surgeon's Perspective | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells and Cancer in Hepatology | 6. 最初と最後の頁 211 ~ 253 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-812301-0.00011-6 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 小池直人, 白石匡, 齋藤将喜, 大島祐二, 武内俊章, 有田誠司, 笹井大督, 河上牧夫 | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 多発性膵腫瘍として認められた膵神経内分泌腫瘍と自己免疫性膵炎の1切除例 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 膵臓 | 6. 最初と最後の頁 302-311 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |
| 1. 著者名 Tsuchida Tomonori, Murata Soichiro, Matsuki Koichiro, Mori Akihiro, Matsuo Megumi, Mikami Satoshi, Okamoto Satoshi, Ueno Yasuharu, Tadokoro Tomomi, Zheng Yun-Wen, Taniguchi Hideki | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 The Regenerative Effect of Portal Vein Injection of Liver Organoids by Retrorsine/Partial Hepatectomy in Rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 178 ~ 178 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010178 | 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 - |
| 1. 著者名 Sekine Keisuke, Ogawa Shimpei, Tsuzuki Syusaku, Kobayashi Tatsuya, Ikeda Kazuki, Nakanishi Noriko, Takeuchi Kenta, Kanai Eriko, Otake Yugo, Okamoto Satoshi, Kobayashi Tsuyoshi, Takebe Takanori, Taniguchi Hideki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Generation of human induced pluripotent stem cell-derived liver buds with chemically defined and animal origin-free media | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 17937 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73908-1 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 谷口英樹 | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 【幹細胞治療と疾患】総論 幹細胞治療の課題は克服できるのか? | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BIO Clinica | 6. 最初と最後の頁 400-401 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koike Naoto, Tadokoro Tomomi, Murata Soichiro, Sekine Keisuke, Ueno Yasuharu, Okamoto Satoshi, Uchida Yutaro, Takahara Ako, Nanjo Kazuki, Taniguchi Hideki |
| 2. 発表標題 Development of the hepatic nervous system in the ontogeny of mouse liver |
| 3. 学会等名 Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小池直人 |
| 2. 発表標題 消化器外科医として、臓器再生医療に臨む一身体内で長期機能を有する微小肝組織の開発 |
| 3. 学会等名 札幌医科大学東京同窓会例会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019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 | 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 | 武部 貴則 (Takebe Takanori) (20612625) | 横浜市立大学・先端医科学研究センター・特別教授 (22701) | |

| | 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究協力者 | 村田 聡一郎 (Murata Souichirou) (40436275) | 横浜市立大学・医学部・准教授 (22701) | |
| 研究協力者 | 小林 達哉 (Kobayashi Tatsuya) (60837839) | 横浜市立大学・医学研究科・特任助手 (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 |
|---------|---------|
| | |