

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293291

研究課題名(和文) 微小血管網及び胆管構造を有するヒト型高次肝組織の生体内での再構築

研究課題名(英文) Engineering of three dimensional human hepatic tissue with microvascular network and bile duct structures

研究代表者

小池 直人 (KOIKE, Naoto)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から作製した肝前駆細胞と、血管内皮細胞、間葉系幹細胞を共培養し作製したヒト型肝芽をマウス頭部観察窓内や腹腔内に移植し、構築された肝組織内での微小血管、胆管の構造を観察した。構築された肝組織内ではHNF4a陽性の肝細胞索様構造と、SOX9陽性の胆管様構造が観察された。肝細胞索様構造内には毛細胆管様の形態が認められたが胆汁産生は明らかでなかった。組織内の微小血管はEphB4陽性の静脈として観察され、門脈、動脈への分化は明らかでなかった。ラット肝硬変モデルにこの肝芽を移植し、肝線維化の予防効果を検討したところ、ラット血清内にヒトアルブミンの分泌が確認され、若干の線維化改善効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：We created three-dimensional liver buds in vitro by co-culturing hepatic endoderm cells with endothelial and mesenchymal cells prepared from human iPSC. The liver buds were implanted into mouse cranial windows or intra-abdominal organs and then the microvascular networks and bile duct structures reconstructed in the liver buds were histologically observed. In the results, HNF4a positive hepatic cord like structures and SOX9 positive bile duct structures were observed. The canaliculus like structures were also observed within hepatic cord like structures, however, bile production could not be seen. Whereas EphB4 positive microvessels were observed in these tissues, intralobular veins and arteries could not be identified. We transplanted the human liver buds into the liver of rat cirrhosis models to examine the inhibition effects of liver fibrosis. In the results, human albumin was detected in rat serum, and an improvement of liver fibrosis was confirmed.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝再生 微小血管 胆管構築

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次元血管網の構築に成功し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 (iPS肝細胞)に置換した肝芽を*vitro*で作成し、これを移植したところ、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)。今回の研究はこの組織をより成熟させ、動静脈や門脈、胆管構造を有する高次肝組織として長期安定化を試みたものである。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。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。高次機能を有する肝組織を生体内において再構成するための研究は、これまで主に大型組織の再構築に必須とされる血管化技術の未熟性のため阻まれてきた。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。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。

2. 研究の目的

CW法と、これまで確立した肝芽を腹腔内に移植する方法を基盤技術として、いまだ未確立の下記の技術開発を推進する。

(1) ヒト型微小肝組織内に胆管を構築させる最適な条件を決定する：これまで作成したヒト型肝組織は高度の機能を有することが証明された。しかし、その形態形成に関しては類

洞様組織や胆管様組織が一部で認められるものの均一でなく不十分であった。特に小葉間胆管動脈門脈を有するグリソン鞘を構築することは不可能であり、胆汁の分泌過程は観察できなかった。ここまで形成できる条件が設定されればヒト肝組織と血管網の再構築のみならず、胆管構築を計時的にライブ観察することが可能な世界初の実験系となり、その成長の様子を評価することができるようになる。胆汁分泌のライブ観察に関しては頭蓋内では困難と思われるので、新たなモデルの開発が必要である。

(2) 肝組織構築における血管内皮細胞や間葉系細胞の意義を評価する：これまで血管構築のための細胞ソースにはHUVECを用いてきた。しかし、生体肝には動脈門脈があり、それぞれに分化した血管構築する為の素材を投入する必要がある可能性がある。特に胎生期の胆管の分化には肝小葉内の門脈内皮や線維芽細胞に発現するJagged-1と肝前駆細胞との相互作用が重要と考えられている。これらの細胞をiPSC等で作製し共培養することにより、再構築される肝組織の構造や機能、生体内での生存期間に差がでる可能性があり、これらを計時的に観察する。

(3) 肝再生、胆管形成に関与すると思われる因子の解析：Hepatocyte growth factor (HGF)、Platelet derived growth factor (PDGF)、Transforming growth factor (TGF) は、肝再生、胆管構築、肝硬変における肝の線維化に大きく関与していると思われる因子で、これらの意義をこのモデルで解析することは肝再生、肝線維化予防を狙った創薬のプラットフォームになる。

3. 研究の方法

(1) Cranial 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からの血管内皮細胞(iPSC-EC)、MSC (iPSC-STM)の作成はNakazakiら、Samuelら等の方法を改変して行った(Nakazaki G et al., Circulation 2008, Samuel R. et al., PNAS 2013)。

(3) 肝芽作製法、及びCW、腹腔内組織への移植法

肝芽作製法：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。門注のために細胞数を減少させた微小肝芽も作成した。

肝芽の移植法：作成した肝芽をネブター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。腹腔内臓器では、肝腎に移植を行った。肝には肝葉の間にマトリゲルを利用して埋め込んだものと、門注にて細胞数を減らした微小肝芽を移植した。また、腎被膜下への移植はNature誌と同様に行った。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)肝芽を移植した動物を犠牲死させ、肝腎に移植した組織標本をパラフィンブロックから作成した。HE 染色にて構成された組織の形態観察を行った後、酵素抗体法を用いた免疫染色により肝細胞、胆管、血管内皮、間葉系細胞のマーカーを確認し、肝臓としての形態形成を評価した。使用抗体は次のごとく。

	抗体	メーカー
肝細胞 マーカー	抗 HNF1a マウスモノクローナル抗体	ThermoFisher Scientific
	抗アルブミン(ALB) ヤギポリクローナル抗体	BD Biosciences
胆管 マーカー	抗サイトケラチン (CK)19 ウサギモノクローナル抗体	Abcam
	抗 CK7 マウスモノクローナル抗体	DAKO Agilent technologies
	抗 CD10 マウスモノクローナル抗体	Leica biosystems
	抗 SOX9 ウサギポリクローナル抗体	Chemicon international
	抗ヒト CD31 マウスモノクローナル抗体	DAKO Agilent technologies
血管(内皮) マーカー	抗 CD31 ウサギポリクローナル抗体	Abcam
	抗 Ephrin B2 ヤギポリクローナル抗体	R & D systems
	抗 EphB4 ウサギポリクローナル抗体	Proteintech
	抗 Jagged-1 ウサギモノクローナル抗体	Abcam
	抗 SMA マウスモノクローナル抗体	DAKO Agilent technologies

(5) マウスの肝組織発生の評価
iPSCより構築された肝芽と、マウス肝発生各段階におけるgene signatureの比較は2013年のNature誌で既に報告している。本研究では組織レベルで比較するためにマウスE9.5からP7までの肝組織の構築過程、組織マーカーの発現を前述の抗体を用いた免疫染色で評価し、iPSC肝芽を移植して得られた高次肝組織と比較した。

(6) ラット障害肝モデル

当初マウスで行う予定であったが、肝硬変モデルがラットの方が作成しやすい事と、マウスより大型で手術手技、観察手技がしやすい事からラットで行った。ラットは免疫不全ラット(SD IL2RG KO, F344 IL2RG KO, SD Rag2 KO)を用い、ジメチルニトロサミン(DMN)腹腔内投与による肝硬変モデル、またはレトロシン(RS)腹腔内投与と部分肝切除による肝障害モデルを作成した。作成したモデルにiPSC肝芽を肝に移植し、肝線維化の改善の有無、アルブミンの産生等について評価した。

4. 研究成果

(1)生体顕微鏡下での iPSC 肝芽の観察
EGFP や KO で標識した all iPSC 肝芽を CW 内に移植し、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 1a)。iPSC で構築された高次肝組織構造を共焦点レーザー顕微鏡で 3 次元構築したところ、図 1b のごとく、iPSC-HE よりなる肝実質内(緑)に、iPSC-EC よりなる血管網(赤)が走行している所見が認められた(白は肝組織外のマウス血管)。しかし、胆管構造ははっきりしなかった。後の項で述べるように現時点での all iPSC 肝芽では組織標本でも胆汁分泌は観察できなかったため、この条件での機能血管の細かな定量までは行わなかった。

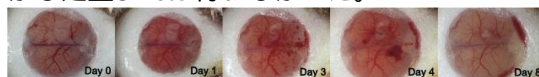


図 1a

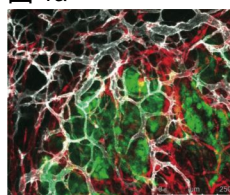


図 1b

(2) マウスの肝組織発生の評価

当初の計画では、肝組織内の門脈、動静脈を分化作成するために、CD31 陽性血管内皮細胞に、Jagged-1、Ephrin B2、EphB4 の遺伝子導入、または、サイトカイン等による誘導を予定していた。しかし、いずれの分子も今回の免疫染色の結果、及び文献的考察から必ずしも門脈、動静脈に特異的な分子でない事、既に iPSC がこれらの分子を発現していることがわかった。そこで、これらの遺伝子の導入手技を中止し、門脈、動脈、胆管分化に必要なマーカーを再検索するために、マウスの

E9.5 から P7 までの胎生、及び出生後肝を用いて、肝組織の発生過程を組織形態と、肝組織マーカーの免疫染色を用いて評価した。

その結果、E9.5 で肝憩室と思われる位置に肝細胞マーカー HNF4a 陽性の細胞が出現した。この時点では後に胆管マーカーとなる SOX9 も HNF4a 陽性細胞の一部に陽性に観察された(図 2 E9.5)。CD31 はこの周囲の細血管に陽性に観察された。

E10.5 では HNF4a 陽性の胎児肝組織のサイズは増大したが、この中の SOX9 の陽性細胞率は減少した。肝組織内にも CD31 陽性の微小血管が出現したが、肝小葉構造は全く見られなかった。この時点では ALB、SMA、CK19、CD10 は陰性であったが、門脈マーカーと思われていた、Jagged-1 は血管と関係なく広範囲に強陽性を呈し、動静脈マーカーと考えていた Ephrin B2、EphB4 は弱陽性に観察された。

E12.5 では肝実質内はまだ血液系の細胞が目立つが、多くの細胞に ALB の産生が確認された(図 2 E12.5)。CD31 は肝類洞様の細血管網で陽性所見を呈し(図 2 E12.5)、EphB4 もこれとほぼ同様に血管網で陽性を呈するようになった。これらの血管網のうちやや太い血管の周囲ではわずかに SMA の発現も認められた。胆管マーカー SOX9 は門脈に成り行く太い脈管の周囲に限定して分布するようになった。Jagged-1(図 2 E12.5)、Ephrin B2 は血管とは関係なく、まだ、肝全体に陽性所見を呈していた。

E15.5 では肝全体で ALB の産生が認められるようになった。CD31 陽性の類洞様の構造がより目立ち、門脈や中心静脈を思わせる太い血管も目立つようになった。EphB4 も同様にこれらの血管で陽性を示し、太い血管周囲での SMA の発現が明瞭になった。Jagged-1 陽性細胞は肝ほぼ全体に見られたが、陽性細胞の割合は減少した。SOX9 陽性細胞は E12.5 と同様、太い血管周囲に分布していたが、この時点までは CK19 や CD10 陽性の胆管構造の出現は見られなかった。

E17.5 では CD31、EphB4 陽性の類洞構造が更にはっきりと構築され(図 2 E17.5)、門脈と思われる太い脈管の周囲で ductal plate が形成された。それまで肝全体に陽性であった Jagged-1 はこの ductal plate の細胞で陽性を呈する様になった(図 2 E17.5)。SMA はこのような脈管の壁で強く陽性を示した。SOX9 はこの ductal plate の細胞で陽性で(図 2 E17.5)、この陽性細胞の一部で小葉間胆管を思わせる胆管構造が観察された。この時点でこの胆管構造に初めて CK19(図 2 E17.5 矢印)、CD10 陽性所見が認められた。

P0 では EphB4 は CD31 陽性の血管内皮のうち門脈よりも ductal plate の認められない静脈や類洞で強い陽性像を呈するようにな

った。Jagged-1 はこの時点でも ductal plate の細胞に主に陽性で、Ephrin B2 陽性細胞数は更に減少した。門脈周囲の SOX9 陽性細胞は CK19 陽性の小葉間胆管を形成し、CD10 はこれらの細胆管のみならず、肝細胞索の毛細胆管と思われる構造にも陽性となった。しかし、門脈周囲の動脈構造はこの時点まで認められなかった。

P7 になると CD31 陽性の肝類洞はよりはっきり構築され、小葉構造内に門脈(小葉間静脈)小葉間胆管とともに内皮に Ephrin B2 が強く陽性の動脈が出現した(図 2 P7)。この時点で Jagged-1 は門脈のみならず、動脈、胆管でも発現が強く認められた(図 2 P7)。胆管には CK19 がよりはっきり発現を呈し、CD10 はヘリング管と思われる細胆管にも強い陽性所見を示した(図 2 P7)。

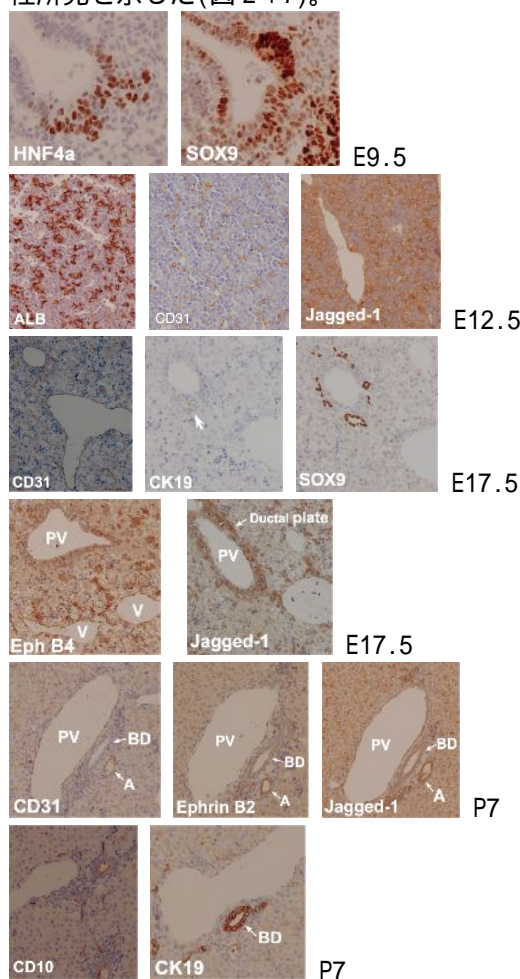


図 2 PV: 門脈, V: 静脈, BD: 胆管

(3) iPSC より構築した高次肝組織構造の評価
2013 年の Nature 誌で報告したごとく、CW 内移植では、構築された肝組織の機能は低く、腹腔内の環境が肝組織構築には重要と考えられた。そこで、今回、当初導入を予定していた Jagged-1 等の発現を既に有する all iPSC で作成した肝芽内で構築される脈管、胆管構造の詳細な観察には、ラット肝、及びマウス

腎被膜等の腹腔内に移植した肝芽を用いた。図3は移植後3週目の組織写真である。いずれの移植においても構築された高次肝組織では肝細胞索様の構造を呈する部分と、胆管様の構造を呈する部分が認められた。肝細胞索様の構造を呈する細胞では、核内にHNF4a陽性所見が認められた。Human CD31抗体で陽性を呈する類洞、またはそれよりやや太い脈管構造が肝細胞索様構造内に認められた(図3)。わずかではあるが、肝細胞索様構造内には毛細胆管を思わせるCD10陽性の微小管腔構造が認められたが、明らかな胆汁産生は認められなかった。この肝細胞索様の構造ではNature誌で報告したごとくヒトアルブミンの産生を認め、正常胆管で陽性を呈するSOX9はほぼ陰性であったが、肝細胞には通常発現しないCK19は強陽性であった(図3)。マウス肝の発生過程でアルブミン陽性細胞がCK19を発現している過程は見られなかった。しかし、肝芽から構築された肝組織はNature誌で報告したように機能的にはかなり分化した肝の性質を有していたことから、肝細胞から胆管細胞への部分的な分化転換が疑われた。一方、胆管様の腺管構造ではSOX9、CK19陽性で、一部でhuman CK7陽性所見を呈した。残念ながら脈管で見られたようにこの胆管様構造が宿主の胆管と交通する所見は認められなかった。胆管様構造は一部で肝細胞索様の構造と接するものの、CD10陽性の毛細胆管様構造と交通する所見もはっきりしなかった。CD31陽性の脈管ではJagged-1、EphB4の発現が認められたが、形態的に明らかな動脈は認められなかった。しかし、Ephrin B2は一部の脈管や胆管で強陽性を示し、研究当初の推測のごとく、Jagged-1、EphB4、Ephrin B2が、高次肝組織の形態形成を決定する上で必要充分の分子ではなく、今回のiPSC由来の細胞のみでは胆管、動脈門脈を有する小葉構造を構築するにはいたらなかった。マウス肝の発生過程で造血系の幹細胞が肝内に多数存在していたことから、門脈周囲での胆管、動脈の構築に、これら造血系幹細胞が関与している仮説をたて、造血幹細胞を加えた次回の研究を試みる予定である。

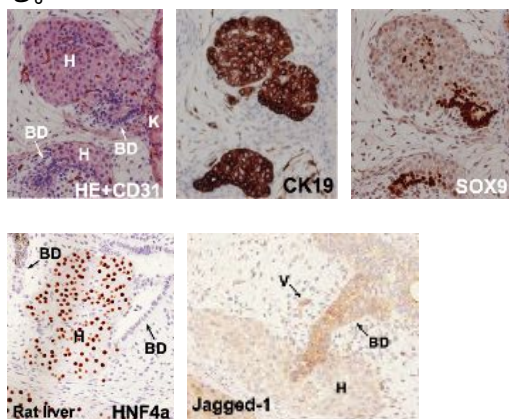


図3 H:肝細胞索様構造、BD:胆管様構造、V:血管、K:マウス腎臓

(4) ラット障害肝モデル

免疫不全ラットにDMN繰り返し腹腔内投与を行い作成した肝硬変モデルに、iPSCより作成した肝芽をマトリゲルに包埋して肝に移植したところ、ラット血清中にヒトアルブミンの分泌が確認され、肝線維化のマーカであるヒドロキシプロリンの減少が確認できた(図4)。また、シリウスレッド染色でも組織の肝線維化の改善も確認できた。

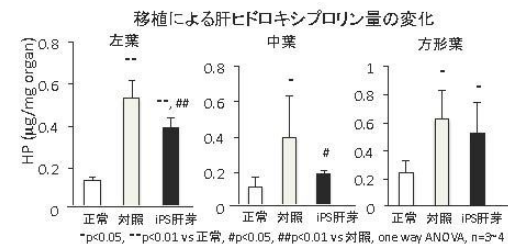


図4

RSの繰り返し腹腔内投与と30%肝切除による肝障害モデルでも、肝芽の移植によりヒトアルブミンがラット血清中に確認できたが、Nature誌におけるマウスの実験と同様に血清中のヒトアルブミンの濃度は移植部位により異なった(門注<肝被膜下<腎被膜下)(図5)。しかし、まだ、いずれの移植部位でも生着率が低く、アルブミンの産生量も少ない。また、経時的にアルブミンの産生量が減少するため、移植方法、肝芽の作成方法の改良を行っており、現在成績は向上中である。

RS/30%PH model: 血清中ヒトアルブミン濃度

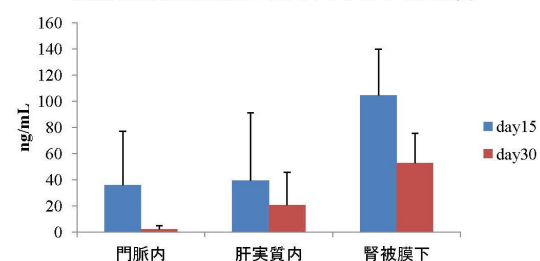


図5

このように肝線維化モデルがラットで確立された事により、今後、当初の予定であった肝再生、胆管構築、肝硬変における肝の線維化に大きく関与していると思われるHGF、PDGF、TGFの意義をこのモデルで解析中である。今後、このモデルは、肝再生、肝線維化予防を狙った創薬のプラットフォームになるとと思われる。

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 7件)

Sekine K, Takebe T, Taniguchi H. Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) . 査読無し、1597:2017, 207-216. DOI: 10.1007/978-1-4939-6949-4_15.

Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Taniguchi H. Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-chain amino acid metabolism. Development (Cambridge, England). 査読有り、144:2017, 1018-1024. DOI: 10.1242/dev.143032.

Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa HY, Taniguchi H. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. Cell stem cell. 査読有り、16:2015, 556-565. DOI: 10.1016/j.stem.2015.03.004.

小池直人、武内俊章、藤井隆之、大島祐二、有田誠司、井坂直秀、篠崎英司。FolFiri療法が長期奏効した透析前末期腎不全を有する直腸癌術後再発の1例。癌と化学療法。査読有り、42:2015, 1427-1430. [URL] <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/42110/1427>

Tomizawa M, Shinozaki F, Uchida Y, Uchiyama K, Fugo K, Sunaoshi T, Ozaki A, Sugiyama E, Baba A, Fukamizu Y, Kagayama S, Hasegawa R, Shirai Y, Oshima Y, Koike N, Toshimitsu Y, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Kishimoto T, Ishige N. Diffusion-weighted whole-body imaging with background body signal suppression/T2 image fusion and positron emission tomography/computed tomography of upper gastrointestinal cancers. Abdominal imaging. 査読有り、40:2015, 3012-3019. DOI: 10.1007/s00261-015-0545-2.

Takahashi Y, Takebe T, Enomura M, Koike N, Lee S, Nemeno JG, Sekine K, Lee JI, Taniguchi H. High-resolution intravital imaging for monitoring the transplanted islets in mice. Transplant Proc. 査読有り、46:2014, 1166-1168. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.11.089.

Takebe T, Koike N, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW, Taniguchi H. Engineering of human hepatic tissue

with functional vascular networks. Organogenesis. 査読有り、10:2014, 260-267. DOI: 10.4161/org.27590

[学会発表](計 4件)

高橋禎暢、武部貴則、小池直人、関根圭輔、谷口英樹 血管化膵島移植による革新的糖尿病治療法の確立 第16回日本再生医療学会総会 2017年3月7-9日 仙台国際センター(宮城県仙台市)
Naoto Koike, Yuji Ohshima, Toshiaki Takeuchi, Toru Kubota, Tadashi Shiraishi, Seiji Arita Prognostic value of tumor infiltrating CD8+ T cells and FoxP3+ Treg in HCC patients after surgical treatment IASGO World Congress 2016 2016年9月8-10日 Seoul, Korea

高橋禎暢、武部貴則、小池直人、関根圭輔、谷口英樹 血管化膵島移植による革新的糖尿病治療法の確立 第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17-19日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
Naoto Koike, Yuji Ohshima, Toshiaki Takeuchi, Seiji Arita Our Experiences of Major Hepatectomy for Hepatobiliary Carcinoma in Extremely Elderly Patients World congress of Surgery 2015 2015年8月23日-27日 Bangkok Thailand

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

谷口英樹 (TANIGUCHI, Hideki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 70262555

(3) 研究分担者

武部貴則 (TAKEBE, Takanori)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 20612625

(4) 研究協力者

村田聡一郎 (MURATA, Souichirou)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 40436275