

令和元年6月12日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18403

研究課題名(和文)肝傷害誘導モデルマウスを用いたin vivoにける肝臓分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an in vivo differentiation system for liver cells using a fetal liver-deficient mouse model

研究代表者

樋口 裕一郎 (Yuichiro, Higuchi)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

研究者番号：00596281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では多能性幹細胞から肝細胞を分化誘導する方法として、マウス胎仔肝臓の発生メカニズムを利用した新規in vivo分化誘導技術の確立を試みた。マウス胎仔肝芽細胞においてヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼを発現するトランスジェニックマウス(Afp-TKマウス)を作製し、薬剤の投与依存的に胎仔肝芽細胞への障害を誘導できるモデルを確立した。障害を誘導したAfp-TKマウス胎仔肝にマウス肝芽細胞を移植すると、移植した肝芽細胞による肝臓の補完がおきることを確認した。以上の結果より、Afp-TKマウスを用いたin vivo分化誘導技術が、多能性幹細胞由来の肝芽細胞にも応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の主要構成要素である肝細胞は、新しい薬の効果を検証するための非常に重要なツールである。現在、ヒトの肝細胞はドナーの了承を得て提供されるものに限られており、個人差や有限性などに課題を抱えている。これらを克服するソースとして期待されるのが、ヒトiPS細胞より作製される肝細胞である。本研究では薬物の投与依存的に、胎仔期の肝臓に障害を誘導できる遺伝子改変マウスを新たに作製した。その肝臓に未熟な肝臓細胞を移植したところ、障害誘導された肝臓が移植細胞によって補完される現象を確認した。この技術をヒトiPS細胞に応用することで、より成熟度の高い肝実質細胞を作製できるようになるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to establish in vivo differentiation of mature hepatocytes, which can reconstitute the liver in a liver-injured mouse model, using human pluripotent stem cells. I generated hepatoblast-injured model Afp-TK mice. Afp-TK mice express herpes virus thymidine kinase 1 (TK) under the control of the alpha-fetoprotein (Afp) promoter. Hepatoblast degeneration can be induced by administration of gancyclovir. I transplanted mouse hepatoblasts into the fetal liver of Afp-TK mice with induced hepatoblast degeneration. The damaged livers were complemented by the transplanted hepatoblasts. This observation suggests that the liver complementation system of Afp-TK mice is applicable for hepatoblasts derived from human pluripotent stem cells.

研究分野：実験動物学

キーワード：肝臓 肝芽細胞 Ex-utero法 Afp-TKマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウス肝細胞をヒト肝細胞へと置換することによって作製されるヒト化肝臓マウスは正常ヒト肝臓と極めて近い構造・機能を再現する *in vivo* モデルとして、ドラッグスクリーニングなどの創薬技術やヒト肝臓疾患モデルの観点から注目されている (Mercer et al., Nat. Med, 2001, Suemizu et al., BBRC, 2008, Hasegawa et al., BBRC, 2011)。現在、その材料となるヒト肝細胞はドナーの了承を得た上で提供される生体材料に限られている。しかし、ドナーから提供されるヒト肝細胞は個人差によってマウス肝臓への生着性や代謝酵素の発現レベルが大きく異なるため、均質なヒト化肝臓マウスを生産するための障害となっている。また、現時点では肝細胞を試験管内で増やすことが困難なため、よいロットの肝細胞を特定できたとしても、その量に限りがあるという問題もある。これらの問題を克服しうる新たな肝細胞のソースとして注目されるのが、ES 細胞、iPS 細胞に代表される多能性幹細胞である。多くのグループが *in vitro* において多能性幹細胞から肝細胞を分化誘導したとする報告を行っており、それらの中にはマウス肝臓への生着が認められ、血中へのアルブミン産生・分泌を確認したとするものもある (Duan et al., Stem cells, 2007, Basma et al., Gastroenterology, 2009, Yusa et al., Nature, 2011)。しかし、マウス肝臓への生着性や *in vivo* におけるヒト肝細胞としての成熟度はいずれも低く、*in vitro* で作製された多能性幹細胞由来の肝細胞は、ヒト化肝臓マウスを作製するための細胞源として未だに不十分である。

2. 研究の目的

2010 年、小林らは膵臓発生のマスター遺伝子である Pdx1 をノックアウトしたマウスの胚盤胞にマウス、もしくはラットの iPS 細胞を導入することで、iPS 細胞由来の膵臓を持つマウスが得られることを報告した (Kobayashi et al., Cell, 2010)。この報告より、肝臓形成不全の表現型を示すマウスの肝臓を多能性幹細胞に補完させることで、*in vivo* において肝臓再構成能力を有する肝細胞を作製できるのではないかと推測した。この仮説が正しければ、肝臓形成不全マウスに多能性幹細胞を導入して肝臓を補完させた後、肝細胞を単離して肝臓マウスに移植することで、多能性幹細胞由来の肝臓をマウスの生体内に再構築することが出来る。

3. 研究の方法

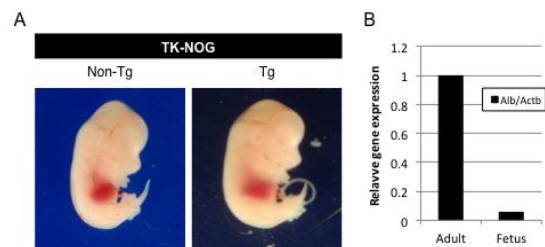
本研究の目的を達成するためには表現型として肝臓形成不全を示す遺伝子改変マウスが必要となる。しかしながら肝臓形成不全を示す遺伝子改変マウスは、肝臓の他にも胚体外組織や神経系譜、心臓中胚葉、横中隔といった臓器の異常を伴うものが多く報告されている。そこで本研究では、薬剤の投与依存的に胎仔肝臓への障害を誘導できるトランスジェニックマウスを作製し、初期肝臓発生の生じる胎生 8-12.5 日目において選択的に肝臓の形成不全を誘導できるモデルを新たに樹立する。形成不全を誘導したマウス肝臓を移植細胞に補完させることで、*in vivo* 分化誘導系の確立とする。

4. 研究成果

既存の肝障害誘導モデルを用いた胎仔肝障害誘導の検証

申請者が所属する実験動物研中央研究所ではヒト化肝臓マウスを作製するための肝傷害モデルマウスとして、マウスアルブミンプロモーター下でヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (HSVtk) を発現するトランスジェニックマウス (TK-NOG マウス) を作出している。TK-NOG マウスにガンシクロビル (GCV) を投与すると、薬剤依存的にアルブミンを発現する肝細胞への傷害を誘導することができる。アルブミンは胎仔期の肝芽細胞にも発現することが確認されているため、TK-NOG マウスを胎仔肝臓への障害誘導モデルに応用できるか検証を行った。妊娠中の TK-NOG マウスにおいて、胎生 10.5 日目と胎生 12.5 日目に GCV を 10mg/kgBW 投与し、胎生 14.5 日目で肝臓発生への影響を確認した。結果、雌雄と GCV 投与の有無に関らず肝臓形成不全の表現型は観察されなかった (図 1A)。そこで胎生 14.5 日目の TK-NOG マウス胎仔肝と、成体の TK-NOG マウス肝臓より total RNA をそれぞれ回収し、HSVtk のプロモーターとして用いているアルブミンの発現量を定量的 RT-PCR によって比較した。結果、成体のマウス肝臓と比較して、胎仔肝ではアルブミンの発現量が 1/10 以下であることを確認した (図 1B)。以上の結果より、TK-NOG マウスを用いた胎仔肝の形成不全誘導は難しいものと判断した。

図 1. TK-NOG マウス胎仔肝への障害誘導

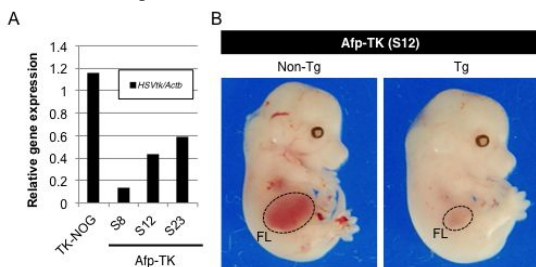


新規胎仔肝傷害誘導モデルの開発

TK-NOG マウスにおいて胎仔期の肝傷害を誘導できなかったため、Alpha-fetoprotein (Afp) プロモーター下で HSVtk を発現するトランスジェニックマウスを新たに樹立した。Afp は胎生 8 日目以降の肝芽細胞における発現が報告されており、肝臓発生における最初期のマーカー遺伝子として知られている。マウスゲノムへの Tg 挿入及び次世代への Tg 伝達を 3 ラインで確認し、この 3 ラインについて、胎生 12.5 日目肝臓における HSVtk 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR によって解析した。結果、3 ライン中 2 ラインが、TK-NOG マウス成体肝臓における HSVtk 遺伝子の発現量と比較して、5 割前後の発現量を示すことを確認した (図 2A)。そこでこの 2 ラインについて、胎仔肝臓の形成不全を誘導できるか検証を行なった。胎生 10.5 日目の母体に 100mg/kgBW で GCV を腹腔内投与し、胎生 14.5 日目にサクリファイしたところ、いずれのラインでも肝臓の形成不全を示す胎仔を確認した。ジェノタイプの結果、

肝臓形成不全を示した胎仔は全て Tg 個体であり、特に一方のライン (S12) では雌雄に関係なく、安定して肝臓の形成不全を誘導できることを確認した (図 2B)。

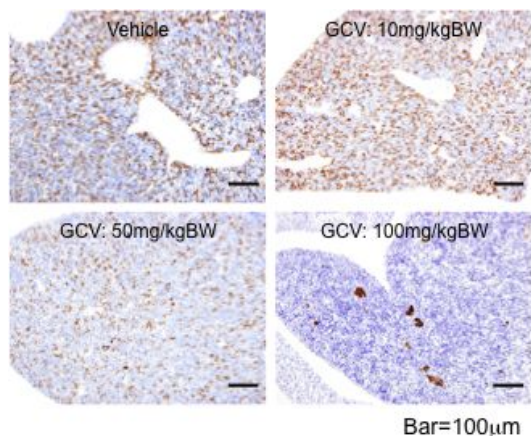
図 2. Afp-TK マウス胎仔肝への障害誘導 1



しかしながら、肝臓形成不全を誘導した Tg 胚は出生に至らず、胎生致死となることも確認した。これは肝臓の消失とともに、Afp を発現する胚体外組織 (特に羊膜) への障害が原因であるものと推測された。そこで GCV の投与量と投与のタイミングについて詳細な検討を行い、胎生 12.5 日目に 50mg/kgBW で GCV を腹腔内投与することにより、肝芽細胞への緩慢な障害を誘導した上で、胎生致死を回避できることを確認した (図 3)。

図 3. Afp-TK マウス胎仔肝への障害誘導 2

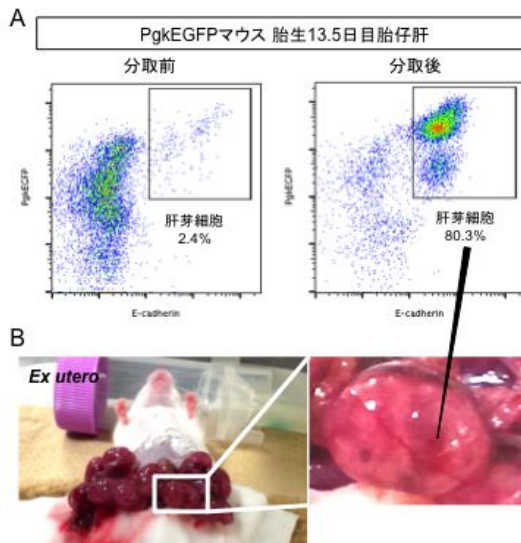
抗 E-cadherin 抗体を用いた肝芽細胞の染色



Afp-TK マウスを用いた胎仔肝臓補完

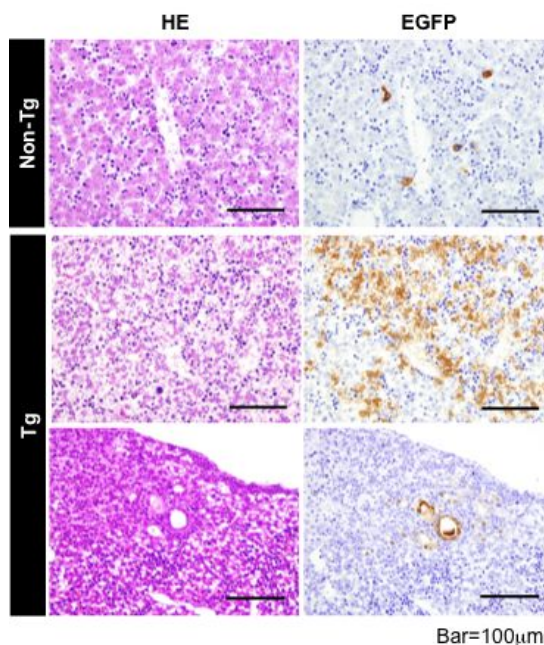
作製した Afp-TK マウスにおいて、胎生期の肝臓に直接細胞を移植することで、形成不全を誘導した胎仔肝臓の補完を行えるか検証を実施した。胎仔肝臓に細胞を移植するため、子宮外発生法 (Ex utero 法) の技術を導入した。レシピエントとして Afp-TK マウス (♂、ヘテロ) と IQI マウス (♀) を交配し、胎生 12.5 日目に母体の腹腔内へ GCV を 50mg/kgBW で投与し、Afp-TK マウス胎仔肝芽細胞における緩慢な障害誘導を実施した。またドナー細胞として、全身性に EGFP を発現する PgkEGFP マウスの胎生 13.5 日目肝臓より、E-cadherin を指標として肝芽細胞を分取した (図 4A)。レシピエントが胎生 13.5 日目となるタイミングにおいて麻酔下で母体を開腹し、子宮筋膜を切開して羊膜に包まれた胎仔を露出させた後、実体顕微鏡下でその肝臓に 1 匹当たり 1×10^5 個ずつドナー細胞を直接注入した (図 4B)。

図 4. Afp-TK マウス胎仔肝への PgkEGFP マウス胎仔肝芽細胞移植



細胞移植後に胎仔を腹腔内に戻し、麻酔からの覚醒を確認した後、帝王切開を行う胎生 19.5 日まで通常通りの飼育を行った。帝王切開後、蘇生した胎仔より肝臓を採取し、抗 EGFP 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、移植細胞のレシピエント肝臓への寄与を確認した (図 5)。その結果、EGFP を発現する移植細胞由来の肝実質細胞がレシピエント肝臓組織に寄与しており、Afp-TK マウス胎仔では同腹内の野生型マウス胎仔に比べて、その寄与率が高いことを確認した。また、同肝臓中には EGFP を発現する胆管様構造も存在し、二分化能を有する肝芽細胞がレシピエント肝臓中で実質細胞と胆管細胞のいずれにも分化していることを確認することができた。これらの結果より、Afp-TK マウスを用いた胎仔肝臓補完技術が、マウスやヒトの多能性細胞由来肝芽細胞にも応用できる可能性が示唆された。

図 5. Afp-TK マウスにおける肝臓補完の確認



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Yuichiro Higuchi, Takeshi Takahashi, Kenji Kawai, Hayato Hikita, Tetsuro Takehara, Hiroshi Suemizu. “Dual reconstitution model of the liver and hematopoietic system using mouse fetal liver cells” 2017/6/14-17, ISSCR, Boston
2. Yuichiro Higuchi, Kenji Kawai, Hiroshi Suemizu. “Differentiation of bi-potent hepatoblasts into hepatocytes and cholangiocytes in the hepatoblast-depleted fetal liver of an AFP-HSVtk transgenic mouse (Travel Award)” 2018/6/18-24, ISSCR, Melbourne

〔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〕

特記事項なし