

令和元年5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15046

研究課題名(和文) 肝臓生着因子同定による移植型培養肝細胞の開発

研究課題名(英文) Generation of transplantable hepatocytes by identifying engraftment factors

研究代表者

川又 理樹 (Kawamata, Masaki)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80602549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は肝細胞移植時にTbx3陽性肝細胞のみが肝臓に生着するという仮説のもとに遂行する。目的達成のためにまずTbx3レポーターマウスの作製を行った。BL6Jマウス由来のES細胞を新たに樹立し、このES細胞に対してCRISPR/Cas9システムを用いてTbx3-Venus knockin ESクローンを作製した。インジェクションにより、キメラマウスを経てヘテロ型 knockinマウスを得ることに成功した。ヘテロ型マウスの肝臓におけるVenus陽性細胞の局在を調べた結果、中心静脈周囲の肝細胞で最も強い内在性Tbx3と同じ発現パターンが観察され、極めて正確なTbx3レポーターマウスが作製できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓におけるTbx3陽性細胞は高い再生能力を持つことが最近の研究で分かってきた。一方で、障害を受けた肝臓に対する培養肝細胞の移植効率は一般的に低く、特定の細胞のみが生着できる可能性が考えられている。本研究で作製したTbx3-VenusレポーターマウスによってTbx3陽性細胞のみを集めることが可能になるため、Tbx3陽性細胞が移植能力が極めて高い性質を持つことが証明できれば、この細胞の特性を調べ、移植能力に決定的な因子を同定することが可能となる。更に、この因子を培養肝細胞で活性化させれば移植効率が劇的に向上し、将来的に肝臓の再生医療や疾患治療が可能になる点において社会的に大きな貢献となる。

研究成果の概要(英文)：In order to verify the hypothesis that the Tbx3-expressing hepatocytes have the ability to engraft in the liver when transplanted, we first addressed to generate Tbx3-Venus reporter knockin (KI) mice. The KI ES clones were obtained using CRISPR/Cas9 system. Heterozygous KI mice could be generated from a chimeric mouse which was produced via microinjection of the KI ES cell clone into the blastocysts. The heterozygous mice show the similar expression pattern of Venus fluorescence to that of endogenous Tbx3, suggesting that we could generate exact reporter mice to monitor Tbx3 expression in vivo.

研究分野：分子生物学、発生学、再生医療

キーワード：肝臓 移植 遺伝子改変マウス 誘導肝細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は肝癌、肝硬変、代謝疾患、胆道閉鎖症など多くの疾患が発症し、重度の場合は肝移植を必要とするが、ドナー数が少なく多くの人が移植を受けることができず死に至っている。そこで肝臓器移植の代替法として期待されているのが細胞移植法である。これまでの研究においてマウスやヒトの肝臓から精製した肝細胞を肝障害マウスに移植すると肝臓に生着し、それらの肝細胞は正常な肝機能を示す事が証明されている (Overturf et al., *Nat. Genet.*, 1996; Azuma et al., *Nat. Biotechnol.*, 2007)。更に、この肝細胞移植法はチロシン血症マウスの治療に有効である事も証明されており、臨床応用への大きな可能性を秘めている。一方、ヒトへの臨床応用を考えた場合、巨大な肝臓の機能を補うために大量の肝細胞を培養で増やし、且つ、それらが高い生着能を持つことが条件となる。iPS, ES, 胆管オルガノイド由来の肝細胞は大量培養は可能だが、生着能が低いことが問題となっている。この問題を克服しない限り、細胞移植の臨床応用の実現は極めて難しい。

正常時の肝臓では肝細胞はほとんど増殖しないため幹細胞の同定は困難とされてきたが、自己増殖する Tbx3 陽性肝細胞 (ここでは肝幹細胞と命名する) が肝臓の中心静脈周囲に存在することが証明された (Wang et al. *Nature* 2015)。一方、申請者らはこれまで *in vitro* の系で増えないとされてきた肝細胞の培養に成功し、肝細胞に 3.6%程しか存在しない 2c の DNA 量をもつ肝細胞が増殖する起源細胞であることを明らかにした (Katsuda, Kawamata et al. *Cell Stem Cell*, 2017)。以上の知見から、肝細胞移植時には中心静脈周囲の Tbx3<sup>+</sup>/2c 肝幹細胞が生着に優れた細胞であると考えられる。本研究ではこの仮説を証明し、生着能を制御する遺伝子を特定する。更に生着能の乏しい培養肝細胞の生着効率を高めることで、細胞治療の実現を目指す。

## 2. 研究の目的

誘導肝細胞様細胞: iHep(induced hepatocyte-like)細胞は Hnf4a と Foxa1, 2, 3 のいずれかの 2 つの転写因子を線維芽細胞に導入し、Direct reprogramming によって作製される。この細胞は Albumin の発現や Cyp 活性を持つなど肝細胞の性質を有し、無限の増殖能も持つ。また、肝細胞への分化誘導を介さずに移植によって肝臓に生着し、成熟肝細胞として機能する事が証明されている。iHep 細胞は ES・iPS 細胞に比べて分化誘導ステップを必要としない点で大きなアドバンテージを有するが、やはり肝臓への生着能は低く、臨床応用は現実的ではない。本研究は iHep 細胞による細胞移植・再生医療の実現に向けて、生着を制御する遺伝子とそのメカニズムを解明し、これらの分子機構を利用することで高効率な生着能を有する iHep 細胞を開発し、肝細胞移植治療マウスモデルの確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

肝幹細胞特異的に発現する Tbx3 を蛍光で認識し、FACS で分離・回収するための新規 Tbx3-Venus KI マウスを作製する。CRISPR/Cas9 を用いることで ES 細胞での相同組換えを迅速に行い、キメラ、ヘテロマウスの作製を行う。ヘテロマウスが得られ次第、成体マウスから肝細胞を調整し、Venus 蛍光と Hoechst33342 染色をもとに Venus<sup>+</sup>/2c, Venus<sup>+</sup>/4c, Venus<sup>-</sup>/2c, Venus<sup>-</sup>/4c 細胞を FACS で分離・回収する。これらの細胞は肝障害モデルマウス (Fah<sup>-/-</sup>) へ移植し、肝臓への生着能を比較する。同時に RNA の回収も行い、RNA-seq により生着能が最も高い細胞集団に特異的に発現する遺伝子を特定し、生着を促す遺伝子の候補とする。更に、これらの候補遺伝子を iHep 細胞に強制発現させ、移植能の改善を試みる。

一方で、Tbx3-Venus 蛍光システムを利用し、Venus 陰性 iHep 細胞が陽性へと転換する培養法を開発し、これら Venus 陽性細胞が高い生着能を獲得するかを調べる。Tbx3 は肝幹細胞以外に ES 細胞 (Niwa et al., *Nature* 2009) や肝芽細胞 (Suzuki et al., *Development* 2008) などの幹細胞で高く発現している。申請者は 4 つの低分子化合物でラット ES 細胞の樹立に成功し (Kawamata and Ochiya, *PNAS* 2010)、そのうちの 3 つの低分子化合物によって肝幹細胞の半永久的増殖にも成功しており (Katsuda, Kawamata et al. *Cell Stem Cell*, 2017)、低分子化合物でのステムセル培養に精通している。この経験をもとに、これら 4 つの低分子化合物を中心に、様々な幹細胞培養に使われている化合物を組み合わせることで、Venus 陽性 iHep 細胞を選択的に培養、あるいは Venus 陰性 iHep 細胞を陽性細胞へと転換させ、生着能の改善を試みる。

## 4. 研究成果

Tbx3 レポーターマウスの作製のため、CRISPR-Cas9 を用いて 129 ES 細胞株に対して Tbx3-Venus KI vector を導入、KI 細胞株を取得し、キメラマウスを作製した。しかし germline transmission が起きずヘテロ型マウスを得ることができなかった。この原因が使用した培地中の高濃度 MEK

inhibitor によるものと考え、低濃度 MEK inhibitor に変換した培地で新たに BL6 マウス胚盤胞から良質な ES 細胞を樹立した。または KI plasmid の 3' arm 内の 3' UTR 領域がおよそ 50 bp 欠損していることも原因であると考え、これも改良した KI vector で再度 Tbx3-Venus KI ES 細胞株を作製し、インジェクションによりキメラマウス作製した。その結果、germline transmission を経てヘテロ型 knockin マウスを得ることに成功した。ヘテロ型マウスの肝臓における Venus 陽性細胞の局在を調べた結果、中心静脈周囲の肝細胞で最も強い内在性 Tbx3 と同じ発現パターンが観察され、極めて正確な Tbx3 レポーターマウスが作製できた。

## 5. 主な発表論文等

該当なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 鈴木淳史

ローマ字氏名: Atsushi Suzuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。