

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17561

研究課題名（和文）胚盤胞補完法を用いた移植可能な肝臓作製技術の開発

研究課題名（英文）Development of technology for creating transplantable livers using blastocyst complementation

研究代表者

鈴木 悠地（Suzuki, Yuji）

岩手医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：00779332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：動物の発生段階で肝臓欠損の表現型となることが知られている、Hematopoietically expressed homeobox（以下Hhex）ノックアウトマウスを用いた同種胚盤胞補完法による検討を進めた。EGFP発現マウス由来ES細胞を注入して、個体発生が得られたマウスキメラ胎仔胎生11.5日の解析で、Hhexホモノックアウト胚由来のキメラでは肝芽細胞がドナーES細胞由来に置換された。また、同種胚盤胞補完法により作出したHhexホモノックアウト胚由来のキメラは成体まで正常に発育した。本研究により、多能性幹細胞の分化の場となる肝臓欠損の環境がHhexの制御で実現できることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、異種胚盤胞補完法によって、大型固形臓器である肝臓を創出し、移植可能であることを証明する初の試みである。胚盤胞補完法による肝臓再生の将来的な展開は、ブタなどの大動物の生体内を使って、ヒトに移植可能なヒト多能性幹細胞由来の肝臓を作製することである。実現するためには、ヒトと臓器サイズが合致する個体での臓器欠損動物の作製、進化的な距離の遠い種間でキメラを作出するための技術開発、医学的ニーズと生命倫理に関する議論など解決すべき課題は多いが、胚盤胞補完法によりヒトに移植可能な肝臓をはじめとする臓器を作製することが実現すれば、ドナー臓器不足という人類が抱える医療問題の一つを解消できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In our study, we utilized Hematopoietically Expressed Homeobox (Hhex) knockout mice. These mice are known to exhibit a phenotype of liver deficiency during the developmental stage. Our experiment involved injecting embryonic stem (ES) cells, which were derived from mice expressing Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), into the embryos of the knockout mice. We then analyzed these chimeric mouse embryos at 11.5 days post-fertilization. Our analysis revealed that in the chimeras, which were derived from Hhex homozygous knockout embryos, hepatic bud cells had been replaced by the donor ES cells. Notably, these chimeras exhibited normal development from their embryonic stages through to adulthood. Our study has provided new insights into how the environment necessary for the differentiation of pluripotent stem cells into liver tissue can be controlled by Hhex.

研究分野：消化器病学

キーワード：臓器再生 肝移植 肝不全 再生医療

1. 研究開始当初の背景

内科治療に抵抗性の末期肝不全に対する唯一の根治的治療は肝移植である。しかしながら、肝移植ドナーが比較的充実している米国であっても、肝移植待機患者における待機死亡率は2割、本邦においては、実に5割が臓器移植を受けられず死亡している。このような現状から、移植臓器不足の克服が社会的に求められている。移植臓器不足を解決するために、移植可能な臓器を作製することは再生医療分野の技術開発における重要な課題の一つである。移植可能な臓器を作製するための技術的課題として、多能性幹細胞である胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) による臓器創出を考えた場合、肝実質細胞、胆管細胞、門脈、肝動静脈により三次元的に構築された肝臓について、“移植可能な肝臓 (臓器)” として試験管内で作製するには至っていないという問題点が挙げられる。移植可能な肝臓を作製するための解決策として、動物の発生過程を利用して移植用臓器を作製する方法が有効である。具体的には、遺伝子工学的手法で特定臓器の欠損動物を作製し、その欠損動物の受精卵の胚盤胞期に多能性幹細胞を注入すること (胚盤胞補完法) で多能性幹細胞由来の臓器を作製する技術である。この技術を用いれば、肝細胞による代謝機能、胆管による胆汁排出機能などを維持した、機能的な移植に耐えうる臓器を作製できる可能性がある。

2. 研究の目的

胚盤胞補完法により、動物の体内に人に移植可能な肝臓を作製するための基盤研究として、ES 細胞由来の肝臓を作製する技術を確認することを目的とした。また、動物体内で作成した、ES 細胞由来の肝臓が同所移植可能であることを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胚盤法補完法による ES 細胞由来の肝臓の作製

Hhex (Hematopoietically Expressed Homeobox Hhex) 遺伝子は肝臓の発生に関与することが報告されており、この遺伝子の機能が欠失した動物個体は、肝臓欠損の表現型を示す。この Hhex 遺伝子のヘテロ欠損マウスを交配して得られた受精卵の胚盤胞期に、EGFP ラベルされた正常マウス ES 細胞を microinjection にて注入した (胚盤法補完)。注入した胚を偽妊娠マウスに導入し、キメラマウスを得た。胎生 11.5 日時点の胎仔の肝芽細胞 (発生が進むと、胆管細胞と肝細胞に分化する前駆細胞) のキメリズム (ES 細胞の寄与率) を解析した。また、胚盤法補完法により個体発生が得られた Hhex ホモ欠損マウスが、生育可能な固定であるかどうかを観察した。また、生体まで発育した Hhex ホモ欠損マウスの肝臓について組織学的に評価した。

(2) マウス同所肝移植プロトコルの確立

胚盤胞補完法で作成した臓器をマウスなど小動物で同所肝移植を行うために、3~18 倍の顕微鏡下でのマイクロサージャリーによる同所移植手術手技 (右図)、プロトコルの確立を移植外科医の協力を得て行った。



本研究の移植手術で用いる手術用顕微鏡

4. 研究成果

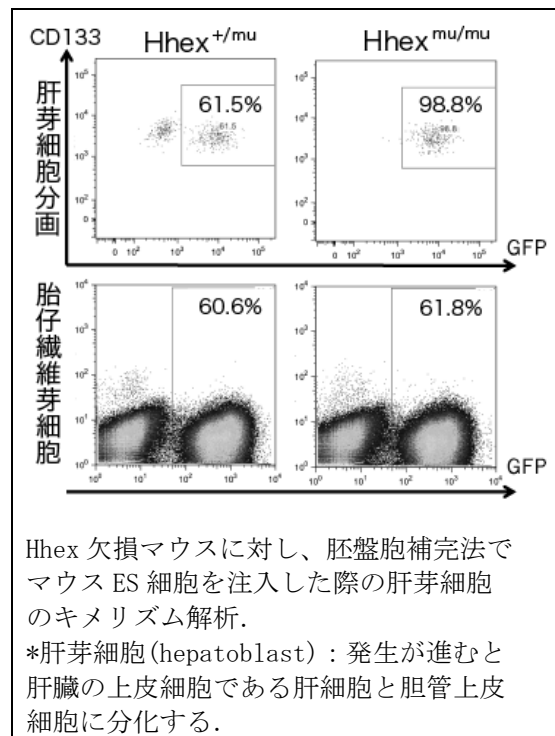
(1) 胚盤法補完法による ES 細胞由来の肝臓の作出

EGFP 発現マウス由来 ES 細胞を注入して、個体発生が得られたマウスキメラ胎仔胎生 11.5 日の解析で (次ページ図)、同腹仔の Hhex 遺伝子ヘテロ欠損マウス胚由来のキメラは胎仔繊維芽細胞と肝芽細胞のキメリズムが同率であったのに対し、Hhex ホモ欠損マウス胚由来のキメラでは肝芽細胞がドナー ES 細胞由来に置換されていた。そして、同種胚盤胞補完法により作出した Hhex ホモ欠損マウス胚由来のキメラは成体まで正常に発育することを確認した。また、成体まで正常に発育した Hhex ホモ欠損マウス胚の肝臓の肉眼および

組織形態は正常に構築されていた。EGFP を指標に ES 細胞の肝臓の構成細胞の寄与率を評価した結果、胆管細胞ではほぼすべての細胞が EGFP 陽性細胞で構築されていた。肝細胞での EGFP の発現細胞の割合は少なかったが、これは EGFP の発現が肝細胞ではサイレンシングされていることに起因することが示唆された。そこで、TdTomato 発現の ES 細胞を樹立の上、ES 細胞由来の肝臓を同じく作成し、TdTomato 陽性の肝細胞で肝細胞が構築されることを確認する方針とした。今回の検討で、キメラマウスの作成効率などの課題が浮き彫りとはなったものの、ES 細胞由来の肝臓の作成が可能であることを明らかにすることができた。

(2) マウスへの同所肝移植プロトコルの確立

合計で 50 回程度のマウス同所肝移植手術を実施し、小動物間での肝移植を行うことのプロトコルは概ね確立することができた。しかしながら、今回の検討では、胚盤法補完法で作成した臓器が同所移植可能であるかという研究目的の一つを達成するまでには、検討を進めることができなかった。今後も研究を継続し、胚盤法補完法で作成した臓器の同所移植により本手法で作成した臓器が移植可能であることの実証を目指す。そして、マウスラット間など異種間による臓器作成に向けた研究開発を進めていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Y, Kakisaka K, Sato T, Mikami R, Abe H, Sasaki T, Takikawa Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Tc-99m GSA scintigraphy within the first 3 days after admission as an early predictor of outcome in severe acute liver injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92058-6	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Editors: Naoki Tanimizu (Book Chapter: Suzuki Y, Sasaki T, Kakisaka K, Abe H, Takikawa Y)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 281
3. 書名 Hepatocytes	

〔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
研究協力者	正木 英樹 (Masaki Hideki)		
研究協力者	片桐 弘勝 (Katagiri Hirokatsu)		

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
---------	---------