

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07959

研究課題名(和文)細胞移植をベースとする肝再生治療モデルの確立と免疫拒絶回避のための新規治療の開発

研究課題名(英文) Establishment of a liver regeneration treatment model based on cell transplantation and development of a new treatment against immune rejection.

研究代表者

石川 哲也 (Ishikawa, Tetsuya)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授

研究者番号：10288508

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)：HSVtk (TKトランスジェニックマウス)-ガンシクロビル投与モデルへのAuto及びAllo肝細胞移植による肝再生と免疫拒絶について検討を行った。Auto肝細胞移植後、回復時の肝臓はドナー肝細胞とレシピエント肝細胞とのキメラとなりドナー肝細胞比率には約20%～74%とかなりの幅があった。Auto肝細胞移植では、移植後2週で一過性のALT上昇、肝内への炎症細胞浸潤、肝内TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1などのサイトカイン/ケモカインの発現上昇の後に回復に向かうことがわかった。細胞接触シグナルがこの現象に関与する可能性が考えられた。Allo移植時の肝内の炎症軽減には脂肪由来幹細胞が有効に作用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性・慢性肝不全などの難治性肝疾患に対して、iPS細胞由来肝様細胞、肝organoid、肝細胞そのものを用いた肝再生を目的とする細胞移植治療、及び広範な免疫調節作用を有するASC移入により背景肝の炎症制御を目的とする細胞治療など、細胞移植・移入をベースとした治療法が検討されている。このような治療を実現するためには、急性・慢性肝不全などの病態を再現した動物モデルでの基礎的な検討が必須である。本研究では、持続性肝不全の病態を示すHSVtk-GCVモデルにおいて、auto肝細胞移植が肝不全からの回復をもたらすこと、allo肝細胞移植ではASCが炎症軽減に作用することなど細胞治療の有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated liver regeneration and immune rejection following auto and allo hepatocyte transplantation in a HSVtk (TK transgenic mouse)-ganciclovir administration model. After auto hepatocyte transplantation, the liver at recovery was a chimera of donor and recipient hepatocytes, with a wide range of donor hepatocyte ratios, from approximately 20% to 74%. In auto hepatocyte transplantation, we found that two weeks after transplantation, a transient increase in ALT, infiltration of inflammatory cells into the liver, and increased expression of cytokines/chemokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and MCP-1 in the liver were followed by recovery. It was suggested that cell contact signals may be involved in this phenomenon. Adipose-derived stem cells were effective in reducing intrahepatic inflammation during allo transplantation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞移植 持続性肝不全 脂肪由来幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

重度免疫不全形質である NOG マウスに単純ヘルペスウイルスの thymidine kinase 遺伝子 (albumin promoter) を導入したトランスジェニックマウス、TK-NOG においてはガンシクロビル (GCV) 投与による宿主肝細胞の死滅により、移植されたヒト肝細胞の生着・増殖が可能となる。この TK-NOG を Balb/c あるいは C57BL/6 に戻し交配した正常免疫系を有するマウス、HSVtk/Balb、HSVtk/BL6 を作製し (実験動物中央研究所 末水洋博士との共同研究)、これまでに以下の研究を実施した。

HSVtk に GCV 投与後 (HSVtk-GCV モデル)、同系の B 型肝炎ウイルス・トランスジェニックマウス (HBV-tg) の肝細胞を移植し、通常の HBV-tg のように HBV 抗原に対する深い免疫寛容とはならない新規 HBV キャリアモデルマウスの確立に成功している (J Gastroenterol Hepatol. 2020, doi: 10.1111/jgh.15142)。この HBV キャリアモデルマウスでは外来抗原である HBV 抗原に対する免疫応答が生じるため、置換率は 20~50%程度に留まるが、肝細胞移植前、GCV 投与後に持続する肝再生不全 (持続性肝不全) の状態は移植後 4-8 週で解消され、移植後 8 週で肝細胞置換率の程度に関わらず、肝臓は組織学的には正常形態に復していた。

これは、移植肝細胞の増殖だけでなく、レシピエント肝細胞の回復・増殖、さらには持続性肝不全からの回復を示唆している。この HSVtk-GCV モデルにおける肝細胞移植後の肝不全状態からの回復に至る機序が解明できれば、今後の肝および肝様細胞をベースとした移植治療を推進するための強力な理論的根拠となると考えた。また、同じく先行研究において Allo 肝細胞を HSVtk-GCV モデルに移植した場合は 2 週以内に完全に移植細胞は排除され、肝不全状態は改善されず、免疫拒絶に起因すると思われる重度の肝線維化を生じることから、免疫拒絶の回避が極めて重要であることも明らかになった。

これまでに、強力な蛍光を発する量子ドットでラベル化した細胞 (脂肪由来幹細胞) 移植後の肝臓における intravital, in vivo, ex vivo イメージングに成功している (Sci Rep. 2017, 7:40047)。量子ドットは高輝度、長寿命で、ラベル化手法も簡便であるためイメージングのための有力な手段であるが、肝細胞移植の場合のように移植後、急激な細胞増殖がみられる場合にはセンシング閾値を下回ってしまう可能性が高いため、本研究では luciferase/GFP 発現トランスジェニックマウス (Luc-tg) 由来肝細胞を用いて移植後肝細胞の動態を解析することも試みることにした。

## 2. 研究の目的

肝臓は再生医療の主要な対象臓器であり、iPS 細胞、体性幹細胞を分化させた肝様細胞、肝 organoid、肝前駆細胞あるいは肝細胞そのものを用いた移植医療が検討されている。しかし、肝及び肝様細胞などの移植による肝再生医療を実現するには、急性・慢性肝不全などの移植対象疾患の肝内環境を再現したモデルにおける基礎的な検討が必須である。我々の HSVtk-GCV モデルは慢性肝不全 (持続性肝不全) の病態を再現している点で、この目的のためには有用なモデルと考えた。

本研究では、正常な免疫系を有する新たな肝細胞キメラマウス作製系において移植細胞の生着、増殖過程のモニタリングが可能なるモデルを確立し、移植後の肝再生、免疫拒絶の機序の解明、拒絶に対する治療法の検討を行うとともに、肝不全、肝線維化などの肝内環境が移植効率に与える影響についての評価を行う。

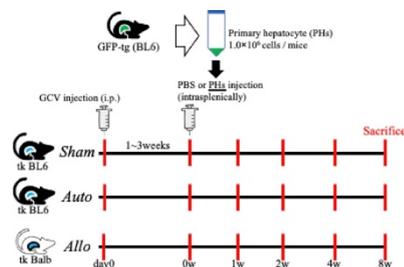
また、実臨床では例え HLA ホモドナーからの iPS 細胞由来肝様細胞を用いたとしても、免疫拒絶を完全に回避することは難しく、免疫抑制剤投与は回避できない可能性が高い。HSVtk-GCV モデルにおける Allo 肝細胞移植時の免疫拒絶の機序、治療法の検討を通じて、急性・慢性肝不全への肝再生医療として実臨床への応用が可能な肝および肝様細胞をベースとした治療モデルの確立を試みる。

## 2. 研究の方法

HSVtk-GCV モデルに auto、allo 肝細胞移植を行い、以下の解析を行う。

### 1) HSVtk-GCV モデルへの肝細胞移植

GCV 投与 1-3 週後 ALT 値の上昇が確認された HSVtk マウスに対して GFP トランスジェニックマウス (GFP-tg, C57BL/6 バックグラウンド) より分離した肝細胞  $1 \times 10^6$  個を門脈経由で投与した。そして、GFP-tg 肝細胞を HSVtk/BL6 (同系) マウスに投与したものを Auto モデル、GFP-tg 肝細胞を HSVtk/Balb (異系) に投与したものを Allo モデル、肝細胞移植を行わず生食のみを投与したものを Sham モデルとした。肝細胞投与



後、マウスを経時的に Sacrifice し、肝細胞生着率、組織像、肝内遺伝子発現などの解析を行った。

## 2) 生化学的・免疫学的・組織学的解析、肝内遺伝子発現解析

- ・血清を用いた解析：トランスアミナーゼ値などの生化学検査値のモニタリングを行う。
- ・肝内浸潤細胞の解析：real-time PCR、flow cytometry などで cell lineage 解析を行う。
- ・肝組織像の解析：肝細胞移植前後で H+E 染色、線維染色、コラーゲン染色などを行う。また、肝細胞移植後の肝細胞形態についても解析する。
- ・肝内遺伝子発現解析：移植前、移植後 2, 4, 8 週の肝組織より total RNA を抽出し、real-time PCR などによる遺伝子発現パターンの解析を行う。主に肝再生・肝細胞増殖に関わる成長因子などの分子群、炎症、肝線維化などによって変動する分子群との関連を解析する。これにより、移植後の肝細胞増殖の機序と、肝内環境が細胞増殖に与える影響について明らかにしていく。

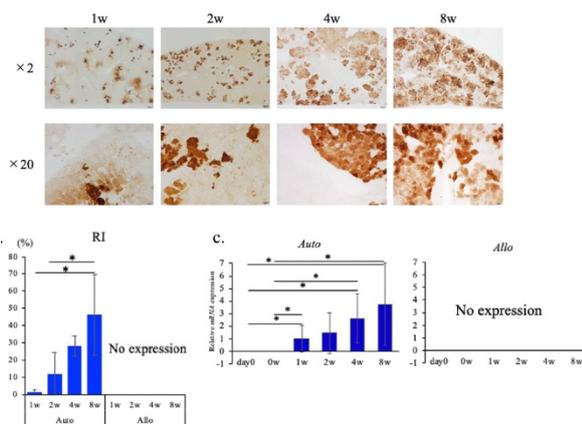
## 3) 免疫拒絶に対する免疫制御・免疫寛容誘導治療の検討

HSVtk-GCV モデルにおける allo 肝細胞移植（免疫拒絶モデル）に対し、移植前後の FK506、移植前後の auto 脂肪由来幹細胞投与（免疫制御）などによる治療を試み、免疫拒絶に対する新規治療法の確立を試みる。

## 3. 研究成果

### a. 移植後肝細胞の生着率

移植後の肝細胞の生着率の検討では、Auto モデルでは定着した GFP 陽性肝細胞が経時的に増殖していることを確認した（1, 2, 4, 8 週の生着率はそれぞれ  $1.2 \pm 1.5\%$ ,  $11.5 \pm 13.2\%$ ,  $28.1 \pm 6.1\%$  and  $46.2 \pm 23.2\%$ 、8 週での生着率は  $19.8 \sim 73.8\%$ ）。しかし、Allo モデルでは GFP 陽性細胞は確認できなかった。リアルタイム PCR による肝内の GFP mRNA 発現解析でも Auto モデルでは経時的に発現増強が確認されたのに対し、Allo モデルでは発現を認めなかった。

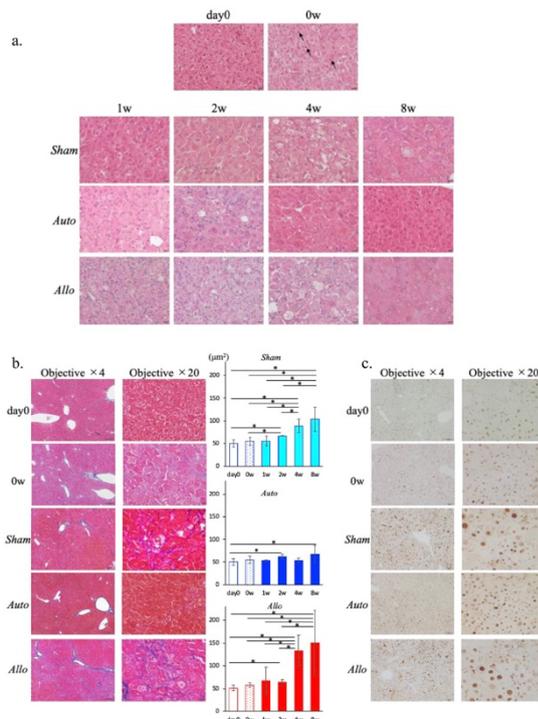


### b. 移植後の肝細胞形態

移植後の肝像の組織像（HE 染色）を確認したところ、8 週時点では Sham および Allo モデルでは、大部分の肝細胞で細胞の膨化などの変性像や炎症細胞浸潤が観察された。それに対し、Auto モデルでは 1, 2 週では小葉全般に確認された炎症細胞浸潤が 4, 8 週で著明に減少していた（a）。

また、それぞれのモデルにおいて、肝内の線維化の程度を解析したところ（Azan 染色、右図 b）、Auto モデルではほぼ線維化を認めなかったのに対し、Sham、Allo モデルでは経時的に線維化が進行し、その程度は Allo モデルにおいてより顕著であった（b）。

それぞれのモデルにおける肝細胞核のサイズの解析した結果、Auto モデルの 8 週時点では移植前に比べてほとんど変化が見られなかったのに対し、Sham モデルでは Auto モデルの約 2 倍、Allo モデルでは約 3 倍に膨化し、さらに核の不均一性が顕著に認められた。これは Sham および Allo モデルにおいて肝細胞の細胞老化が進行した結果と考えられた（c）。



### c. 移植後の肝内遺伝子発現解析（移植後 8 w）

Auto モデルにおいては、IL-6 や IFN- $\gamma$  といった炎症性サイトカインの mRNA 発現は、Sham モデルと比較して減少しており、GCV により障害された肝細胞が置換されたことによる炎症の軽減の結果と考えられた。一方 Allo モデルは、Sham モデルの発現と比較し炎症性サイトカインの mRNA 発現が高い傾向を認め、拒絶反応が誘導された結果であることが示唆された。

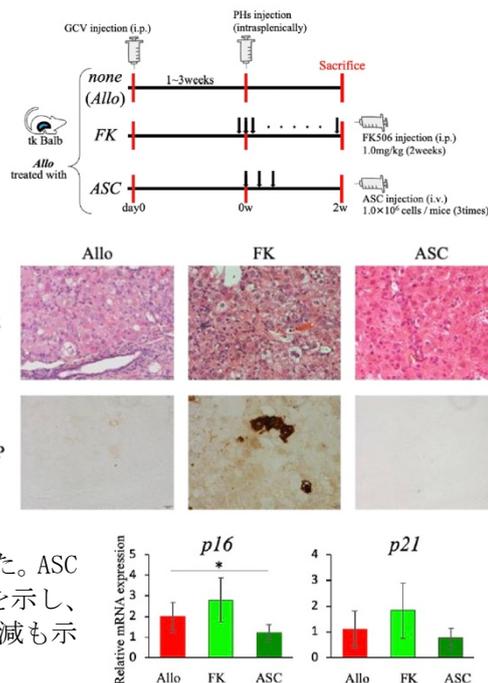
細胞系統マーカーの mRNA 発現解析では、Auto モデルで CD11b および CD11c の mRNA 発現が低下、CD4、CD8、Nkp46 発現も軽度の低下を認め、肝細胞置換によって炎症軽減がもたらされた結果であることが示唆された。また、細胞老化マーカーである P16 は Auto モデルで幹細胞移植前とほぼ同レベルにまで低下していたが、Sham、Allo モデルでは経時的な増加がみられ、細胞老化の持続、進行を裏付ける所見であった。

d. Allo 肝細胞移植時の免疫拒絶に対する治療法

Allo モデルにおける免疫抑制療法モデルのうち、FK506 投与モデル (FK モデル) では移植した GFP 陽性細胞の生着が確認され、免疫拒絶反応を抑制できたことが示唆された (肝細胞置換率 1.45%)。一方、脂肪由来幹細胞投与モデル (ASC モデル) では GFP 陽性肝細胞は観察されなかった。

組織像 (HE 染色) では特に FK モデルにおいて大部分の肝細胞で細胞の空胞変性を認め、さらに小葉全般的な炎症細胞浸潤も顕著であった。しかし、ASC モデルにおいては、肝細胞の空胞変性、炎症細胞浸潤は比較的軽度であった (a)。

肝組織中の炎症性サイトカインおよび細胞系列マーカー、細胞増殖マーカーの mRNA 発現をリアルタイム PCR により評価した。FK モデルでは Allo モデルと比較して CD3、CD8、IFN- $\gamma$  などが低下していた。ASC モデルでは IL-6 や TGF- $\beta$ 、CD11b、P16 が低下の傾向を示し、組織像で示唆された炎症の軽減に加え、細胞老化の軽減も示唆された。



<まとめ>

本研究では、持続性肝不全の病態を示す HSVtk-GCV モデルにおいて、auto 肝細胞移植が肝内の炎症軽減、レシピエント肝細胞の細胞老化からの回復などの機序により肝不全 (肝再生不全) 状態からの回復をもたらすことを示した。また、Allo 肝細胞移植時の免疫拒絶回避のための治療としては、FK 治療で免疫拒絶の回避が可能であるものの肝細胞老化の改善には至らなかった。ただし、ASC が炎症軽減とともに細胞老化の改善に作用することが示され、両者の併用療法が有用である可能性が示された。当初予定していた Luc-Tg 由来肝細胞を用いることについては、ルシフェラーゼの肝細胞における発現量が低く in vivo イメージングの系を構築することが困難であったが、GFP 発現トランスジェニックマウスを用いての経時的解析により当初の目的を果たすことができた。

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 Tamaki Y, Shibata Y, Hayakawa M, Kato N, Machii A, Ikeda Y, Nanizawa E, Hayashi Y, Suemizu H, Ito H, Ishikawa T	4. 巻 32
2. 論文標題 Treatment with hepatocyte transplantation in a novel mouse model of persistent liver failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101382.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉置優貴、林由美、石川哲也
2. 発表標題 肝細胞移植後の肝再生過程における肝内環境変化とその役割について
3. 学会等名 第42回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉置優貴、堀純子、内藤沙妃、柴田ゆりあ、池田悠馬、名仁澤英里、林由美、石川哲也
2. 発表標題 肝再生不全マウスに対する肝細胞移植後の肝内環境変化と肝再生との関連について
3. 学会等名 第68回 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 待井亜美、加藤温、池田悠馬、秋山悠菜、森遥香、荒木美穂、玉置優貴、林由美、石川哲也
2. 発表標題 新規HBVキャリアマウスモデルにおける治療用ワクチン開発の試み
3. 学会等名 第70回 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2023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	林 由美  (Hayashi Yumi)  (30632707)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・講師   (13901)	
研究 分担者	伊藤 弘康  (Ito Hiroyasu)  (80373075)	藤田医科大学・医学部・教授   (33916)	

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