

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390260

研究課題名（和文） 微小血管網を有するヒト型高次肝組織構築過程のライブ観察

研究課題名（英文） Live observation of three dimensional hepatic tissue with microvascular networks.

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

研究成果の概要（和文）：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、ヒト胎児肝細胞を共培養し、*in vitro*で再構築した微小血管網を有する立体的なヒト型高次肝組織をマウス頭部観察窓（cranial window）内に移植した。移植されたヒト型高次肝組織は宿主に生着し成熟した。本研究では、この組織成熟再構築過程における細胞間相互作用や血流因子の解析のライブ観察に成功した。移植組織内の血管は宿主の血管系と数日で交通を持ち、2ヶ月以上安定して存在した。移植組織の摘出標本や動物実験による機能解析でも、移植組織片は成熟ヒト肝組織の性質を備えていることが確認された。

研究成果の概要（英文）：We provide a proof-of-concept study to engineer human liver tissue with fully functional vascular networks. We established a stable 3D culture platform to vascularize human fetal liver cells combined with human umbilical vein endothelial and mesenchymal cell populations. *In vitro* vascularized fetal liver cells were intravitaly monitored the dynamic cellular organizing process after implantation under transparency window (cranial window). Engineered human tissue shows multiple liver-specific features with several hepatic functions. By analysis of the resected transplanted tissues and further animal experiments, it was confirmed that the tissues possessed the nature of the mature human hepatic tissue. Our new techniques discovered here should facilitate not only for future clinical use, but also for industrial use such as drug testing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	5,800,000	1,740,000	7,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：血管、肝臓、組織再構築、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マウス頭部観察窓（cranial window）内にヒト臍帯静脈血管内皮細胞（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)。その後C3H10T1/2 に変えて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell(hMSC)) を用いて完全ヒト型微小血管網をマウス生体内に構築することにAu P ら (Blood 111:4551-58, 2008)に引き続いて成功し発表した (Takebe et al., Transplant Proc 2012)。今回のライブ観察はこの微小血管網に肝細胞をミックスした一連の実験に引き続いて行うものと位置づけている。日本には40万人にも及ぶ肝硬変患者がおり、現在その多くがC型肝炎が原因となっている。今後C型肝炎は減少すると考えられているが、その後肝硬変の原因としてメタボリック症候群が関与するnon-alcoholic steatohepatitis (NASH)が増加すると考えられている。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、これまでは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して、また、癌の肝転移過程の観察モデルとしても基盤技術となることが期待される。

## 2. 研究の目的

Cranial window法を用いて血管網を有するヒト型高次肝組織を生体内において再構築し、組織再構築過程における細胞間相互作用や血流因子の解析、構築組織の評価を行い、微小血管網の再構成を伴った高次機能を発揮可能な移植用組織を開発するための基盤技術を創出することを目的とする。

(1)ヒト型微小肝組織の生体内における観察：これまでの研究 (課題番号19390340) では血管内皮細胞、間葉系細胞、肝細胞を包埋培養したコラーゲンゲルをcranial windowに移植し肝組織を再構築していたが、ゲル中に包埋することなくマトリゲル上に培養すると3次元の肝芽を形成することが近年示された (Takebe et al., Nature 2013)。この肝芽も用い、より良いライブ観察法を検討すると共に、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡で撮影した画像よ

り組織の3次元像をより簡便にin silico 再構築する手法を開発する。

(2)再構築された肝組織の機能解析：構築された肝組織が成熟した正常肝として機能し、再生医療において有効なものであるか検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) Cranial window の作製

NOD/SCID マウス (Sankyo Labo Service Co., Tokyo, Japan)を用い、cranial window 作製は Dellian らの方法(Dellian M et al.,Am J Pathol 1996)に従って行った。

### (2) 細胞培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)) (Cambrex CL CC-2517-NZ)、ヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell (hMSC)) (Cambrex CL PT-2501)、ヒト胎児肝臓細胞 (human fetal liver cell (hFLC)) (ACBRI CS-ABI-3716)を用いた。

### (3) 移植細胞への蛍光色素遺伝子導入

モロニーマウス白血病ウイルスの LTR 部分に改変が加えられた pGCD Δ Nsam IRES-EGFP 及び-KO レトロウイルスベクターを作製し、それぞれの細胞に導入した。

### (4) ゲル包埋培養法、肝芽作製法、及び cranial window への移植法

①コラーゲンゲル包埋培養法：Nature 誌に掲載したごとく行い、HUVEC、hMSC、hFLC の濃度は、それぞれ  $8 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$  cells/ml、 $1 \times 10^6$  cells/ml となるように調製した。

②肝芽作製法：HUVEC、hMSC、hFLC の濃度は、それぞれ  $8 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$  cells/ml、 $1 \times 10^6$  cells/ml を 24 穴プレートをを用い、マトリゲル上で共培養し、4-6 日後収縮した立体構築した肝芽を実験に使用した (Takebe et al., Nature 2013)。

③Cranial window への移植法：3 次元包埋培養を行ったコラーゲンゲルは培養開始 3 日後スキパンチで径 4mm の小片を切除して、ネンブータル麻酔下でカバーガラスを外した cranial window 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 (図 1)。

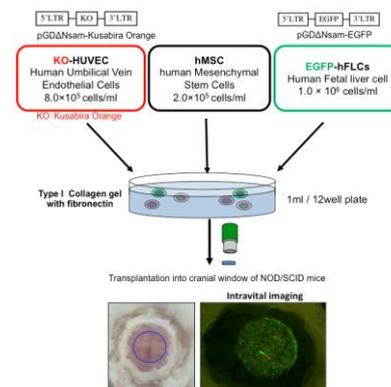


図 1

肝芽は培養開始 4-6 日後 作製されたものをそのまま同様に cranial window 内に移植した。

(5) in vivo での観察

移植後のライブ観察は、ケタミン・キシラジン混合麻酔下でマウスを仰臥位固定し、倒立蛍光顕微鏡を用いて cranial window 内の微小肝組織や血管網の血流状態の計時的変化を観察した。血流を観察する際には、PBS により 10 mg/ml とした Rhodamin-Dextran MW 2 million (Molecular probes) をトレーサーとし尾静脈から注射し、ホスト血流を蛍光色素で可視化することにより観察を行った。共焦点、及び多光子レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss Co., Germany) でも観察し、できた組織の 3 次元立体構築を行った。

(6) 微小血管網の定量化

撮影した画像を用い、MetaMorph Angiogenesis Module software で必要な計測を行い、Excel spreadsheet から、移植後の血管の総血管長、密度、平均径を算出した。

(7) 組織学的解析

計測終了時に 4% paraformaldehyde/PBS により還流固定後移植組織を脳とともに摘出、パラフィン切片を作成した。Hematoxylin & Eosin (HE) 染色を行い形態観察を行った。免疫染色は、上記の切片を用い、蛍光抗体免疫染色と酵素抗体免疫染色で行った。一次抗体は抗ヒト: CD31; smooth muscle actin (SMA); AFP; CK8.18 (いずれも Dako Corporation, Carpinteria, CA)、アルブミン(ALB) (BD Biosciences)、抗マウス CD31 (BD Biosciences) を用いた。Whole mount 免疫染色には抗ヒト: ZO1, collagen IV (Millipore, USA)、desmin (Dako Corporation) を用いた。Whole mount 免疫染色の観察は Leica TCS SP5 多光子レーザー顕微鏡を使用した。

(8) ELISA

コラーゲンを移植後 30 日目のマウスの血液を採取し、human albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Lab Inc) を用い、マウス血中のヒトアルブミンを計測した。

(9) FACS

構築肝組織からマウス H2Kd を発現していないヒト肝細胞を FACS にてまず分離した。更に分離肝細胞におけるアルブミンと AFP の発現割合を FACS にて確認した。

(10) マウス障害肝モデル

ALB-TRECK/SCID マウス (東京都立医学研究所より供与) を用いた。肝芽を腸間膜に移植後 2 日目にジフテリア毒素で重篤な肝障害を引き起こし、肝芽を移植していないマウスとの間で生存率を Kaplan-Meier 法で比較検討した。

(8) はコラーゲン包埋培養の実験でのみ、

(9) (10) は肝芽移植の実験でのみ行った。

4. 研究成果

(1) コラーゲン包埋培養

cranial window 法を用いて血管網を有するヒト型高次肝組織を生体内において再構築し、組織再構築過程における細胞間相互作用や血流因子の解析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。コラーゲン包埋に (KO-) HUVEC, hMSC と更に

EGFP-hFLC を共培養し、cranial window 内に移植したところ、EGFP-hFLC は急速に増殖し、互いに接着し、7 日目までに 1 個 1 個の細胞を識別できなくなった。同時に HUVEC 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。Rhodamin-Dextran をトレーサーとして静注すると、10 日目には HUVEC からなる微小血管網に宿主よりの血流が観察できた (機能血管) (図 2)。移植後 30 日目に hFLC 内の機能血管の定量化を行い、以前の実験で (Transplant Proc 2012) HUVEC-hMSC のみから形成された機能血管と比較した。その結果、hFLC 内の機能血管の方が密度は高かったが、平均血管径は 12  $\mu\text{m}$  程度で両者に差はなかった (図 3)。この後も移植後 4 週まで順調に増殖し、40 日目の hFLC で構築された組織内の細かな機能血管を共焦点レーザー顕微鏡の高倍率で観察したところ、その血管径は 3-4  $\mu\text{m}$  でマウス類道血管径とほぼ同じで、形態も似ていることが確認された。

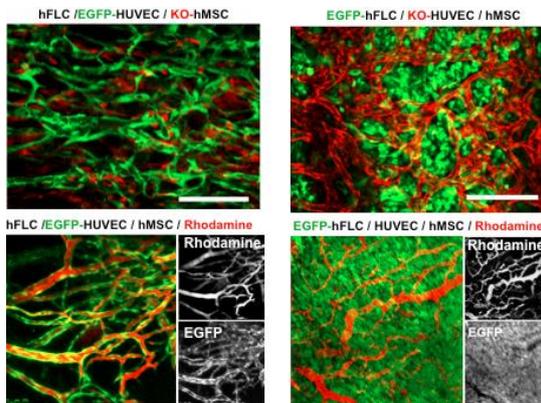


図 2

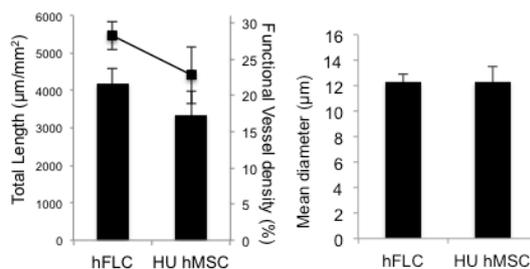


図 3

移植後 4 週目の組織を用いて免疫染色を行

ったところ、形成された組織には上皮マーカーである CK8/18、胆管細胞マーカーCK19、CK7が確認され、アルブミン以外に肝組織のマーカーhepatocyte specific antigen が認められ、微小血管網はヒト CD31 陽性でありヒト型血管網を有する肝様組織が再構成されたと考えられた。移植後 30 日目でコラーゲンゲルを摘出し行った whole mount 免疫染色では、成熟肝組織に認められる接着分子 ZO-1、E カドヘリン、基底膜の構成因子 4 型コラーゲンやラミニンが確認できた。

この時点で ELISA 法にてマウス血液内にヒトアルブミンが確認され、機能的にもヒト型肝組織がアルブミン産生能を有していることが確認できた (図 4)。

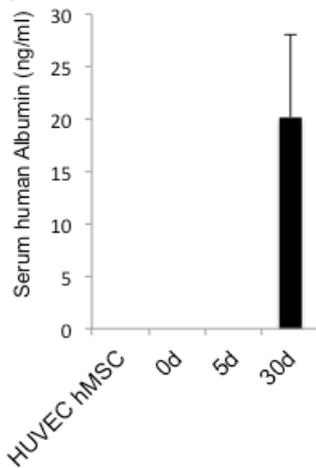


図 4

## (2) 肝芽移植

KO-HUVEC、hMSCとEGFP-hFLCをコラーゲンゲル内ではなくマトリゲル上に共培養することにより、足場材料非依存的に立体的な肝臓の原基(肝芽)を誘導することができた。マトリゲル上に播種した細胞塊は72時間まで2次元方向にはそのサイズを収縮させることにより3次元の立体構造を構築した。この肝芽をcranial window内に移植すると、コラーゲンゲルに包埋した際より早く数日でHUVECからなる微小血管網に宿主よりの血流がトレーサーの静注により観察できた (図 5)。

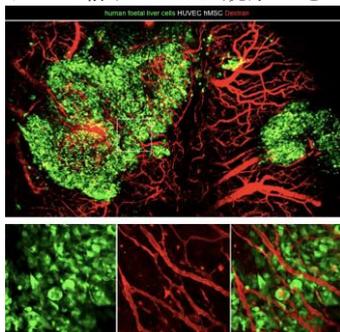


図 5

移植後60日目に脳とともに組織を摘出し、構築組織の性質を解析した。組織標本では一部で肝細胞索様の構造が観察できた(図 6)。

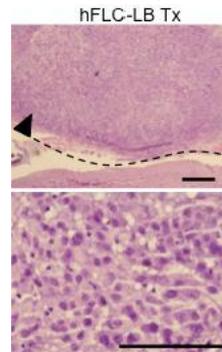


図 6 Bar 上200μm、下100μm

パラフィン切片(図 7)、及び、whole mount 免疫染色(図 8)ではアルブミン以外にCK8,18、肝組織のマーカーhepatocyte specific antigen (HepPAR1)、ASGR1、成熟肝組織に認められる接着分子ZO-1、desmin、4型コラーゲンが認められたが、AFPはほぼ陰性であった。組織内に構築された血管にはヒトCD31、SMAの発現が認められた(図 9)。電顕の観察でもヒト成熟肝組織の構造を有していることが確認できた。

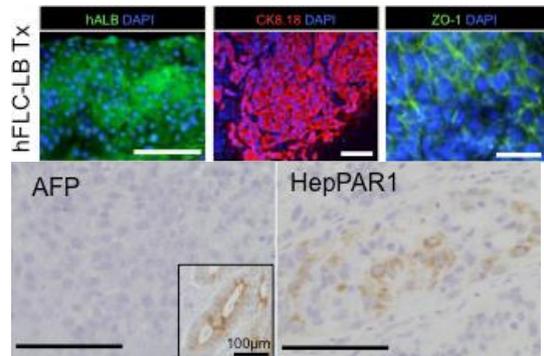


図 7 Bar 200μm

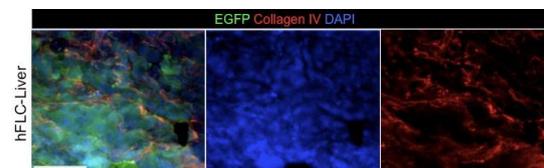


図 8 Bar 200μm

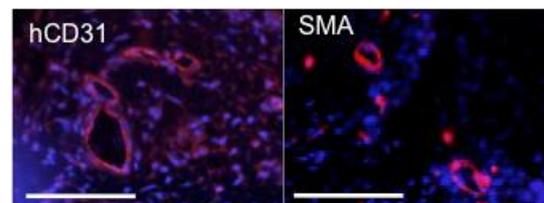


図 9 Bar 200μm

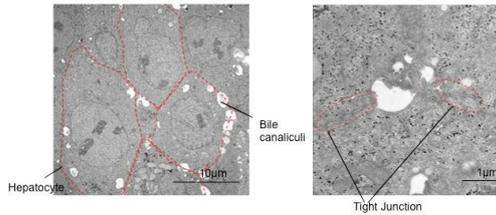


図10

抽出した構築組織からマウスH2Kdを発現していないヒト細胞をFACSにて分離し、アルブミンとAFPの発現を、更にFACSにて確認したところ、アルブミン単独陽性細胞は27.5%でアルブミンAFP共に陽性の細胞は4.4%であり、成熟した肝組織のパターンと似ていることが確認された (図11)。

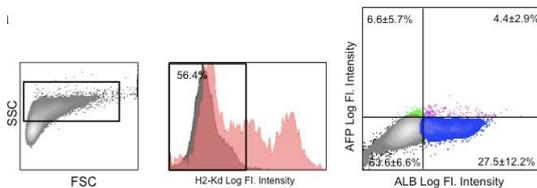


図11

肝障害モデルにおいて、この肝芽を腹腔内の腸間膜に移植すると有意に生存率が延長することが確認できた (図12)。

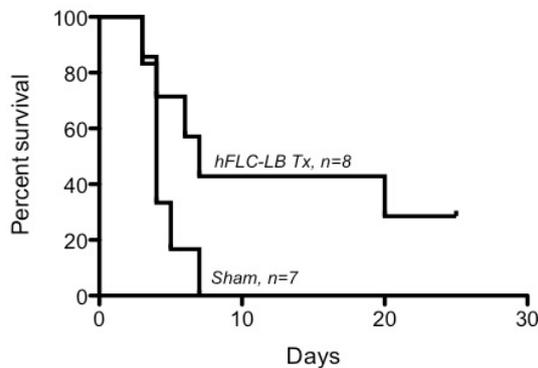


図12

Cranial window法により移植組織成熟再構築過程における細胞間相互作用や血流因子の解析のライブ観察が良好に観察できた。レーザー顕微鏡の使用により、組織の3次元的な構築も行うことが可能であった。

今回研究の途中から導入した肝芽の移植による検討でもこれまでにを行った包埋培養を行ったコラーゲンゲルの移植 (課題番号19390340) とほぼ最終的に同様の結果を得ることができた。しかし、肝芽移植の方がより短時間に宿主からの血流を得ることができ、再生医療を考える上ではより実用的と思われる。更に、マウス肝障害モデルでは機能的にも大きく評価できるものであった。ただし、

HE染色による構築肝組織観察では、肝芽の移植においてもまだ、正常肝組織と大きくかけ離れた構造も一部で認められ、今後は機能上のみならず形態的にもより正常肝に近づけ、再生医療で問題となる癌化の問題に取り組んで行く必要があると思われた。今回の研究は、hFLCをiPS細胞に変えて既に行われており、その研究では更に形態的、機能的に良好なデータを得ることができ、TakebeらによりNature誌に投稿、既にアクセプトされている。したがって、本研究は再生医療の研究として世界的にもインパクトの強く、今後の再生医療の基礎研究に大きな影響を与えると思われた。今後このモデルは更に微小血管網を伴った高次機能を発揮可能な移植用組織の開発や、創薬開発のプラットフォームにできる可能性があると思われる。

### 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 24 件)

1. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H: Vascularised and functional human liver tissue from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant, Nature 査読有 2013, in press.

2. Tanaka H, Tanaka S, Sekine K, Kita S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J, Taniguchi H: The generation of pancreatic beta-cell spheroids in a simulated microgravity culture system, Biomaterials 査読有 2013, 34:5785-5791  
10.1016/j.biomaterials.2013.04.003 [doi]

3. Takebe T, Koike N, Sekine K, Enomura M, Chiba Y, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Generation of functional human vascular network, Transplant Proc 査読有 2012, 44:1130-1133  
10.1016/j.transproceed.2012.03.039 [doi]

4. Motosugi U, Yamaguchi H, Furukawa T, Ichikawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Motoi F, Kanno A, Watanabe T, Koike N, Koyama I, Kobayashi J, Shimizu M: Imaging Studies of Intraductal Tubulopapillary Neoplasms of the Pancreas: 2-Tone Duct Sign and Cork-of-Wine-Bottle Sign as Indicators of Intraductal Tumor Growth, J Comput Assist Tomogr 査読有 2012, 36:710-717  
10.1097/RCT.0b013e31826d1fc8 [doi]

5. Koike N, Onaya H: Gd-EOB-DTPA-Enhanced MRI versus Extracellular Contrast Medium-Enhanced MRI in Differentiation of Metastatic from Benign Liver Lesions., *Ann Gastroenterol Hepatol* 査読有 2012, 3:57-62  
<http://www.agh.sanlucasmedical.com/Issue/1-2012> [URL]

6. Zheng YW, Tsuchida T, Taniguchi H: A novel concept of identifying precancerous cells to enhance anti-cancer therapies, *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 査読無 2012, 19:621-625  
10.1007/s00534-012-0546-2 [doi]

7. Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro, *Transplant Proc* 査読有 2012, 44:1018-1020  
10.1016/j.transproceed.2012.02.007 [doi]

8. Sekine K, Taniguchi H: Basics and applications of stem cells in the pancreas, *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 査読無 2012, 19:594-599  
10.1007/s00534-012-0545-3 [doi]

9. Koike H, Taniguchi H: Characteristics of hepatic stem/progenitor cells in the fetal and adult liver, *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 査読無 2012, 19:587-593  
10.1007/s00534-012-0544-4 [doi]

10. Koike H, Kubota K, Sekine K, Takebe T, Ouchi R, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H: Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells, *BMC Biotechnol* 査読有 2012, 12:81  
10.1186/1472-6750-12-81 [doi]

11. Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H: Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor, *J Biosci Bioeng* 査読有 2011, 111:711-718  
10.1016/j.jbiosc.2011.01.019 [doi]

12. Li B, Zheng YW, Sano Y, Taniguchi H: Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation, *PLoS One* 査読有 2011, 6:e17092  
10.1371/journal.pone.0017092 [doi]

13. Kobayashi S, Takebe T, Inui M, Iwai S, Kan H, Zheng YW, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium, *Proc*

*Natl Acad Sci U S A* 査読有 2011, 108:14479-14484  
10.1073/pnas.1109767108 [doi]

[学会発表] (計 19 件)

1. 谷口英樹 如何にして器官発生を模倣するのか?—血管系を有するヒト肝組織創出法の開発— 第12回日本再生医療学会総会 (招待講演) 2013年03月21日~2013年03月23日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

2. Koike N, Ohshima Y, Arita S, Takeuchi T, Ohkohchi N., Evaluation of drainage fluid amylase level after pancreatojejunostomy using our method in pancreatoduodenectomy. *International Surgical Week 2011*. 2011年8月31日パシフィコ横浜 (神奈川県)

3. Koike N, Fujiwara R, Nakano A, Chiba T, Amiya T, Sekine K, Taniguchi H., Creation of long lasting human hepatic tissue in vivo. 25<sup>th</sup> Anniversary tumor course. Critical issues in tumor microenvironment, angiogenesis and metastasis. 2010年9月26日 Harvard University, Cambridge, USA

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