

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300162

研究課題名(和文) 小児生体肝移植手術で得られる肝組織を活用したヒト肝型マウスの作製と解析

研究課題名(英文) Development of humanized-liver mice using hepatocyte derived from isolated liver tissue from recipient or donor of living donor liver transplantation

研究代表者

田上 昭人 (Tanoue, Akito)

独立行政法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・部長

研究者番号：60301800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、手術摘出肝組織より分離した肝細胞を用いて、ヒト肝細胞を持つヒト肝型マウスの作成を行った。手術摘出肝より単離した同一肝細胞を、単離直後、4℃にて一晩保存、凍結保存、の後にマウスへ移植した結果、単離直後の肝細胞を移植したマウスにおいて生着率が最も高く、また移植マウスにおける血中ヒトアルブミン値も単離直後の肝細胞を移植したマウスにおいて最も高かった。一方、単離時の細胞生存率と移植後のマウス血中ヒトアルブミン値に相関は見られなかった。これらの結果から、ヒト肝型マウスの作製には、単離直後のヒト肝細胞の移植が有効であり、また移植細胞の保存方法がヒト肝型マウスの作製に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried for development of humanized-liver mice in which the liver is reconstituted with human hepatocyte derived from isolated liver tissue from recipient or donor of living donor liver transplantation. We demonstrated that, in identical hepatocyte derived from one recipient, freshly (non-freezing) hepatocytes were most effectively engrafted in mouse liver compared with hepatocytes refrigerated at a temperature of 4 degrees overnight or freeze-stocked hepatocytes. On the other hand, there is no correlation between cell viability at isolation of hepatocyte and human albumin level in humanized-liver mice. These results indicated that freshly hepatocyte is useful for development of humanized-liver mice, and improvement of freezing method for hepatocyte may lead to effective development of humanized-liver mice.

研究分野：小児科学・分子薬理学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：疾患モデル 手術摘出検体

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は先天性代謝疾患や胆道閉鎖症、肝硬変およびウイルス感染症など様々な疾患の標的となる臓器である。そのため病態解明や治療法の開発の上において肝組織や肝細胞を用いた研究は必要不可欠である。肝組織や肝細胞を用いた研究は、組織入手等の問題により主に動物を用いて行われている。しかしながら、動物の肝細胞・組織を用いた解析は、種差の問題やウイルス感受性(感染性)の問題等により動物実験の結果をそのままヒトに外挿するのが困難な場合がある。この問題を克服するために、近年ヒト肝細胞を持つマウス(ヒト肝型キメラマウスやヒト肝型マウス)が作成され、ヒト肝疾患の病態解明、治療法の開発や創薬研究に応用が図られつつある。特にヒト肝炎ウイルスである HBV および HCV は生きているヒトやチンパンジーの体の中の肝細胞にしか感染しないことが知られているため、ヒト肝細胞を持つマウスはウイルスの感染のメカニズムの解明や抗ウイルス剤の開発に有用な動物ツールになると考えられている。このようにヒト肝細胞を持つマウス(ヒト肝型マウス)は病態の解明や治療法の開発研究において非常に有用と考えられ、国内外を含めて多くの研究者・研究機関が作成に取り組んできている。これまで国内においては、フェニックスバイオ社と実験動物中央研究所でヒト肝細胞を持つマウス(ヒト肝型キメラマウスおよびヒト肝型マウス)の作成に成功している。フェニックスバイオ社は、ヒト肝細胞を免疫不全肝障害マウス(uPA/SCID:重症複合型免疫不全(SCID)マウスと肝臓に障害を持つ albumin enhancer/promoter urokinase plasminogen activator トランスジェニックマウス(uPAマウス)を掛け合わせて作成したマウス)に移植し、ヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス)の作成に成功している。一方、研究分担者の中村や連携研究者の末水(実験動物中央研究所)の研究グループでも肝細胞などのヒト細胞を持つマウス(「ヒト化マウス」)の作成に取り組んできている。実験動物中央研究所では「ヒト化マウス」を効率よく作成するために様々な免疫不全マウスの作成に取り組み、NOGマウス等の重度複合免疫不全マウスの作成に成功してきている。また、ヒト肝細胞を効率よく生着させるため、肝障害を引き起こす uPA 遺伝子などをこれらの重度複合免疫不全マウスに遺伝子導入し、重度肝障害複合型免疫不全マウスの作成にも成功している。さらに、この重度肝障害複合型免疫不全マウスに海外から購入した凍結肝細胞の移植を行い、ヒト肝型マウスの作成にも成功している。しかしながら、移植に用いるヒト肝細胞は海外の肝移植手術等で用いられなかった脳死ドナー肝組織から分離された凍結肝細胞のため、移植後の肝細胞の生着率やヒト肝型マウスの作成効率に問題が残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述の実験動物中央研究所にて開発した重度肝障害複合型免疫不全マウスに、国立成育医療研究センターにて分離保存した肝細胞の移植を行い、ヒト肝型マウスの作成を行う。凍結肝細胞とともに非凍結新鮮肝細胞を移植に用いることにより、ヒト肝細胞の高い生着率とヒト肝型マウスの効率的な作成が期待できる。また、正常肝組織由来の肝細胞以外に疾患(病態)肝組織から分離した肝細胞を移植に用いることにより疾患(病態)肝ヒト肝型マウス(病態モデルマウス)の作成が可能になると期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1)肝組織からの肝細胞の分離保存

摘出された肝組織の研究用提供部分の採取

国立成育医療研究センターにて行われる小児生体肝移植手術の際に生じる摘出肝組織(ドナー余剰肝組織及びレシピエント肝組織)より肝細胞の採取を行った。生体肝移植手術で摘出されたドナー肝組織は、手術室で執刀医が移植に必要な部位を確保する。小児生体肝移植手術では、レシピエント側の小児の体重が小さい場合は、ドナー移植肝臓のトリミングを行い、小さくした肝組織を移植する必要がある。本研究では、その余剰の部分が研究用として提供された。一方、摘出されたレシピエント肝組織は、病理検査室に搬送され病理検査に必要な処理をした後の組織を研究用として提供を受けた。受け取ったドナーあるいはレシピエント肝組織は研究所に移送し、一部を肝組織として凍結保存あるいは組織観察用に固定し、残りは肝細胞分離に用いた。

#### 肝組織から細胞の調製

肝細胞分離はコラゲナーゼ液灌流法による肝消化により行った。手術で摘出された肝臓の肝組織切断面より門脈または中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入した。カニューレ挿入後血管周囲とともにカニューレを結索することによりカニューレを固定し、灌流路を確保した。挿入したカニューレより前灌流液をシリンジにより肝組織内へ灌流し、組織内の残留血液を除去した。次いでカニューレをペリスタポンプに接続し、37 保温条件下でコラゲナーゼ液にて 30 分間灌流し、組織構造を消化した。コラゲナーゼ液処理後、組織を分散し、ガーゼとナイロンメッシュにて濾過することにより大型の細胞塊を除去し、肝細胞懸濁液を得た。

#### ヒト肝細胞分離・凍結保存

得られた肝細胞懸濁液を低速遠心により、肝実質細胞と非実質細胞へ分画した。概ね湿細胞体積の 20 倍の氷冷緩衝液を加えた細胞懸濁液を 50xg、3 分、4 で遠心し、沈殿した細胞を再懸濁した。同遠心を計 3 回繰り返し最終的な肝実質細胞懸濁液を作成した。一部の細

胞は市販の細胞凍結保存液等を用いて凍結処理を行い、液体窒素中において保管・管理した。分離した肝細胞の生存率は凍結前と解凍後に細胞懸濁液極少量を用いて、細胞数および生細胞率を血球計算板にて測定した。生細胞率はトリパンプルー排除能により評価を行った。

#### 代謝試験

単離直後の新鮮肝細胞および凍結保存後融解した肝細胞(表1)およびXenotech製プール凍結肝細胞(Lot. 0910227, N=50)を用い、細胞懸濁液(1X10<sup>6</sup> Cells/mL)に薬物溶液を添加後37℃で30および120 min インキュベーション後、1%ギ酸およびアセトニトリルを添加することによって反応を停止させて分析用試料を得た。UPLC (Waters)およびLTQ Orbitrap (Thermo Fisher)を用いて試料の分析を実施した。

#### (2) ヒト肝型マウスの作成

ヒト肝型マウスの作成は、国立成育医療研究センターにて分離保存した肝細胞を用いて実験動物中央研究所ならびに国立成育医療研究センター研究所で行った。9~12週齢の重度肝障害複合型免疫不全マウスの脾内門脈より最大10<sup>6</sup>個の肝細胞の注入を行った。移植した肝細胞の生着およびその効率については末梢血ヒトアルブミンの測定や組織学的解析にて判定を行った。ヒト肝細胞が生着したヒト肝型マウスは、実験動物中央研究所ならびに国立成育医療研究センターにて飼育および解析を行った。移植したヒト肝細胞の生着の評価は移植後4週目以降に末梢血ヒトアルブミンの濃度測定により判定を行った。

#### (3) ヒト肝型マウスを用いた解析

これまでの成人由来凍結肝細胞を移植した場合のヒト肝細胞の生着率にくらべて、新鮮肝細胞を移植した場合や疾患を有するレシピエント由来肝細胞を移植した場合のヒト肝型マウスでの肝細胞の生着率の評価を行った。肝細胞生着率の評価は、末梢血中のヒトアルブミン濃度および肝組織切片におけるヒト肝細胞分布の割合を免疫染色により解析した。

なお、本研究実施において、採取された肝組織を本研究に用いることは、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会にて承認を得た(「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」(受付番号385平成21年12月8日承認))。国立成育医療研究センター病院臓器移植センターにおいて主治医から説明を受け同意を得た後に提供されたドナー余剰肝およびレシピエント摘出肝を用いた。提供して頂いた組織は、生体肝移植手術を行った方から提供されたものであり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。肝組織は国立成育医療研究センター病院にて匿名化された後に国立成育医療研究センター研究所に搬送され、肝組織の一部の保存と肝細胞分離の処理を行っ

た。国立成育医療研究センター研究所においては、連結可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れた。本研究は、平成10年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」に従い研究を遂行した。ヒト肝細胞を用いてヒト肝型マウスを作成する研究は、国立成育医療研究センター倫理審査委員会(「ヒト肝型マウスを用いた肝胆道疾患の病態解明と新規治療法の開発研究」(受付番号411平成22年7月1日承認))にて承認を得ている。動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼育および保管の改善にも最大限努力した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝組織からの肝細胞の分離保存

本研究では、ドナー23検体、胆道閉鎖症47検体をはじめ、肝線維症、糖尿病1b、CPS1欠損症、カロリーー病、糖原病IIIa、アラジール症候群等より合計101検体より、肝細胞単離を行った(図1)。



図1. 手術摘出肝組織(左)と単離細胞懸濁液(右)。

##### (2) 代謝試験

単離直後の新鮮肝細胞および凍結保存後融解した肝細胞を用いて、同一ドナー由来の肝細胞の凍結前後での生存率および薬物代謝能を検討するためTiamide、Troglitazone、Diltiazem、Acetaminophenに対する代謝活性を測定した。何れの化合物を用いた場合でも、検体1においては凍結前後で各代謝物の生成量に変化はなかった。一方、検体2では新鮮肝細胞に比べ、凍結肝細胞の代謝物生成活性は著しく低下していた。Xenotech製肝細胞(融解時の生存率は86-91%)を用いた場合、検体1および2の新鮮肝細胞と類似した代謝物の生成パターンを示した。

表1. 使用した新鮮肝細胞および凍結肝細胞の背景データおよび試験使用時の生存率

検体	Age (Year)	Sex	Viability (%)	
			Fresh	Cryo.
1	37	Male	79	51
2	30	Female	78	36

この結果から、凍結保存法の改良による凍結融解後の細胞生存率の低下を抑えることにより、単離直後の新鮮肝細胞と同様に凍結肝

細胞の肝機能の維持が可能であると考えられた。

### (3) ヒト肝型マウスの作成

単離した肝細胞を肝傷害重度免疫不全マウスである uPA/NOG マウスへ移植し、健常ドナーおよび複数の疾患に由来する肝細胞を用いて、ヒト肝型マウスの作成に成功した(図2)。生着したヒト肝細胞は、アルブミン産生

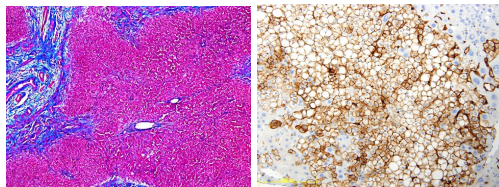


図2. 疾患肝によるヒト肝型マウスの作成。左; レシピエント肝の Mallory-Heidenhain 染色像。肝線維化像を示す。右; ヒト肝細胞移植後の uPA/NOG マウス肝臓の抗 HLA 染色像。uPA/NOG マウス肝内でのヒト肝細胞の生着を示す。

などの肝機能を有していた。これにより、代謝性疾患をはじめとする肝線維化の進行した疾患肝由来の肝細胞を用いてもヒト肝型マウスの作成が可能であることが示された。一方、本研究において、凍結正常肝細胞を用いたマウスへの移植では、4割のロット(ドナー)において肝内への生着が認められ、移植細胞によってその生着性は大きく異なると考えられた。また手術摘出肝より単離した同一肝細胞を単離直後、4にて一晩保存、凍結保存、の後にマウスへ移植し、生着性を検討した結果、すべての条件においてマウス肝内での移植細胞の生着が確認された。しかし、移植を実施したマウスに対する移植細胞の生着が確認されたマウスの割合は、単離直後に移植したマウスにおいて最も高く、また移植マウスにおける血中ヒトアルブミン値も単離直後に移植したマウスにおいて最も高かった。一方、単離時の細胞生存率と移植後のマウス血中ヒトアルブミン値に相関は見られなかった。これらの結果から、同一ドナーより得られた肝細胞においては、単離直後の移植が最も成績がよく、効率的なヒト肝型マウスの作製において、移植細胞の保存方法が重要であると考えられた。また、単離時細胞生存率はマウス肝内への接着性には影響せず、その他の因子により生着性が規定されていると考えられた。

近年海外では先天性代謝疾患や劇症肝炎、胆道閉鎖症などの重症肝・胆道疾患に対して、肝移植治療の代替療法または橋渡し療法として肝細胞移植療法の臨床報告が多数なされているが、肝細胞移植療法においてもその成績に移植細胞の保存方法が重要であると考えられる。また、生着率の高い細胞群と低い細胞群を比較検討することにより、移植後に肝臓への生着性の高い細胞群の特性が明らかとなり、肝幹細胞の評価が可能となると考えられた。今後さらに疾患由来肝細胞を用

いたヒト化肝型マウスを解析することにより、肝胆道疾患の病態進行機構等が明らかになると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Suemizu H<sup>§</sup>, Nakamura K<sup>§</sup>, Kawai K, Higuchi Y, Kasahara M, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura M. <sup>§</sup> contributed equally to this work. Hepatocytes buried in the cirrhotic livers of biliary atresia patients proliferate and function in the liver of uPA-NOG mice. *Liver Transplantation*. 査読有、In press. DOI: 10.1002/lt.23916

Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. *Liver Transplantation*. 査読有、2014 20, 391-393. DOI: 10.1002/lt.23800

Nakamura K, Tanoue A. Etiology of biliary atresia as a developmental anomaly: Recent advances. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 査読有、2013, 20(5):459-464. DOI: 10.1007/s00534-013-0604-4

Nakamura K, Kato N, Aizawa K, Mizutani R, Yamauchi J, Tanoue A. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *Journal of Toxicological Science*. 査読有、2011 36, 625-633. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.36.625>

中村和昭、田上昭人、胆道閉鎖症の病因に関する最近の知見 - 特に発生異常説に関して -、*Organ Biology* 2011, 査読有、18 (3), 5-10.

[学会発表](計2件)

Matsui A, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Kasahara M. HEPATOCYTES TRANSPLANTATION FOR AN INFANT OF ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE DEFICIENCY USING CELLS ISOLATED FROM LIVING DONOR REDUCED-GRAFT TISSUE. 47th Annual Meeting of The European

Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2014年6月9日~2014年6月12日、The Jerusalem International Convention Center.

Tanaka K, Nakamura K, Nozaki K, Terashita A, Tanoue A, Teramura T. IN VITRO DRUG METABOLITE PROFILING USING HUMAN HEPATOCYTES FRESHLY ISOLATED FROM TRANSPLANT DONORS. 第26回日本薬物動態学会、2011年11月16日~2011年11月18日、広島国際会議場.

〔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〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田上 昭人 (TANOUE, Akito)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所薬剤治療研究部・部長  
研究者番号：60301800

### (2) 研究分担者

中村 雅登 (NAKAMURA, Masato)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：00164335

### (3) 連携研究者

末水 洋志 (SUEMIZU, Hiroshi)  
公益財団法人実験動物中央研究所・バイオメディカル研究部・部長  
研究者番号：40332209

### (4) 研究協力者

中村 和昭 (NAKAMURA, Kazuaki)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所薬剤治療研究部・実験薬理研究室・室長  
研究者番号：80392356