

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700439

研究課題名(和文)肝再生能力を有するヒトiPS細胞由来胆管上皮細胞を用いたヒト化肝臓マウスの作製

研究課題名(英文)Generation of the humanized-liver mouse from human iPS cell-derived cholangiocytes

研究代表者

樋口 裕一郎(Yichiro, Higuchi)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：00596281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝臓細胞をヒト肝臓細胞へと置換させたヒト化肝臓マウスの作製には良質な細胞源の確保が必要となる。本研究ではヒト化肝臓マウスを作製するための細胞源として胆管上皮細胞に着目した。まずマウス肝臓より単離した胆管上皮細胞を肝傷害モデルマウスに移植することで、その肝再生能力を検証した。更に、ヒトiPS細胞より誘導した胆管上皮細胞を用いてヒト化肝臓マウスの作製を試みた。その結果、正常時の胆管上皮細胞に肝再生能力は認められず、ヒトiPS細胞より誘導した胆管上皮細胞についても同様の結果となった。これらの結果より、胆管上皮細胞はヒト化肝臓マウス作製のための細胞源としてふさわしくないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Humanized-liver mice, in which the liver has been repopulated with human hepatocytes, have been used to study aspects of human liver physiology such as drug metabolism, toxicology and hepatitis infection. However, the procurement of human hepatocytes is a major problem in producing humanized-liver mice because of the finite nature of the patient-derived resource. In this study, I focused on the cholangiocytes as donor cell source for liver reconstitution since former studies demonstrated the differentiation potential of cholangiocytes (Furuyama et al, Nat. Genet, 2011, Shimper-Ronan et al., Development, 2006). To evaluate the liver reconstitution potential, cholangiocytes that purified from mouse liver, or induced from human iPS cells, were transplanted into the injured liver mouse model. As a result, both of cholangiocytes did not show the liver reconstitution. These results indicate that normal cholangiocytes are not suitable for the donor cell source of humanized-liver mice.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ヒト化肝臓マウス ヒトiPS細胞 胆管上皮細胞 HepaRG細胞

1. 研究開始当初の背景

マウス肝臓細胞をヒト肝臓細胞へと置換させたヒト化肝臓マウスは創薬、病態モデルの観点からも非常に有用な動物モデルである。しかしその材料となるヒト肝臓細胞は試験管内での培養が困難であり、良質な肝細胞の確保がヒト化肝臓マウスを安定生産する際の障害となっていた。多能性を有するヒト iPS 細胞は高品質かつ均一な肝細胞の供給源として注目されたものの、現在においても高置換型のヒト化肝臓マウスを作製するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究においてヒト化肝臓マウスを作製するための材料として着目したのが、胆管上皮細胞である。成体マウス肝臓における Sox9 陽性胆管上皮細胞の細胞系譜追跡実験により、正常時の肝細胞のターンオーバーは胆管上皮細胞を起源として行われることが示唆された (Furuyama et al., Nat. Genet., 2011)。また、ラット胎仔肝より単離した胆管上皮細胞分画に、肝再生能力を有する細胞が存在することが報告されている (Shimper-Ronan et al., Development, 2006)。これらの報告からヒトの胆管上皮細胞も肝再生能力を有すると推測し、ヒト iPS 細胞より分化誘導した胆管上皮細胞を用いてヒト化肝臓マウスを作製しようと試みた。

3. 研究の方法

(1) 胆管上皮細胞の肝再生能力確認

全身性に EGFP を発現するトランスジェニックマウスの肝臓より、細胞表面抗原 (EpCAM) を指標として胆管上皮細胞を単離する。これを肝傷害モデルマウスに移植し、生着性を検証することで胆管上皮細胞の肝再生能力を評価する。

(2) ヒト iPS 細胞より胆管上皮細胞を分化誘導する培養系の確立

肝臓発生の過程において肝芽細胞から胆管上皮細胞が分化する際に Notch シグナルの関与が報告されている (Tanimizu & Miyajima et al., JCS, 2004)。そこで、iPS 細胞から誘導された肝芽細胞において Notch シグナルを活性化することで、胆管上皮細胞への分化を誘導する。Notch シグナルを活性化させる方法としてはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 処理による誘導法を検討する。

(3) ヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞によるヒト化肝臓マウスの作製

ヒト化肝臓マウス作製のために用いる肝傷害マウスとして TK-NOG マウス (Hasegawa et al., BBRC 2011) を使用する。ガンシクロビル投与によって肝傷害を誘導した TK-NOG マウスに分化誘導後のヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞を継脾移植し、マウス肝への生着性を検証する。移植した細胞の生着につ

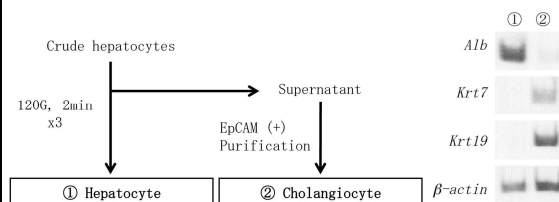
いてはヒト特異的抗原 (HLA) に対する抗体染色によって病理学的に評価する。

4. 研究成果

(1) 胆管上皮細胞の肝再生能力確認

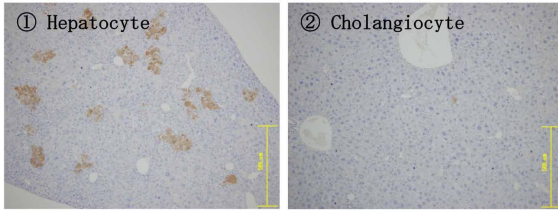
肝実質細胞及び胆管上皮細胞において EGFP を発現するトランスジェニックマウスとして、PgcEGFP-NOG マウスを新たに作出し、これを報告した (発表論文 1)。胆管上皮細胞精製手順の概要を図 1 に示す。従来のコラゲナーゼ灌流法により成体の PgcEGFP-NOG マウス肝臓を処理し、120G-1 分の遠心を 3 回行って肝実質細胞を精製した。目的とする胆管上皮細胞は遠心後の上清に含まれるため、上清を 190G-5 分間遠心し、胆管上皮細胞を含む非肝実質細胞分画を回収した。更に回収した非肝実質細胞分画において、胆管上皮細胞のマーカーである EpCAM を指標として磁気細胞分離を行い、胆管上皮細胞を精製した。各細胞分画における遺伝子発現解析を行ったところ、アルブミン (Alb) の発現は肝実質細胞分画 (Hepatocyte)、ケラチン 19 (Krt19) およびケラチン 7 (Krt7) の発現は胆管上皮細胞分画 (Cholangiocyte) に濃縮されており、胆管上皮細胞が精製されていることを確認した。

図 1. マウス胆管上皮細胞の単離



単離した肝実質細胞、及び胆管上皮細胞について、その肝再生能力を検証した。肝傷害を誘導した TK-NOG マウスに一匹当たり 2×10^5 個の肝実質細胞、もしくは胆管上皮細胞を経脾移植し、移植後 4 週間目に移植肝臓の採材を行った。摘出した肝臓においてパラフィン切片を作製し、移植細胞の指標となる EGFP に対する抗体染色を実施した。肝実質細胞を移植した個体の肝臓においては EGFP 陽性の肝実質細胞からなるコロニーが多数観察されたのに対し、胆管上皮細胞を移植した群では EGFP 陽性のコロニーが全く観察されなかった (図 2)。これらの結果より、正常肝より摘出した胆管上皮細胞には TK-NOG マウス肝臓中における再生能力を示さないことが示唆された。

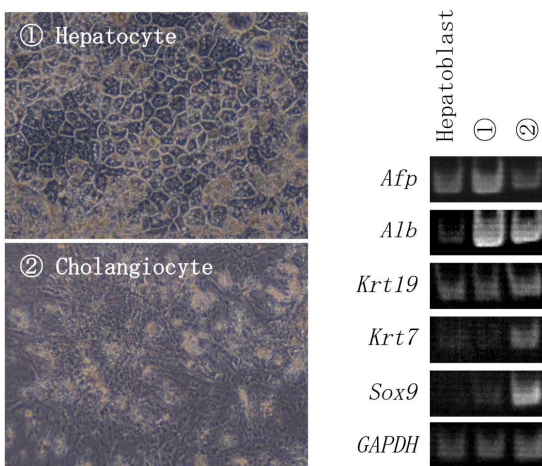
図2. 単離肝細胞の移植



(2) ヒト iPS 細胞より胆管上皮細胞を分化誘導する培養系の確立

ヒト iPS 細胞から肝臓系譜への分化誘導方法については先行論文を参照した (Kajiwara et al., PNAS, 2012)。このうち肝芽細胞 (Hepatoblast) から肝実質細胞への分化段階にあたる培養 10-17 日目の過程において、記載の添加因子 (Hepatocyte growth factor; HGF, Oncostatin M; OsM) に変えて 5mM EDTA による処理を行った。培養 17 日目における細胞の形態を図3に示す。HGF、OsM を添加した通常培養群 (Hepatocyte) では典型的な敷石状構造の肝実質細胞が誘導されているのに対し、EDTA 処理を行った胆管上皮細胞誘導群 (Cholangiocyte) では繊維芽細胞様の小型細胞が誘導された。それぞれの細胞における遺伝子発現を確認したところ、EDTA 処理によって胆管上皮細胞マーカー (Krt19, Krt7, Sox9) の発現が亢進しており、ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞より胆管上皮細胞が誘導されることを確認した。

図3. ヒト iPS 細胞からの胆管上皮細胞誘導

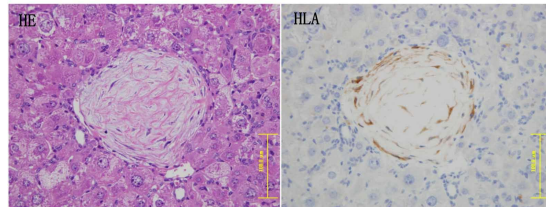


(3) ヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞によるヒト化肝臓マウスの作製

EDTA 処理によって誘導したヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞を TK-NOG マウスに一匹当たり 1×10^6 個ずつ経脾移植し、肝再生能力を検証した。移植後 8 週の時点で肝臓を摘出し、ヒト特異的抗体 (HLA) による免疫染色を行った。その結果、移植マウス肝臓中には繊維芽細胞様の構造からなる HLA 陽性コロニーが観

察されたものの、肝実質細胞様の構造を示すコロニーは観察されなかった。(図4)。これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来胆管上皮細胞は TK-NOG マウス肝臓中における再生能力を示さないことが示唆された。

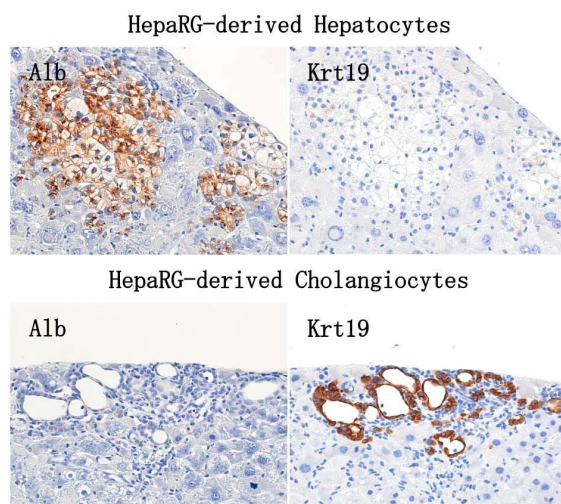
図4 ヒト iPS 由来胆管上皮細胞の移植



(4) 肝再生能力を有する培養細胞株のスクリーニング

ヒト iPS 細胞より誘導した胆管上皮細胞ではヒト化肝臓マウスを作製することが出来ないことを確認したため、研究計画を軌道修正し、肝再生能力を有する培養細胞株のスクリーニングを行った。その結果、ヒト肝癌細胞株の一種である HepaRG 細胞に TK-NOG マウス肝臓中における肝再生能力があることを確認し、これを報告した(発表論文2)。TK-NOG マウス肝に移植した HepaRG 細胞は生体内において肝実質細胞、もしくは胆管上皮細胞からなるコロニーを形成した(図5)。HepaRG 細胞由来肝実質細胞では薬物代謝関連因子 (CYP3A4, MRP2) の発現も確認され、生着率の高い個体では血中へのヒトアルブミン放出も観察された。これらの結果から、HepaRG 細胞はヒト化肝臓マウスを作成するための非常に有用な細胞源となりうることを示唆された。

図5. HepaRG 細胞の移植



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Yuichiro Higuchi, Kenji Kawai, Hiroshi Yamazaki, Masato Nakamura, Françoise Bree, Christiane Guguen-Guillouzo, Hiroshi Suemizu. ‘ ‘ The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice ’ ’ Xenobiotica 44 (2). 146-153 (2014). DOI: <http://dx.doi.org/10.1538/expanim.63.55>
2. Yuichiro Higuchi, Kenji Kawai, Masafumi Yamamoto, Miyuki Kuronuma, Yasuhiko Ando, Ikumi Katano, Masato Nakamura, Hiroshi Suemizu. ‘ ‘ A novel enhanced green fluorescent protein-expressing NOG mouse for analyzing the microenvironment of xenograft tissues ’ ’ Exp. Anim 63 (1). 55-62 (2013). DOI: 10.3109/00498254.2013.836257

〔学会発表〕(計1件)

樋口裕一郎、川井健司、山崎洋志、中村雅登、Françoise Bree, Christiane Guguen-Guillouzo、末水洋志 「HepaRG細胞を用いたヒト化肝臓マウスの作成」 第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4-6日、国立京都国際会館

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 裕一郎 (HIGUCHI, Yuichiro)
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 研究員
研究者番号: 00596281