

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：72611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640055

研究課題名(和文)人工肝幹細胞作製のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for development of artificial liver stem cell

## 研究代表者

末水 洋志(SUEMIZU, Hiroshi)

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：40332209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は肝臓を再構築する能力を持つ「真の肝幹細胞」をバイオアッセイにより特定し、同等の能力を持つ細胞を人工的に作製することである。薬剤の違いにより過形成による再生と幹細胞様細胞による再生を誘導する実験系を構築した。それぞれの再生で増殖してくる細胞を回収する方法の確立が今後の課題である。TK-NOG肝傷害マウスに極めて良く生着し、増殖する凍結ヒト肝細胞の解析により、増殖促進にかかわる遺伝子22個、分化成熟にかかわる遺伝子181個を抽出した。これらの知見をもとに「真の肝幹細胞」探索と「効率的なヒト化マウス」作製を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the genuine liver stem cells that have the ability to reconstitute a liver, and is to create artificial cell with equivalent capabilities to liver stem cells. We established a simple method for inducing direct hyperplasia and compensatory regeneration of hepatocytes by administration of thioacetamide and ganciclovir to HSVtk transgenic mice, respectively. The future challenge is to establish a method for collecting proliferative liver cells, which appeared in both regenerative patterns. We identified 22 genes involved in growth promotion, and 181 genes involved in hepatic maturation by analyzing a cryopreserved human hepatocytes that are well engrafted in injured liver of TK-NOG mice. On the basis of these findings, we will advance in the exploration of "genuine liver stem cells" and the development of "humanized-liver mice model".

研究分野：実験動物学

キーワード：肝再生 肝幹細胞 ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素の特性に種差があることや、一部の感染症では宿主特異性に違いがあることから、マウスやラット等のげっ歯類をヒトの代替動物として利用することには限界があった。このような問題を克服するために我々はヒト肝臓を個体レベル (*in vivo*) で持つ「ヒト化肝臓マウス」を開発した。肝臓の卓越した増殖能力はギリシャ神話の逸話にも記されているとおりが、今なお、肝細胞を試験管内で殖やすことができない。そのため、「ヒト化肝臓マウス」の作製には常に初代培養肝細胞 (コラゲナーゼで単離し凍結保存された市販のヒト肝臓細胞) が使用されている。移植したヒト肝臓細胞は宿主マウスの肝臓を再構築するほど増殖できることから、肝幹細胞、あるいは肝前駆細胞が存在するのは明らかである。肝臓の再生様式には部分肝切除時に見られる代償性過形成による再生と薬剤性肝障害やウイルス感染時に出現する幹細胞様細胞による再生が知られる。前者では幹細胞様細胞の出現は認められず、残存する肝細胞の分裂と肥大が再生に同等に寄与している。一方、後者で出現する幹細胞は「両能性肝幹細胞」として知られ、成熟肝細胞と胆管上皮細胞の2種類に分化が限定されている。多くの研究者が細胞表面抗原マーカーを駆使し、試験管内で旺盛に増殖し、かつ、肝臓特異酵素を発現誘導できる細胞を取得している。このような細胞は初代培養肝細胞とは異なり無限に殖えることから、同じ品質のヒト化肝臓マウスを作製するための有望な移植細胞ソースになると期待された。しかし、これまでの報告を見る限り、これらの細胞の肝再構築能は十分とは言えず、初代培養肝細胞の持つ能力の足元にも及ばない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は肝臓を再構築する能力を持つ「真の肝幹細胞」をバイオアッセイにより特定し、同等の能力を持つ細胞を人工的に作製することである。多くの研究者が試験管内で旺盛に増殖し、肝臓特異酵素を誘導できる「肝幹細胞」を報告しているが、これらには十分な肝再構築能が認められず、生体内で肝臓を再構築しうる細胞 (真の肝幹細胞) の正体は未だ不明である。我々が開発した肝傷害 TK-NOG マウスにヒト肝臓細胞を移植すると肝臓の大部分がヒト細胞で置換されることから、肝再構築能を有する細胞は明らかに存在する。研究期間内の目標は薬剤投与や肝切除による肝修復、肝再生時に増殖をはじめ細胞を細胞周期マーカー Fucci 遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓から単離し、肝再構築能を指

標に「真の肝幹細胞」を取得することである (研究の方法・“人工肝幹細胞の作製工程3に相当)。

## 3. 研究の方法

本研究では肝再構築能を有する肝幹細胞を動物実験によるバイオアッセイで特定し、そのような細胞を体細胞から人工的に作製することをめざす。肝細胞分化に特化した“人工肝幹細胞 (iLS 細胞)”の作製工程を次の8項目に分類して段階的に進めた。

- 1) 肝再生の誘導
- 2) 候補細胞の単離
- 3) 肝再構築能の評価
- 4) リプログラミング候補因子の絞り込み
- 5) iLS 細胞の作製
- 6) iLS 細胞の機能検証
- 7) ヒト iLS 細胞の樹立
- 8) ヒト iLS 細胞によるヒト化肝臓マウスの作製

上記行程に必要な以下のマウスの作製、系統化を行った。a) Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子 Tg マウス (肝再生誘導)、b) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) 遺伝子 Tg マウス (再構築能評価)、c) Fucci-S/G2/M 遺伝子 Tg マウス (増殖細胞採取)、d) PkgEGFP 遺伝子 Tg マウス (移植細胞)、e) Albumin (Alb) 遺伝子欠損 KO マウス (再構築能評価)。

### ◆ 肝再生誘導条件の検討

肝傷害マウスにおける肝再生様式の検討を行った。すなわち、HSVtk 遺伝子 Tg マウスにおいて肝傷害誘導を行い、細胞増殖を開始する条件を検討した。

### ◆ 肝再構築能の評価

マウス細胞による肝再構築能は、PkgEGFP 遺伝子 Tg マウス肝臓からコラゲナーゼ灌流法により単離した肝細胞を肝傷害誘導 HSVtk-Tg マウスの肝臓に移植し、7週後の GFP 陽性肝細胞の増殖で評価した。一方、ヒト細胞による肝再構築能評価は、市販の凍結肝細胞を肝傷害誘導 HSVtk-Tg マウスの肝臓に移植し、3及び7週間後の HLA 陽性肝細胞の分布にて行った。ドナーの異なるヒト肝細胞については FACS による性状解析を行った。

### ◆ リプログラミング候補因子の絞り込み

生体内で肝臓を再構築しうる細胞、あるいは当該細胞により再構築中の肝組織、及び、増殖停止期の肝細胞・肝組織から RNA を抽出し、GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array 全転写産物発現解析、Human

Genome U133 Plus 2.0 Array 遺伝子発現解析により網羅的遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

本研究では肝臓を再構築する能力を持つマウス肝幹細胞をバイオアッセイにより特定し、同等の能力を持つ細胞をヒト肝臓細胞中に見いだすこと、及び、そのような細胞を人工的に作製することをめざしている。そこで、はじめに肝細胞増殖を開始する条件を検討した。

再生誘導のため HSVtk 遺伝子 Tg マウスにチオアセトアミド (TAA, 200 mg/kg) あるいは、ガンシクロビル (GCV, 10 mg/kg) を投与し、肝傷害マーカー ALT 活性を経時的に測定した (図 1)。

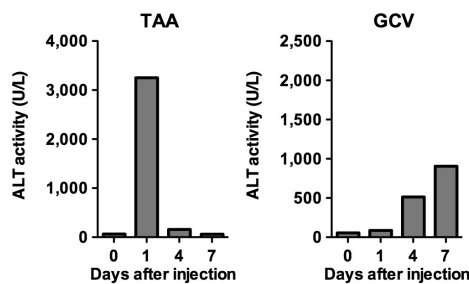


図 1 薬剤投与による肝傷害誘導

TAA 投与による肝傷害は翌日に ALT 活性が最高値を示し、急性、且つ一過性であることが確認された。一方、GCV により誘導される肝傷害は投与から 1 週間後まで上昇を続けることから、TAA とは機構が異なることが示された。これら肝傷害に伴う肝再生細胞を増殖マーカー Ki67 染色により検出したところ、TAA では生存する肝実質細胞に多数の陽性細胞が認められた (図 2A)。GCV による肝傷害はこれと異なり主に胆管周辺に Ki-67 陽性細胞が認められた (図 2B)。

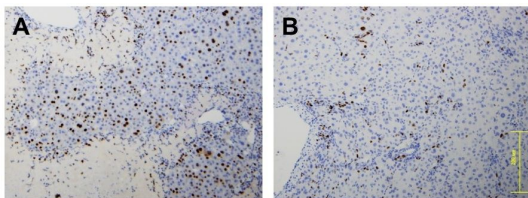


図 2 肝傷害誘導後の増殖細胞検出

これら増殖性細胞を肝臓から取り出し、肝臓再構築能を評価するため、肝細胞単離法、及び、移植法の確立を行った。肝実質細胞中に緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する PgcEGFP 遺伝子 Tg マウス (図 3A, B) の肝臓をコラゲナーゼ灌流し、肝細胞を単離した (図 3C)。

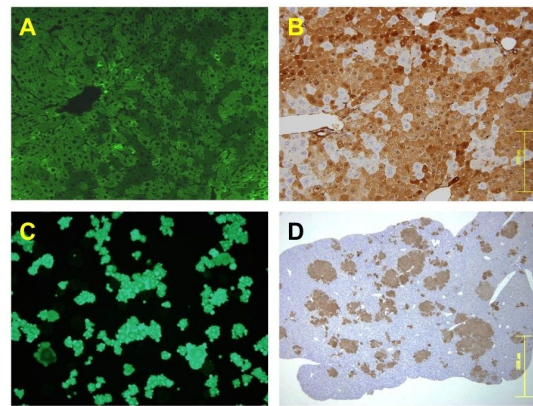


図 3 GFP の発現検出

単離した GFP 陽性細胞を肝傷害 HSVtk-Tg マウスに移植し、その 7 週後に免疫染色法にて GFP 陽性細胞の検出を行った (図 3D)。移植された GFP 陽性細胞が生着・増殖し、コロニーを形成したことは成熟肝臓中に増殖能を有する細胞が存在することを裏付けている。このような増殖性細胞を生細胞として取得するため、Fucci-S/G2/M タンパクを全ての肝臓細胞 (肝実質細胞・非実質細胞) で発現するトランスジェニックマウスの利用を検討した。既存の B6.Cg-Tg(Fucci)504Bsi マウスの肝臓を 2/3 切除して肝再生を誘導したところ、多数の Ki-67 陽性細胞が肝実質細胞に認められたが、Fucci-S/G2/M タンパク由来の蛍光シグナルは検出されなかった。そこで、Fucci-S/G2/M が全ての肝臓細胞で発現する Tg マウスの作製を試みた。全身性に発現する CMV プロモータに加え、PgcEGFP 遺伝子 Tg マウスで肝臓内の全細胞で発現が確認されているマウス Pgc プロモータを用いて Fucci-S/G2/M Tg マウスを作製した。また、目的遺伝子の導入と発現を確認するため、全身で常時赤色蛍光タンパクを発現する遺伝子を Fucci-S/G2/M タンパクと共発現させた。これらの発現ユニットを肝がん培養細胞株 HepG2 細胞や大腸がん細胞株 HCT116 細胞で一過性に発現させたところ、赤色蛍光を発する細胞の一部で緑色蛍光も認められ、Fucci-S/G2/M 発現ユニットが期待通りに作動していることが確認できた。しかし、本研究期間中に増殖期の肝臓細胞が蛍光を発するマウスの取得には至らなかった (表 1)。

Strain	Promoter	Reporter	# of founder	# of Tg (+)	# of Fucci-S/G2/M expression in Liver
B6C3	CMV	none	66	21	0
NOD	CMV	Kusabira orange	15	2	0
NOD	CMV	Kusabira orange	19	0	0
B6C3	mPgc	none	40	6	0
B6C3	CMV	tdTomato	19	0	0
FVB	CMV	tdTomato	2	0	0
BD	CMV	tdTomato	8	1	0
B6C3	CMV	tdTomato	12	1	0
B6J	CMV	tdTomato	13	1	0

表 1 Fucci-S/G2/M Tg マウスの作製



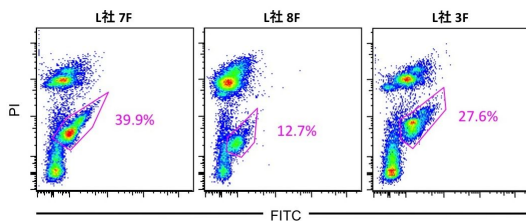


図4 市販ヒト肝細胞のフローサイトメトリー解析

本研究では“既存の肝幹細胞マーカーにとらわれないこと”を重視しており、肝再構築能を有する細胞の発見と新たな肝幹細胞マーカーの創出をめざしている。これまでヒト化肝臓マウス作製に使用した凍結ヒト肝細胞のフローサイトメトリー解析データから、比較的自家蛍光が強い生細胞分画 (High Intrinsic Fraction; HIF) (図4; ピンク色囲い部分)の量と移植後の生着性が関連することを見いだした。このフラクションを多量に含むヒト肝細胞が移植された肝傷害 HSVtk免疫不全マウスの肝臓には多数の生着コロニーが移植後早期から認められ、高い細胞増殖性も確認された (図5)。

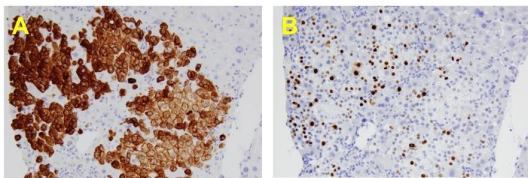


図5 高 HIF ヒト肝細胞移植 3 週後の TK-NOG マウス肝臓 (A:CK8-18 染色、B:ヒト Ki-67 染色)

そこで、高 HIF ドナー細胞、移植 3,11 週後のマウス再構築肝臓、対照マウス肝臓における遺伝子発現を GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array、及び、Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて解析し、肝臓再構築能にかかわる遺伝子 (リプログラミング候補因子) の同定を試みた。

Donor < Liver after 3w transplant (fold)	Gene
3737.9	glutathione S-transferase alpha 1
1700.2	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
1331.8	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
899.8	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
796.2	chromosome 10 open reading frame 116
752.6	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
552.0	ornithine carbamoyltransferase
445.3	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
419.5	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6
302.9	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B15
Donor > Liver after 3w transplant (fold)	Gene
< 0.001	C-reactive protein, pentraxin-related
0.001	chromosome 11 open reading frame 96
0.001	serum amyloid A1 // serum amyloid A2
0.001	calcitonin-related polypeptide alpha
0.001	nicotinamide N-methyltransferase
0.001	suppressor of cytokine signaling 3
0.001	C-reactive protein, pentraxin-related
0.001	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
0.001	nicotinamide N-methyltransferase
0.001	S100 calcium binding protein P

表2 ドナー肝細胞とヒト化肝臓の遺伝子発現比較

Human Gene 2.0 ST Array では宿主マウス肝臓 RNA との交差反応性が明瞭に区別しにくいことが判明したことから、Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用

いた発現比較により差のある遺伝子を抽出した。ドナー肝細胞に対し移植 3 週後に 10 倍以上発現が高い遺伝子が 381 個、発現量が 1/10 以下の遺伝子が 610 個同定された。表 2 に上位 10 遺伝子を示す。また、増殖が停止した移植 11 週後に対し、移植 3 週後に 5 倍以上発現が高い遺伝子が 22 個、発現量が 1/10 以下の遺伝子が 181 個同定された。これらにはそれぞれ増殖促進にかかわるもの、分化成熟状態を表す遺伝子が多数含まれていた。

本研究により抽出された肝再構築時に増減している遺伝子は、細胞増殖開始時に発現するもの、増殖中発現し続けるものが含まれる。今後はこれらの知見をもとに「真の肝幹細胞」探索と「効率的なヒト化マウス」作製を進めていく予定である。

## 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)

### 幹細胞探索関連

1. Suemizu, H., Nakamura, K., Kawai, K., Higuchi, Y., Kasahara, M., Fujimoto, J., Tanoue, A., and Nakamura, M.: Hepatocytes buried in the cirrhotic livers of patients with biliary atresia proliferate and function in the livers of urokinase-type plasminogen activator-NOG mice. *Liver Transpl* 20, 1127-1137, 2014.
2. Higuchi, Y., Kawai, K., Yamazaki, H., Nakamura, M., Bree, F., Guguen-Guillouzo, C., and Suemizu, H.: The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice. *Xenobiotica* 44, 146-153, 2014.
3. Muench, M. O., Beyer, A. I., Fomin, M. E., Thakker, R., Mulvaney, U. S., Nakamura, M., Suemizu, H., and Barcena, A.: The Adult Livers of Immunodeficient Mice Support Human Hematopoiesis: Evidence for a Hepatic Mast Cell Population that Develops Early in Human Ontogeny. *PLoS One* 9, e97312, 2014.
4. Gutti, T. L., Knibbe, J. S., Makarov, E., Zhang, J., Yannam, G. R., Gorantla, S., Sun, Y., Mercer, D. F., Suemizu, H., Wisecarver, J. L., Osna, N. A., Bronich, T. K., and Poluektova, L. Y.: Human Hepatocytes and Hematolymphoid Dual Reconstitution in Treosulfan-Conditioned uPA-NOG Mice. *Am J Pathol* 184, 101-109, 2014.
5. Fukusumi, H., Shofuda, T., Kanematsu, D., Yamamoto, A., Suemizu, H.,

Nakamura, M., Yamasaki, M., Ohgushi, M., Sasai, Y., and Kanemura, Y.: Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells. PLoS One 8, e55226, 2013.

#### マウスモデル樹立関連

6. Katano, I., Takahashi, T., Ito, R., Kamisako, T., Mizusawa, T., Ka, Y., Ogura, T., Suemizu, H., Kawakami, Y., and Ito, M.: Predominant Development of Mature and Functional Human NK Cells in a Novel Human IL-2-Producing Transgenic NOG Mouse. J Immunol 194, 3513-3525, 2015.
7. Katano, I., Ito, R., Kamisako, T., Eto, T., Ogura, T., Kawai, K., Suemizu, H., Takahashi, T., Kawakami, Y., and Ito, M.: NOD-Rag2(null) IL-2Rgamma(null) Mice: An Alternative to NOG Mice for Generation of Humanized Mice. Exp Anim 63, 321-330, 2014.
8. Higuchi, Y., Kawai, K., Yamamoto, M., Kuronuma, M., Ando, Y., Katano, I., Nakamura, M., and Suemizu, H.: A Novel Enhanced Green Fluorescent Protein-Expressing NOG Mouse for Analyzing the Microenvironment of Xenograft Tissues. Exp Anim 63, 55-62, 2014.
9. Ito, R., Takahashi, T., Katano, I., Kawai, K., Kamisako, T., Ogura, T., Ida-Tanaka, M., Suemizu, H., Nunomura, S., Ra, C., Mori, A., Aiso, S., and Ito, M.: Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. J Immunol 191, 2890-2899, 2013.

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Suemizu, H., Higuchi, Y., Kawai, K., Yamazaki, H., Bree, F., Guillouzo, GC., and Nakamura, M.: The human hepatic cell line HepaRG<sup>®</sup> as a possible cell source for the steady generation of humanized liver TK-NOG mice. 4th International Workshop on Humanized Mouse (開催地: 韓国ソウル・会期: 2013.9.30-2013.10.2)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

末水 洋志(SUEMIZU Hiroshi)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・部長

研究者番号: 40332209

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: