

氏名（本籍）	古屋 欽司		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	9952	号
学位授与年月	令和	3年	3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ヒト肝細胞キメララット作成のためのヒト肝オルガ ノイド作成とマクロファージ制御によるヒト造血幹 細胞移植の検討		
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学准教授	医学博士	竹内 薫
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	小林 千恵
副査	筑波大学講師	博士（医学）	三好 浩稔

論文の内容の要旨

古屋欽司氏の博士学位論文は、ヒト羊膜上皮細胞由来肝オルガノイドの樹立と性状解析を行い、またヒト肝細胞の生着を可能ならしめる免疫不全ラットの条件樹立を目指したもので、ラットでヒト肝細胞が機能するような新たな研究用動物の樹立を目標とした研究である。その要旨は以下の通りである。

（背景と目的）

臨床応用あるいは実験動物としての利用など、様々な目的で異種移植の研究が進められている。肝細胞移植ないし肝臓器移植の分野においても、異種移植の報告は多い。著者は、薬理研究や毒性試験などに利用が期待されるヒト肝細胞キメララットの可能性に着目し、同モデルの確立につながるテーマを設定して研究を行った。

第一部では、著者は倫理的要件、幹細胞の多能性、造腫瘍性、などから羊膜上皮細胞（AEC）に着目した。著者はAECの特性を網羅的に明らかにするとともに培養方法を工夫し、新たな移植ソースとしての肝オルガノイドを作成することを目的とした。

第二部において著者は、造血幹細胞移植による免疫寛容誘導を着想し、マクロファージ制御によるヒト造血幹細胞移植を検証した。具体的には、リンパ球欠損マウスモデルの検討からは、細胞の生着にはSIRP α /CD47の親和性とマクロファージが関与すると想定されているが、他の動物における報告は限定的であることから、ラットへのヒト造血幹細胞移植におけるマクロファージの影響を明らかに

し、マクロファージの制御によってヒト造血幹細胞移植モデルを樹立することを目的とした。

(方法)

第一部で著者は、予定帝王切開で出生した新生児の胎盤、臍帯から AEC, 間葉系幹細胞 (MSC), 臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を採取して実験に用いた。最初に, AEC の幹細胞性および肝分化能を, 遺伝子発現, フローサイトメトリー, RNAseq を用いたバイオインフォマティクス解析等により検証している。続いて著者は, 肝分化誘導プロトコル, 三次元培養法, および AEC・MSC・HUVEC の共培養を組み合わせて, 肝オルガノイドを作成した。共焦点顕微鏡によってオルガノイドの構造を評価し, 遺伝子発現, PAS 染色, インドシアニンググリーン試験で肝機能を評価している。

第二部では, 第一部と同様に採取した臍帯血から分離した単核球分画細胞 (hCB-MNC) を実験に用いている。移植レシピエント動物は, 中国科学院上海生命科学研究院で作成された SRG ラット (Rag2, Il2rg, Fah 遺伝子のノックアウトラット) を用いている。最初に, SRG ラットの免疫不全状態が, 末梢血のフローサイトメトリーと脾臓の免疫染色で評価されている。続いて, hCB-MNC を SRG ラットへ尾静脈注射で移植する実験系を作成し, マクロファージを除去するクロドロン酸内包リポソーム (CL) の投与による造血キメラ形成への影響を評価している。マクロファージのヒト血球貪食の評価系として著者は, hCB-MNC の静注モデル, および標識赤血球の腹腔内注入モデルを用いている。

(結果)

第一部で筆者は, AEC が未分化マーカーである EPCAM, E-cadherinなどを広く発現し, 一部の細胞で TRA-1-81, TRA-1-60 の発現も上昇していることを確認した。また著者はバイオインフォマティクス解析を行い, AEC は, 線維芽細胞由来や人工多能性幹細胞由来の肝様細胞と似たプロファイリングを持つこと, 複数の幹細胞マーカー (*TJPI*, *KRT8* 他), 肝細胞マーカー (*MET*, *IL6ST* 他) を発現することを確認した。著者は, AEC の肝遺伝子発現は肝分化誘導と三次元培養により促進されることを見出している。さらに, MSC・HUVEC との共培養により, 細胞は秩序のある配置をとる細胞塊 (オルガノイド) となり, グリコーゲン貯留能, ICG 取り込み・排泄能を獲得することを見出している。

第二部で著者は, SRG ラットの末梢血中には, T, B, NK 細胞がほぼ完全に欠損しており, 脾臓においては, リンパ濾胞が欠損することを確認した。hCB-MNC 移植実験においては, 著者は CL 投与なし群では移植後 7 時間ではほぼすべての hCD45 陽性細胞が除去され, CL1 回投与群では, 3/6 匹において移植後 1 か月までキメラ率が低い割合で維持されることを示している。CL 3 回投与群においては, 5/6 匹で移植後 7 日後までのキメラ形成が確認されたが, 2 週間以上のラットの生存は得られなかった。ヒト血球の貪食試験において著者は, 静脈注射の実験では hCB-MNC は血中から急速に除去されるものの, 脾臓免疫染色中の hCD45 陽性細胞の頻度は低く, 貪食の評価が困難であったとしている。また腹腔内注射実験では, ラット赤血球に比べてヒト赤血球において, 有意に貪食率が高かった, としている。

(考察)

第一部では, 著者は AEC には肝細胞増殖因子受容体をコードする *MET* などの遺伝子発現上昇見出し, これらの遺伝子発現が肝分化能に影響していると推察している。また, 脂質代謝, 胆汁輸送などの系統的な遺伝子発現も認められることも, AEC の肝細胞分化との関連があるものと推察している。オ

ルガノイドでは、実際の組織に近い多種細胞環境、立体構造、微小環境が模倣されることから、著者は一定の肝機能が獲得されたと推測している。

第二部では、CLのマクロファージ除去は4日間程度であるとされるが、CL1回投与群においても移植した細胞が移植後1か月以上維持されていることから、一時的なマクロファージ除去であっても長期的なキメラ形成に繋がる可能性が示唆されたと著者は論じている。また著者はキメラ率について、過去の知見と今回の研究成果の違いについて、以下のように論じている。すなわち、既存のヒト・マウス造血幹細胞移植におけるレシピエントマウスでは、NODかhSIRP α を組み込んだリンパ球欠損モデルが使用され、60-80%のヒト造血キメラも達成されている。ラットにおいてもhSIRP α 遺伝子導入を含むリンパ球欠損モデルによって14-27%程度のヒト造血キメラが報告されている。本方法のキメラ率は0.5%と低く、免疫を模倣するレベルではない。しかしながら、免疫寛容を誘導のためには1%以下のキメラ率でも良いとする報告がある。こうしたことから著者は、CL1回投与による造血幹細胞移植は、簡便に他の細胞移植/臓器移植と組み合わせることができるため、免疫寛容誘導モデルとしての応用可能性があると考えられる、と考察している。

審査の結果の要旨

(批評) 著者は、ヒトAEC由来のオルガノイド形成による肝細胞分化系の樹立および性状解析を行うとともに、ヒト肝細胞の移植を成立ならしめるラットの免疫不全条件樹立を検討したことにより、ヒト肝細胞をマウスよりも大型の動物に移植して機能させる実験系開発に重要な貢献を果たしたものとして高く評価される。

令和3年1月8日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。