

令和元年9月5日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15604

研究課題名(和文) ヒト免疫システムを持つヒト肝臓化ラットの創出とヒト肝疾患・治療モデルの開発研究

研究課題名(英文) Rat liver disease modeling with humanized liver and immune system

研究代表者

鄭 允文 (Zheng, Yunwen)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80404995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜幹細胞はES細胞と近い性質を持ち、肝細胞に分化する傾向をもつことが知られており、肝不全治療への臨床応用が期待されている。我々は胎盤由来性幹細胞の新規3次元培養により肝オルガノイドを作成し、その肝遺伝子発現が上昇すること、肝に近い性質を持つことを発見した。また、重症免疫不全・肝障害のFRGラットを用いて、ヒト肝細胞移植系を確立した。更に、マクロファージがヒト血球細胞拒絶に重要な役割を果たすこと、高度なマクロファージの除去により、ヒト造血幹細胞が限定的に生着することを確認した。造血幹細胞移植は異種拒絶が顕著にでる移植モデルであり、拒絶メカニズム解明やヒト肝臓化ラットにも応用可能と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変・肝不全による死者は国内で年間2万人を超えるが、唯一の根治的治療である肝移植は深刻な臓器不足に直面しており、世界的な問題となっている。臓器移植の代替治療として、幹細胞を用いた新規治療法の開発は重要な課題である。重症免疫不全ラットに対してヒト臍帯血由来造血幹細胞や体性細胞を移植することにより、正常な機能を有する肝組織を再構築することが可能となり、創薬研究などに役立つヒト肝臓動物モデルの作成や肝不全に対抗する新たな移植治療の実現が期待される。さらに、造血幹細胞移植は異種拒絶が顕著にでる移植モデルであり、マクロファージの拒絶メカニズム解明は、ヒト化肝臓ラットにも応用が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The amnion stem cells from the placenta have been reported to have not only the pluripotent characteristics similar to ES cells, but also the liver differentiation potential. Here we evaluated the characteristics of the amnion stem cells and confirmed the new features, that the hepatic related gene expression increased when incubated on the special 3D cultural system. Furthermore, we tried to generate humanized liver and immune system in severe immunodeficient rat. Human hepatic repopulating in rat model was established, however, since the macrophage, human cord blood cells could not exist in the model longer. Only macrophage removed thoroughly, the limit reconstitution of human hematopoietic stem cells could be confirmed. Xenograft rejection with the transplantation of hematopoietic stem cells markedly elevated, by this model, explore the mechanism of rejection from macrophage and reconstitute human immune system in humanized liver become possible.

研究分野：幹細胞生物学と再生医学

キーワード：ヒト化ラット 再生医療 羊膜上皮細胞 肝オルガノイド 血管内皮前駆細胞 造血幹細胞 間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

日本肝臓学会の肝がん白書によれば、肝臓による死亡者数は平成 26 年の時点で年間 3 万人を越える。肝臓の主な原因であるウイルス性肝炎は新規治療法の開発により減少傾向にあるものの、そのかわりに脂肪肝/NASH に由来する肝硬変を背景とした肝発癌は増加傾向にあり、その対策が喫緊の課題である。しかしこの発癌機序に関しては現在でも不明な点が多く、早期発見や治療体系の確立が不十分である。申請者らは現状を打破するため、ヒト化肝臓マウス・ラットを作成し肝再生や代謝能に関する研究を行い継続的に新たな知見を提供してきた (Tsuchida T, Zheng YW et al. Transplant Proc 2014;46:1191; Zhang RR, Zheng YW et al. Stem Cell Res Ther 2015;6:49)。しかし近年肝疾患と免疫系の相互作用(マクロファージと肝の線維化との関係や、肝の分化と造血幹細胞の相互作用など)が注目され (Bieghs B et al. Trends Immunol 2013;34:446)、ヒトの免疫システムを持たないヒト肝臓化モデルのみではヒトの病態に即した肝疾患の研究を行うことはもはや不可能と考えられる。そこで我々は、重症免疫不全 (XSCID: Il2R KO) ラットに造血幹細胞移植を行いヒト化血液モデルを作成し、さらに、ヒト肝細胞または肝細胞への分化能力を有する多能性幹細胞や組織幹細胞などを移植することにより、ヒト化血液・ヒト化肝臓ラットを作成する。未だ実現されていないこのモデルは、ヒト肝とヒト血液の相互作用を *in vivo* でより忠実に模倣し、疾患モデルや治療モデルへの応用が期待され、肝臓や NASH 等の肝疾患における新たな知見を提供することが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重症免疫不全ラットに対しヒト臍帯血に由来する造血幹細胞や羊膜などに由来する多能性幹細胞を移植することにより、ヒト免疫システム(ヒト血液化)を持つヒト肝臓化ラットを作成し、さらにはそこから肝臓を含む肝疾患モデル及び治療モデルの作成を試みることである。それにより、臨床的に大きな問題となっている肝臓の病態や脂肪肝・NASH からの肝発癌における、分子生物学的なメカニズムの解明に寄与し、ヒト肝疾患の治療における新規かつ有益な知見を提供することを目指す。

3. 研究の方法

まず、筑波大学附属病院において予定帝王切開を行う患者にインフォームドコンセントを行った上で、本来廃棄される胎盤から 4 種類の体性幹細胞 (羊膜幹細胞(ASC)、臍帯由来の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC)、血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)、造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell: HSC)) を単離・同定・保存する技術を確認した。

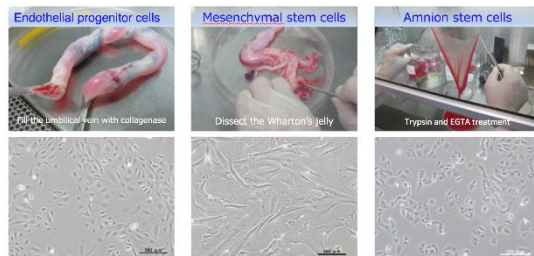
続いて、羊膜上皮細胞の特性解析を行った。FACS による表面抗原解析、培養法の違いによる遺伝子発現を行った。また、通常の 2 次元培養と特殊な培養プレートを用いた 3 次元培養とで、遺伝子発現を比較した。さらに、3 次元培養プレートで肝オルガノイドを作製し、肝がもつ代謝能の再現性を検討した。

In vivo モデルとしては、まず肝への移植プラットフォームを開発した。移植動物としては、X-SCID より高度な免疫不全を持ち、肝障害を呈する FRG ラットを用いた。肝細胞移植に必要な肝障害のコントロールの手法を確認したうえで、肝細胞を移植するプロトコルを確認した。ヒト化血液の目的においては、放射線照射の最適化を行い、臍帯血由来単核細胞の移植を行った。拒絶のメカニズムを明らかにし、血球の生着を促すために、マクロファージの除去薬であるクロドロン酸内包リポソームを用いることで、臍帯血移植モデルの作成を試みた。

4. 研究成果

羊膜由来体性幹細胞バンクの確立

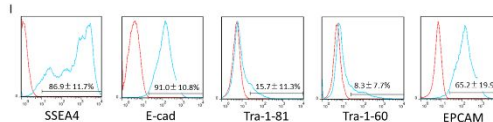
胎盤組織より 4 種類の体性幹細胞の採取を安定化させた。具体的には、胎盤表面の羊膜とトリプシン等で処理することで ASC を、臍帯静脈をコラゲナーゼ等で処理することで EPC を、臍帯中心部付近の Wharton's jelly を細断することで MSC を採取した。HSC に関しては Ficoll paque を用いて単核球分画を遠心分離したのちに、セルソーターを用いて Lin-CD45-CD38-CD34+CD90+CD49f+ の分画をソーティングすることで、単核球分画の約 0.01% を占める HSC を単離した。これらの細胞は新規に導入した大型液体窒素タンクに保存し、患者情報(個人特定は不可能)と突き合わせる事が可能な状態となっている。



羊膜幹細胞の特性解析

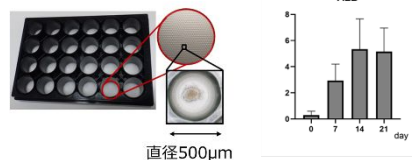
単離した羊膜上皮細胞の表面抗原をフローサイトメーターにて解析すると、SSEA-4,

Tra-1-60, Tra-1-81, EPCAM, E-cadherin などの未分化細胞に特徴的なマーカーが高発現しており、羊膜上皮細胞中には多分化能を保持する羊膜幹細胞が高い割合で存在することが示唆された。網羅的遺伝子発現解析では、羊膜幹細胞は、幹細胞マーカーと肝細胞マーカーが部分的にオーバーラップしていることが示された。

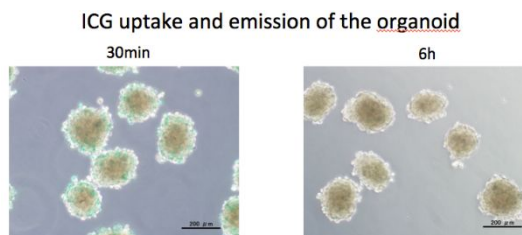


移植にむけた肝オルガノイドの創出

羊膜細胞は、通常の二次元培養においては、長期間培養は困難であり、肝分化は難しい。そこで、我々は(株)クラレ提供の三次元培養プレートを導入した。三次元培養によって細胞同士は球体(スフェロイド)を形成し、長期間培養が可能となった。更に、培養条件を調整した肝分化誘導プロトコルによって、肝遺伝子発現の上昇が確認された。

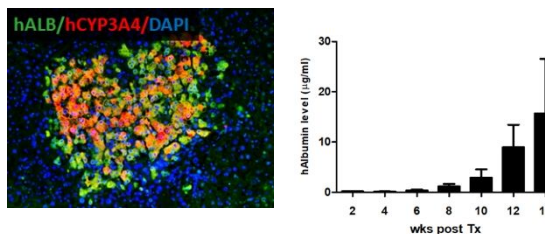


一方でこの細胞塊単独では肝機能を代替することは不十分であることが明らかとなり、羊膜細胞に由来する幹細胞数種類を特定の条件下で共培養することで、さらに肝臓に近い性質をもつことが明らかとなった。具体的には肝芽様の立体構造を持ち、グリコーゲン貯蔵能や ICG 取り込み・排泄能などを獲得した。



ヒト肝細胞移植モデル

ヒト化肝臓モデルを作成するために、まずは、ヒト肝細胞をラットに移植するプラットフォームを作成した。移植動物として用いたFRGラットに関して、T・B・NK細胞が高度に抑制されていることを確認した。更に、肝障害の抑制物質であるNTBCをコントロールして持続的な肝障害を誘発するサイクリックなおNTBC除去方法を樹立した。



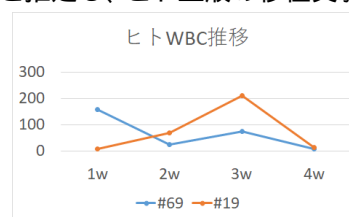
この肝障害誘導下に、ヒト初代肝細胞の経門脈的な細胞移植を行った。肝細胞は、ラットの肝臓内に生着して増加し、アルブミンを産生することが確認された。

次の段階としては、羊膜由来の肝様細胞・肝オルガノイドを用いて、移植モデルの確立を試みる予定である。

ヒト造血幹細胞移植とマクロファージ

X-SCID と FRG に対する放射線照射実験から 8Gy を半致死線量と推定し、ヒト血液の移植実験を行った。移植細胞源の臍帯血由来単核細胞には、1%程度の CD34 陽性細胞が含まれていることを確認した。移植動物としては FRG ラットを用いた。

放射線照射下に、ヒト単核細胞の移植を行っても数時間のうちに細胞が除去されてしまうが、放射線照射とクロドロン酸内包リポソームを併用することによって、ヒト細胞が数週間にわたってラットの血液中に維持されていることを確認した。



造血幹細胞移植は異種拒絶が顕著にでる移植モデルであり、マクロファージの拒絶メカニズム解明は、ヒト化肝臓ラットにも応用が可能と考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- Liu LP, Li YM, Guo NN, Li S, Ma XL, Zhang YX, Gao YM, Huang JL, Zheng DX, Wang LY, Xu H, Hui L, Zheng YW#. Therapeutic potential of patient iPSC-derived iMelanocytes in autologous transplantation. Cell Rep 2019;27(2): 455-66.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.046. (#Lead contact) 査読有
- Nie YZ*, Zheng YW*,**, Miyakawa K, Murata S, Zhang RR, Sekine K, Ueno Y, Takebe T, Wakita T, Ryo A, Taniguchi H**. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. EBioMedicine 2018; 35:114-23

doi:10.1016/j.ebiom.2018.08.014 (*equal contribution, **corresponding, Cover image). 査読有

- Zhang YX, Liu LP, Li M, Huang JL, Xu H, Chen XD, Zhu WY, Cai YP, Guo NN, Chen ZQ, Zheng YW**, Li YM**, Development of Individualized Induced Pluripotent Stem Cells from Fibroblasts of Keloid Lesions in Patients', *Transplant Proc.* 2018,50(9):2868-71. doi:10.1016/j.transproceed.2018.04.008. (**corresponding) 査読有
- Wang LY, Liu LP, Ge JY, Yuan YY, Sun LL, Xu H, Huang PY, Hui LJ, Isoda H, Ohkohchi N, Li YM, Zheng YW. A multiple-cell microenvironment in a three-dimensional system enhances direct cellular reprogramming into hepatic organoids, *Transplant Proc.* 2018, 50(9): 2864-7. doi:10.1016/j.transproceed.2018.03.076. 査読有
- Zhang RR*, Zheng YW*,**, Li B, Nie YZ, Ueno Y, Tsuchida T, Taniguchi H**. Hepatic stem cells with self-renewal and liver repopulation potential are harbored in CDCP1-positive subpopulations of human fetal liver cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1):29. Doi:10.1186/s13287-017-0747-3 (*equal contribution, **corresponding) 査読有
- Nie YZ*, Zheng YW*,**, Ogawa M, Miyagi E, Taniguchi H**. Human liver organoids generated with single donor-derived multiple cells rescue mice from acute liver failure. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1):5. DOI:10.1186/s13287-017-0749-1 (*equal contribution, **corresponding) 査読有
- Saito J, Yokoyama U, Nicho N, Zheng YW, Ichikawa Y, Ito S, Umemura M, Fujita T, Ito S, Taniguchi H, Asou T, Masuda M, Ishikawa Y. Tissue-type plasminogen activator contributes to remodeling of the rat ductus arteriosus. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190871. DOI:10.1371/journal.pone.0190871 査読有
- Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Taniguchi H. Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-chain amino acid metabolism. *Development.* 2017;144(6):1018-24. 査読有
- Nakayama K, Murata S, Ito H, Iwasaki K, Villareal MO, Zheng YW, Matsui H, Isoda H, Ohkohchi N. Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. *Oncol Lett.* 2017;14(2):2015-2024. 査読有
- Iwasaki K, Zheng YW (corresponding), Murata S, Ito H, Nakayama K, Kurokawa T, Sano N, Nowatari T, Villareal MO, Nagano Y, Isoda H, Matsui H, Ohkohchi N. Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(44):9765-74. DOI: 10.3748/wjg.v22.i44.9765 査読有
- Zhang RR*, Zheng YW*,**, Taniguchi H. Generation of a humanized mouse liver by using human hepatic stem cells. *J Vis Exp* 2016;(114),e54167,doi:10.3791/54167 (*equal contribution, **corresponding). 査読有
- Zhang L, Shao Y, Li L, Tian F, Cen J, Chen X, Hu D, Zhou Y, Xie W, Zheng YW, Ji Y, Liu M, Li D, and Hui L. Efficient liver repopulation of transplanted hepatocyte prevents cirrhosis in a rat model of hereditary tyrosinemia type I. *Sci Rep* 2016;6:31460. doi:10.1038/srep31460 査読有

[学会発表](計 8 件)

- 古屋欽司 佐古大輔 鄭東旭 岩崎健一 梁宸 古田智章 葛劍云 劉莉萍 打田慶明 八木洋也 濱田洋実 礪田博子 大河内信弘 鄭允文 胎盤組織由来体性幹細胞を用いた三次元多細胞共培養法による肝性分化誘導の探索 第 18 回日本再生医療学会総会 2019 年 3 月 21-23 日 兵庫県神戸市
- 葛劍云 張魯狄 古屋欽司 佐古大輔 鄭東旭 梁宸 礪田博子 大河内信弘 惠利健 鄭允文 Application of multiple-cell 3D system in chemical induction of Endoderm progenitor-like state 第 18 回日本再生医療学会総会 2019 年 3 月 21-23 日 兵庫県神戸市
- 葛劍云 鄭允文 A triple knockout rat model with liver damage and severe combined immunodeficiency 第 30 回日本肝臓医生物学研究会 2019 年 3 月 9 日 石川県加賀市
- 鄭允文 佐古大輔 古屋欽司 轟運中 八木洋也 濱田洋実 秋本和憲 礪田博子 谷口英樹 大河内信弘 幹細胞からオルガノイドへと肝再生の道 第 10 回生体表面研究会

2019年2月28日-3月1日. 東京

5. 打田慶明 ファラハナフェルドウシ 佐々木一憲 鄭允文 磯田博子 Potential Role of Isorhamnetin in Differentiation of Human Amnion Epithelial Cells to Hepatocyte-like Cells 日本動物細胞工学会 2018年11月5-8日 茨城県つくば市
6. 葛剣云 劉莉萍 古屋欽司 佐古大輔 R. Sabrina C. RAMIREZ 梁宸 宋丹 八木洋也 濱田洋実 磯田博子 大河内信弘 鄭允文. Application of multiple-cell 3D system in chemical induction of Endoderm progenitor-like state. 第17回日本再生医療学会総会 2018年3月21-23日 神奈川県横浜市
7. 佐古大輔 鄭允文 岩崎健一 清水義夫 R.サブリナ ラミレズ 葛剣云 古屋欽司 劉莉萍 八木洋也 濱田洋実 磯田博子 秋本和憲 大河内信弘 胎盤組織由来体性幹細胞を用いた肝オルガノイドの創出 第24回肝細胞研究会 2017年6月30日-7月1日北海道旭川市
8. 岩崎健一 鄭允文 大河内信弘 胎盤由来体性幹細胞を用いた肝オルガノイドの作製 第25回日本肝臓医生物学研究会 2016年9月17日 新潟県南魚沼郡湯沢町

〔図書〕(計 4 件)

1. Liu LP, Li YM, Guo NN, Wang LY, Isoda H, Ohkohchi N, Taniguchi H and Zheng YW. Generation of liver organoids and their potential applications. In Stem Cells and Cancer in Hepatology: From Essentials to Application (edited by Zheng YW). ELSEVIER May 24, 2018. ISBN 9780128123010
2. Xu H, Zheng YW, Liu Q, Liu LP, Luo FL, Zhou HC, Isoda H, Ohkohchi N and Li YM. Reactive Oxygen Species in Skin Repair, Regeneration, Aging, and Inflammation. In Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells (edited by Cristiana Filip).InTechOpen (December 20th 2017). ISBN 978-953-51-5822-6
3. Zhang RR, Zheng YW, Taniguchi H. Three-Dimensional Culture Systems and Humanized Liver Models Using Hepatic Stem Cells for Enhanced Toxicity Assessment. In Stem Cells in Toxicology and Medicine (edited by Sahu SC). Johns Wiley and Sons. Dec, 2016, pp145-54. ISBN: 978-1-119-13541-8, DOI: 10.1002/9781119135449.ch8
4. Huang PY, Li B, Zheng YW. Role of Stem Cells in the Gastrointestinal Tract and in the Development of Cancer. In Stem Cells in Toxicology and Medicine (edited by Sahu SC). Johns Wiley and Sons. Dec, 2016, pp363-74. ISBN: 978-1-119-13541-8, DOI: 10.1002/9781119135449.ch19

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田村孝史

ローマ字氏名：TAMURA, Takafumi

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：研究員

研究者番号：20633192

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大河内信弘

ローマ字氏名：OHKOUCI, Nobuhiro

研究協力者氏名：古屋欽司

ローマ字氏名：FURUYA, Kinji

研究協力者氏名：葛剣云

ローマ字氏名：GE, Jianyun

研究協力者氏名：古田智章

ローマ字氏名：FURUTA, Tomoaki

研究協力者氏名：佐古大輔

ローマ字氏名：SAKO, Daisuke

研究協力者氏名：岩崎健一

ローマ字氏名：IWASAKI, Kinichi

研究協力者氏名：劉莉萍

ローマ字氏名：LIU, Liping

研究協力者氏名：清水義夫

ローマ字氏名：SHIMIZU, Yoshio

研究協力者氏名：梁宸

ローマ字氏名：LIANG, Chen

研究協力者氏名：宋丹

ローマ字氏名：SONG, Dan

研究協力者氏名：打田慶明

ローマ字氏名：UCHIDA, Yoshiaki

研究協力者氏名：R.サブリナ ラミレス

ローマ字氏名：R. Sabrina RAMIREZ

研究協力者氏名：八木洋也

ローマ字氏名：YAGI, Hiroya

研究協力者氏名：濱田洋実

ローマ字氏名：HAMADA, Hiromi

研究協力者氏名：磯田博子

ローマ字氏名：ISODA, Hiroko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。