別紙４

報告番号	※　　第　　号

主　論　文　の　要　旨

論文題目　Treatment with hepatocyte transplantation in a novel mouse model of persistent liver failure

(新規持続性肝不全マウスモデルにおける肝細胞移植治療)

氏　　名　玉置　優貴

論　文　内　容　の　要　旨

【緒言】

急性および慢性肝不全、肝細胞癌などの難治性肝疾患に対する同所性肝移植（OLT）は、患者の予後を改善するために効果的な治療法である。しかし、ドナーの不足、移植片拒絶のリスク、免疫抑制剤への副作用など、様々な問題を抱えている。そのため、OLT の代替として間葉系幹細胞や iPS 細胞より誘導された肝様細胞による細胞移植治療やオルガノイド移植による治療の検討が進められている。

成熟肝細胞を移植に使用する戦略は、肝不全の治療において検討されており、その有効性を証明するための臨床試験が 20 年以上にわたって続けられている。その安全性および短期的な有効性は証明されているが、細胞の生着率が低く、効果が持続しないなど未解決の問題を抱えている。このような問題を解決し、次世代の細胞移植やオルガノイド移植の可能性を保証するためには、細胞移植治療法を研究するのに役立つ適切なモデルの確立が非常に重要である。

近年、ヒト化マウスの一種であるヒト肝細胞キメラマウス作製系が構築され、肝炎ウイルの複製系、薬剤スクリーニング系などに利用されている。その一つが、重度の免疫不全形質をもつ NOG マウスのアルブミンプロモーター下に単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、TK-NOG である。ガンシクロビル（GCV）はチミジンキナーゼによって毒性物質に変換されるため、TK-NOG は GCV の投与によって肝細胞が死滅し、移植肝細胞の生着・増殖が可能となる。しかし、同時にこれらのマウスは重度の免疫不全のため、免疫による肝障害の病態を再現できないという問題を抱えている。

本研究では、肝細胞または肝細胞様細胞移植に適したモデルを開発するために、TK-NOG を正常な免疫能を有するマウスに改変し、移植細胞の生着および免疫拒絶のメカニズムが可能となるモデルを作製した。すなわち、TK-NOG を C57BL/6 または BALB/c マウスに戻し交配することで、肝細胞に TK を発現し、正常免疫能を有するマウス（HSVtk）を作製した。これらの HSVtk マウスに、GCV を投与した後、同系または同種異系の肝細胞を移植した。その後、移植された肝細胞による置換率と、移植によって引き起こされた肝臓の組織学的および免疫学的変化を経時的に観察した。 さらに、同種異系移植において免疫拒絶反応を回避するため、タクロリムス（FK506）および脂肪組織由来幹細胞（ASC）の有効性を検証した。

【材料と方法】

HSVtk（C57/BL/6, Balb/c）マウスへ GCV を投与 1～3 週間後に、緑色蛍光タンパク質（GFP）トランスジェニックマウス（GFP-tg, BL/6 バックグラウンド）から単離した 1×10^6 個の肝細胞を脾注移植した。同種同系（GFP-tg→HSVtk/BL6：*Auto* モデル）または同種異系（GFP-tg→HSVtk/Balb： *Allo* モデル）の組み合わせで移植を行い HSVtk マウスに GCV 投与後、PBS のみを投与したマウスを対照（*Sham* モデル）とした。経時的な変化を確認するため、各モデルで 0 日（処置なし）、0 週（GCV 投与後）、移植後 1, 2, 4, 8 週において、移植細胞の生着率、肝内環境の変化、移植細胞の生着や拒絶に関わる因子などについての解析を行なった。

また、*Allo* モデルにおける拒絶回避のための治療法として、タクロリムス（FK506）あるいは脂肪由来幹細胞（ASC）投与の有用性について検討を行った。どちらの治療群についても移植後 2weeks で移植細胞の生着率を評価した。

【結果】

Auto モデルでは、肝組織の GFP 免疫染色および肝内遺伝子発現解析の結果から、移植された肝細胞が生着し、経時的に増殖していた。また、*Sham* モデルと比較し、GCV 投与によって減少した体重は移植後に上昇していた。移植後 8 週で、血清 ALT レベルと肝臓組織像はほぼ正常化したが、肝細胞置換率は 19.8 から 73.8%までとマウス間で変動を認めた。肝細胞移植前、すなわち GCV 投与後の肝再生不の状態は移植後 8 週では解消されており、肝細胞置換率の程度に関わらず、肝臓は組織学的に正常形態に復していた。これは、移植肝細胞の増殖だけでなく、レシピエント肝細胞も再生不全状態から回復し、増殖したためであると考えられた。*Auto* モデルでは、p16 の肝内 mRNA レベルが大幅に低下したため、肝障害に関連する肝細胞の老化が解消されたと考えられた。

一方、*Allo* モデルでは、移植肝細胞は早期に排除され、移植後 1 週から肝細胞置換率は全てのマウスで 0%であった。GCV 投与によって惹起された肝不全状態は改

善されず、移植後 8 週時点での肝組織像でも変性肝細胞や炎症細胞浸潤を多く認め、*Sham* モデルと比較して有意に肝線維化が進展していた。また、p16 の肝内 mRNA レベルが移植後 8 週で有意に上昇し、肝細胞老化の増悪が示唆された。

最後に、*Allo* モデルにおける移植細胞の免疫拒絶回避のため、FK506 および ASC を用いた治療を試みた。FK506 モデルでは生着肝細胞を認めたものの、移植肝細胞による置換率は移植後 2 週で 1 割程度と *Auto* モデルの置換率より低かった。また、*Allo* モデルと比較しても ALT 値の低下はみられず、体重は減少傾向を認めた。ASC モデルでは移植肝細胞の生着は確認できなかったものの、*Allo* モデルと比較し、ALT 値の低下や体重の増加を認めた。

【考察】

本研究で用いた *Sham* モデルは、8 週という長期にわたり、肝障害、肝細胞の形態変化が持続、増悪する慢性肝再生不全モデルである。これまで肝再生の研究に用いられてきた肝切除、CCl_4 肝障害などのモデルが急性肝障害の後に自然経過で肝再生が起こることを考えれば、このモデルは肝移植あるいは細胞移植治療を必要とする臨床的病態により近く、肝再生不全に対する治療法の効果を評価するために適切なモデルであると考えられた。このモデルにおいて、少量の肝細胞（*Auto*）の移植により肝不全からの回復がもたらされたことは、大変意義深い結果と考えている。

さらに移植した同系肝細胞が生着、増殖するのみでなく、再生不全に陥ったレシピエント肝細胞の形態の正常化、増殖を認めたことも、肝再生不全に対する肝細胞移植治療の高い有用性を示唆するものであり、治療応用に向けた肝再生メカニズム解明に向けてさらに詳細な解析が必要であると考えた。

肝再生不全の治療における肝細胞移植の有用性の機序について、本実験では主に肝内の遺伝子発現について検討を行った。*Auto* モデルでは、炎症性サイトカイン/ケモカインや細胞系列マーカーの一過性の発現上昇が、生存シグナルとなり肝再生をもたらしたと考えられたが、その詳細な機序についてはさらに検討が必要である。

Allo モデルでは、FK506 が移植肝細胞の拒絶回避に有用であることが示されたが、体重減少が生じるなど、副作用の観点からは問題点も認められた。炎症抑制作用のみられた ASC との併用、免疫チェックポイント阻害剤の併用など、副作用の少ない拒絶回避のための治療法の開発が必要と考えられた。

【結論】

HSVtk/GCV モデルでの細胞移植による肝再生のメカニズム解析、拒絶回避のための治療法開発は、臨床的なアンメットニーズの解決につながるものであり、今後も同モデルを活用した研究の継続が必要と考えられた。