

平成 27 年 5 月 15 日

平成 26 年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：京都大学大学院医学研究科

職名：特定講師

氏名：祝迫 恵子

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：iPS 細胞から誘導した肝細胞に対する免疫反応についての解析
ードナー不要の肝不全治療を目指してー
2. 再生医科学研究所共同研究者： 河本 宏 教授
3. 研究期間：平成 26 年 4 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

①iPS 細胞を用いた再生・移植医療 ーNK 細胞による拒絶反応の制御ー

iPS 細胞を用いた新たな再生・移植医療では、患者自身の細胞から作製した iPS 細胞を用いるのが理想である。しかし、費用と緊急対応の観点から、細胞再生医療用 iPS 細胞ストック計画が進んでいる。ストックされるのは、HLA homo 接合体の細胞から作成された iPS 細胞である。肝移植は、慢性的なドナー不足であり、iPS 細胞を用いた再生肝臓作製に期待が寄せられている。ストックされた iPS 細胞を用いた移植は、高い職であり HLA が homo to hetero となる移植では、T 細胞だけではなく NK 細胞による拒絶反応の制御も必要であると考えられる。そこで、マウスの骨髄移植モデルを用いて、homo to hetero の移植における各種免疫抑制剤の有効性を検証した。

C57B/6 と BALB/c マウスは、MHC haplotype が各々 b, d と異なる純系マウスである。これらをかけあわせた F1 マウスは、同胞 F1 マウスからの骨髄・皮膚移植が可能だが、親の純系マウスからの骨髄・皮膚移植は拒絶される。この現象は、NK 細胞によるもので、hetero MHC の存在環境に適した F1 の NK 細胞は、homo MHC (F1 からみると片方が欠如) を持つ骨髄や皮膚が移植されると、hetero と homo の違いを認識して攻撃を

するとされる。

今回は、C57B/6 (B6)マウスをドナーとし、C57B/6 と BALB/c マウスの F1 をレシピエントとして骨髄移植を行い、作用機序の異なる 3 種類の免疫抑制剤の有効性を検討した。免疫抑制剤は、広範な免疫抑制作用を持つメチルプレドニゾロン (MP)、カルシニューリン阻害剤のシクロスポリン A (CsA)、mTOR 阻害剤のラパマイシン (Rapa)を用い、NK 細胞除去抗体である抗アシアロ GM1 抗体をポジティブコントロールとした。

免疫抑制剤投与群のうち、ラパマイシンを投与した群のみで拒絶反応が抑制された。NK 細胞による拒絶には、メチルプレドニゾロンやシクロスポリン A (CsA)は効果が認められず、ラパマイシンが有効であることが示された (図 1)。

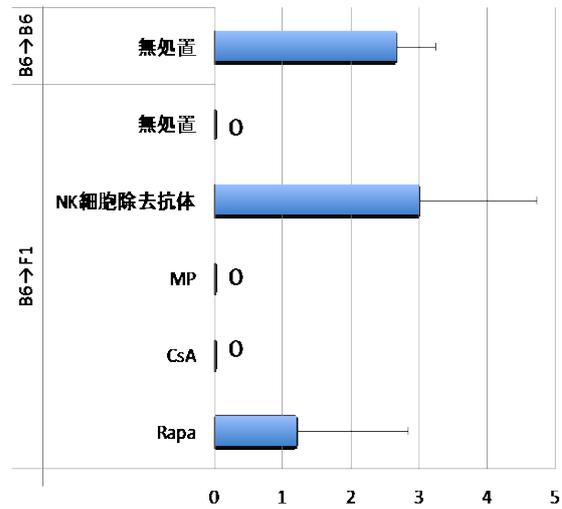


図 1 各種免疫抑制剤の効果

②肝移植ドナーに対するレシピエント由来骨髄細胞移植によるグラフトの細胞置換—拒絶反応軽減の試み—

ラット強拒絶肝移植モデル (DA to Lewis) において、術前にレシピエント骨髄細胞をドナーに移植する事で肝構成細胞を一部置換し、拒絶反応軽減を目指した。肝移植 1 週間前にドナーの DA ラットに対し、LacZ-Tg Lewis ラットの骨髄細胞を移植した。移植後 7 日目の肝組織を組織学的に観察すると Xgal 陽性細胞は類洞壁に存在し、CD68 陽性であることから、クッパー細胞であることが確認された。術前骨髄移植により肝移植後の生存期間の延長を認めた。肝移植前日にドナーに対して塩化ガドリニウムを投与してクッパー細胞を消去して肝移植をおこなったところ、生存期間の延長効果は、認められなくなった。肝移植ドナーに対する術前の骨髄細胞移植によってクッパー細胞が置換され、肝移植術後の拒絶反応が軽減する事が示された (研究成果 9)。臨床では、ドナーに骨髄移植を行うことは現実的ではないが、手術時のバックテーブルでのグラフト処置の際にドナー固有のクッパー細胞の活性化を抑制するなどの処置を行い、メカニズムについて今後さらに検討したいと考えている。

③肝構成細胞から誘導される筋線維芽細胞について —肝移植後の線維化を回避するために—

肝移植は、肝機能不全の患者を救う唯一の根本的な治療法として発展してきた。しかし、肝移植後、無症状かつ血清中の肝・胆道系酵素の上昇が認められないにも関わらず、肝生検で高度な線維化を認め、肝硬変に至る予後不良な症例が存在する。肝線維症において、細胞外マトリクスを産生する筋線維芽細胞の主たる起源は肝星細胞と考えられていたが、今回我々は、他の細胞系列からも筋線維芽細胞が誘導される可能性を報告した (研究成果 5)。

肝線維症動物モデルとして、肝細胞障害物質である四塩化炭素の反復投与モデルと、総胆管結紮による胆汁鬱滞性モデルを用いた。病理組織学的に、前者は慢性 C 型肝炎と同じように脈管域どうしを架橋する線維化が特徴的で、後者では原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎のような門脈域に優位な線維化が認められる。この病理組織像の違いに着目し、コラーゲン産生細胞を GFP でラベルするレポーターマウスを用いて、筋線維芽細胞の起源について解析したところ、四塩化炭素の反復投与では、出現した筋線維芽細胞の 8 割以上が肝星細胞に由来していた。一方、総胆管結紮では、これまで筋線維芽細胞の起源として未知であった門脈域の線維芽細胞が主体であることや、この細胞が肝星細胞とはサイトカイン等に対する反応が大きく異なることが示された。

肝線維症における筋線維芽細胞の起源として、これまでに知られていなかった門脈域の線維芽細胞が大きく寄与していることを示した。特に胆汁鬱滞を背景とする肝線維症では、肝星細胞に先行して門脈域の線維芽細胞が活性化しているため、これらの細胞を制御することが肝線維症の進展を抑制するためには非常に重要である。

現在、iPS 細胞を用いた再生肝臓作製については、谷口らが iPS 細胞から誘導した未分化な肝細胞と臍帯血由来の血管内皮幹細胞および間葉系幹細胞から肝原基を作製することに成功している。しかし、胆管系の構築のために必要な細胞系列については、まだ不明な点が多い。今回我々が同定した門脈域の線維芽細胞は、線維化という病態においては抑制したほうがよいが、iPS 細胞を用いた再生肝臓の作製において胆管系の構築に関与している可能性があり、性状解析を継続している。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

1. Tanabe K, Taura K, Koyama Y, Yamamoto G, Nishio T, Okuda Y, Nakamura K, Toriguchi K, Takemoto K, Yamanaka K, Iwaisako K, Seo S, Asagiri M, Hatano E, Uemoto S. Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice. *J Gastroenterol*. 2015 (in press)
2. Iwaisako K, Taura K, Koyama Y, Takemoto K, Asagiri M. Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. *Curr Pathobiol Rep*. 2014;2(4):209-215.
3. Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Tanaka H, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Saji S, Uemoto S, Asagiri M. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. *FEBS Open Bio*. 2014 Sep 6;4:777-87.
4. Kageyama S, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Okamura Y, Iwaisako K, Takada Y, Uemoto S. Intestinal ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia/reperfusion

injury in rats: role of heme oxygenase 1 in the second window of protection. *Liver Transpl.* 2015 Jan;21(1):112-22.

5. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Xu J, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA, Kisseleva T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Aug 12;111(32):E3297-305.
6. Jobara K, Kaido T, Hori T, Iwaisako K, Endo K, Uchida Y, Uemoto S. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. *Nutrition.* 2014 Oct;30(10):1195-207.
7. Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S. Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice. *Hepatol Res.* 2014 Jun;44(6):663-677.
8. Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatol Res.* 2014 Jun;44(6): 460–473.
9. Endo K, Hori T, Jobara K, Hata T, Tsuruyama T, Uemoto S. Pretransplant replacement of donor liver grafts with recipient Kupffer cells attenuates liver graft rejection in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 (in press)
10. Hori T, Yagi S, Okamura Y, Iida T, Ogawa K, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Hata T, Kirino I, Nagai K, Kubota T, Jobara K, Endo K, Uemoto S. How to successfully resect 70 % of the liver in pigs to model an extended hepatectomy with an insufficient remnant or liver transplantation with a small-for-size graft. *Surg Today.* 2014 Nov;44(11):2201-7.
11. Endo K, Iida T, Yagi S, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Ogawa K, Ogura Y, Mori A, Kaido T, Uemoto S. Impact of preoperative uncontrollable hepatic hydrothorax and massive ascites in adult liver transplantation. *Surg Today.* 2014 Dec;44(12):2293-9.

・学位申請

肝胆膵・移植外科 遠藤耕介 (論文9にて、2015/3/4 学位審査)