

学位論文題名

Establishment of immortalized human hepatocytes
by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT
as cell sources for liver cell-based therapy

(肝細胞治療用細胞ソースに向けた HPV16 E6/E7 及び hTERT 遺伝子
導入によるヒト不死化肝細胞株の樹立)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】肝疾患に対する究極的な治療法として肝臓移植があるが、臓器不足は深刻化している。すでに代替治療として肝細胞移植や、hybrid 型人工肝臓などの肝細胞を用いた治療法が臨床研究されているが、細胞ソースの確保が臨床応用拡大への課題となっている。人工肝臓では、ヒト初代肝細胞に代わる細胞ソースとしてヒト肝癌由来細胞やブタ肝細胞が実用化されているが、ヒト肝癌由来細胞は、肝細胞としての機能が不十分であり、ブタ肝細胞も人獣共通感染症の潜在的な危険がある。不死化ヒト肝細胞は、ヒト初代肝細胞に不死化遺伝子を導入し、ヒト初代肝細胞の性質を保持したまま継代、増殖を可能としたものであり、将来的な細胞ソースの一つとして研究が進んでいる。これまでに主に SV40T を導入した不死化ヒト肝細胞株、胎児肝細胞株の報告があるが、SV40T による不死化ヒト上皮細胞では染色体不安定性が認められており、継代、増殖を重ねることにより腫瘍化する危険性を排除できないため、臨床応用には至っていない。HPV16 E6,E7 はそれぞれ p53 経路、RB/p16 経路を抑制することにより、早期の細胞増殖停止を回避し、さらに hTERT を導入することにより crisis を回避できる。そこで、本研究はヒト肝細胞に HPV16 E6,E7 及び hTERT を導入し、成熟肝細胞の機能を保持した長期継代可能な肝細胞株の作製を目的とした。

【材料と方法】ヒト肝組織は北海道大学病院で肝切除術を行った 27 歳男性患者の切除肝の正常部分より得た。informed consent は本学倫理委員会の承認の元、術前に患者本人より得た。肝細胞は collagenase-dispase 灌流法によって分散した。遺伝子導入は lentivirus

vector を用いて行ない、得られた増殖コロニーから樹立した肝細胞株を HHE6E7T-1,-2 とした。肝細胞機能評価として ELISA 法による albumin 分泌能評価、逆転写 PCR による肝細胞特異的遺伝子発現の評価を行い、染色体安定性、腫瘍原性の有無を評価するために、染色体解析、SCID マウス皮下移植による腫瘍原性評価を行なった。また長期継代により機能低下した不死化ヒト肝細胞の生体内での再分化の可能性を評価するため acetaminophen 肝障害 SCID マウスへの脾臓内移植を行い、生存期間および移植 24 時間後の血糖値、アンモニア値を評価した。

【結果】HPV16 E6,E7、hTERT 遺伝子を導入し得られた細胞株 HHE6E7T-1,-2 は、細胞形態は上皮細胞様を維持し、200 population doublings (PDs)以上増殖し続けた。

HHE6E7T-1,-2 細胞はヒト albumin 分泌を示したが、継代が進むにつれて次第に低下し、両細胞株とも 200PDs では検出できなかった。また逆転写 PCR にて albumin、CK18、 α 1-AT、HNF-4 などの肝細胞特異的遺伝子の発現を認めたが、継代とともに発現は低下した。AFP の発現は認めなかった。染色体解析では 75PDs では染色体数の増減が認められたが、ほぼ 2 倍体を維持していた。しかし HHE6E7T-2 細胞では 150PDs で 4 倍体に近い細胞が認められた。SCID マウスへの皮下移植では 3 ヶ月間の観察で HHE6E7T-1,2 細胞ともに腫瘍原性を認めなかった。長期培養により機能低下した HHE6E7T-1,2 細胞の in vivo での再分化の可能性を検証するために acetaminophen 肝障害 SCID マウスに 200PDs 以上の長期継代した HHE6E7T-1,-2 細胞 1×10^6 個を脾臓内に移植した。1 週間の観察で Control 群が 30%生存したのに対し、HHE6E7T-1 細胞移植群では全例、HHE6E7T-2 細胞移植群では 71.4%が生存し、Control 群に対し有意に生存を改善した。同数の HHE6E7T-1 細胞の lysate を注入した場合には生存率の改善は認められなかった。また移植群では移植 24 時間後の血糖値、血清アンモニア値の有意な改善がみられた。

【考察】HHE6E7T 細胞は albumin の分泌や肝細胞特異的遺伝子の発現を示し、AFP の発現を認めなかったことから成熟肝細胞の表現形を保持していると考えられた。HPV16 E6,E7 導入細胞も SV40T 導入細胞と同様に長期継代により crisis が生じる。しかし加えて hTERT を導入した細胞では染色体不安定性が少ないと報告されている。HHE6E7T 細胞も crisis を回避することには成功したが、染色体変異の蓄積を認めた。しかし腫瘍原性は認めなかった。さらに 200PDs 以上の長期培養により in vitro では肝細胞機能の著しく低下した細胞を acetaminophen 肝障害マウスに脾臓内移植することによりレスキューすることに成功した。lysate ではレスキューできず、移植 24 時間後の移植マウスで血糖値、血清アンモニア値の改善が認められたことから、移植した細胞が生体内で再分化し糖新生やアンモニア代謝などの肝細胞機能を補助している可能性が示唆された。

【結論】本研究では、HPV16 E6、E7、hTERT の導入により成熟肝細胞の表現形を保持した不死化ヒト肝細胞株の樹立に成功した。さらに急性肝不全 SCID マウスへの脾臓内移植により肝細胞移植ソースとしての可能性を示した。しかし今後の不死化ヒト肝細胞の臨床応用には、より染色体安定性の高い不死化方法の開発が不可欠である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as cell sources for liver cell-based therapy

(肝細胞治療用細胞ソースに向けた HPV16 E6/E7 及び hTERT 遺伝子
導入によるヒト不死化肝細胞株の樹立)

肝疾患に対する究極的な治療法として肝臓移植があるが臓器不足は深刻化しており、代替治療として肝細胞移植などの肝細胞を用いた治療法が研究されているが、細胞ソースの確保が課題である。不死化ヒト肝細胞は、初代肝細胞に不死化遺伝子を導入し、初代肝細胞の性質を保持したまま継代を可能としたものであり、将来的な細胞ソースの一つとして研究が進んでいる。HPV16 E6,E7 はそれぞれ p53 経路、RB/p16 経路を抑制することにより、早期の細胞増殖停止を回避し、さらに hTERT を導入することにより crisis を回避できる。そこで、本研究はヒト肝細胞に HPV16 E6/E7 及び hTERT を導入し、成熟肝細胞の機能を保持した長期継代可能な肝細胞株の作製を目的とした。本学倫理委員会の承認の元、肝切除術を行った男性患者の切除肝正常部分より肝細胞を分散し、遺伝子導入した。樹立した細胞株 HHE6E7T-1,-2 は、200 population doublings (PDs)以上増殖し続けた。細胞のヒト albumin 分泌及び肝細胞特異的遺伝子の発現を確認し、成熟肝細胞の性質を保持していると考えられたが、継代が進むにつれて次第に低下した。染色体解析では継代数の増加とともに染色体異常の増加が認められたが、腫瘍原性は認めなかった。また、長期培養により機能低下した HHE6E7T-1,-2 細胞の生体内での再分化の可能性を検証するため acetaminophen 肝障害 SCID マウスに 200PDs 以上継代した細胞を脾臓内移植したところ、Control 群に対し有意に生存を改善した。また移植群では血糖値、血清アンモニア

値の有意な改善がみられた。この結果より移植した細胞が生体内で再分化し糖新生やアンモニア代謝などの肝細胞機能を補助している可能性が示唆された。しかし今後の不死化ヒト肝細胞の臨床応用には、より染色体安定性の高い不死化方法の開発が不可欠である。

公開発表後、まず副査の三浪教授より①臨床応用に対して腫瘍原性を排除する必要があるがどう考えるのか、②脱分化した不死化肝細胞が生体内で機能を取り戻す機序、③自己肝細胞を使って移植までの時間を延ばすなどの応用が可能か、との質問があった。①に対し、HPV16 E6/E7 導入細胞は従来の不死化方法よりも腫瘍原性が低く、実験結果でも腫瘍形成は認められなかったが、染色体不安定性があることから腫瘍原性獲得の可能性を完全に排除できないため、臨床応用にはさらなる改良が必要と回答した。②に対しては、移植後に不死化肝細胞が暴露される、急性肝不全マウス血中の液性因子、他の細胞との細胞間相互作用、細胞外マトリックスなどが関係していると思われると回答、③に対しては慢性肝疾患においては自己肝細胞から不死化肝細胞を樹立し、免疫抑制のいらぬ肝細胞移植治療により移植までの期間の延長もしくは回避を目標としているとの回答があった。次に主査の浅香教授より、移植後長期間たつと発癌する可能性があることと、機能低下していくことをどう考えるかとの質問があった。これに対して発癌性を抑えるために不死化遺伝子を導入後に不活化する技術が開発されており、将来的な解決が可能と考えていることと、機能低下には培養環境による遺伝子発現の変化と染色体変異の蓄積によるものがあり、前者に関しては生体内で回復できる可能性を示した実験結果だと考えるとの説明があった。浅香教授からは現在のところ急性肝不全をレスキューするための短期間のサポートとしては実用可能性があるとのコメントをいただいた。また ES 細胞や iPS 細胞由来の肝細胞と比較してどうかとの質問があり、細胞ソースとしての評価は機能、安全性、コストを考える必要があるが、安全性に関してはまだ ES, iPS 由来細胞も完全ではなく、培養コストは不死化細胞のほうが安価で有利と考えると回答した。最後に副査の藤堂教授より、移植細胞ソースとしてよりも有用物質の産生を目指したほうが実用化は早いと考えるが、不死化肝細胞の培養環境下での機能低下を防ぐためにはどのような方法が考えられるかとの質問があった。これに対し、染色体不安定性を防ぐことが機能維持にも繋がるため、現在ウイルス由来遺伝子を用いない不死化法を研究中であること、細胞外基質、三次元培養などにより遺伝子発現パターンを生体内に近い状態に維持することを検討中との回答があった。

いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当に回答した。不死化ヒト肝細胞の肝細胞治療用細胞ソースの一つとしての可能性を示し、将来的な臨床応用への課題を含め、重要な

知見を示した。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受け取るのに十分な資格を有するものと判定した。