

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19863

研究課題名(和文) 創薬研究基盤の確立を目指した新規立体培養法によるiPS細胞由来肝組織の創出

研究課題名(英文) Creation of hepatic tissue containing Human Induced Pluripotent Stem Cells derived hepatocyte like cells

研究代表者

高木 知聡 (Takagi, Chisato)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10626708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPS細胞)より成熟肝細胞への分化誘導をより高い精度で行う手法として、間葉系幹細胞を利用した分化誘導法と脱細胞化肝骨格を利用した立体的な細胞の分化誘導法の確立を模索した。間葉系幹細胞や肝細胞骨格を用いてiPS細胞から肝細胞への分化誘導を行い得られた細胞は、成熟した肝細胞機能を有した細胞を得ることができたが、成熟肝細胞に比較するとまだ機能的には未熟であり、臨床応用にはさらなる技術革新を要する。

研究成果の概要(英文)：To obtain more mature iPS induced hepatocyte like cells, we investigated a novel protocol by using mesenchymal stem cells and decellularized liver matrix. Mesenchymal stem cells and decellularized liver matrix could enhance the hepatic function of human iPSC-derived hepatocyte-like cells. However, these cells have immature function compared to primary hepatocyte. More technological innovations are needed to clinical application.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：iPS細胞 間葉系幹細胞 脱細胞化肝骨格 肝細胞

### 1. 研究開始当初の背景

新規医薬品の開発には莫大な費用を要する。一般に1つの医薬品を市場に出すためには、1000億円以上の費用を要するという試算が報告されている(DiMasi JA et al. The price of innovation: new estimates of drug development costs. J Health Econ, 2003)。また、日本でわずか年間500、米国で年間2000程度の治験まで辿りついた数少ない開発の中でさえ医薬品として採用されるのは8%に満たず、ほとんどの薬剤が開発の段階で中止されている。その理由の多くは、薬効が得られないもしくは毒性があり安全性に問題を認めた例であり、近年、幹細胞を含めた生物学的製剤の開発の増加に伴い、開発にかかる費用は一層増加することが予想されている。従って今後の創薬開発には、より早期の段階において医薬品の効果・安全性を評価するためのスクリーニング機構を確立することが、創薬産業の加速と費用抑制の実現化に必須である。通常、新規医薬品候補の臨床応用へ向けた前段階において、ヒト成熟細胞での毒性・代謝活性試験を行うことが早期に薬効を確認、もしくは危険性を検出する上でのゴールドスタンダードとされている。しかしながらヒト成熟肝細胞を得ることは容易ではなく、また体外での増殖が困難であることから、限られた新規医薬品候補に対してのみ適応されているのが現状である。さらに、一般的に入手される凍結肝細胞は本来の肝細胞よりも格段に機能が落ちること、ロット間格差が生まれやすいことが、スクリーニング機能と代謝活性評価における定型的システムとしての困難性を助長している。

このような課題を解決する手段として近年 iPS 細胞に注目が集まっている。iPS 由来肝細胞であれば、大量の細胞入手が比較的容易となる可能性や、ロット間格差を最小化し得ること、良好な費用対効果を将来実現できるに大きな期待が寄せられている。しかしながら、ヒト iPS 由来肝細胞は未だ創薬評価に十分な代謝活性を持っているとは言いがたく、新しい分化誘導法や成熟工程の開発が待たれている。

これに対して我々のグループは、間葉系幹細胞の持つ細胞機能補助効果に着目し、肝細胞機能維持、特に CYP450 活性の向上に寄与することを示してきた。(Yagi H et al. Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure. Tissue Engineering 2009)。また最近になり、iPS 細胞由来肝前駆細胞と間葉系幹細胞および血管内皮細胞との直接共培養が肝原基の創出に大変重要な役割を担うことが示されてきている(Takebe T, Nature 2013)、従って間葉系幹細胞は十分な代謝活性を持つ成熟肝細胞の創出に非常に大きな役割を果たすと考えられる。

一方で、生体内では複雑な立体構造内で存在する肝細胞は、体外においても3次元培養

下で明らかにその機能を向上させることが知られている。またその素材として細胞外マトリックスの果たす役割が非常に大きいことが示されている(Soto-Gutierrez, Yagi H, et al. Cell Transplantation 2010)。更に我々のグループはこの立体構造と3次元循環培養法を最適化する新たな技術「脱細胞化臓器骨格」を用いて、ラット肝臓を用いた細胞外マトリックス骨格内で肝細胞を生着させ循環培養化に機能解析を行う新たな体外培養システムを確立した。(Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. Nature Medicine, 2010)。この技術の大きな特徴は細胞をすべて除去して作製した半透明なスキャフォールドの中に生体に本来あるべき3次元立体構造が保持され、細胞成熟・再生に必要な微細構造を保つ点である。更に生体由来の細胞外マトリックスにはラミニンやフィブロネクチンなどの接着因子と分化誘導促進因子が残存しており、本システムを用いた体外培養法が肝細胞の分化・誘導に強く寄与すると考えられる。

上記に示す様に、間葉系幹細胞の肝細胞機能補助効果と脱細胞化3次元マトリックス構造の利点を生かし、高いCYP活性を持つ機能的な肝細胞から肝組織様構造を創出することで、ロット間格差が少なく、安定した供給が可能な創薬開発基盤技術の確立が可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究はドラッグスクリーニングに用いるための十分な薬物代謝能を有した成熟肝細胞を、ヒト iPS 細胞から分化誘導する有効な手法を構築するため、間葉系幹細胞を用いた独自の共培養方法と、脱細胞化肝臓骨格を用いた新しい立体培養法を確立し、一塊の肝近似組織を作製することを目的とする。我々がこれまで示してきた間葉系幹細胞の肝細胞機能補助効果と脱細胞化3次元骨格の利点を生かし、高いCYP活性を持つ機能的な肝細胞を用いた組織上構造を創出することで、ロット間格差が少なく、安定した供給が可能な創薬開発基盤技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト間葉系幹細胞を用いた機能的肝細胞の分化誘導法の確立

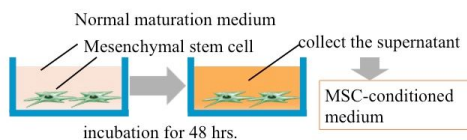
iPS 由来肝細胞の分化誘導として、本研究では複数のヒト iPS 細胞株から、肝分化誘導を行った際に最もアルブミン産生能が高いとされる株の一つとして示されている 201B6 を用いた(Kajiwara M, PNAS 2012)。ただし、後述するように、安定した数の細胞を継続的に細胞を得ることが困難であったため、既存の細胞として製品化された iPS 由来肝前駆細胞を使用して次の実験に繋がった。

iPS 由来肝細胞への分化誘導過程における間葉系幹細胞の導入として、本実験では、iPS 由来肝前駆細胞から iPS 由来肝細胞へ成熟化させる過程で用いる培養液に、MSC が分泌するタンパク質を混在させた培養液（調整培地）を作成し、この調整培地で iPS 由来肝前駆細胞を iPS 由来肝細胞へ成熟化させた（図 1）。調整培地によって得られた iPS 由来肝細胞と標準的な培地によって得られた iPS 由来肝細胞を以下の様に評価した（図 2）。位相差顕微鏡による細胞の形態的評価、MTT 試験を用いた細胞数評価、肝細胞分化の過程で発現されるとされるマーカーを用いた免疫染色による陽性細胞数の比較、培地上に分泌されたアルブミン、尿素の濃度測定、薬剤代謝活性評価を目的とした CYP3A4, CYP1A2 の活性評価。肝分化マーカーと肝機能評価に関連した遺伝子発現量を定量評価比較するためのリアルタイム PCR を測定した。さらに、正常肝細胞との比較として、正常肝細胞を培養した上でのアルブミン濃度、CYP 活性も評価した。

(図 1)

### 調整培地の作成法

調整培地“MSC-conditioned medium(MSC-CM)”の作成



- ヒト骨髓より抽出された間葉系幹細胞(MSC)を使用
- 供与されたiPS細胞を成熟させるために用いる培地にて、MSCを培養。
- 48時間培養後に上清を採取

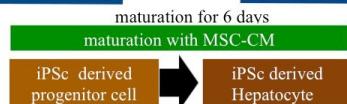
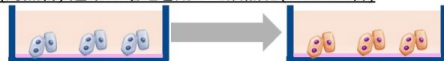
(図 2)

### 培養方法 ～間接共培養～

(介入群) 作成したMSC-CMの培地を用いて成熟化(MSC-CM群)”



(対照群) 通常の培地を用いて成熟化(Medium群)”



(2) 脱細胞化肝を用いた 3 次元培養下での機能的肝細胞の分化誘導法の確立と薬剤代謝機能の評価

生体由来細胞外マトリックス骨格の作成

脱細胞化肝臓は以下のごとく定型化した工程で作成した。ラットより摘出した肝臓にトリプシンを還流させ細胞融解を起こし、さらに界面活性剤を還流させることで細胞を洗い流し脱細胞化を完了させた。

均一な質を持った再細胞化肝組織様構造の作製

脱細胞化骨格内に、iPS 由来肝細胞様細胞を経門脈的に充填した後、培養液を門脈経路で持続的に還流することで循環培養を行なった。正常肝組織と比較して代謝酵素発現・肝細胞機能解析を行い、肝組織としての成熟度を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 新たな iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導法の確立

ヒト間葉系幹細胞(MSC)を用いた機能的肝細胞の分化誘導法の確立について研究を進めた。当初は iPS 由来肝細胞の分化誘導を安定化した上で分化誘導過程における MSC の導入を行う予定であったが、iPS 細胞由来の肝細胞の作成することはできたものの、より安定した分化誘導を行うためにはまだ至らなかった。そのため、既存の細胞として製品化されて iPS 由来肝前駆細胞を使用した。これにより、細胞の質の均一化を図ることができた。また、MSC を導入する方法について、MSC が分泌したタンパク質を含有する培地(調整培地)を使用することとした。iPS 由来肝前駆細胞から iPS 由来肝細胞への成熟化の過程において、MSC 調整培地を用いて成熟化した iPS 由来肝細胞を、通常の方法にて成熟化した iPS 由来肝細胞の機能を比較した。結果、間葉系幹細胞を利用した調整培地を用いて成熟化した細胞は通常の方法で成熟化した iPS 由来肝細胞と比較して、高いアルブミン産生、尿素産生、CYP3A4 活性を示した。また免疫染色においても、未分化マーカーである Oct3 陽性細胞数が減少、肝前駆マーカーである AFP 陽性細胞数の増加、肝成熟マーカーである ALB 陽性細胞数の増加を認めることができた。さらに、リアルタイム PCR を行なった結果、薬剤代謝活性に関わる一部の CYP 遺伝子の発現量が増加していることがわかった。一部の機能的評価に留まるものの、MSC が分泌するタンパク質が肝機能の向上に寄与した可能性が示唆された。

さらなる評価として、培養されている細胞数自体に差が生じていないか検証を行う必要があった。具体的には、肉眼的な成熟細胞数の評価と、MTT 試験を用いた評価と目視による成熟細胞数の測定を行い、調整培地で成熟化を行なった場合においても細胞数自体の増減が認めなかったことがわかった。よって、調整培地は細胞数の数自体を増加させるわけではなく、細胞の機能もしくは分化効率に寄与している可能性が示された。

また、調整培地のどの因子が肝成熟化に寄与するかの機序を明らかにするために、培地中に含まれている物質の評価を行った。実験期間の関係もあり網羅的な検索はできなかったが、肝分化過程の一部に必要な BMP4 がより高い濃度で含まれていることがわかった。

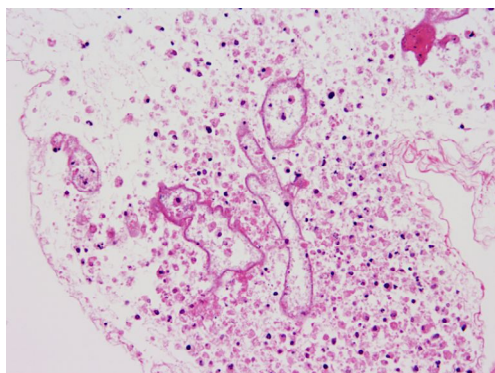
加えて、成熟肝細胞をポジティブコントロールとして、アルブミン産生量、CYP 活性を測定したところ、iPS 由来肝細胞よりもはるかに高いアルブミン濃度と CYP 活性であった。

以上これら事柄より、MSC が分泌する物質を含有した調整培地は iPS 細胞の肝分化において有用であると考えられたが、肝細胞としての機能はまだ成熟肝細胞に比較すると劣っており、実用化に向けてはさらなる技術革新を要すると考えた。

## (2) 脱細胞化肝の作成と、iPS 由来肝細胞の導入

脱細胞化肝を用いた3次元培養下での機能的肝細胞の分化誘導を行なった。具体的にはラットより門脈、肝静脈を保持したまま全肝の摘出を行なった。系門脈的にトリプシンを還流し細胞融解を起こし、さらに界面活性剤を還流して肝組織内に含まれている細胞を洗い流しラット肝臓の脱細胞化を完了した。脱細胞化した肝臓に iPS 由来肝前駆細胞を経門脈的に注入したのちに、iPS 由来肝前駆細胞を iPS 由来成熟肝細胞へ成熟化させる培養液を用いて系門脈的に還流させ、iPS 由来肝前駆細胞を脱細胞化したラット肝臓内で培養かつ成熟化させた。細胞注入し循環培養させた肝臓を組織学的に評価した結果、門脈外への注入した細胞が存在していることが確認され、もともとの肝細胞が存在していた部位への細胞の生着を確認できた(図3)。さらに、循環培養した肝組織から RNA を抽出し CYP の発現をリアルタイム定量 PCR した結果、CYP3A4, CYP2W1 の発現がみられ、もともとの細胞で測定した発現量よりも高発現であった。以上より、さらなる検証を要するものの、iPS 由来肝前駆細胞を脱細胞化した肝組織内で循環培養することができ、さらに細胞の成熟化を確認することができた。

(図3：脱細胞化肝臓への細胞注入後)



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Chisato Takagi, Hiroshi Yagi, Makiko Hieda, Kazuki Tajima, Taizo Hibi, Yuta Abe, Minoru Kitago, Masahiro Shinoda, Osamu Itano, Yuko Kitagawa. Mesenchymal Stem Cells Contribute to Hepatic Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *European Surgical Research* (査読有) 2017;58:27 DOI: 10.1159/000448516

〔学会発表〕(計 3 件)

Chisato Takagi, MESENCHYMAL STEM CELLS CONTRIBUTE TO HEPATIC MATURATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. ISSCR(International society of stem cell reserch) 2015 annual meeting

高木 知聡, iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝臓器再生の試み 第 27 回 日本肝胆膵外科学会(2015 年)

高木 知聡, 間葉系幹細胞はより成熟した iPS 細胞由来肝細胞への分化誘導を可能にする 第 23 回 日本消化器関連学会週間(2015 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高木知聡 (Takagi Chisato)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  
研究者番号: 10626708