

令和元年6月18日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05405

研究課題名(和文) 肝疾患モデルブタを用いたiPS肝臓原基移植による新規治療法の開発

研究課題名(英文) development of safe transplantation method of human iPS cell derived liver organoid through portal vein in pig model

研究代表者

村田 聡一郎 (Murata, Soichiro)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40436275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓領域を中心としたオルガノイド研究が盛んに行われており、移植による新規治療法開発が期待されている。これまで肝細胞を経門脈的に移植する臨床試験が世界各国で報告されているが、オルガノイドを経門脈的に移植した報告は見られない。そこで今回ブタを用いて経門脈的に胎仔肝細胞由来肝オルガノイドおよびヒトiPS細胞由来肝オルガノイドの移植を行い、安全性検討を行った。移植による門脈圧上昇は一過性で全頭安全に移植を施行できた。肺、脳等の他臓器には組織移行は見られなかった。肝オルガノイドの経門脈移植は安全に施行可能であり、今後臨床試験を目指した開発を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝オルガノイドの経門脈移植の安全性を確立することはiPS細胞治療のみならず、今後の幹細胞を用いた再生医療にとって必要な基礎的データとなる。幹細胞移植による他臓器への細胞の迷入は大きな課題であり、肝芽移植によって迷入がなくなることが本研究で実証でき、再生医療の安全性の確保に繋がると考えられる。本研究成果は肝臓のみならず、他の臓器への経血管的なオルガノイド移植の安全性を示唆すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The organoid study around the liver domain is conducted flourishingly, and new cure development by the transplant is expected. A clinical trial to transplant hepatocytes through portal vein is reported in all the countries of the world, but the report that transplantation of organoids through portal vein is not seen until now. Therefore in this study, we use a new born pig model and transplanted liver organoid derived from embryo hepatocytes and the liver organoid derived from human induced pluripotent stem cells through portal vein and examined safety. The upswing in portal vein pressure by the transplant was transient, and all head security was able to enforce transplant. The organoid translocation was not seen in an other organs, such as, the lungs, heart, and brain. The organoid transplantation through portal vein is a safe method, and will perform the development that aimed at the clinical trial in near future.

研究分野：外科学、再生医学

キーワード：オルガノイド 移植 門脈 他臓器移行

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

末期臓器不全症に対しては、臓器移植による臓器置換が極めて有効な治療法として実施されている。しかしながら、年々増大する臓器移植のニーズに対し、ドナー臓器の供給は絶対的に不足している。したがって、臓器移植に代わる治療法の開発は、多くの患者救済のために必須である。また、臓器不全症に対する待機的治療には莫大なコストを要することから、医療経済学的観点からもその開発ニーズが非常に高まっている。

肝臓の代謝異常症は肝臓内の1種類の酵素が欠損して起きる疾患で、銅の代謝異常であるWilson病や全身にアミロイドが蓄積する家族性アミロイド多発神経症、尿素サイクル異常症などがある。中でも尿素サイクル異常症は有病率が8,000人に1人の疾患群であり、新生児から乳幼児期に発症することが多い。OTC欠損症、CPS1(カルバモイルリン酸合成酵素I)欠損症などがあり、アンモニアを尿素に変換することができないため、アンモニアの蓄積による神経障害を引き起こす。これらの疾患の治療法は究極的には肝移植であるが、生後半年までは安全に肝移植を行えないため、タンパク質制限や薬物で保存的に治療する。しかし、発作的なアンモニア上昇が不可逆的な神経障害を引き起こすこともあり、新生児期から乳児期に肝移植に代替可能な治療法が特に求められている。

尿素サイクル異常症を治療する基礎的な研究として遺伝子治療が検討されてきたが、これまでの所実用化する目処は全く立っていないのが現状である。肝移植を行えない新生児から乳児期に肝細胞移植を行う臨床試験の報告例は全世界で20例程度あり、一定の成果を挙げているが、肝移植のドナーが少ないのと同様に肝細胞のドナーも少ないのが現状である。研究代表者らはヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞の3種類を混合して革新的な三次元培養を行うことにより、正常な肝臓構造に近いiPS肝臓原基(肝芽)の開発に成功した(Takebe T, Taniguchi H, Nature 2013)。iPS肝芽を免疫不全マウスに移植することにより、ヒト血管網を有した機能的なヒト肝臓が構築され、肝不全を改善した。iPS肝芽の移植はこれまで異所を中心に行ってきたが、胆汁の排泄経路を考えるとiPS肝芽の移植先は同所がより好ましいと考えられた。

2. 研究の目的

我々は胎児期の肝臓の発生過程を模倣してヒトiPS細胞由来肝細胞、血管内皮細胞、ヒト間葉系幹細胞を3次元培養したヒトiPSC肝オルガノイドを作製し、これを大量に製造して移植することで肝疾患を治療することを目指している。ブタは前臨床のモデルとして人間と同じ手技による治療法の検証を行うことが可能である。本研究ではブタ胎仔から作製した肝オルガノイドを門脈より同所性に移植し、移植の安全性と有効性を検討することを目的とする。さらにブタ胎仔由来肝オルガノイドでの安全性を確認後、ヒトiPSC肝オルガノイドをブタに同所移植して安全性を検討する。

3. 研究の方法

①ブタ肝疾患モデル治療のための免疫抑制剤の選択:新生仔ブタにFK506およびMMFを経口で1週間投与し、トラフ値を測定する。

②ブタ肝芽移植による経門脈的移植の安全性確認:

クサビラオレンジを全身に発現するブタの胎仔肝組織より肝芽を作製し、クサビラオレンジ陰性のブタの門脈左枝に選択的に肝芽を移植する。

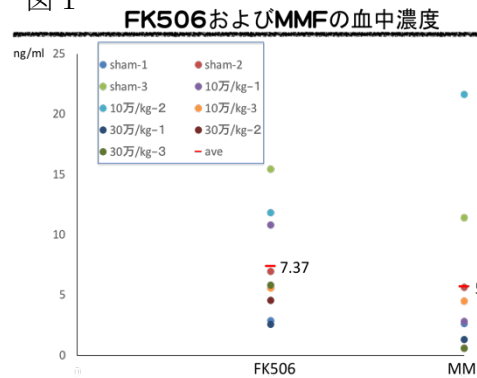
③ヒトiPSC肝芽移植による経門脈的移植の安全性確認:ヒトiPS細胞を内胚葉細胞、血管内皮細胞

胞、間葉系細胞に分化誘導させ、3次元混合培養を行うことによりヒトiPSC肝芽を作製する。前年度のブタ胎仔由来肝オルガノイドの安全性の検討から、ブタの門脈内に移植可能な肝芽数が試算できている。今年度はヒトiPSC肝オルガノイドをブタの門脈内に移植し、門脈圧変化、体内動態を検討する。組織学的解析も合わせて行い、ヒトiPSC肝オルガノイドの経門脈移植の安全性を評価する。

4. 研究成果

①ブタ肝疾患モデル治療のための免疫抑制剤の選択：健康の新生仔ブタの肝臓にブタ胎仔肝組織由来肝芽を生着させるための免疫抑制剤の選択を行った。その結果、FK506およびMMFを併用して経口投与することによって安定した血中濃度が維持されることが明らかとなった（図1）。

図1



②ブタ肝オルガノイド移植による経門脈的移植の安全性確認：

クサビラオレンジを全身に発現するブタの胎仔肝組織より肝オルガノイドを作製し、クサビラオレンジ陰性のブタの門脈左枝に選択的に肝芽を移植した（図2）。ブタ体重当たり10万個/kg~90万個/kgの肝オルガノイドを移植したところ門脈左枝圧の上昇が認められた。門脈本幹圧は移植直後は有意に上昇したが、移植1週間後は変化が見られなかった（図3）。移植施行したブタは全例生存し、肝組織の広範な壊死や門脈塞栓などの合併症は認められなかった。移植後1週間の肝機能変化を経時的に追跡したが、肝オルガノイド移植に伴う明かな肝機能の増悪は認められなかった。これらのことから肝芽の経門脈的移植は安全に実施可能な手技であることが示唆された。

図2

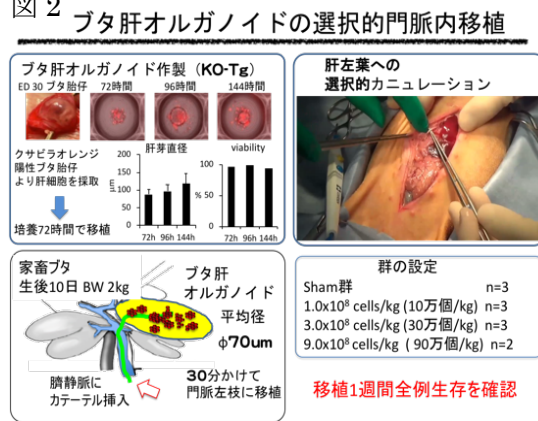
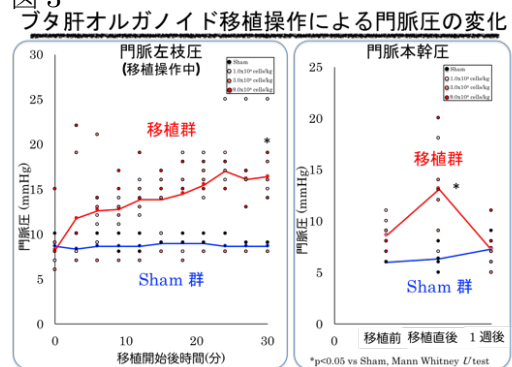
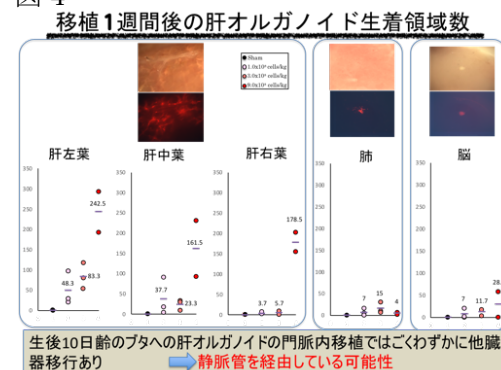


図3



移植 1 週間後の肝オルガノイドの生着領域数を肝臓、肺、脳に関して検討したところ、肝左葉への生着が最も多く、中葉、右葉にもわずかに認められた。90 万個/kg の肝芽移植群においてわずかに肺、脳への移行が見られた（図4）。胎仔期に開存している静脈管を経由して肝オルガノイドが他臓器移行している可能性が示唆された。

図4



③ヒトiPSC肝芽移植による経門脈的移植の安全性確認

ブタ胎仔由来肝オルガノイドの安全性の検討から、新生仔ブタの麻酔法、周術期管理、ブタ胎仔由来肝芽の作製法、臍静脈を經由して肝臓の特定の部位へ移植する手法が確立できた。さらにヒトiPSC肝芽の安全性検討を行った。ヒトiPSC細胞から内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞に分化誘導させ、3次元混合培養を行うことによりヒトiPSC肝芽を作製した(図5)。

前年度のブタ胎仔由来肝芽で安全性が確認された移植方法に従い、臍静脈を經由して肝左葉の門脈内にヒトiPSC肝芽を移植した。移植個数は 1×10^8 個肝内胚葉細胞/個体とした(図5)。

新生仔ブタにおいては門脈臍部と下大静脈の間に静脈管の開存が見られることがあり、静脈管を結紮せずに移植したところ一部組織の肺への移行が観察された(図6)。そのため静脈管を外科的に結紮する実験群を設定した(n=3)。ヒトiPSC肝芽移植中の門脈分枝および門脈本幹の門脈圧変化を検討したところ、静脈管開存例および静脈管結紮例のいずれも有意な門脈圧上昇は見られなかった。ヒトiPSC肝芽移植後の体内動態をヒトAlu配列のPCRおよび免疫染色にて検討したところ、静脈管結紮例においては肝臓以外の肺、心臓、脳、腎臓、脾臓等の臓器にヒト細胞の検出は認められなかった(図6)。このことから、ヒトiPSC肝芽の門脈内移植は他臓器移行の抑制効果という観点で安全な手技であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

1. 村田 聡一郎 iPS細胞を用いた三次元組織作製のための基盤技術開発と臓器再生への応用 第52回日本移植学会 2016年9月29日 東京
2. 村田 聡一郎 Generation of functional human organ from induced pluripotent stem cell (iPS cell) 第71回日本消化器外科学会 2016年7月14日 徳島
3. 村田 聡一郎 ヒト iPS 細胞を用いた肝芽 (liver bud) の作製 第44回日本臓器保存生物医学会 2017年11月10日 大阪
4. Soichiro Murata, Satoshi Okamoto, Keisuke Skine, Yasuharu Ueno, Tomomi Tadokoro, Hideki Taniguchi Therapeutic effect of human induced Pluripotent Stem cell derived liver buds in an immunodeficient liver fibrosis animals 28th APASL, 2019年2月20日 マニラ
5. 村田 聡一郎, 土田 倫範, 松成 ひとみ, 中野 和明, 絵野沢 伸, 福田 晃也, 長嶋 比呂志, 谷口 英樹 ブタを用いた肝オルガノイドの門脈内移植の安全性の検討 第18回日本再生医療学会 2019年3月21日 神戸

図5 ヒトiPSC細胞由来肝オルガノイドの選択的門脈内移植

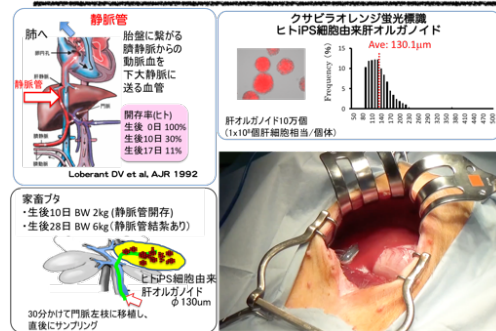
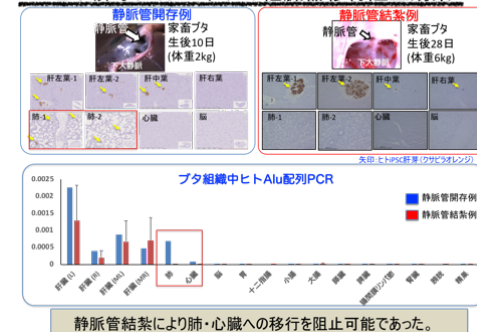


図6 ヒト肝オルガノイドの他臓器移行抑制効果



6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名：村田 聡一郎

ローマ字氏名：Soichiro Murata

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40436275

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：武部 貴則

ローマ字氏名：Takanori Takebe

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：先端医科学研究センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：20612625

研究分担者氏名：長嶋 比呂志

ローマ字氏名：Hiroshi Nagashima

所属研究機関名：明治大学

部局名：農学部

職名：専任教授

研究者番号（8桁）：50318664

研究分担者氏名：谷口 英樹

ローマ字氏名：Hideki Taniguchi

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70292555

研究分担者氏名：絵野沢 伸

ローマ字氏名：Hideki Taniguchi

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名：先端医療開発室

職名：研究員

研究者番号（8桁）：40232962

※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。