

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15596

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝臓原基移植による新しい肝硬変治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for liver cirrhosis using human iPS cells

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変に対する肝移植に代わる新規治療法の開発が求められている。我々はヒトiPS細胞から分化誘導した内胚葉細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞を用いてヒトiPSC肝芽の開発を行っている。本研究ではヒトiPSC肝芽を用いた肝線維化モデル動物の治療効果を検討し、ヒトiPS細胞を用いた画期的な肝硬変治療を開発することを目的とする。まず、ヒトiPSC肝芽に近い胎仔肝組織を肝硬変モデルに移植したところ、生存率が著明に改善し、移植によりレシピエント肝臓の線維化が改善した。次にヒトiPS細胞由来肝芽による肝硬変治療効果の検討を行ったところ、ヒト組織の生着と生存率の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：Organ shortage urges us to develop new therapy without using liver transplantation for curing liver cirrhosis. We create human iPSC derived liver buds mimicking liver organogenesis in the embryo. In this study, we tried to develop new treatment method for liver cirrhosis using human iPSC derived liver buds. At first, we developed rat liver cirrhosis model using DMN. Then, we transplanted fetal liver instead of human iPSC liver buds into the liver cirrhosis model. By transplanting fetal liver, survival rate, liver function, and liver fibrosis of the host liver were improved. Then, we transplanted human iPS liver bud into the immunodeficient liver cirrhosis model. The human iPSC derived tissue was attached in the host liver. Survival rate, some of the liver function and liver fibrosis of the host liver were improved, but the effect was weaker comparing to the fetal liver. By these results, we will improve the quality of the human iPSC liver buds for clinical trial.

研究分野：再生医学、外科学

キーワード：移植・再生医療 肝臓 肝硬変 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

わが国には約400万人の肝炎患者がいると推定されており、そのうち約33万人が慢性肝炎、約11万人が肝硬変や肝癌を発症している。近年抗ウイルス治療の進歩は目覚ましく、特にC型肝炎に関しては70%以上の患者でウイルスの完全排除が可能になってきた。その一方で、肝硬変まで進行した患者の治療法は極めて限定されており、その根本的な治療法は肝移植のみである。しかし、ドナー数の絶対的な不足は解決されていない。肝硬変に対して肝移植に代替する肝臓置換療法を実現するためには、従来よりもさらに機能性が高く、かつ肝硬変の肝臓に生着して正常組織に置換する可能性のある高性能の幹細胞の移植によって、効率のよい肝再生および抗線維化治療法の開発が達成される必要がある。我々はヒトiPSC細胞から肝内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞を分化誘導し、これを混合培養して胎児期の肝臓に類似したヒトiPSC肝芽の作成に成功している。

2. 研究の目的

ヒトiPSC肝芽を用いて肝線維化モデルの線維溶解作用および肝再生促進作用を検討する。

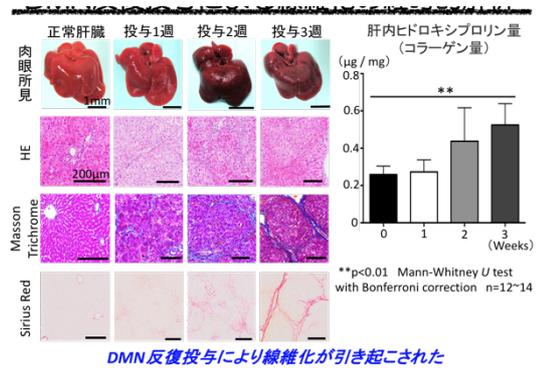
3. 研究の方法

免疫不全ラット肝硬変モデル作成

野生型ラットおよびIl2rg欠損の免疫不全ラットにジメチルニトロサミン(DMN)を3週間投与することにより著明な肝線維化が再現性をもって引き起こされた。DMN投与週毎にsirius red染色で表される肝組織の線維化が亢進しており、肝組織のコラーゲンを定量した肝内ヒドロキシプロリンの定量的評価によっても同様の結果が得られた。以後ラットにDMNを反復投与したモデルを用いて検討を行った(図1)。

図1 DMN反復投与による線維化の経時的

解析



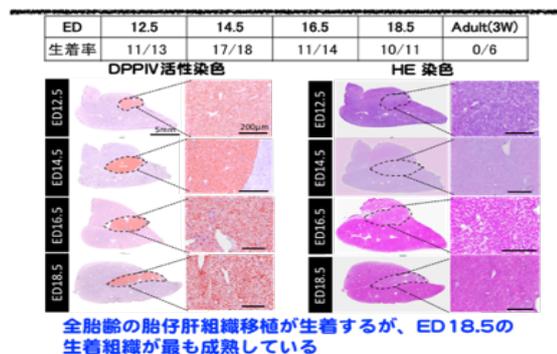
ラット胎仔およびヒトiPSC肝芽移植

ラット肝硬変モデルに対して肝左葉と中葉の間に胎仔肝組織またはヒトiPSC肝芽を挟み込んで移植する移植法を開発し、生着組織の解析と胎児肝臓組織移植による治療効果を検討した。

4. 研究成果

移植する胎仔肝組織の胎齢をED12.5, ED14.5, ED16.5, ED18.5および若年ラット(3週齢)の各段階に設定した。その結果胎齢12.5~18.5の胎仔肝組織はそれぞれ11/13(84.6%), 17/18(94.4%), 11/14(78.6%), 10/11(90.9%)と良好な生着を得た。一方成体の肝組織を移植しても生着しなかった(0/6(0%))。生着組織を観察すると胎齢18.5の組織が宿主肝臓に近く、成熟した組織となっていることが示唆された(図2)。

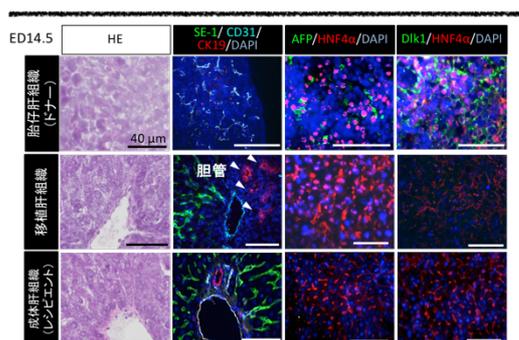
図2 各胎齢の胎仔肝組織の生着状況



ED14.5の胎仔肝組織を移植した群において免疫組織学的検討を行った。胎仔肝組織で

はAFPやDlk1などの未分化な肝細胞マーカーが発現しているが、移植3週目にはそれらの未分化マーカーは消失していた。一方、類洞内皮細胞を表すSE-1、胆管を表すCK19などは胎仔肝臓では明らかな発現はないが移植3週経過するとホスト肝臓と同程度に発現していた。これらのことより、胎仔肝組織を移植することで組織の成熟化が見られる

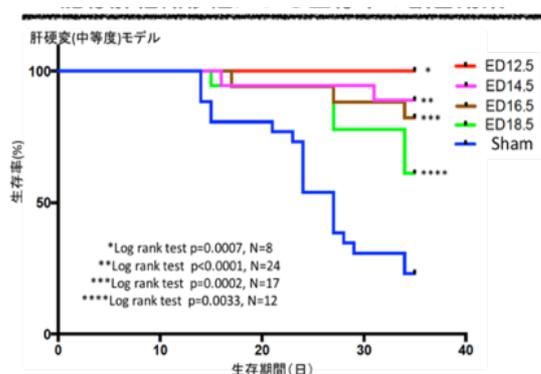
図3 生着組織の免疫組織学的解析



移植した胎仔肝組織は生体内において成熟肝組織へ分化することが示唆された(図3)。

各胎齢の胎仔肝組織を移植後の生存率を比較検討した。ED12.5の組織を移植した群が最も生存率が高く、ED14.5, ED16.5, ED18.5が続いて生存率改善効果を認めた。胎齢が若い組織を移植した群が生存率改善傾向を示した(図4)。

図4 胎仔肝組織移植による生存率の改善効果

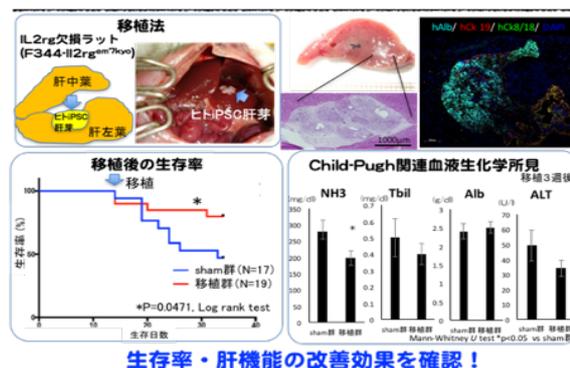


胎齢12.5日~18.5日の胎仔肝組織移植で生存を有意に改善

各胎齢の胎仔肝組織を移植後、ホストの肝組織の線維化を定量的に評価すると、ED12.5の胎仔肝組織を移植した際に最も線維化改善効果が認められた。

次にヒト iPSC 肝芽を免疫不全肝線維化ラットの肝左葉と中葉の間に挟み込んで移植した。移植21日後に組織学的解析を行ったところ、ヒト組織の生着が確認された。生着組織を免疫染色すると、ヒトアルブミン、ヒトサイトケラチン19、ヒトCD31等の陽性組織が認められた(図5)。

図5 免疫不全肝硬変モデルへのヒト iPSC 肝芽移植



生存率・肝機能の改善効果を確認!

またヒト iPSC 肝芽の移植により生存率が有意に改善した。移植3週間後のアンモニア値が有意に改善した。

移植3週間後の組織を検討したところ、ヒト iPSC 肝芽移植群では線維化の改善傾向がみられた。ヒト iPSC 肝芽を移植している肝左葉のヒドロキシプロリンを定量すると、sham群と比較して移植群で低下が見られた。ホスト肝組織の遺伝子発現を比較すると、ヒト iPSC 肝芽移植群において TGF-beta が低下していた。TGF-beta は肝臓の線維化を引き起こす肝星細胞を活性化させるサイトカインであり、ヒト iPSC 肝芽移植群で TGF-beta の抑制が見られることが線維化の改善に繋がっている可能性が示唆された。

ヒト iPSC 肝芽の移植組織における MMP9 の発現を免疫染色により検討した。その結果、血管内皮細胞や間葉系細胞と同一部位において MMP9 が確認された。ヒト iPSC 肝芽移植による線維化改善効果の可能性の一つとして、MMP9 の発現が示唆された。今後、更なるメカニズム解析を進めるとともに、より肝線維化改善機能を高めたヒト iPSC 肝芽の

開発を進めていく。

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)

[学会発表] (計 2件)

- ① 今野 孝浩, 村田 聡一郎, 谷口 英樹.
ラット肝線維化モデルに対する胎児肝臓
様組織を利用した新規治療法の確立.
第 40 回日本分子生物学会年会.
2017. 12. 6. 神戸ポートアイランド (兵庫
県神戸市)

- ② 大城 克友, 村田 聡一郎, 今野 孝浩,
森 淳祐, 松木 康一郎, 土田 倫範,
谷口 英樹. ラット胎仔肝組織移植によ
る肝線維化モデルの治療効果の検討. 第
17 回日本再生医療学会総会. 2018. 3. 22.
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)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