

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18152

研究課題名(和文)革新的なヒト完全iPS由来人工肝臓の作成による肝不全に対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the novel therapy for Liver Failure by Engineering Liver Graft from iPS cells

研究代表者

武石 一樹 (Kazuki, Takeishi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50733713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から肝細胞への分化を確立した。iPS細胞由来肝細胞は、肝細胞特異的遺伝子であるHNFやアルブミンの発現を認めた。この肝細胞を免疫抑制ラットに肝細胞移植し、移植後90日目に免疫学的染色にて、約80%のヒトアルブミンの染色の陽性率を認め、ラット肝臓からDNAを抽出し、PCRを行ったところ、ヒト特異的DNAが検出され、ラット肝内でヒト細胞が存在することが証明され、ラット肝内でヒトiPS由来肝細胞を増殖されることに成功した。このラット肝から肝細胞を抽出し、ヒト細胞にラット肝が10%程度混入していた。ラット肝の混入は下げるため、Cris-Cas9を導入したラットを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝不全に対する唯一の治療は肝移植であるがドナー不足は深刻で拒絶反応も問題となる。本人の細胞から人工肝臓が作成できればこれらの問題を解決できる。iPS細胞は再生医療への応用が期待されているが、人工肝臓の作成には至っていない。この原因は、iPS細胞から肝細胞を大量に作成できないからである。今回、我々はiPS細胞から肝細胞を作成し、免疫抑制ラットに移植することで、ラットの肝臓内で大量のiPS細胞由来肝細胞を作成することに成功した。このことにより臨床に必要な大量の肝細胞を作成でき、iPS由来肝細胞が生体内でも十分に機能することが証明され、今後、肝不全への臨床応用に向けてブレイクスルーとなり得る。

研究成果の概要(英文)：We have established an optimized differentiation protocol. Most important transcription factors (HNF4alpha and FOXA2 etc) related to liver regeneration are expressed in the resulting cells at the same levels as human adult hepatocytes. In order to establish an animal model for liver repopulation and generate sufficient number of highly functional iPSCs-Heps, we transplanted five million iPSCs-Heps into SCID rats. At 90d after transplantation both iPSCs-Heps engrafted and started to form colonies of growing human liver tissue implying that repopulation of iPSCs-Heps in rat's liver succeeded. We tried to isolate human iPSCs-Heps from rats livers, but the cells still contained rat's cells. We are making the new SCID rat which has Cris-Cas9 genes. We are trying to delete the rat cells by induction of suicide genes in rat livers.

研究分野：消化器外科

キーワード：iPS細胞 人工肝臓 肝不全 肝硬変

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では肝臓病は第2の国民病とされ、多くの患者さんが罹患している。肝臓が機能しなくなる肝不全に対する唯一の根本治療は肝移植だけであるが、本邦における脳死ドナー不足は深刻で、生体肝移植が行われているものの、ドナー肝の容量不足や脂肪肝で移植できない症例も多い。また、移植後の拒絶反応も大きな問題である。これらの問題に対して、患者本人の細胞から人工肝臓を作成することができれば解決することができると考えられる。山中教授らが報告した induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) は多分化能を持ち (Yamanaka S et al. Cell 2007)、再生医療への応用が期待されている。これまでにヒト iPS 細胞から iPS 細胞由来肝細胞 (iPS-Heps) を作成した報告はあるものの、臨床応用には至っていない (Basma H, et al. Gastroenterology 2009, Zhu et al. Nature 2014, Si-Tayeb K, et al. Hepatology 2010)。その理由は、これまでの iPS-Heps は機能が未熟で、生体内では増殖させることができず、臨床応用に必要な大量の iPS-Heps を容易に作成できないためである。

これまで iPS 細胞から肝細胞に分化させる研究を行っており、肝特異的転写因子に着目した新たなプロトコルを創出した。これまでのプロトコルにて作成した iPS-Heps を免疫不全ラットの肝臓に細胞移植しても、ほとんど増殖しなかったのに対して、新たに作成したプロトコルの iPS-Heps はラットの肝内において増殖を認め、移植 60 日後には約 50 ~ 60% の再分布を認め、ラット肝臓内で iPS-Heps を増殖させることに成功した。このラットよりヒト iPS-Heps を抽出することができれば、大量に iPS-Heps を作成することができると考えられた。

iPS 技術が臨床応用できない2つ目の理由に人工肝臓を作成する上で、実際の肝臓の構成細胞となっている肝非実質細胞の機能がわかっていない。肝臓の構成細胞である星細胞や類洞内皮細胞は肝再生時にサイトカインや成長因子を放出することで肝前駆細胞の肝細胞への分化、増殖を制御している。しかし、iPS-Heps の分化、増殖における肝非実質細胞の役割についてはわかっていない。

臨床応用できない3つ目の理由に、移植可能な人工肝臓を 3D 再構築できない点である。これまでに移植可能な 3D 培養を再現する方法として以前より肝臓を脱細胞化した Scaffold の研究を行ってきた。肝臓を脱細胞化し、マトリックスのみにした Scaffold に肝細胞を再細胞化することで、移植可能なミニ人工肝臓を作成することに成功した。この技術を応用し、iPS 由来人工肝臓を作成できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的の1つ目は、臨床応用可能できるように成熟した iPS-Heps が大量に作成するシステムを構築すること。2つ目は、iPS 由来細胞を脱細胞化した Scaffold を利用して、より大規模の完全 iPS 細胞由来人工肝臓を作成し、人工肝臓肝非実質細胞の役割を明らかにすることである。

これまでの iPS-Heps は実験室内にて作成したのみであり、今回のように動物内で iPS-Hep が分化、増殖した報告はなく、iPS-Heps を大量に作成することはできていない。また、肝非実質細胞に着目した人工肝臓の作成した報告はない。スケールアップした完全ヒト人工肝臓を作成することができれば、将来的に肝不全の革新的治療方法となるだけでなく、創薬でのヒト人工肝臓を生体外で再現することが可能となり、治験のコストを削減できる可能性もある。

## 3. 研究の方法

iPS 由来肝細胞の作成

ヒト iPS 細胞を内胚葉に分化させ、HGF、DMSO にて 10 日間培養し、iPS-Heps を作成する。分化後の細胞の HNF4 や FOXA2、アルブミンの発現量を免疫染色および qPCR を用いて評価し、iPS-Heps の分化能を確認した。

**細胞移植:** *Il2rg Rag2* 免疫不全ラットの肝臓内にヒト iPS-Heps を経門脈的に細胞移植した。移植後 2 週間毎に血液を採取し、エライザにて血液中のヒトアルブミンを定量する。移植 90 日目に肝臓を摘出する。摘出した肝臓から DNA を抽出し、ヒト由来 DNA を PCR にて評価する。また、摘出した肝臓をヒト特異的アルブミンにて免疫染色を行い、iPS-Heps の再分布率を評価した。

**移植した細胞の回収:** ラット肝臓をコラゲナーゼ処理し、肝細胞を回収する。ヒト特異的 HLA 抗体にて染色後、MACS にてラット由来細胞を除去し、ヒト iPS-Heps の回収率を評価した。

#### iPS 由来星細胞の作成

iPS 細胞に ActivinA, BMP-4, bFGF で培養し、中胚葉を作成。その後、BMP-4, bFGF で 6 日間培養し、iPS 由来星細胞を作成した。作成した星細胞の分化度を遺伝子発現にて評価した。

#### iPS 由来星細胞の機能解析

iPS-Heps の分化、増殖における iPS 由来星細胞の役割を評価するため、iPS-Heps に iPS 由来星細胞を共培養し、iPS-Heps の分化、増殖能を評価した。

#### Scaffold の作成

ラットより肝臓を摘出し、トリトンを門脈から注入し、脱細胞化する。その際に、トリトンの濃度を変更し、人工臓器としての強度となる残存コラーゲン量及び抗原性を示す DNA 残存率を評価し、適切な脱細胞化プロトコールを作成した。

#### 人工肝臓の作成

Scaffold に iPS 由来細胞を再細胞化し、人工肝臓を作成した。作成した人工肝臓の機能をエライザ、免疫染色にて行った。

## 4. 研究成果

### iPS 由来肝細胞(iPS-Heps)の作成

iPS 細胞を Activin と bFGF, BMP-4 で培養し、内胚葉を作成。次に HGF と DMSO にて 10 日間培養し、iPS-Heps を作成した。作成した iPS-Heps は肝細胞特異的転写因子である HNF4 $\alpha$ 、FOXA2 の mRNA の発現量は、正常肝細胞と同じレベルであり、これまでのプロトコールの iPS-Heps(Si-Tayeb K, et al. Hepatology 2010)の発現量の 2 倍近くあった(図 1)。

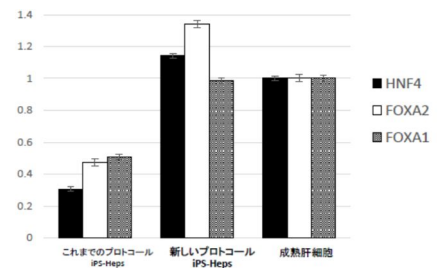


図1) iPS-Hepsの肝特異的転写因子発現量の比較

### 細胞移植の評価

作成した iPS-Heps を免疫抑制ラットに細胞移植した。移植後のラット血清のヒトアルブミンをエライザにて、移植 60 日目にヒトアルブミンを 51.21 ng/ml 検出した。また、移植 90 日目のラット肝をヒトアルブミンで免疫染色したところ、80% 以上ヒトアルブミン陽性となった(図 2)。また、ラット肝より抽出した DNA より PCR にてヒト特異的 DNA を検出した(図 3)。

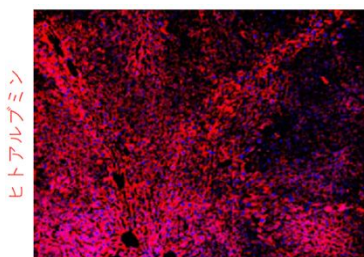
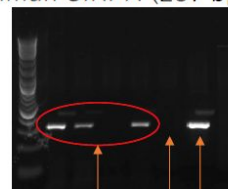


図2 移植後90日後ラット肝臓

### Human SIRPA (287 bp)



移植したラット | ヒト細胞  
移植なしラット

図3 ラット肝のヒト特異的DNAの検討

このことより iPS-Heps をラット肝を利用して、増殖させることに成功した。

### iPS-Heps の回収

ラット肝内で増殖させた iPS-Heps を利用するために、回収を試みた。移植後にラットを開腹し、門脈よりコラゲナーゼを注入し、肝細胞を回収した。回収した肝細胞をヒト特異的 HLA で染色し、MACS にてヒト細胞のみを回収した。回収した肝細胞を FACS にかけて、ラット由来細胞の混入率を調べたところ、混入率は 10%程度あった。次に回収した肝細胞をラット特異的 HLA で染色し、同じように MACS にてラット細胞を除去する方法を試したが、回収した肝細胞には 8%程度ラット肝が混入していた。臨床レベルにするためには、混入率を限りなく 0%にする必要があり、MACS による分離は困難と判断した。そこで、免疫抑制ラットに Cris-Cas9 を導入し、アポトーシス遺伝子(Caspase9)をラット細胞に発現させることで、ラット細胞を除去することとし、現在、Cris-Cas9 ラットを作成している。

### iPS 由来星細胞の作成

iPS 細胞に ActivinA, BMP-4, bFGF で培養し、中胚葉を作成。その後、BMP-4, bFGF で培養し、iPS 由来星細胞を作成した。作成した iPS 由来星細胞は、遺伝子解析にて、ヒト星細胞株である LX-2 に比べ約 40%程度の SMA (線維化マーカー)の発現を認めた。

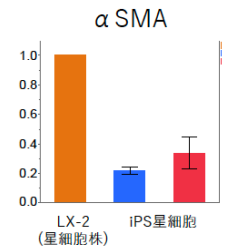


図4 iPS由来星細胞SMA発現量の比較

### iPS 由来星細胞の機能解析

iPS-Heps の分化、増殖における iPS 由来星細胞の機能を評価するため、共培養を行った。しかしながら、共培養を行うと、星細胞の増殖が強く、肝細胞が死滅認め、iPS 由来星細胞の上清を振りかけることにした。上清を振りかけた iPS-Heps は増殖を認め、より分化することがわかった。このことより、iPS 星細胞は、iPS-Heps が増殖、分化するのに役割を果たしていることがわかった。

### Scaffold の作成

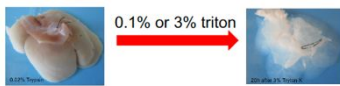


図5 脱細胞化過程

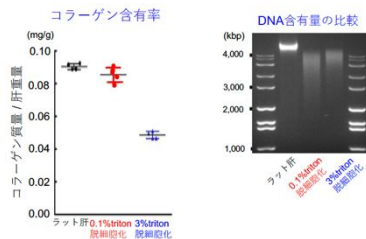


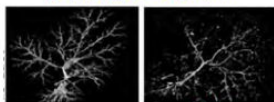
図6 ScaffoldのコラーゲンおよびDNA含有量の比較

ラット肝を摘出し、脱細胞化した。人工臓器としては、移植後の強度を保つためにコラーゲン含有率が高い方がよいが、移植後の拒絶反応を抑制するためには抗原性は完全に消失しておく必要がある。脱細胞化は、トリトンで行ったが、0.1 もしくは 3%トリトンを含む脱細胞化液にて脱細胞化を行った(図5)。3%トリトンで脱細胞化した Scaffold は、脱細胞化前の肝臓と比較して、約 50%程度、コラーゲン含有率が低下していたのに対し、0.1%トリトンで脱細胞化した Scaffold は、脱細胞化前の肝臓とほとんど変化を認めなかった(図6)。さらに DNA 含有量を比較したところ、0.1%及び 3%トリトンにて脱細胞化した肝臓はいずれも DNA の含有を認めず、抗原性を消失していることがわかった(図6)。次に移植可能な臓器として、Scaffold の有効性を検討するため、血管や胆管の構造を Micro MRI にて検討した。脱細胞化した Scaffold は胆管や血管の構造が保たれていることがわかった(図7)。このことより、肝臓を脱細胞化した Scaffold は移植可能な人工肝臓を作成するのに適していると考えられた。

### 人工肝臓の作成

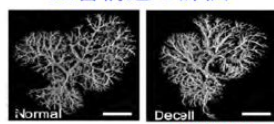
作成した iPS 細胞を作成した Scaffold に再細胞化し、人工肝臓を作成した。非実質細胞の混入率を現在、検討中である。

### 胆管構造の評価



ラット肝 0.1%triton 脱細胞化

### 血管構造の評価



ラット肝 0.1%triton 脱細胞化

図7 ScaffoldのmicroMRI

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeishi Kazuki, Collin de l' Hortet Alexandra, Soto-Gutierrez Alejandro, et al	4. 巻 31
2. 論文標題 Assembly and Function of a Bioengineered Human Liver for Transplantation Generated Solely from Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107711-107711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, Morita K, Achreja A, Popovic B, Wang Y, Handa K, Mittal A, Meurs N, Zhu Z, Weinberg F, Salomon M, Fox IJ, Deng CX, Nagrath D, Soto-Gutierrez A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells with Modifiable SIRT1 Metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Metab	6. 最初と最後の頁 385-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeishi Kazuki, Yoshizumi Tomoharu, Itoh Shinji, Yugawa Kyohei, Yoshiya Shohei, Toshima Takeo, Harada Noboru, Ikegami Toru, Nishie Akihiro, Mori Masaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Surgical Indications for Hepatocellular Carcinoma with Non-hypervascular Hypointense Nodules Detected by Gd-EOB-DTPA-Enhanced MRI	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 3344 ~ 3353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08419-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武石一樹、吉住朋晴、伊勢田憲史、富山貴央、森永哲成、井口詔一、小斉侑希子、湯川恭平、吉屋匠平、戸島剛男、伊藤心二、原田 昇、池上 徹、真下知士、Alejandro Soto-Gutierrez、森 正樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来人工肝臓の機能解析と臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Takeishi
2. 発表標題 Assembly and function of an engineered liver graft generated solely from human induced pluripotent stem cells-Towards Autologous Liver Transplantation
3. 学会等名 American College of Surgeons Clinical Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武石一樹、吉住朋晴、伊勢田憲史、富山貴央、森永哲成、島垣智成、王歆林、栗原 健、大津甫、戸島剛男、井口友宏、米村祐輔、伊藤心二、原田 昇、二宮瑞樹、増田隆明、前田貴司、真下知士、Alejandro Soto-Gutierrez、三森功士、森 正樹
2. 発表標題 ヒトiPS由来人工肝臓による肝不全治療への応用および遺伝子改変による脂肪肝モデルの再現
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武石一樹、吉住朋晴、伊勢田憲史、富山貴央、森永哲成、大津甫、戸島剛男、米村祐輔、伊藤心二、原田 昇、真下 知士、Alejandro Soto-Gutierrez、三森功士、森 正樹
2. 発表標題 完全ヒトiPS細胞由来人工肝臓の機能解析と臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武石一樹、増田隆明、三森功士
2. 発表標題 移植可能完全ヒトiPS細胞由来人工肝臓の機能解析と臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Takeishi, Tomoharu Yoshizumi, Masaki Mori
2. 発表標題 Assembly and function of an engineered liver graft generated solely from human induced pluripotent stem cells-Towards Autologous Liver Transplantation
3. 学会等名 第17回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Takeishi, Tomoharu Yoshizumi, Masaki Mori
2. 発表標題 Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells withModifiable Gene expression
3. 学会等名 第18回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武石一樹、吉住朋晴、伊勢田憲史、富山貴央、森永哲成、吉屋匠平、 大津甫、戸島剛男、米村祐輔、伊藤心二、原田 昇、三森功士、Alejandro Soto-Gutierrez、森 正樹
2. 発表標題 Scaffoldを用いた完全iPS細胞由来による人工肝臓の作成と今後の展望
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武石一樹、伊藤心二、吉住朋晴
2. 発表標題 ヒト肝細胞における脂質代謝・糖新生に関するSIRT-1の役割の検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武石一樹、吉住朋晴、森 正樹
2. 発表標題 SIRT-1発現調節可能なiPS細胞を用いた完全ヒト人工肝臓による脂肪肝再現モデルの作成
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 American College of Surgeons Clinical Congress 2019	開催年 2019年～2019年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Pittsburgh		