

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08808

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝幹細胞様細胞を用いた代謝異常性肝疾患の治療

研究課題名(英文) Treatment for metabolic liver diseases using human iPS-derived hepatic stem-like cells

研究代表者

白水 泰昌 (Shirouzu, Yasumasa)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：20279186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞移植の臨床応用を進めるには組織幹細胞を含む移植方法の開発が重要である。我々は、ヒトiPS細胞から肝幹細胞マーカーXを発現維持する肝幹細胞様細胞(HSLC)を誘導樹立した。また、肝細胞様細胞(HLC)への分化をreal timeで評価するために、アルブミンプロモーター下にGreen Fluorescent Protein(GFP)を発現するiPS細胞(ALB-iPS)を作成した。ALB-iPSから誘導したHSLCは長期継代後であっても、尿素サイクル関連酵素やcytochrome P450を発現する成熟HLCへのさらなる分化が可能で、免疫不全マウスに移植後肝臓内に生着することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝異常性肝疾患は臓器移植に比べてより低侵襲な細胞移植での治療が可能と考えられているが、その効果は限定的である。移植した細胞の生体内での長期生着が困難なことが原因の一つと考えられ、臨床応用のハードルになっている。肝臓には自己複製能と分化能を併せ持ち組織再構築に寄与する組織幹細胞が存在する。本研究ではヒトiPS細胞から肝幹細胞様細胞を誘導する技術が開発され、免疫不全マウスに移植後肝臓内に生着することが確認された。現在肝臓移植以外に治療法のない、特に小児の代謝異常性肝疾患に対し、本研究で開発された肝幹細胞様細胞を用いた移植治療が、新たな標準治療になりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The hepatocyte transplantation has been less effective in curing the metabolic liver disease probably due to including few hepatic stem cells. We produced the hepatic stem-like cell (HSLC) expressing the hepatic stem cell marker X from human induced pluripotent stem cell (iPSC). And an iPSC (ALB-iPS) that contains an albumin allele linked to a Green Fluorescent Protein (GFP) gene was established for monitoring the differentiation toward the hepatic lineage. The ALB-iPS could be differentiated into the hepatocyte-like cell (HLC) expressing albumin accompanied by GFP, and cultivated continuously as the HSLC. The adjustment of chemicals made the ALB-iPS-derived HSLC more matured, and the expression of enzymes related with urea cycle and cytochrome P 450 specific to the loaded drug were confirmed with the GFP expression. Moreover, the HSLC could repopulate in the liver of immune-deficient mice. The HSLC was suggested to be a useful cell source for treating the metabolic liver disease.

研究分野：肝臓

キーワード：ヒトiPS細胞 肝細胞

1. 研究開始当初の背景

先天性代謝異常性肝疾患は重症例では短期予後が不良である一方、非重症例であっても中枢神経障害を発症することが特徴である。肝臓移植が唯一の根治療法であるが、その介入が遅れば脳障害の回復は困難で、また肝臓移植レシピエント特に腹腔内容積の小さい新生児にとっては、高度の血管吻合手技を要する患者負担の大きい難度の高い治療法である (Shirouzu Y et al, Liver Transpl 2006; 12: 1224)。一方ドナー肝臓由来の肝細胞移植は、門脈カニューレーションにより実施可能な低侵襲治療で、新生児に対して臍帯静脈を用いることで安全に施行できるが、長期的な肝機能維持は難しく現時点では部分的な機能補助療法としての位置付けにとどまっている (Iansante V et al, Pediatr Res 2018; 83: 232)。肝細胞移植を長期的に有効な治療法へと発展させるためには、増殖可能な組織幹細胞が必要と考えられる (Spada M et al, Stem Cell Rev Rep 2020; 16: 186)。

ヒト induced pluripotent stem cell (iPSC) は、無限の増殖能と分化能を有する細胞である (Takahashi K et al. Cell 2007; 131: 861)。ヒト iPSC から肝細胞様細胞を分化誘導する技術はほぼ確立してきている (Si-Tayeb K et al. Hepatology 2010; 51: 297) が、分化の過程で経時的に増殖能が低下し成熟した肝細胞様細胞の段階ではドナー肝臓由来肝細胞と同様ほとんど増殖しないという問題を抱えている (Zhang R et al, Transplant Proc 2014; 46: 1201)。

つまり iPSC を用いた代謝異常性肝疾患治療細胞製剤開発のためには、まず肝幹細胞様細胞集団の誘導と character 同定に加え、in vitro における維持培養メカニズムの解明が必要である。

2. 研究の目的

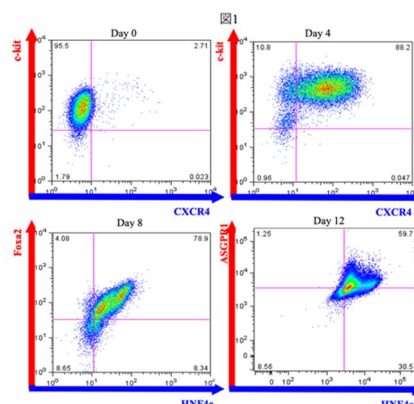
我々は iPSC から分化誘導した肝細胞様細胞の培養条件にサイトカインおよび低分子化合物を組み合わせることで、長期継代可能な肝幹細胞様細胞 (HSLC) を誘導樹立した。本研究の目的は、HSLC の中で self-renew する幹細胞集団を同定することと、細胞増殖と表現型維持のメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

- 1) 肝細胞様細胞への分化段階の評価を real time で行うために、CRISPR-cas9 システムを用いてレポーター遺伝子のノックインを行い、アルブミンプロモーター下に GFP を発現する iPSC 株 (ALB-iPS) を作成。
- 2) ヒト iPS を以下の schedule (Si-Tayeb K et al. Hepatology 2010; 51: 297) に従い肝前駆細胞への分化誘導。
 - (1) Day 0-4: Activin A 50 ng/ml
 - (2) Day 4-8 BMP4 20 ng/ml+bFGF 10 ng/ml
 - (3) Day 4-12: HGF 20 ng/ml
- 3) 誘導した肝細胞様細胞の培養条件にサイトカインおよび低分子化合物を組み合わせ、HSLC を誘導し、幹細胞マーカー遺伝子の発現を逆転写 PCR にて評価し、フローサイトメーターで発現解析。
- 4) 培地中のサイトカインおよび低分子化合物の組み合わせにより、肝前駆細胞特異的な遺伝子およびタンパク質 (HNF4a・AFP・Albumin・ASGPR1 等) 発現と、細胞周期関連遺伝子およびタンパク質 (cyclin・pRB・cMyc・Ki67 等) 発現を同じく定量 PCR および Western blotting において解析評価。
- 5) 免疫不全マウス (NOD/SCID) の脾臓内に移植を行い、1 ヶ月後に肝臓を回収し、凍結切片作成後蛍光顕微鏡観察。

4. 研究成果

- 1) 既存のプロトコール (Si-Tayeb K et al. Hepatology 2010; 51: 297) に従いヒト iPSC を 12 日間分化させると、90% が HNF4a 陽性で 60% が ASGPR1 陽性を示す肝前駆細胞集団が誘導された (図 1)。



- 2) ALB-iPS を 12 日間分化誘導後さらに 8 日間 HGF treatment を継続した後、免疫細胞染色にて、Albumin 発現細胞を同定した(図 2A)。内因性に GFP を発現している細胞の局在は、抗 Albumin 抗体に続いて 2 次抗体で反応させた AL647 陽性細胞と一致しており、約 67% の細胞が Albumin 陽性であった(図 2B)。

図2A 20日分化後のALB-iPSの抗Albumin抗体+2次抗体 (AL647)

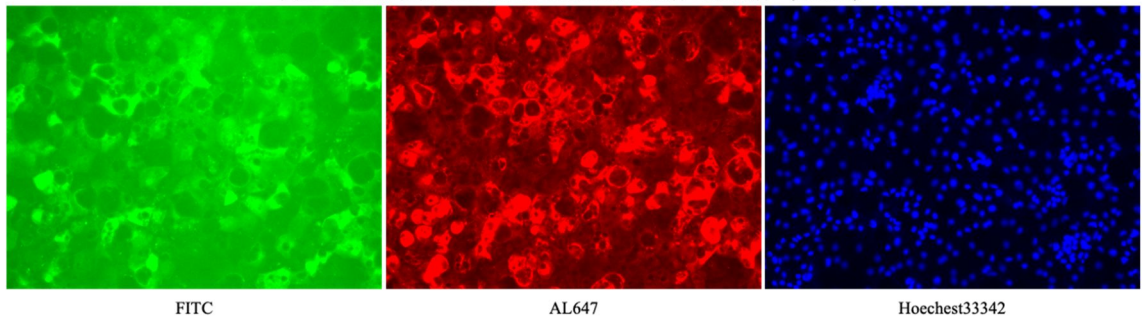
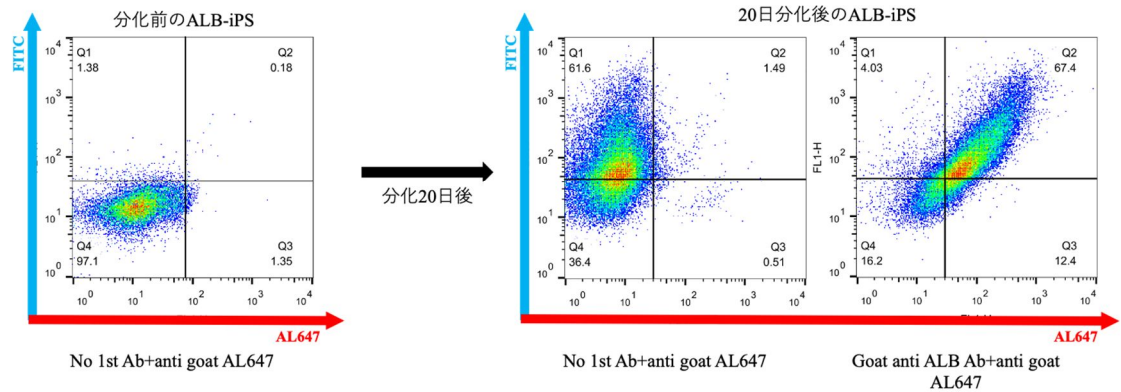


図2B ALB-iPSの20日分化後のALB抗体を使ったFACS解析



- 3) 誘導した肝細胞様細胞にサイトカインおよび低分子化合物を組み合わせ (増殖培地) て、HSLC を誘導すると、少なくとも 10 継代以上維持増殖が可能であった (図 3A)。また長期継代後の HSLC は肝前駆細胞特異的な蛋白発現が維持されていた (図 3B)。

図3A Growth curve of HSLC

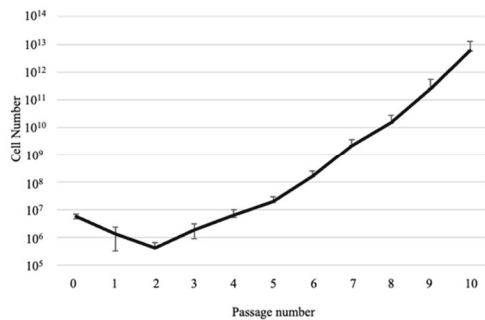
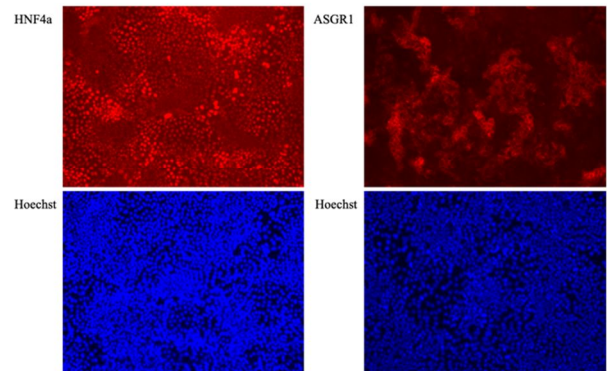


図3B 長期継代後のHSLCの肝前駆細胞特異的な蛋白発現



- 5) ALB-iPS より HSLC 誘導後、化合物 A が含まれている状態では HSLC は増殖し幹細胞マーカー X を発現していたが、化合物 A を取り除くと細胞増殖は抑えられ幹細胞マーカー X の発現も認められなくなり、FITC 陽性細胞 (ALB 陽性細胞) が出現した (図 4)。

図4 HSLC誘導後の化合物に依存した幹細胞マーカーXの発現

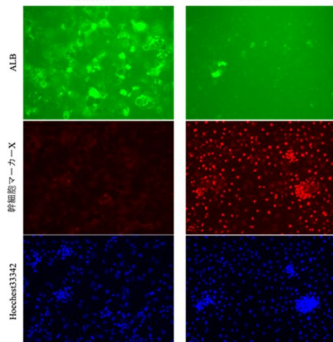
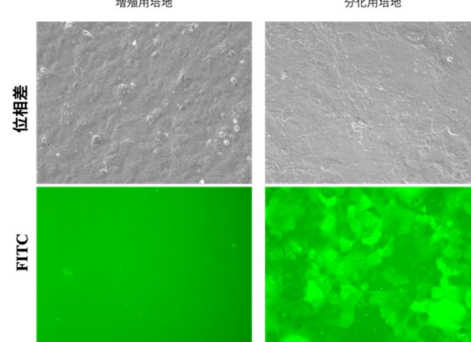


図5 ALB-iPS由来HSLCの増殖時と分化時の蛍光顕微鏡Live観察



- 6) ALB-iPS より誘導した HSLC は、長期継代後であってもサイトカインおよび低分子化合物を調整（分化培地）することで、Albumin 陽性細胞への分化が可能であった（図 5）。
- 7) ALB-iPS より誘導した HSLC を増殖培地にて長期継代後、分化培地へと変更し維持培養すると、ornithine carbamoyl transferase (OCT) や carbamoyl-phosphate synthetase 1 (CPS1) といった尿素サイクル酵素を発現する成熟肝細胞様細胞へのさらなる分化誘導が可能（図 6A）で、Rifampicine の投与により CYP3A4 の誘導も可能（図 6B）であった。

図6A ALB-iPS由来HSLC分化前後の蛋白発現

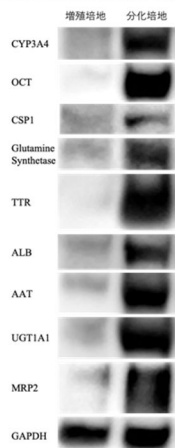
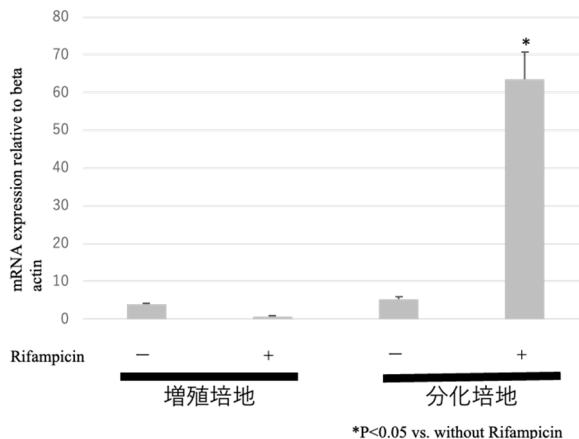
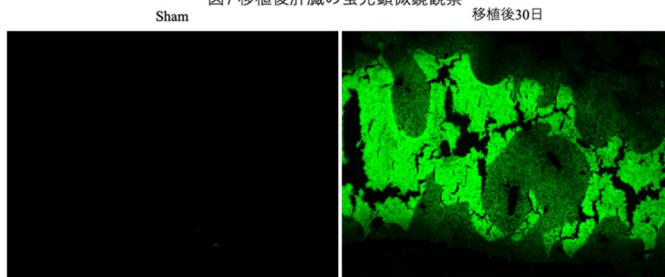


図6B CYP3A4誘導



- 8) ALB-iPS より誘導した HSLC を免疫不全マウス（NOD/SCID）に移植（脾臓内投与）した。1ヶ月後に肝臓を摘出し直ちに凍結切片作成後蛍光顕微鏡観察を行うと、肝臓内で GFP を発現する細胞集団の形成が確認された（図 7）。

図7 移植後肝臓の蛍光顕微鏡観察



ヒト iPSC 由来肝前駆細胞を、サイトカインと低分子化合物を組み合わせることで幹細胞マーカー X を発現する肝幹細胞様細胞集団の誘導および長期継代に成功した。誘導した HSLC はサイトカインと低分子化合物を調整することで、成熟肝細胞様細胞への分化が可能で、免疫不全マウスの肝臓内で repopulation が可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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0件

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
---------	---------