

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22791275

研究課題名（和文）iPS 細胞から機能性肝細胞への分化誘導法の確立；細胞移植治療を目指して

研究課題名（英文）The establishment of induction method from iPs cells to hepatocyte: For cell transplantation

研究代表者

石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)

京都大学大学院医学研究科 肝胆膵移植外科分野 助教

研究者番号：70456789

研究成果の概要（和文）：

現在、末期肝疾患に対する最も有効かつほとんど唯一の根治的治療法は肝臓移植であるが、ドナー不足と免疫拒絶がまだ大きな問題となっている。

その代替治療として肝細胞移植が候補の一つであり、今回我々は肝細胞移植に着目し研究を行った。まず細胞移植の細胞源として iPS 細胞、間葉系幹細胞を選択しそれらを *in vitro* で肝細胞へ分化することに成功した。細胞外基質ならびに増殖因子の添加により RT-PCR と免疫染色にて肝細胞マーカーであるアルブミンの発現を確認できた。

この肝細胞分化細胞を肝障害を加えた免疫不全ラットへ移植した。間葉系幹細胞から分化誘導を行った細胞においては、ラット肝臓内にヒトアルブミンを産生する肝細胞様細胞を認めた。また、一部のラットにおいて、血清中にヒトアルブミンを検出することができた。同様に、iPS 細胞から分化誘導を行った細胞においてもラット肝臓内にヒトアルブミン陽性細胞を確認することができた。

この結果より、iPS 細胞、間葉系幹細胞は肝細胞移植の細胞源となりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, orthotopic liver transplantation is unique and the most efficient treatment for end-stage liver disease. But, the therapy has the issues of donor shortage and immune rejection.

Then, a hepatocyte transplantation is listed as a alternative therapy for liver transplantation, we investigated hepatocyte transplantation.

First, we selected iPS cells and mesenchymal stem cells as a cell source, and we tried and succeeded to induce differentiation of human induced pluripotent stem cells and human mesenchymal stem cells to hepatocyte like cells *in vitro*.

In particular, the cells which was provided with extra cellular matrix and cytokines, expressed albumin and other hepatocyte marker in RT-PCR and immunohistochemistry. We transplanted these hepatocyte like cells into livers of SCID rats. In rats which were transplanted hepatocyte like cells derived from mesenchymal stem cells, we detected the albumin positive cells in the liver, in some of those rats, the serum level of human albumin increased.

And then, in rats which were transplanted hepatocyte like cells derived from iPS cells, the albumin positive cells were detected in the liver.

This result indicated that we can use iPS cells and mesenchymal stem cells as a cell source of hepatocyte transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24 年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学、iPS細胞、細胞移植治療、肝幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、末期肝疾患に対しては肝移植が最も有効で、かつほとんど唯一の根治的治療法でもある。しかし肝臓移植においては、ドナー不足と免疫拒絶がいまだ大きな問題となっている。

一方、ES細胞（embryonic stem cell, 胚性幹細胞）は内部細胞塊由来の細胞株であり、正常な核型を維持したままほぼ無限に増殖する能力を持つ。さらに3胚葉全ての細胞種に分化する能力を持つことから、細胞移植を始めとする再生医療の細胞源として注目されている。肝細胞領域においてもES細胞由来肝細胞は、細胞移植にとどまらず創薬開発支援やハイブリッド型人工肝などの細胞源となりうると考えられている。もしES細胞を用いた細胞移植治療が可能となれば、その旺盛な増殖力からドナー不足は解決されるものと予想されるが、しかし同種間細胞移植であるために免疫拒絶の問題は残る。iPS細胞は、最終分化細胞に2~4種類の遺伝子を導入することにより細胞を初期化して得られる、ES細胞と同等の多分化能を有する幹細胞である（Takahashi, Yamanaka, 2006）。患者本人の細胞からiPS細胞を樹立することができるため、iPS細胞を用いた細胞移植が可能となればドナー不足の問題だけではなく、免疫拒絶の問題も解決できると期待されている。

我々はこれまでに、肝臓発生学を研究する過程において、マウス胎仔肝臓に存在する間葉系細胞であるCD45-CD49f±Thy1+gp38+細胞が、肝前駆細胞（Kamo, Ishii et al. 2007）およびマウスES細胞由来内胚葉細胞（Ishii et al. 2005）を機能性肝細胞へと成熟させることを報告してきた。さらにはこの知見を応用して、このCD45-CD49f±Thy1+gp38+間葉系細胞に不死化遺伝子を導入することにより新たな細胞株（MLSgt20）を樹立することに成功した（Fukumitsu, Ishii et al. 2009）。MLSgt20細胞はマウス胎仔肝前駆細胞だけでなくマウスES細胞由来内胚葉細胞をも機能性肝細胞へと成熟化させることができる。さらにはマウスES細胞のみならず、ヒトES細胞においてもMLSgt20細胞は成熟肝細胞へと分化させる能力を持つことが示された（Ishii et al. in revision. 2009）。

一方、肝細胞移植においても我々はこれまでにマウスES細胞を用いた細胞移植によって致死性肝障害モデルを救命し得たとする報告を行っている（Ishii et al. 2007）。しかしその効果と安全性においては若干の改善点が残された。その大きな原因の一つとして、肝細胞移植においては、未分化肝前駆細胞より成熟肝細胞の方が移植効果が高いためであると我々は考えており（未発表データ）、iPS細胞由来細胞移植を行う際にも、より成熟した肝細胞をin vitroで得ることが望まれる。本研究は、我々がこれまで肝臓発生学並びにES細胞生物学で得られた知見を基に、iPS細胞から成熟肝細胞への分化誘導法を確立することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究は、末期肝不全を始めとした肝疾患に対する、iPS細胞（induced pluripotent stem cell）を用いた肝細胞移植の有用性についての基礎データを収集することを目的とする。具体的には、複数のヒトiPS細胞株を用いて肝前駆細胞への分化誘導至適条件を検討するとともに、得られた肝前駆細胞をさらに機能性肝細胞へとin vitroで成熟化させることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、ヒトiPS細胞から機能性肝細胞へと分化・成熟させる過程を2段階に分けて計画している。すなわち、

1. 未分化iPS細胞から初期内胚葉細胞であるAFP産生細胞までの分化を、細胞外基質や各種増殖因子の刺激によって行い、その分化誘導条件を至適化する。
2. AFP産生細胞を分離・純化し、肝細胞成熟化能を有する細胞株であるMLSgt20と共培養することにより、肝細胞機能を有することをin vitroで検証する。

さらに、この段階まで成熟化が進んだ機能性肝細胞がin vivoでも機能しうるかを検討するために、肝障害モデルラットに細胞移植を行う。

4. 研究成果

(1) 初期内胚葉マーカーに対するレポーターベクターの作成とレポーターベクター遺伝子導入ヒトiPS細胞の作成

ヒトalpha-fetoprotein enhancer/promoter領域をハイブリッドプロモーターとして

EGFP を発現するプラスミドベクターを完成させた。これをヒト肝細胞癌株へ遺伝子導入することによって、AFP 産生細胞が EGFP 蛍光を発することを確認できている。この AFP-EGFP プラスミドベクターをヒト iPS 細胞へトリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行っている。遺伝子導入効率が低く安定導入株をいまだ得ることはできていないが、今後も実験を継続していく予定である。

(2) マウス胎仔肝由来間葉系細胞株 MLSgt20 細胞の培養およびヒト iPS 細胞との共培養我々は以前にマウス胎仔肝由来間葉系細胞である MLSgt20 細胞を樹立し、これがマウスおよびヒト ES 細胞を機能性肝細胞へと分化成熟化させる事を報告して来た。この細胞培養技術をヒト iPS 細胞へも応用することを目的として MLSgt20 細胞の培養を開始した。また、間葉系幹細胞との共培養を行ったが機能性肝細胞の分化には至るも成熟化には至らなかった。

(3) ヒト間葉系幹細胞から内胚葉細胞へと分化誘導する実験

ヒト iPS 細胞だけではなくヒト間葉系幹細胞から内胚葉分化を試みる実験を並行して行っている。既に細胞外基質ならびに増殖因子の添加により RT-PCR と免疫染色にて内胚葉分化に成功している事を確認できた。この内胚葉分化細胞を肝障害を加えた免疫不全ラットへ移植したところ、ごく少数ながらラット肝臓内にヒトアルブミンを産生する肝細胞様細胞を認めた。また、一部のラットにおいて、血清中にヒトアルブミンを検出することができた。

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 5 件)

- ① Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Iwao Ikai, Shinji Uemoto, Kawase E, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji. In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers. Cell Tissue Res. 2010 Mar;339(3):505-12. 2009 Dec 30.
doi: 10.1007/s00441-009-0906-7
- ② Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Iwao Ikai, Shinji Uemoto. Alfa-fetoprotein producing cells act as cancer progenitor cells in human cholangiocellular carcinoma. Cancer Lett. 2010 Aug 1;294(1):25-34. 2010.01.019. 2010 Feb 10.
doi: 10.1016/j.canlet

- ③ Naoya Sasaki, Takamichi Ishii, Ryo Kamimura, Masatoshi Kajiwara, Takafumi Machimoto, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Iwao Ikai, Kentaro Yasuchika, Shinji Uemoto
Alpha-fetoprotein-producing pancreatic cancer cells possess cancer stem cell characteristics. Cancer Lett. 2011 Sep 28;308(2):152-61. 2011 May 26.
doi: 10.1016/j.canlet
 - ④ Sayuri Konishi, Kentaro Yasuchika, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Naoko Kamo, Fujita N, Iwao Ikai, Shinji Uemoto. A transmembrane glycoprotein, gp38, is a novel marker for immature hepatic progenitor cells in fetal mouse livers. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011 Jan;47(1):45-53. 2010 Nov 20.
doi: 10.1007/s11626-010-9354-7
 - ⑤ Ryo Kamimura, Takamichi Ishii, Naoya Sasaki, Masatoshi Kajiwara, Takafumi Machimoto, Miwa Saito, Kohno K, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Iwao Ikai, Kentaro Yasuchika, Shinji Uemoto
Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage. Cell Transplant. 2012;21(11):2351-62. 2012 Apr 2.
doi: 10.3727/096368912X636957
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Iwao Ikai, Shinji Uemoto, Kawase E, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji.
“In vitro differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocytes using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers” 45th EASL (Vienna, Austria) 2010 年 4 月 11 日
 - ② 石井隆道
肝細胞移植における細胞分化度の影響-ES 細胞を用いた細胞移植に向けて
第 17 回肝細胞研究会(秋田)2010 年 6 月 18 日
 - ③ 石井隆道
ES 細胞から機能性肝細胞への分化誘導-ES 細胞を用いた肝細胞移植を目指して
第 65 回日本消化器外科学会総会(下関) 2010 年 7 月 15 日
 - ④ 上村 良、石井隆道、佐々木 直也、梶原 正俊、福光 剣、斉藤 美知子、河野 憲二、

猪飼 伊和夫, 安近 健太郎, 上本 伸二,
「致死性肝障害モデルマウスに対する分化段階の異なる肝細胞移植の検討」
第 38 回日本急性肝不全研究会 (金沢)
2012 年 6 月 6 日

- ⑤ 喜多貞彦, 石井隆道, 小木曾 聡, 片山外大,
河合隆之, 安田勝太郎, 上村 良, 梶原正俊,
波多野悦朗, 落合孝広, 上本伸二
「大量肝切除後の急性肝不全に対する、
肝細胞自家移植を用いた治療戦略」
第 39 回日本臓器保存生物医学会 (福島)
2012 年 11 月 17 日

[図書] (計 3 件)

- ① Takamichi Ishii
Differentiation of Human
Embryonic Stem Cell into Functional
Hepatocyte-like Cells, Stem Cells and
Cancer Stem Cells, Volume 2
Springer 2012
- ② Takamichi Ishii and
Kentaro Yasuchika
Hepatic Maturation of hES Cells by
using a Murine Mesenchymal Cell Line
Derived from Fetal Livers,
Human Embryonic and Induced
Pluripotent Stem Cells
Springer 2012
- ③ Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika
, Iwao Ikai
“Hepatic differentiation of embryonic
stem cells by murine fetal liver
mesenchymal cells”
Springer 2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 隆道 (ISHII TAKAMICHI)
京都大学大学院医学研究科 肝胆膵移植外科分野 助教
研究者番号 : 70456789

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし