

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 4 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462093

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝細胞株の樹立による革新的なハイブリッド型人工肝臓の開発

研究課題名(英文) Development of the innovative hybrid artificial liver with establishment of the hepatocyte strain from human iPS cells

研究代表者

山下 洋市 (YAMASHITA, YOICHI)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：00404070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞からアンモニア代謝能を有する高分化肝細胞株を樹立する事に成功した。『代謝解毒能』は肝細胞が有する最も高次の機能であり、この細胞株は臨床応用可能な人工肝臓を創成する際に有力な細胞源になると考えている。

究極のハイブリッド型人工肝臓は、体外循環式ではなく埋め込み型であり、scaffoldとして、『脱細胞鋳型肝臓』を用いた。臓器外壁の脆弱性の解決のため、ポリグリコール酸シート+フィブリン・トロンビン液を用いて強化し、ラット脱細胞鋳型肝臓の約1時間にわたる体外循環に成功した。この実験系を用いて、埋め込み型移植肝グラフトの評価を行ったところ、添加アンモニアを代謝する事を確認した。

研究成果の概要(英文)：We newly established the well-differentiated liver cell line which has ammonia metabolism from human iPS cells. The metabolic detoxification ability is one of the highest specific liver functions, therefore, this cell line is thought to be the leading cell source at the time of clinical application of the artificial liver support system. The ultimate hybrid artificial liver should be a “dropper type” rather than an extracorporeal type, therefore, we used the decellularized liver as a scaffold. Because of the vulnerability of the outer wall of the decellularized liver, the reinforcement using the “polyglycolic acid sheet + fibrin/thrombin solution” was performed. We succeeded the extracorporeal circulation for approximately one hour of rat decellularized liver. Using this experimental system, we evaluated the functions of the rat decellularized liver implanted with rat primary hepatocytes, and confirmed the high rate of ammonia metabolism.

研究分野：肝胆膵外科、癌の分子生物学、再生医療

キーワード：ヒトiPS細胞 ハイブリッド型人工肝臓

1. 研究開始当初の背景

肝臓に対する治療は肝切除術が唯一の根治的治療である。また、末期肝硬変に対する治療法として生体肝移植が普及しており、その5年生存率は約75%と良好である(Duffy JP et al. Ann Surg. 2010)。しかし、生体肝移植症例数の増加及びレシピエントの長期経過に伴い、数多くの臨床的課題が浮き彫りになっている。特に、病的肝(脂肪肝、NASH、糖尿病など)による肝機能不良を原因とする肝切除の断念やドナー肝容量不足による肝移植断念が問題となっている。

この命題を解決するために、我々はポリウレタン(PUF)三次元スフェロイド培養型ハイブリッド型人工肝臓の研究を進め、ブタ肝細胞約200gを充填できる臨床用プロトタイプを完成させたが(Yamashita Y et al. Cell Transplant 12: 101-7, 2003: 図1)ブタretrovirusの問題により、その実用化への道は頓挫している。その一方でヒト由来肝細胞を用いた基礎研究も独自に進めているが(Yamashita Y et al. Cell Transplant 10: 717-22, 2001、Harimoto N, Yamashita Y et al. J Hepatol 42: 557-64, 2005)肝細胞として実用化できるヒト由来細胞源を得るまでにはいたっていない。

一方、ヒト線維芽細胞にOct-4・Sox2・Klf4・c-Mycの4種の遺伝子を導入することで多分化能を持つiPS細胞が樹立され(Yamanaka S et al. Cell 2007) iPS細胞を分化誘導する事で、オーダーメイドの成熟細胞を得る事ができる可能性があり、臓器機能欠損や臓器機能不全患者に対する再生医療への応用が期待されている。ヒトiPS細胞より、肝細胞への分化誘導に成功したという報告もあり(Song Z et al. Cell res 2009)ヒト肝不全患者への臨床応用の可能性が注目されている。我々は、幾つかのヒト由来肝癌細胞(Hep G2、Huh 7)の肝細胞分化誘導にも成功しており(Yamashita Y et al. Int J Cancer 103: 572-6, 2004)その手技や評価系は、本研究でも応用可能である。

2. 研究の目的

ヒトiPS細胞由来肝細胞株を用いたハイブリッド型人工肝臓開発のための基盤研究を行う。臨床的肝機能指標による評価にてヒトiPS細胞由来高分化肝細胞株を樹立する。三次元スフェロイド培養を行った上で、ヒト肝不全血漿中での肝機能発現を確認する。また、臨床応用を睨み、小型モジュール還流回路を用いてヒト肝不全血漿による還流実験を行う。

iPS細胞から肝細胞への分化へ成功したという報告の肝機能評価系は、-FP

やアルブミンの免疫染色、肝特異遺伝子(HNFなど)の限定的発現の評価に留まり、肝不全治療を睨んだ肝臓が持つ高度な生体機能(「解毒能」など)を評価項目とした報告はない。我々は、これまでに確立しているアンモニア代謝系・リドカイン代謝系・アミノ酸分画評価系などの、ヒト肝不全臨床に即した評価系を既に確立しているなどの機能評価系を本研究に応用する予定である。

また、我々はヒト初代培養肝細胞の採取およびその培養系も確立しており(Yamashita Y et al. Cell Transplant 11: 379-84, 2002)ヒト初代培養肝細胞の機能を常にpositiveコントロールとする事で肝特異機能を定量的に評価できると考える。

ヒトiPS細胞由来肝細胞株の肝特異機能解析の比較として、in vitroで増殖能を持つヒト胎児肝細胞(Hc cells: DSファーマバイオメディカル)独自に作成した自殺遺伝子HSV-tkを導入してトリコスタチンAなど薬剤により肝細胞へ分化誘導させたHep G2(Harimoto N, Yamashita Y et al. J Hepatol 42: 557-64, 2005)ヒト高分化型肝癌株(Huh 7)およびヒト初代培養肝細胞を用いる。また、樹立したヒトiPS細胞由来肝細胞株によるin vitro三次元スフェロイド培養が長期間可能か否かを検討する。

ハイブリッド型人工肝臓はヒト肝不全血漿という細胞培養としては非常に劣悪な環境の中で肝特異機能を発現しなければならない。スフェロイド培養ヒトiPS細胞由来肝細胞株がヒト肝不全血漿中でも肝特異機能(特に「解毒能」)を発現できるか否かを検討する(Yamashita Y et al. Cell Transplant 11: 379-84, 2002)。

また、約2gの細胞を充填できる小型人工肝臓モジュール(Yamashita Y et al. Int J Artif Organs 24: 34-40, 2001)にヒトiPS細胞由来肝細胞株を充填し培養する事で、モジュール内でのスフェロイド形成が可能か否かなどの基礎的検討を行う。また、小型還流回路を作成して、約100 ml/minの高流速還流を行い、モジュール内のスフェロイド形態が維持できるか、またヒト肝不全血漿を還流させた場合の肝機能発現(特に解毒能)の低下がないか否か、またその機能発現期間を検討する。つまり、本検討が最終段階まで達成されれば、ヒトiPS細胞由来肝細胞株を用いたハイブリッド型人工肝臓のプロトタイプが完成する事になる。

3. 研究の方法

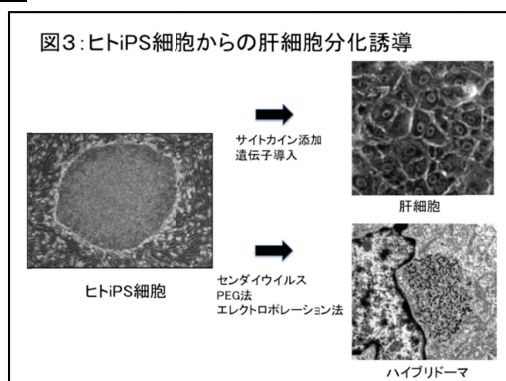
ハイブリッド型人工肝臓の細胞源となり得るヒトiPS細胞由来肝細胞株を樹立する。ヒトiPS由来肝細胞株、ヒト胎児肝細胞(Hc cells)ヒト肝芽腫株(Hep G2)ヒト高分化肝細胞癌株(Huh 7)などを三次元スフェロイド培養し、ヒト初代培養肝細胞をpositiveコントロールとして、肝特異機能(ア

ンモニア代謝能、リドカイン代謝能、肝特異遺伝子発現などを解析する。ヒト iPS 細胞とヒト初代培養肝細胞のハイブリドーマ作成が可能か否かも検討する。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞株をスフェロイド培養し、肝不全患者血漿中で培養し、スフェロイド形態が維持できるか、肝特異機能が維持できるかを確認する。In vitro での機能発現が確認できれば、小型モジュールにヒト iPS 細胞由来肝細胞株を播種してスフェロイド培養し、ヒト肝不全血漿を用いた還流実験を行い、肝特異機能発現を確認する。

【平成 25 年度】

ヒト iPS 細胞由来高分化肝細胞株の樹立(図 3)



ヒト iPS 細胞 (リプロセル社製など) を培養し、下記手法で肝細胞分化を図る。

(1) 肝細胞分化誘導剤の添加:

Activin A + BM4 + FGF2 + HGF + OSM (Song Z et al. Cell Res 2009)
High dose Activin A + HGF + OSM (Takata A et al. Int 2009)

(2) 肝細胞分化誘導遺伝子の導入 (Sendai virus または electroporation 法): SOX 17 + HEX + HNF 4A (Inamura M et al. Mol Ther 2011)

(3) 既に販売されているヒト iPS 由来高分化肝細胞株: ReproHepato Type 1 (リプロセル社製: 右下図)

(4) ヒト初代培養肝細胞とのハイブリドーマ:

センダイウイルスにより作成 (Genom ONE: 石原産業株式会社)

ポリエチレングリコール法により作成 (PEG 1500: Roche 社製)

電気融合法により作成 (ECFG 21: ネッパジーン社)

(1) - (4) で得られたヒト iPS 細胞由来肝細胞株・ヒト iPS 細胞とヒト初代培養肝細胞のハイブリドーマの肝特異機能を以下の項目で解析する (Yamashita Y et al. Int J cancer 2003)。

- ・ アルブミン分泌能 ($\mu\text{g/ml}$)
- ・ アンモニア添加/代謝能評価 ($\text{nmol}/10^6$ 細胞/day)
- ・ リドカイン代謝能 ($\text{nmol}/10^6$ 細胞/day)
- ・ 肝特異遺伝子発現 (HNF・C/EBP・ASGPR など): Real time RT-PCR、cDNA

マイクロアレイなど

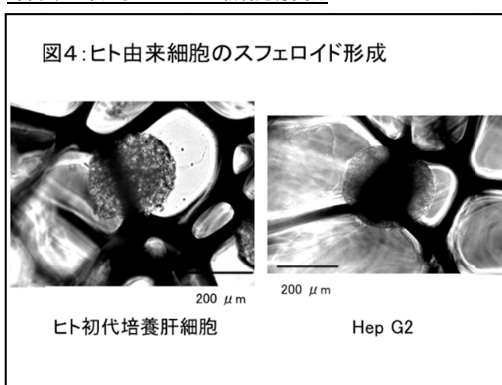
- ・ CYP 活性の検討 (CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 など)

ヒト iPS 細胞由来高分化肝細胞株の肝特異機能評価の対照として以下の細胞群を用いる。

- ・ 転移性肝癌切除症例の切除非癌組織をコラーゲナーゼ還流して得られるヒト初代培養肝細胞 (Yamashita Y et al. Cell Transplant 2002)。検体が不足する場合はラット初代培養肝細胞を用いる。独自に樹立した自殺遺伝子 HSV-tk 導入し、薬剤 (トリコスタチン A など) により肝細胞へ分化誘導させた HepG2 (Harimoto N, Yamashita Y et al. J Hepatol 2005)

【平成 26 年度】

ヒト iPS 由来肝細胞株の三次元スフェロイド培養の観察とその機能解析



我々は、ヒト初代培養肝細胞、Hep G2、Huh 7 および Hc cells が三次元スフェロイド培養可能であることを既に報告している (Yamashita Y et al. Cell Transplant 2001: 図 4)。また、ヒト初代培養肝細胞および Hep G2 は、スフェロイド形態を呈する事により、高い肝細胞特異機能を 1 ヶ月以上維持する事も報告している。

ここでは、平成 25 年の実験により決定されたハイブリッド型人工肝臓の細胞源となり得るヒト iPS 細胞由来肝細胞株 (ハイブリドーマを含む) の三次元スフェロイド培養を行い、以下の項目を検討する。

- ・ スフェロイド培養に最適な培地条件の確認: ヒト iPS 細胞由来肝細胞株培養用培地? WE 培地 \pm 10%FBS?
- ・ 肝細胞分化・機能を長期維持するための条件の設定: HGF や OSM の添加の有無など。
- ・ スフェロイド形態維持期間の検討: 位相差顕微鏡での観察。スフェロイド径の変化の評価。スフェロイド内部の細胞壊死の評価 (ホルマリン固定後 HE 染色で viability 確認)。
- ・ 肝特異機能維持期間の評価: アルブミン分泌能、アンモニア代謝能などを経時的に測定する。

ヒト肝不全血漿中でのスフェロイド形態の維持と肝特異機能発現

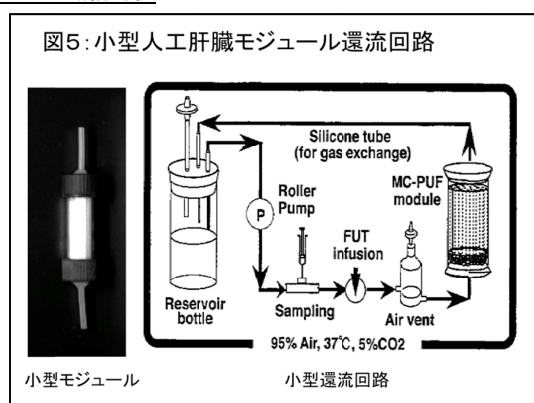
臨床応用を実現するためには、細胞培養に

としては劣悪な条件と考えられるヒト肝不全血漿中でヒト iPS 細胞由来肝細胞株がスフェロイドを形成し、かつ高い肝細胞特異機能（特に解毒能）を発現しなければならない。劇症肝炎患者や肝不全患者の血漿交換で得られたヒト肝不全血漿による in vitro 肝特異機能解析を行う。対照として、ヒト初代培養肝細胞を用いる（Yamashita Y et al. Cell Transplant 2002）。

- ・スフェロイド形態の経時的変化
- ・アルブミン分泌能（ $\mu\text{g/ml}$ ） アンモニア添加/代謝能評価（ $\text{nmol}/10^6$ 細胞/day）
- ・リドカイン代謝能（ $\mu\text{g}/10^5$ 細胞/day）
- ・CYP 活性の検討（CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 など）

【平成 27 年度】

小型モジュールを用いたヒト肝不全血漿による還流実験



小型人工肝臓モジュール（径 20 mm、高さ 60 mm、容積 18.8 cm^3 ：図 5）に 1×10^7 個のヒト iPS 細胞由来肝細胞株を充填する。先の検討で得た三次元スフェロイド培養の至適培地条件で、約 43.0 ml/min の流速でポンプを回し 24 時間還流培養してスフェロイド充填層ハイブリッド型人工肝臓プロトタイプを作成する（Yamashita Y et al, Int J Artif Organs 2001：図 5）。ヒト肝不全血漿による還流実験を行い、スフェロイド形態を維持できるか否か、肝特異機能の発現を維持できるか否かを確かめる。対照として、ヒト初代培養肝細胞を用いる（Yamashita Y et al. Cell Transplant 2002）。

- ・スフェロイド形態の経時的変化
- ・アルブミン分泌能（ $\mu\text{g/ml}$ ）
- ・アンモニア添加/代謝能評価（ $\text{nmol}/10^6$ 細胞/day）

4. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来高分化肝細胞株の樹立に関しては、その分化誘導過程の添加サイトカインに独自の工夫を施すことで、アンモニア代謝能を有するヒト iPS 細胞由来高分化肝細胞株を樹立する事に成功した。『代謝解毒能』は肝細胞が有する最も高次の機能であり、今回樹立した細胞株は将来的に肝不全治療に用いる臨床応用可能な人工肝臓を創成する際にも有力な細胞源になると考えている。

究極のハイブリッド型人工肝臓は、体外循環式ではなく、埋め込み型である。そこで、埋め込み型移植肝臓グラフトの創成を目指し、人工肝臓の scaffold として、『脱細胞鋳型肝臓』を用いる事とした。脱細胞鋳型肝臓を scaffold とした際の問題点は、臓器外壁の脆弱性と血液循環時の溶血である。そこで、ポリグリコール酸シート+フィブリン・トロンビン液を用いてラット脱細胞鋳型肝臓の外壁を強化したところ、ラット脱細胞鋳型肝臓の約 1 時間にわたる体外循環に成功した。この新しく構築した実験系を用いて、ラット脱細胞鋳型肝臓にラット初代培養肝細胞を播種・培養した埋め込み型移植肝臓グラフトのプロトタイプの評価を行い、添加アンモニアを代謝する事を確認した（2015 4th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (Boston, USA) でポスター発表）。

今後は、ラット脱細胞鋳型肝臓内でヒト iPS 由来分化肝細胞を播種・培養して埋め込み型移植肝臓グラフトのプロトタイプとしてのミニチュアヒト肝臓を創成すること、その機能解析を体外循環およびラット同所性肝移植で行う予定である。

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 2 件)

1. Yamashita YI, Yoshida Y, Kurihara T, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Shirabe K, Maehara Y. Surgical results for recurrent hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: Repeat hepatectomy vs. salvage living donor liver transplantation. Liver Transpl. 21: 961-8, 2015.
2. Yamashita YI, Imai D, Bekki Y, Kimura K, Matsumoto Y, Nakagawara H, Ikegami T, Yoshizumi T, Shirabe K, Aishima S, Maehara Y. Surgical Outcomes of Hepatic Resection for Hepatitis B Virus Surface Antigen-Negative and Hepatitis C Virus Antibody-Negative Hepatocellular Carcinoma. Ann Surgical Oncol. 22: 2279-85, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Yamashita Y. Fundamental technology for the creation of Whole Liver Engineering, and functional evaluation of recellularized liver.
1Chemical Engineering, Kyushu University, Fukuoka,

JAPAN, 2Surgery and Science, Kyushu University, Fukuoka, JAPAN.
2015 4th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress
Boston Marriott Copley Place Boston USA ポスター
proceeding: Tissue Engineering Part A.
September 2015, 21(S1): S-116-S-117. に掲載

〔図書〕(計 0 件)

〔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

1) 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター <http://www.ia-nkcc.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表

山下 洋市(Yamashita Yoichi)
国立病院機構九州がんセンター
肝胆膵外科医長
研究者番号：00404070

(2) 研究分担者

米満 吉和(Yonemitsu Yoshikazu)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：40315065

池田 哲夫(Ikeda Tetsuo)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：60585701

調 憲(Shirabe Ken)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：70264025

前原 喜彦(Maehara Yoshihiko)

九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80165662