

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670587

研究課題名(和文) iPS由来肝細胞を用いた細胞非拡散かつ取り出し可能な治療法開発

研究課題名(英文) Creation of iPS-derived Hepatocyte-based Therapeutic Modality Using Liver Micro-organoids

研究代表者

大橋 一夫(OHASHI, KAZUO)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40364062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から分化誘導させた肝細胞の臨床応用を展開するにあたり、用いる細胞を生体内で拡散させるのではなく、目的局所で限局させることが可能な治療法開発のための要素技術開発を目的とした。マイクロフルイディクスを基盤としたマイクロ流路デバイスシステムを用いて、細胞をファイバー内列状充填した直径200ミクロン以下の細径ファイバー型肝オルガノイドの作製技術を確認した。HepG2細胞またはiPS由来肝細胞等の肝細胞と非実質細胞が充填されたマイクロファイバー型肝オルガノイドにおいて、肝細胞機能を確認した。さらにこれら肝オルガノイドは動物実験において移植手技が可能であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to create several fundamental technologies that allow us to create cell-loaded transplantable devices that could be used for cell-based therapies toward liver diseases. The fundamental concept is that cells will be localized after transplantation, instead of scattering the cells after conventional cell infusion-based transplantation procedures. Hepatocytes are loaded into ultra-thin (<200micrometer in diameter) alginate micro-fibers using micro-fluidic devices and microfluidic technologies for creating liver micro-organoids. We have confirmed liver functions at considerable levels of the liver micro-organoids made of HepG2 cells or iPS-derived hepatocytes with non-parenchymal cells. We have also confirmed that the liver micro-organoids were durable for transplantation procedures on a mouse transplantation experiments.

研究分野：消化器外科 再生医療

キーワード：人工臓器学 細胞療法 組織工学 再生医療 肝細胞

1. 研究開始当初の背景

多くの重症肝病態に対応可能な先進的治療として、ドナー肝から分離される初代肝細胞を病態肝臓に門脈系を介して注入する肝細胞移植が先端革新的医療として世界約10施設で試験的に実施されてきている¹⁾。iPS肝細胞はその次世代を担う重要な細胞源であるが、腫瘍化等の課題から安全性を高く担保する治療法の開発が重要である。本研究の連携研究者水口は、アデノウイルスベクターの段階的遺伝子導入によってiPS細胞から高分化肝細胞の分化誘導系を樹立し、細胞創薬評価の実用化iPS由来肝細胞を提供している²⁾。連携研究者の山田は、マイクロ流体デバイスを用いた生体模倣組織作製分野において、世界的先駆テクノロジーを数々開発している³⁾。申請者の大橋は、Cell Transplantation Societyのアジア唯一の代表 Council memberとして、コンセンサス会議開催等を通じ肝細胞の医学利用において肝細胞評価ガイドライン確立にむけての貢献¹⁾を続けつつ、肝細胞治療研究を邁進させるとともに^{4,5)}、すでに水口・山田と共同研究を開始し、世界へ発信できる成果を挙げている²⁾。

これらの3研究を中心とする医療技術結集により、本研究においては、肝細胞を注入移植して拡散させるのではなく、生体内において移植細胞を配置を制御することで拡散を防止し、かつ、移植細胞を簡便に摘出することが可能な細胞移植治療の開発を目指す。

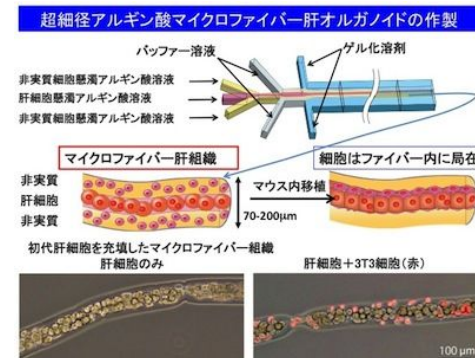
2. 研究の目的

平成26年度は、マイクロ流体デバイス技術を活用したハイドロゲルファイバー作製条件を基に、iPS肝細胞またはHepG2細胞が列状充填したマイクロファイバー肝組織体を作製する。平成27年度は、組織体作製技術をさらに改良し、機能を高めるとともに、生体内への移植手技が可能かの検証も行う。

3. 研究の方法

(1) iPS肝細胞/HepG2細胞充填-マイクロファイバー肝組織の作製

60-200 μ mの間の任意の径を有するマイクロファイバー内に、肝細胞(非実質細胞を並列配置する群も検討)を充填したマイクロファイバー肝組織を作製する。本組織体は、マイクロ流体デバイスを基盤としたマイクロ流路デバイスシステムを用いて細胞をファイバー中心に配列させることを可能とするもの(図下)で、連携研究者(山田)および申請者が中心



となり開発した技術を応用する⁷⁾。肝細胞、線維芽細胞を別々に懸濁したアルギン酸溶液、ゲル化溶剤、バッファー溶液をマイクロデバイス内へ独立して流入させることにより、iPS肝細胞を中心に列状充填したマイクロファイバーを作製する。溶液流速や回収巻き取り速度で、異なった直径を有する(60 μ m-200 μ m)マイクロファイバー肝組織を作製する。

(2) ヒトiPS細胞から肝細胞の分化誘導

アデノウイルスベクターを用いてFOXA2およびHNF1aを分化段階毎に適宜発現させ、さらに異なる増殖因子添加を用いる肝分化手法により肝細胞分化を行う。連携研究者が中心となり既に開発したものを応用する⁶⁾。iPS由来の肝細胞またはHepG2細胞を実質細胞として、また、線維芽細胞を非実質細胞として用い、下記述の手法にてマイクロファイバー肝オルガノイド組織体を作製する。

(3) マイクロファイバー癌オルガノイドの作製

膵癌細胞株と非実質細胞を用いて、上記で最適化されている条件を応用し、癌細胞と間質系細胞が列状に配置するマイクロファイバー膵癌オルガノイドを作製した。一部の実験では、DsRed染色で膵癌細胞を標識し、フ

ファイバー内の細胞配置を観察した。また、培養皿内において作製マイクロファイバー膵癌オルガノイドを培養し、抗がん剤添加実験において、細胞死滅度合いを評価した。

4. 研究成果

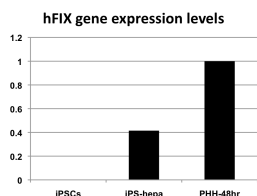
(1) マイクロファイバー肝組織作製システム



図に示すごとく、微量注入ポンプから各溶液が流入するマイクロ流路を倒立顕微鏡上におき、細胞懸濁液のアルギン酸がゲル化していく状況を随時リアルタイムで観察(下左)しながらマイクロファイバー型肝オルガノイドを作製するシステムを構築した。具体的には、ヒュージョンタッチ 100 およびヒュージョンタッチ 200(アイシス社製)の微量注入シリンジポンプを用いて、バッファー溶液・細胞懸濁液・ゲル化溶液をシリンジから倒立顕微鏡状に固定したマイクロ流路デバイス(中右)に任意の流速で注入するシステムを構築した。また、流出

するアルギン酸ゲルマイクロファイバーの自動巻き取りが

可能になるように、回転ローラーを改良して連結した。流出してくるマイクロファイバーの先端一部を引っ掛けるようにして巻き取りすることで、直径 100 μ m のマイクロファイバー組織を 4m/分の



速度で巻き取り回収することに成功した。さらに、マイクロファイバー肝組織は、ピンセットで把持できる強度を有することも確認した(図下右)。

(2) iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における肝細胞機能

用いる iPS 肝細胞の高機能化を試みた。分化誘導ステップにの肝幹前駆細胞の段階で、Ad-FOXA2 および Ad-HNF1 α を用いた遺伝子導入を行うとともに、培養液に Oncostatin M, HGF, デキサメタゾン添加して成熟肝細胞を分化誘導した。分化誘導肝細胞の機能を、血液凝固第 IX 因子の発現レベルにて評価した。iPS 細胞由来分化誘導肝細胞(図 iPS-hepa)は、初代成熟肝細胞(図の PHH)には及ばないものの、未分化 iPS 細胞(図 iPSCs)と比較して有為に高い機能発現を確認した。

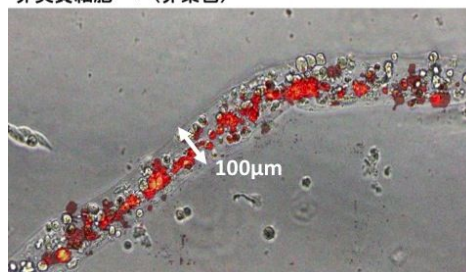
(3) 非実質細胞含有膵癌オルガノイド作製

実質細胞(肝細胞)と非実質細胞を整然とマイクロファイバー内に列状充填させる技術が確立できたことから、その意義を確認する目的で、癌細胞と非実質細胞が列状に配列する癌オルガノイドの作製を行った。

非実質細胞が豊富な癌種として、膵癌を選択し、上記[1]での各種至適条件を参考に、膵癌細胞株と膵臓間質細胞を用いてマイクロファイバー膵癌オルガノイドを作製した。

膵癌+非実質細胞混合癌オルガノイドの作製

膵癌細胞 ⇒ (DsRed, 赤色標識)
非実質細胞 ⇒ (非染色)



引用文献

1. Puppi J, Ohashi K, et al. *Cell Transplantation* 21:1-10, 2012.

2. Takayama K, Ohashi K, Mizuguchi H, et al. *Development*, 141: 91-100, 2014.
3. Yamada M, Ohashi K, et al. *Biomaterials* 33: 8304-8315, 2012.
4. Ohashi K, et al. *Nature Medicine* 13: 880-885, 2007.
5. Kim-K, Ohashi K, et al. *Biomaterials* 33:1406-1413, 2012.
6. Takayama K, Mizuguchi H, et al. *Mol Ther* 2012.
7. Yamada M, Ohashi K, et al. *Biomaterials* 33:8304-8315, 2012.

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8件)

Nagamoto Y, Takayama K, Ohashi K, Okamoto R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Enhancement of survival rate by human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation in acute liver failure mice. *J Hepatol*, 64: 1068-1075, 2016.

土谷博之、大橋一夫 アルコール性高ホモシステイン血症に対する核内受容体SHP欠損による抑制作用 日本アルコール・薬物医学会雑誌 2016, in press.

Yahashita S, Ohashi K, Utoh R, Okano T, Yamamoto M. Human laminin isotype coating for creating islet cell sheets. *Cell Medicine*, 8: 39-46, 2015.

Hanayama H, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Sakurai F, Mizuguchi H, Tsuchiya H, Okano T, Gotoh M. Efficient gene transduction of dispersed islet cells in culture using fiber-modified adenoviral vectors. *Cell Medicine*, 8: 31-38, 2015.

Iizuka S, Sakurai F, Shimizu K, Ohashi K, Nakamura S-I, Tachibana M, Mizuguchi H. Evaluation of transduction properties of an adenovirus vector in neonatal mice. *Biomed Res Int* ID68374, 2015.

Takayama K, Kawabata K, Inamura M, Ohashi K, Nagamoto Y, Okuno H, Yamaguchi Y, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda-MF, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines hepatoblast fate decision. *Development* 141: 91-100, 2014.

〔学会発表〕(計15件)

吉田諭、大橋一夫、他 テイラーメイド膵島分離実現に向けたコタグナーゼサブタイプGの対象基質の検証 第43回日本膵・膵島移植研究会 2016 3月広島市、広島
Ohashi K, Yamashita S, Utoh R, Tsuchiya H, Yamamoto M. Hepatocyte transplantation for the assessment of hepatocyte proliferation and their streaming.

2015 IPITA+CTS+IAX Jint Meeting, 2015 11月,メルボルン、オーストラリア
Ohashi K, Kuge H, Kosai K-I, Tsuchiya H. Therapeutic effects of ectopic liver tissue engineering on lethal acute liver failure in mice. 2015 IPITA+CTS+IAX Jint Meeting, 2015 11月,メルボルン、オーストラリア

Ohashi K. Hepatocyte; A cell source for liver regeneration and liver organogenesis. 2015 IPITA+CTS+IAX Jint Meeting, 2015 11月,メルボルン、オーストラリア

Iizuka S, Sakurai F, Shimizu K, Tachibana M, Ohashi K, Mizuguchi H. Evaluation of transduction properties of an adenovirus vector in neonatal mice. 第21回日本遺伝子治療学会学術集会 2015 7月 大阪市、大阪
大橋一夫 次世代治療としての生体内肝組織構築(肝組織工学)開発の現状と展望 第22回肝細胞研究会 レビュー 2015 6月, 米子市、鳥取

〔図書〕(計2件)

大橋一夫 肝細胞移植 医学大辞典 南山堂 pp441, 2015.

大橋一夫 人工肝臓 医学大辞典 南山堂 pp1216, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称:複合型肝細胞組織体およびその作製方法

発明者:山田真澄、関実、山田理恵、大橋一夫、大和雅之、岡野光夫

権利者:国立大学法人千葉大学、大橋一夫

種類:

番号:特願 2011-123856

取得年月日:平成 28年 4月 12日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋一夫 (OHASHI, Kazuo)

大阪大学・薬学研究科・特任教授

研究者番号: 40364062

(2)連携研究者

水口 裕之 (MIZUGUCHI, Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号: 50311387

(3)連携研究者

山田 真澄 (YAMADA, Masumi)

千葉大学・工学研究科・准教授

研究者番号: 30546784