

令和元年8月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05489

研究課題名(和文) iPS細胞由来自己細胞と脱細胞化肝臓を用いた移植可能人工肝臓作製に関する研究

研究課題名(英文) Development of the transplantable artificial liver using iPS cells and decellularized liver

研究代表者

安近 健太郎 (Yasuchika, Kentaro)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00378895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの生来肝臓由来の脱細胞化組織を用いて移植可能な人工肝臓の作製を行った。まず肝臓の脱細胞化組織と初代培養細胞を用いて細胞の生着方法、培養方法などのプロトコルと評価系を確立した。次に、ヒトiPS細胞より分化させた肝細胞様細胞を用いて肝臓の組織学的な構造を再現し、さらに基本的な肝細胞機能を評価した。また、肝臓だけでなく、小腸においても同様の方法を用いて移植可能な人工小腸を作製した。小腸の欠損部にラット小腸の脱細胞化組織を用いたところ、脱細胞化組織を足場に小腸壁の再生が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植医療において、ドナー不足は深刻な課題である。様々な代替医療の研究が進む中、移植可能な人工肝臓の作製は、課題を解決する方法として、最も理想的な手段であるが実現には多くの困難を伴う方法でもある。脱細胞化組織や自己の組織から作製するiPS細胞を用いることで、移植可能でかつ拒絶反応のない理想的な臓器を作製することが理論的に可能となる。今回、ヒトiPS細胞から肝細胞様細胞へ分化誘導した後に脱細胞化組織の中で培養し、肝臓組織の一部の組織構造や機能を再現したことを示した。今後は、肝不全の患者を救命できるだけの十分な機能と組織構造を有する肝臓を作製できるよう、さらなる技術開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We produced a transplantable bio-artificial liver using the decellularized tissue derived from rat native liver. First, we established a protocol and evaluation system such as cell engraftment method and culture method for decellularized tissue of liver and primary culture cells. Next, the basic structure of the liver was reproduced using hepatocyte-like cells differentiated from human iPS cells, and the fundamental hepatocyte function was evaluated. Moreover, not only in the liver but also in the small intestine, a transplantable artificial small intestine was developed using the same method. When decellularized tissue of the rat small intestine was used at the defect site of the small intestine, regeneration of the small intestine wall was observed with the decellularized tissue as a scaffold.

研究分野：再生医学

キーワード：臓器作製 幹細胞生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器に界面活性剤を還流すると細胞成分のみが除去され Extracellular matrices(ECM)が3次元構造を保持したまま残存する(脱細胞化)。その3次元ECMを足場として新たな細胞を注入し定着させることで(再細胞化)臓器を再構築させる事ができる。2010年、肝臓において脱細胞化および再細胞化した肝臓をin vitroで作成することに成功したという報告がハーバード大学よりなされた。この技術は以下の3段階に分ける事ができる。

1. Decellularization(脱細胞化) 2. Recellularization(再細胞化) 3. Implantation(移植)

本技術は世界中で改良がなされたが、それらのプロトコールには、細胞のviabilityが低い、あるいは門脈内の血栓により十分な血流を還流できないなどの問題点があったが、2013年よりプロトコールの改良(細胞の注入を門脈から胆管へ変更するなど)を重ねることで、徐々に改善されてきた。しかし、未だ残された問題点として、再細胞化する為の細胞源の不足が挙げられる。成熟肝細胞や胎児肝細胞などの初代培養細胞を用いることは、ヒトへの臨床応用を考えた場合、現実的に極めて困難と考えられる。最終目標は、肝不全の患者に対してin vitroで作製した臓器を移植することであり、その場合の問題点である、細胞の安定的な供給と拒絶反応を考慮すると、細胞供給源としてのiPS細胞は有望な細胞源である。

2. 研究の目的

ヒトiPS細胞より分化させた肝細胞、血管内皮細胞などを用いて肝臓の組織学的な構造を再現し、さらに基本的な肝細胞機能をin vitroの系で評価する。

3. 研究の方法

ラット肝臓に界面活性剤を還流させることで、細胞成分を除去し、細胞外基質のみを残存させることで細胞化肝臓を作製し、人工肝臓の鋳型とする。また、細胞源としてのヒトiPS細胞は、分化誘導した後に、脱細胞化肝臓へ生着させることで、再細胞化肝臓を作製する。再細胞化した肝臓については、組織学的評価と生理学的機能評価を行う。

4. 研究成果

ラット生体肝臓を脱細胞化して肝臓の3次元scaffoldを作製する技術に加え、マウス胎児肝細胞を回収し増速させて純度の高い初代胎仔肝細胞を得る技術を応用して、成体肝細胞を脱細胞化した肝臓(3D scaffold)へ注入すると共に、再細胞化した肝臓を循環培養する実験を進めた。まず、脱細胞化・再細胞化プロトコールの最適化を目的に、再細胞化した肝臓のviabilityとfunctionの評価を行い、細胞懸濁液の濃度、注入する際の至適プロトコールを調整のうえ、注入する細胞数や条件を適正化した。その過程において、従来は主流であった経門脈的再細胞化よりも経胆管的再細胞化において優位に高い生着率が得られ、かつ生着した細胞のviabilityも高いことを確認した。また、再細胞化した肝臓組織に培養液を環流しながら培養する、いわゆる循環培養のプロトコールについて、ポンプの設定、気泡の除去方法、培養液の組成、循環させる流量などを改良してきた。これらの試行錯誤を通じて、再細胞化肝臓作製における細胞源として胎児肝細胞が有用であること、また再細胞化における細胞注入の経路は胆管が適していることを示した。

Sinusoidの構造を詳細に再現することを目的として、肝細胞と類洞内皮細胞を用いて再細胞化を行った。内皮細胞は、血管構造を裏打ちするように、一層で隙間なく配列し、より生体肝臓に近い組織像を得ることができた。また、肝細胞との共培養となることで、肝細胞機能も上昇することが示された。

ヒトiPS細胞の分化誘導について、分化誘導方法のプロトコールを確定した。ラット肝臓より作製した脱細胞化肝臓組織に、分化誘導した肝細胞様細胞をもちいて再細胞化し、培養液を門脈より循環させることで、in vitroにて48時間培養した。この再細胞化肝臓の組織像と機能を評価した。再細胞化肝臓において、肝実質腔内に肝細胞が整然と配列され、viabilityも保っていることが確認された。また、免疫染色にてアルブミン、フェトプロテイン、Cyp3a4などの肝細胞に特徴的なマーカーの発現を確認でき、RT-PCRにて同様のマーカー発現を確認できた。培養液中にはヒト・アルブミンを検出することができ、以上の成果を論文として報告した。

次に、脱細胞化組織を用いた再生研究を肝臓だけでなく小腸にも応用することを試みた。ラットの腸を脱細胞化し、まずは生体ラットの腸壁の一部を切除し、脱細胞化組織をパッチとして修復する方法を用いた。その後、腸を切離して、脱細胞化組織を管腔のまま小腸に端々吻合することで小腸の再生を試みた。手術後に一定期間を経てサンプルを回収して観察したところ、脱細胞化組織内には生体の腸より平滑筋が徐々に延伸している像を得ることができた。また、神経細胞のマーカーで染色した

ところ、神経も平滑筋に沿って脱細胞化組織内へ延伸している所見を得ることができた。脱細胞化組織を用いることで、肝臓のみならず小腸の再生にも有効である可能性を示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1 . The Protective Effect of Transplanting Liver Cells Into the Mesentery on the Rescue of Acute Liver Failure After Massive Hepatectomy.

Kita S, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kawai T, Yasuda K, Fukumitsu K, Mizumoto M, Uemoto S.

Cell Transplant. 2016;25(8):1547-59. doi: 10.3727/096368916X690999. Epub 2016 Feb 15.

2 . SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma.

Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Komori J, Hatano E, Kawaguchi Y, Uemoto S.

Sci Rep. 2016 Jul 26;6:30489. doi: 10.1038/srep30489.

3 . Identification of Keratin 19-Positive Cancer Stem Cells Associating Human Hepatocellular Carcinoma Using 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography.

Kawai T, Yasuchika K, Seo S, Higashi T, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Nakamoto Y, Hatano E, Uemoto S.

Clin Cancer Res. 2017 Mar 15;23(6):1450-1460. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0871. Epub 2016 Sep 23.

4 . Efficient recellularisation of decellularised whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes.

Ogiso S, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Kojima H, Miyauchi Y, Yamaoka R, Komori J, Katayama H, Kawai T, Yoshitoshi EY, Kita S, Yasuda K, Uemoto S.

Sci Rep. 2016 Oct 21;6:35887. doi: 10.1038/srep35887.

5 . Generation of non-viral, transgene-free hepatocyte like cells with piggyBac transposon.

Katayama H, Yasuchika K, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Kawai T, Yukie Yoshitoshi E, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Fukumitsu K, Komori J, Ishii T, Uemoto S.

Sci Rep. 2017 Mar 15;7:44498. doi: 10.1038/srep44498.

6 . Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs.

Yoshitoshi-Uebayashi EY, Toyoda T, Yasuda K, Kotaka M, Nomoto K, Okita K, Yasuchika K, Okamoto S, Takubo N, Nishikubo T, Soga T, Uemoto S, Osafune K.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 May 6;486(3):613-619. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.037. Epub 2017 Mar 14. Erratum in: Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jul 1;488(3):570-571.

7 . A novel three-dimensional culture system maintaining the physiological extracellular matrix of fibrotic model livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma cells.

Miyauchi Y, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Ogiso S, Minami T, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Kawai T, Yoshitoshi-Uebayashi EY, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Uemoto S.

Sci Rep. 2017 Aug 29;7(1):9827. doi: 10.1038/s41598-017-09391-y.

8 . Identification of keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using CYFRA 21-1.

Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Minami T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Fukumitsu K, Hatano E, Uemoto S.

Cancer Med. 2017 Nov;6(11):2531-2540. doi: 10.1002/cam4.1211. Epub 2017 Sep 30.

9 . CD90 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with lymph node metastasis and poor prognosis.

Yamaoka R, Ishii T, Kawai T, Yasuchika K, Miyauchi Y, Kojima H, Katayama H, Ogiso S, Fukumitsu K, Uemoto S.

J Surg Oncol. 2018 Sep;118(4):664-674. doi: 10.1002/jso.25192. Epub 2018 Sep 9.

10 .Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold.

Minami T, Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ogiso S, Miyauchi Y, Kojima H, Kawai T, Yamaoka R, Oshima Y, Kawamoto H, Kotaka M, Yasuda K, Osafune K, Uemoto S.
Regen Ther. 2019 Mar 30;10:127-133. doi: 10.1016/j.reth.2019.03.002. eCollection 2019 Jun.

〔学会発表〕(計 件)

1 .Satoshi Ogiso, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Hidenobu Kojima, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Elena Yukie Yoshitoshi, Sadahiko Kita, Katsutarō Yasuda, Shinji Uemoto
Biliary tree as a window for repopulation of the decellularized liver scaffold.
26th International congress of the transplantation Society、2016年08月20日

2 .Satoshi Ogiso, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Hidenobu Kojima, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Sadahiko Kita, Shinji Uemoto
Optimizing recellularization of decellularized whole-liver graft: from which route and with which cell?
The American College of Surgeons 102nd Clinical Congress、2016年10月19日

3 .Hidenobu Kojima
Approaches to fabricate practical recellularized liver graft using primary liver cells-our seeding method for optimal distribution of parenchymal and endothelial cells-、
52nd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)、2017年

4 .Hidenobu Kojima
Alternative usage of recellularized liver graft as clinical application
15th Transplantation Science Symposium (TSS)、2017年、
5 .Hidenobu Kojima
Promising application for drug screening with recellularized whole-liver scaffold
103rd Annual American College of Surgeons (ACS) Clinical Congress、2017年

6 .小島秀信
生体への応用を目指した再細胞化肝臓の構築 実質細胞と内皮細胞の再細胞化法
第117回日本外科学会定期学術集会、2017年

7 .小島秀信
脱細胞化小腸グラフトを使用した、生体内での小腸再生の試み
第30回日本小腸移植研究会、2018年

8 .Hidenobu Kojima
Vascularization of recellularized liver graft
8th International Forum of Liver Surgery、2018年

9 .小島秀信
再細胞化肝臓における内皮化の効果
第54回肝臓学会総会、2018年

10 .Hidenobu Kojima
Endothelialized liver scaffold-the impact of endothelial cells on recellularized liver-
第30回肝胆膵外科学会・学術集会、2018年

11 .Hidenobu Kojima
Impact of endothelial cells on the engineered liver recellularized with primary rat hepatocytes
13th IHPBA World Congress、2018年

12 . Yuya Miyauchi, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Satoshi Ogiso, Hidenobu Kojima, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Hokahiro Katayama, Elena Y Yoshitoshi, Sadahiko Kita, Katsutarō Yasuda, Naoya Sasaki, Takamichi Ishii, Junji Komori, Shinji Uemoto
A novel three-dimensional culture system, decellularized-tissue obtained from cirrhotic livers, enhances an epithelial-mesenchymal transition phenotype in HCC cells
American college of Surgeons clinical congress、2017 年

13 . Yuya Miyauchi, Kentaro Yasuchika Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Hidenobu Kojima, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Satoshi Ogiso, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Shinji Uemoto
A novel culture system preserving natural scaffolds of fibrotic livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma
Cells
The Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single topic Conference on HCC、2018 年

14 . 宮内雄也 石井隆道 河合隆之 川本浩 大島侑 南貴人 小島秀信 山岡竜也 小木曾聡 福光: 剣 岡島英明 海道利実 上本伸二
細胞外基質による微小環境は肝細胞癌の不均一性に寄与する
肝癌研究会、2018 年

15 . 南 貴人、宮内 雄也、小島 秀信、大島 侑、川本 浩史、山岡 竜也、河合 隆之、上林エレナ幸江、安田 勝太郎、福光 剣、石井 隆道、上本 伸二
ヒト iPS 由来肝細胞様細胞とラット脱細胞化肝臓骨格を用いた臓器作製
第 20 回日本異種移植研究会、2018 年

16 . Hidenobu Kojima, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Shinji Uemoto
Vascularization of recellularized liver graft
8th International Forum of Liver Surgery、2018 年

17 . Hidenobu Kojima, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Shinji Uemoto
Impact of endothelial cells on the engineered liver recellularized with primary rat hepatocytes
13th IHPBA World Congress、2018 年

18 . Hidenobu Kojima, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Shinji Uemoto
Endothelialized liver scaffold-the impact of endothelial cells on recellularized liver-
第 30 回日本肝胆膵外科学会学術集会、2018 年

19 . 小島秀信、石井隆道、福光 剣、大島 侑、川本浩史、南 貴人、宮内雄也、山岡竜也、河合隆之、上本伸二
再細胞化肝臓における内皮化の効果、第 54 回肝臓学会総会、2018 年

20 . 小島秀信、石井隆道、福光 剣、小木曾 聡、友藤克博、伊藤 孝、大島 侑、川本浩史、南 貴人、宮内雄也、上本伸二
脱細胞化骨格を用いた肝臓再生の試み、第 21 回日本異種移植研究会、2019 年

21 . 南 貴人、宮内 雄也、小島 秀信、大島 侑、川本 浩史、山岡 竜也、河合 隆之、上林 エレナ 幸江、安田 勝太郎、福光 剣、石井 隆道、岡島 英明、海道 利実、上本 伸二
ヒト iPS 由来肝細胞様細胞とラット脱細胞化肝臓骨格を用いた臓器作製、第 20 回日本異種移植研究会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hbptsurgery.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>大学院について/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：上本伸二

ローマ字氏名：Shinji Uemoto

所属研究機関名：京都大学 肝胆膵・移植外科

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40252449

研究分担者氏名：石井隆道

ローマ字氏名：Takamichi Ishii

所属研究機関名：京都大学 肝胆膵・移植外科

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：70456789

研究分担者氏名：福光剣

ローマ字氏名：Ken Fukumitsu

所属研究機関名：京都大学 肝胆膵・移植外科

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：70700516

研究分担者氏名：河合隆之

ローマ字氏名：Takayuki Kawai

所属研究機関名：京都大学 肝胆膵・移植外科

部局名：医学部

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：00813867

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。