

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390334
 研究課題名（和文） ヒト ES 細胞の肝細胞分化誘導とそのバイオ人工肝臓システムへの応用
 研究課題名（英文） Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and its application to the development of a bioartificial liver system
 研究代表者
 田中 紀章（TANAKA NORIAKI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：10127566

研究成果の概要：

肝臓は人体の中で最大の実質臓器であり、その機能は糖質、蛋白質、脂肪の代謝を始めビリルビン代謝、薬物代謝、血液凝固因子の生成など多岐にわたり、未知な機能を含めると肝臓の機能は数百にもものぼり、生体において非常に重要な役割を果たしている。長期に及ぶ慢性肝臓疾患はいうまでもなく、例えそれが一時的なものであれ、重篤な肝臓疾患は患者の生命にとって極めて危険である。よって、生きた細胞のエネルギーを利用したハイブリッド式バイオ人工肝臓補助装置を開発することは重要な医学的課題である。そこで、当該治療用の細胞ソースを新たに開発するため、ES細胞に注目し、その肝細胞への分化誘導法の開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工臓器学

1. 研究開始当初の背景

(1) 重篤な肝疾患に対して、肝臓移植が最も効果的であることは事実であるが、深刻なドナー不足といった問題がある。一方で、肝臓は旺盛な再生能を有しているため、肝臓が急激に傷害を受けたとしても、1週間程何らか

の手法で肝機能を代替することができれば肝臓は回復し患者は復活する。現在、本邦における C 型肝炎感染者数は 200 万人、B 型肝炎の患者数は約 150 万人（中国では 1 億 3 千万人）である。特に C 型肝炎の合併症により本邦では年間約 9,000 人が死亡し、2010 年ま

で死亡数は3倍に跳ね上がると予測されている(日経サイエンス、2004年2月号)。従って、肝不全対策は国内外において、医療上の緊急課題である。

(2)そこで期待されているのがバイオ人工肝臓システム(bioartificial liver: BAL)の開発である。BALの細胞ソースとしてブタ肝細胞がこれまで臨床試験されたが(Ann Surg 239: 660, 2004)、ブタ内因性レトロウイルスがヒト細胞へ感染することが証明され、こうした異種細胞を用いた治療が懸念されるようになった。

これまで、我々は、正常ヒト肝臓細胞を可逆的に増殖誘導することで大量の細胞を調達してBALのソースとするべく、各種ヒト細胞株の作成に努めてきた(Science 287: 1258, 2000、Nat Biotechnol 23: 1274, 2005、特許第3454818号: 肝臓細胞の増殖方法、該方法により得られる肝臓細胞、およびその用途、特許第3609395号: 哺乳類の不死化肝臓細胞)。これは、組み換えレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術に基づくものであった。重症免疫不全症患者に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療で、白血病が発症した事実を鑑み(Science 302: 415, 2003)、BALの細胞ソースとして、より自然な形に近い細胞源が重要と考えるに至った。

(3)そこで、遺伝子改変を伴わないより自然な形での肝細胞の調達が必要と考え、胚性幹細胞(ES細胞)に注目した。マウスES細胞を肝細胞成長因子(HGF)と細胞接着性スーパーシートを組み合わせることで、肝細胞への分化誘導に成功した(Nat Biotechnol 24: 1412, 2006)。現在、文部科学省からヒトES細胞研究(課題名: ヒト胚性幹細胞の肝細胞

への分化誘導およびその体外式バイオ人工肝臓への応用に関する基礎的研究)の承認を受けているため、実験の執行に関しては国の指針に則したものであった。

2. 研究の目的

再現性のある信頼できるES細胞から機能的な肝細胞(以下ES-Hep細胞と略す)の分化誘導法を開発することを目的とした。当該成果は、①実験試料として利用、②医薬品開発へ応用、③再生・移植医療へ応用することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、2年間で以下の項目を検討した。

(1)ヒトES細胞の肝細胞分化の促進のためのツールの開発

我々がこれまで作成してきた3種類のヒト肝臓細胞株(ヒト肝星細胞株TWNT-1(寄託番号BP-7843)、ヒト肝類洞内皮細胞株TMNK-1(寄託番号BP-7340)、ヒト胆管細胞株MMNK-1(寄託番号BP-8126))の馴化培地中の各種成長因子やサイトカインの検索を行った。

(2)肝擬似基底膜の作成

ヒトES細胞の肝細胞への分化誘導を促進するために、ラミニン10を産生する肝擬似基底膜の作成に取り組んだ。我々が独自に作成した不死化ヒト肝細胞株CYNK-1を使用した。

(3)ヒトES細胞の肝細胞分化に関わる遺伝子の解析のための手法の開発

ヒトES細胞の肝細胞への分化誘導に伴うプロスペクティブな因子を同定するために、DNAチップ作動装置SPBIO・CRBIOIIE、DNAチ

ップ読み取り装置 FMBIO III・Luminex、発現データ解析ソフトウェア DNASIS Pro（日立株式会社製）の操作方法を熟知した。

(4) ヒト ES 細胞の胚様体形成

細胞密度、培養液を検討し、ヒト ES 細胞から機能的な胚様体の形成が 2 日間で可能となった。

(5) ヒト ES 細胞から胚性内胚葉の形成

ヒト ES 細胞から、胚様体を 2 日間形成させた後に、Activin-A と bFGF にて胚性内胚葉への分化誘導を行った。各種遺伝子の発現を RT-PCR 法や real-time PCR 法にて検証した。

(6) ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導

肝細胞成長因子 HGF と DMSO (dimethyl sulfoxide) を使用することで、胚性内胚葉へ分化誘導したヒト ES 細胞を ES-Hep 細胞へと分化誘導した。肝細胞成長因子 HGF の至適濃度を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞から、胚様体を 2 日間形成させた後に、Activin-A (100 ng/ml) と bFGF (100 ng/ml) を培養液に添加することで 3 日間培養し Definitive endoderm への分化誘導を行った。その後、肝細胞成長因子 HGF (100 ng/ml) と 1% DMSO にて 8 日間培養し、最後に 3 日間デキサメサゾンを追加することで肝細胞への分化誘導を施行した。経時的に、RNA を抽出して Oct3/4、Nanog、Sox17、Albumin (アルブミン)、AFP (アルファ胎児性蛋白)、CF VII (第 7 血液凝固因子)、ASGPR (アシアロ糖蛋白レセプター) の発現を検討した。内因性コントロールとして GAPDH を使用した。

上記分化誘導法にて、未分化マーカーである Oct3/4、Nanog の発現は減少し、Albumin、

CF VII、ASGR1 の発現の上昇が認められた。特に、ASGPR の発現が認められることから蛋白発現が認められれば、ASGR1 陽性細胞のみを選択的に回収することができる。今後の ES-Hep 細胞研究に大いに有効なデータを得た。

(2) 我々が独自に作成した不死化ヒト肝細胞株 CYNK-1 を使用することで、ラミニン 10 を産生する肝擬似基底膜を作成した。

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 7 件)

- ① Kobayashi, N: Life support of artificial liver: development of a bioartificial liver to treat liver failure. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery 16: 113-117, 2009. 査読有
- ② 小林直哉: 肝臓の再生医療. 総合臨牀 58: 79-85, 2009. 査読無
- ③ 小林直哉: 胚性幹細胞に着目したバイオ人工肝臓の開発の試み. 肝胆膵 57: 467-477, 2008. 査読無
- ④ 小林直哉: 肝臓領域から iPS 細胞と肝疾患. 再生医療 7: 188-192, 2008. 査読無
- ⑤ Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Kobayashi N: Hepatocyte transplantation; a step forward. Current Opinion in Organ Transplantation 12: 652-658, 2007. 査読有.
- ⑥ 小林直哉: 肝臓と再生医療. Medical Science Digest 33: 1264-1267, 2007. 査読無

- ⑦ 小林直哉: 臨床応用を目指したバイオ人工肝臓の開発. Medical Science Digest 33: 1025-1028, 2007. 査読無

[学会発表] (計 12 件)

- ① 小林直哉: バイオ人工肝臓の開発. 第 8 回日本再生医療学会総会, 2009 年 3 月 6 日, 東京都.
- ② 小林直哉: ES細胞を用いたバイオ人工肝臓. 第 46 回日本人工臓器学会大会, 2008 年 11 月 29 日, 東京都.
- ③ 中路修平: バイオ人工肝臓モジュール技術を応用した高密度細胞培養モジュールの検討. 第 46 回日本人工臓器学会大会, 2008 年 11 月 29 日, 東京都.
- ④ 小林直哉: 人工肝臓. 第 46 回日本人工臓器学会大会, 2008 年 11 月 28 日, 東京都.
- ⑤ 小林直哉: 肝臓疾患とiPS細胞. 第 35 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会, 2008 年 11 月 23 日, 東京都.
- ⑥ 小林直哉: ES細胞、iPS細胞に着目したバイオ人工臓器の開発. 第 2 回移植医療のための次世代テクノロジー交流会, 2008 年 9 月 19 日, 大阪市.
- ⑦ Kobayashi N: Treatment of liver failure with a newly developed bioartificial liver using tightly regulated clonal human hepatocytes. The 6th Catholic International Stem Cell Symposium, June 20, 2008, Seoul, Korea.
- ⑧ 小林直哉: ヒト胚性幹細胞の肝細胞への分化誘導と細胞治療への応用. 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008 年 5 月 15 日, 長崎市.
- ⑨ 小林直哉: バイオ人工肝臓を使用した次世代肝不全治療技術の開発. 第 69 回日本臨床外科学会総会, 2007 年 11 月 29 日, 横

浜市.

- ⑩ 小林直哉: ヒトES細胞と再生医療. 第 34 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会, 2007 年 11 月 16 日, 札幌市.
- ⑪ Kobayashi N: A newly developed bioartificial liver using cell culture and material technologies. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs, October 29, 2007, Osaka, Japan.
- ⑫ 小林直哉: 肝不全の新しい治療技術としてのバイオ人工肝臓の開発. 第 32 回日本外科系連合学会学術集会, 2007 年 6 月 22 日, 東京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 紀章 (TANAKA NORIAKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 10127566

(2) 研究分担者

小林 直哉 (KOBAYASHI NAOYA)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 10325102
山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 40379730
加藤 順 (KATO JUN)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 90379743

(3) 連携研究者

近藤 英作 (KONDO EISAKU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准

教授

研究者番号：30252951

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

持立 克身 (MOCHITATE KATSUMI)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・上席研究員

研究者番号：20132863

(4) 研究協力者

Jane Lebkowsky

米国 ジェロン社・副社長

Ira J. Fox

米国 ネブラスカ州立大学医療センター・教授

中西 徹 (NAKANISHI TORU)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：30243463

横井 毅 (YOKOI TSUYOSHI)

金沢大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：70135226

片山 浩 (KATAYAMA HIROSHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：90161067

赤須弘幸 (AKASU HIROYUKI)

クラレメディカル株式会社・商品開発部

江尻洋子 (EJIRI YOKO)

クラレメディカル株式会社・商品開発部