

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10023

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来バイオ人工肝臓のin vivo performanceの検討

研究課題名(英文) Examination of in vivo performance of human iPS-derived bioartificial liver

研究代表者

白水 泰昌 (SHIROUZU, Yasumasa)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：20279186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を、無血清培地で均一な肝前駆細胞へと効率的に分化誘導を行うことに成功した。この肝前駆細胞は、さらに成熟した肝細胞への分化が可能であった。さらに、このヒトiPS細胞由来肝前駆細胞を単細胞として冷凍保存する技術を工夫することで、解凍後の細胞生存率が大幅に向上した。この方法を応用して、polyvinyl alcoholにて細胞を包埋冷凍することによるバイオ人工肝の作成を行った。このバイオ人工肝を解凍ゲル化した際の死細胞を減少させることに成功し、移植実験への応用が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in the highly efficient differentiation of human pluripotent stem cells to the hepatic progenitor cells under the chemically defined condition, which were able to differentiate to the mature hepatocytes. Moreover, freezing them as dissociated cells made the cell viability after thawing improved substantially. This technique was applied to making bioartificial liver, which had the hepatic progenitor cells in freezed polyvinyl alcohol. The bioartificial liver therefore could have the more viable cells, and the application to the transplantation experiment was made possible.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 バイオ人工肝

## 1. 研究開始当初の背景

急性肝不全は、代謝障害による血液凝固障害や脳症を発症し、高率に死に至る広範肝細胞壊死の状態である。ウイルス感染や薬剤、自己免疫性肝炎等がその原因となる。現在、肝臓移植がその根治療法として確立しているが、脳死ドナー不足は深刻で、特に日本では生体肝移植に頼るところが大きい(1, 2)。一方、肝細胞移植は、代謝性肝疾患だけでなく急性肝不全に対する有効な治療法として、その有効性が報告されている。患者への負担が少なく、繰り返しの移植も可能である一方、大量のドナー細胞獲得の必要性和ヒト肝細胞の限定的な増殖能により、長期にわたって移植細胞が機能することは稀とされ、現時点では広く普及するに至っていない(3, 4)。細胞をカプセル化することは、移植細胞を移植部位にとどめ置き分散することを防ぎと同時に、その回収を容易にし、宿主免疫系からの隔離効果も期待される。我々のグループはバイオ人工臓作製のための臍島細胞塊のカプセル化技術を開発考案し、これまで改良を重ねてきた。basic fibroblast growth factor (bFGF)を用いた血管新生誘導デバイスの応用により皮下移植に成功(5, 6)し、さらにその強力な免疫隔離作用を応用して異種臍島移植の成功を報告した(7, 8)。近年はより安定した強固なデバイスの開発を目指して polyvinyl alcohol (PVA)溶液の凍結・解凍によるゲル化を用いたシート型のバイオ人工臓の開発に取り組み、その効果を報告している(9, 10)。

embryonic stem cell (ESC)及び induced pluripotent stem cell (iPSC)は、in vitro で無限に増殖することができ、全ての種類の体細胞へと分化することが可能な、魅力的な donor source となる可能性を秘めた細胞である(11, 12)。ESC 及び iPSC を in vitro で肝細胞へと分化誘導する技術は、ここ数年で著しく進歩し、機能的にも優れた成熟肝細胞の誘導精製が報告されている(13, 14)。ヒト iPSC を臨床応用する上で最も大きな障壁の一つが、移植細胞の腫瘍化である。ヒト iPSC 由来細胞をカプセル化し、レシピエント体内で安定して局所にとどめおくことは、細胞の transformation による局所浸潤・遠隔転移を防ぎ、またグラフト機能不全時には容易にカプセル化細胞塊を摘出することができ、大変有用である。

## 2. 研究の目的

ヒト iPSC を source として肝前駆細胞を分化誘導した後、マクロカプセル化を行ってバイオ人工肝を作製する。in vitro でバイオ人工肝の機能評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト iPSC の培養

ヒト iPSC (HPS0014 RIKEN 2F)を matrigel coating dish 上で、NutriStem 培地を用いて

feeder free culture で継代する。

(2) ヒト iPSC の肝前駆細胞への分化誘導 matrigel coating 48 well plate に  $0.5 \times 10^5$ /well で細胞播種し、播種翌日から以下の schedule にて肝前駆細胞への分化誘導開始。

Day 0-1: CHIR99021  $3 \mu\text{M}$

Day 0-4: Activin A 50 ng/ml

Day 4-8 BMP4 20 ng/ml

Day 8-20: HGF 20 ng/ml

(3) ヒト iPSC 由来肝前駆細胞の評価 分化誘導開始後 10・15・20 日目で細胞を回収し、RT-PCR・免疫細胞染色・フローサイトメトリーにて遺伝子及びタンパク発現を評価する。

(4) ヒト iPSC 由来肝前駆細胞の凍結保存とバイオ人工肝の作成

ヒト iPSC 由来肝前駆細胞を Stem Cell Banker (Takara Bio Inc.)を用いて凍結保存し、解凍後に細胞 viability を評価する。また、PVA 溶液にヒト iPSC 由来肝前駆細胞を包埋し凍結後再解凍しゲルを補強してバイオ人工肝を作製し、その viability を評価する。

## 4. 研究成果

(1) ヒト iPSC から肝前駆細胞への分化誘導 上記プロトコールにて、feeder free culture condition から高効率に安定して肝前駆細胞の分化誘導が可能であった。分化誘導開始後 10 日目には、フローサイトメトリーにて約 70%が HNF4a (+) AFP (+)の肝前駆細胞への分化を示していた (Figure 1)。また、分化誘導開始後 20 日目には、免疫細胞染色にてアルブミンの発現が確認された (Figure 2)。

(2) ヒト iPSC 由来肝前駆細胞の凍結保存 上記プロトコールにて、分化誘導 20 日目の肝前駆細胞を、slow cooling 法にて凍結保存した。解凍播種後接着した細胞の免疫細胞染色では、HNF4a 陽性細胞は減少していた。PVA 溶液にヒト iPSC 由来肝前駆細胞を包埋し凍結保存後再解凍しゲル化させバイオ人工肝を作製した。当初解凍ゲル化したバイオ人工肝内には多くの死細胞を認めしたが、十分に細胞を単離し ROCK 阻害剤を併用することで、死細胞は劇的に減少した。さらに作製したバイオ人工肝による急性肝不全の治療効果を検討するため、現在移植実験の準備中である。

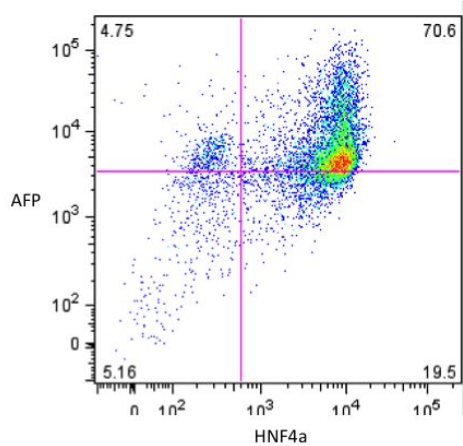


Figure 1 分化誘導 10 日目の HNF4a(+)AFP(+) 細胞

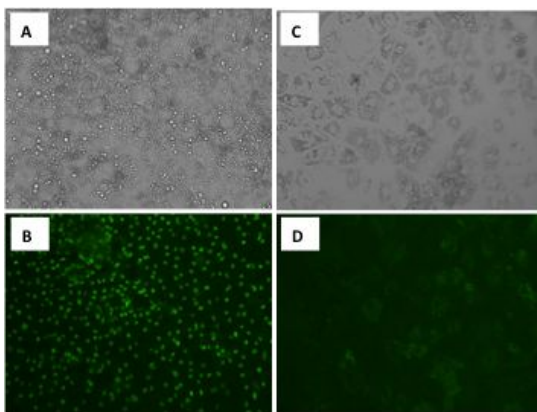


Figure 2 A) 分化誘導 15 日目の光学顕微鏡像  
B) A の抗 HNF4a 抗体染色像  
C) 分化誘導 20 日目の光学顕微鏡像  
D) C の抗アルブミン抗体染色像

< 引用文献 >

Shirouzu Y, Kasahara M, Morioka D, et al., Vascular reconstruction and complications in living donor liver transplantation in infants weighing less than 6 kilograms: the Kyoto experience. *Liver Transpl* 2006; 12: 1224-1232.

Shirouzu Y, Ohya Y, Hayashida S, et al., Reduction of left-lateral segment from living donors for liver transplantation in infants weighing less than 7 kg: technical aspects and outcome. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 709-714.

Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *J Hepatol* 2015; 62: S157-169.

Cantz T, Sharma AD, Ott M. Concise review: cell therapies for hereditary metabolic liver diseases-concepts, clinical results, and future

developments. *Stem Cells* 2015; 33: 1055-1062.

Kawakami Y, Iwata H, Gu YJ, et al. Successful subcutaneous pancreatic islet transplantation using an angiogenic growth factor-releasing device. *Pancreas* 2001; 23: 375-81.

Sakurai T, Satake A, Nagata N, et al. The development of new immunoisulatory devices possessing the ability to induce neovascularization. *Cell Transplant* 2003; 12: 527-35.

Wang W, Gu Y, Hori H, et al. Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells normalizes hyperglycemia in diabetic mice. *Transplantation* 2003; 76: 290-6.

Yang KC, Wu CC, Lin FH, et al. Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisulative matrix for injectable bioartificial pancreas. *Xenotransplantation* 2008; 15: 407-416.

Qi M, Gu Y, Sakata N, et al. PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials* 2004; 25: 5885-92.

Qi Z, Shen Y, Yanai G, et al. The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets. *Biomaterials* 2010; 31: 4026-31.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.

Brolén G, Sivertsson L, Björquist P, et al. Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 2010; 145: 284-294.

Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51: 297-305.

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 )

Sumi S, Kawagoe M, Abe R, Yanai G, Yang

KC, Shirouzu Y. A multiple-funnels cell culture insert for the scale-up production of uniform cell spheroids. Regen Ther 2017; 7: 52-60. (査読有)

Shirouzu Y., Yanai G, Yang KC, Sumi S. Effects of Activin in Embryoid Bodies Expressing Fibroblast Growth Factor 5. Cell Reprogram 2016; 18: 171-186. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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  
<http://www3.kmu.ac.jp/hygiene/index.htm>  
|

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白水 泰昌 (SHIROUZU, Yasumasa)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20279186

### (2) 研究分担者

角 昭一郎 (SUMI, Shoichiro)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
准教授  
研究者番号：80252906

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

該当なし