

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08662

研究課題名(和文) 増殖能を有するヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の凍結保存と急性肝不全治療への応用

研究課題名(英文) Cryopreservation of hiPS-derived hepatic progenitor cells and application to acute liver failure treatment

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞は、無血清培地下に高効率に肝細胞への分化誘導が可能である一方、分化誘導の過程でその増殖能は経時的に低下していき、分化した肝細胞の長期維持培養は困難とされる。本研究では、複数のヒトiPS細胞株から分化誘導した肝細胞を用いて、その培養条件にサイトカインおよび低分子化合物を組み合わせることで、血清やfeeder細胞の使用なしに20継代以上の長期培養に成功した。さらに、長期培養後の細胞は肝前駆細胞に特徴的なAFPやHNF4a、ALBの発現に加え、より成熟した肝細胞に特徴的なASGPR1やAATを発現しており、培養上清中へのALB分泌も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞移植はそのドナー不足と肝細胞のin vitroにおける乏しい増殖能に関連した培養維持の困難さから広く臨床応用されるに至っていない。ヒトiPS細胞は高効率に肝細胞への分化誘導が可能である一方、分化誘導の過程でその増殖能は経時的に低下していき、分化した肝細胞の長期維持培養はヒト由来の肝細胞と同じく困難とされている。本研究ではヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞を長期培養する技術を開発した。さらにその培養維持方法も血清や異種細胞を必要とせず簡便であることから、ヒトへの投与を念頭に置いたさらなる研究の発展が可能で、肝移植を必要とする一部の代謝生肝疾患や急性肝不全の代替医療となりうる期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：hiPS cells can be induced into hepatic-lineage cells under the defined culture condition, while the abilities to proliferate have gotten worth and worth during differentiation and the long-term culture of the differentiated hiPS-derived hepatocytes is supposed to be challenging. In the present study, the addition of the cytokine and the low-molecular-weight compounds into the culture medium made the long-term culture more than 20 passages with no serum and no feeder cells possible in the multiple hiPS cell line-derived hepatocytes. Furthermore, they expressed AFP, HNF4a and ALB specific to the hepatic progenitor cells after the long-term culture, and also showed the expression of ASGPR1 and AAT unique to the matured hepatocytes. Moreover, the secretion of ALB to the supernatants was also confirmed.

研究分野：肝細胞移植

キーワード：ヒトiPS細胞 肝細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性肝不全は肝臓移植がその根治療法としての地位を確立しているが、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(Shirouzu Y et al. Liver Transpl 2006; 12: 1224-32)。一方、臨床応用は限定的だが肝細胞移植も有効な治療戦略の一つである(Cantz T et al. Stem Cells 2015; 33: 1055-62)。患者への負担が少なく、繰り返しの移植も可能であるが、大量のドナー細胞獲得の必要性と、ヒト肝細胞(primary hepatocyte)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(Forbes SJ et al. J Hepatol 2015; 62: S157-169)。

ヒト induced pluripotent stem cell (iPSC)は、無限の増殖能と分化能を有する細胞(Takahashi K et al. Cell 2007; 131: 861-72)で、in vitro で高効率に肝細胞への分化誘導が可能である(Si-Tayeb K et al. Hepatology 2010; 51: 297-305)。その一方、ヒト iPSC 由来の肝細胞も分化誘導過程で経時的に増殖能が低下し、最終的には primary hepatocyte と同様ほとんど増殖を示さなくなり長期の培養維持は困難とされ、臨床応用のための一つの障壁となっている。

研究開始当初、ヒト iPSC から in vitro で増殖可能な肝幹細胞様細胞誘導の報告はいくつかあるものの、血清や feeder 細胞を使用する複数のサイトカインを組み合わせた複雑なプロトコールが必要である(Takayama K et al, Stem Cell Reports 2013; 1: 322, Kido T et al. Stem Cell Reports 2015; 5: 508)。

2. 研究の目的

ヒト iPSC 由来肝細胞の in vitro における長期培養を可能にし、そのメカニズムの一端を解明し肝細胞移植医療への応用につなげることである。

3. 研究の方法

ヒト iPSC を matrigel coating dish 上で、feeder free culture で継代する。
matrigel coating 48 well plate に 0.5×10^5 /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する。

- (1) Day 0-4: Activin A 50 ng/ml
- (2) Day 4-8 BMP4 20 ng/ml+bFGF 10 ng/ml
- (3) Day 4-12: HGF 20 ng/ml
- (4) Day 12 より細胞増殖と肝前駆細胞マーカーの発現を比較し、低分子化合物およびサイトカインの screening

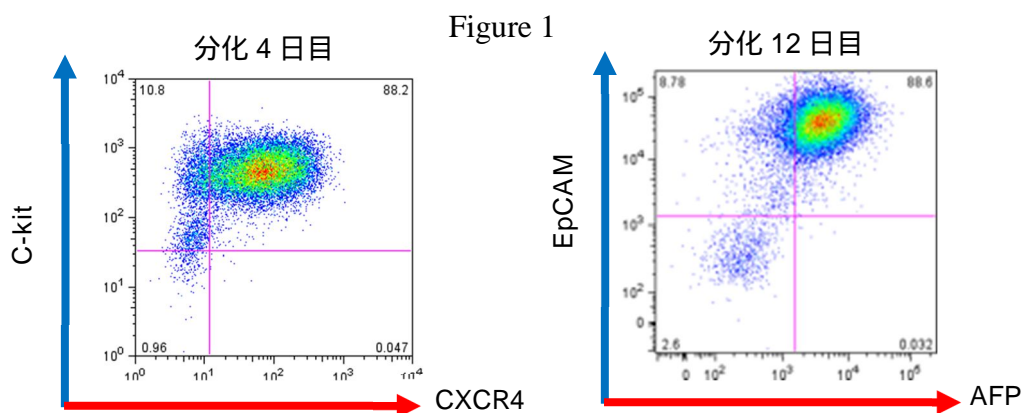
細胞の増殖性は細胞数の計測に加え、MTT assay さらに Ki67 発現を定量 PCR および Western blotting において解析し評価する。

肝前駆細胞としての character 評価は、肝前駆細胞に特異的とされる Foxa2・HNF4a・Prealbumin・AFP・CK19・Albumin・ASGPR1 等の遺伝子発現およびタンパク発現を定量 PCR・Western blotting・フローサイトメーターを用いて解析評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPSC から肝前駆細胞への分化誘導

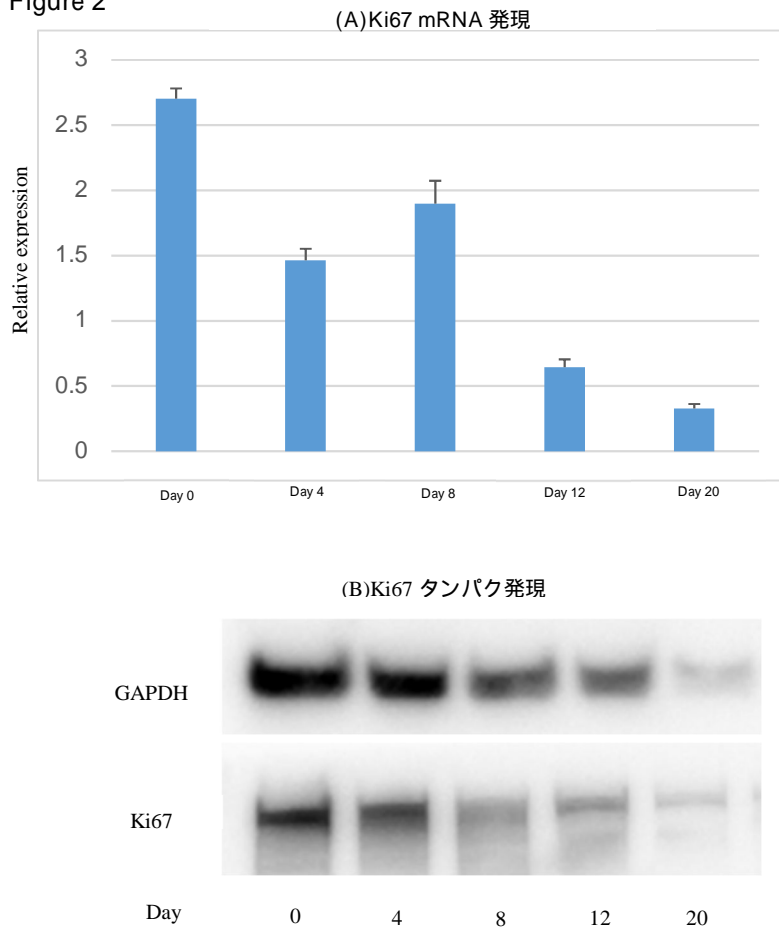
上記プロトコールにて分化誘導後、4日目と12日目にそれぞれ内胚葉および肝前駆細胞への分化の割合を FACS 解析にて評価した。開始4日目には全体の90%が CXCR4 陽性細胞で、12日目には90%が AFP 陽性を示した (Figure 1)。



(2) 肝前駆細胞への分化経過中の Ki67 発現の推移

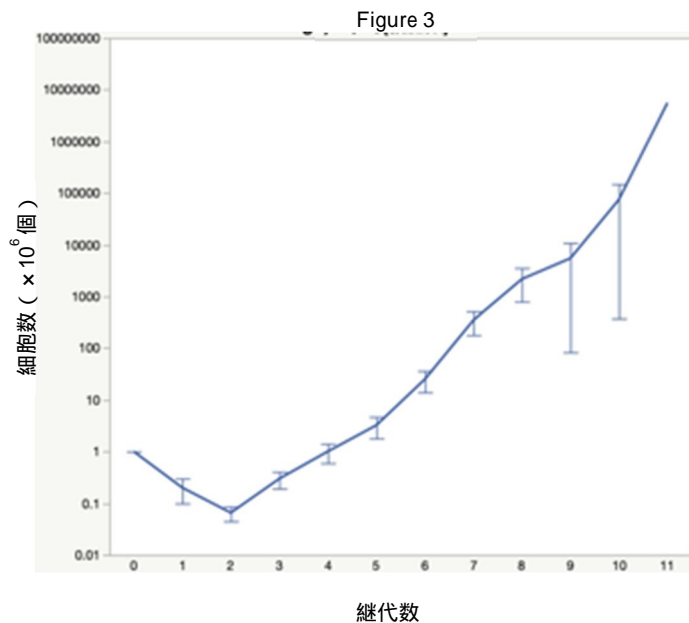
分化の各段階における増殖細胞のマーカーとして Ki67 発現を検討した。Ki67 の mRNA 発現およびタンパク発現いずれも経時的に低下していった (Figure 2)。

Figure 2



(3) 肝前駆細胞の再増殖

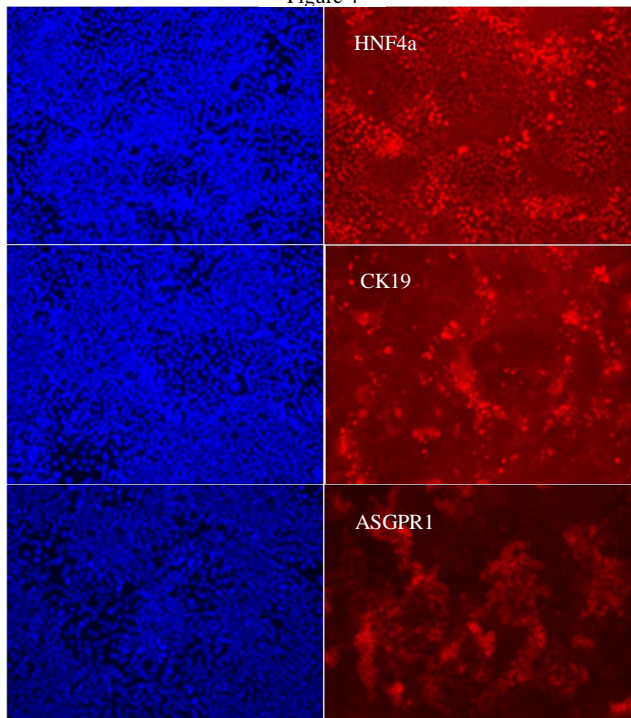
低分子化合物とサイトカインの screening を行い肝前駆細胞の増殖可能な condition を同定した。サイトカイン X と低分子化合物増 Y および Z を組み合わせることで、ヒト iPSC 由来肝前駆細胞の増殖および継代が可能になった (Figure 3)。



(4) 増殖性肝前駆細胞のタンパク発現の検討

継代後肝前駆細胞における、肝細胞特異的なタンパク発現を免疫細胞染色にて検討した。10 継代以上培養したヒト iPSC 由来肝前駆細胞はほぼ 100% が HNF4a を発現し、高率に CK19 と ASGPR1 タンパクを発現していた (Figure 4)。

Figure 4



ヒト iPSC 由来肝前駆細胞を、新たなサイトカインと低分子化合物を組み合わせた condition で細胞増殖させることに成功した。現在、長期培養後の細胞の最終分化への培地 condition の調整、さらに機能評価を行い、劇症肝不全治療への応用を目指し動物実験 (移植実験) の準備を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------