

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2020

課題番号：18KK0252

研究課題名（和文）iPS細胞由来肝芽移植によるカニクイザル肝硬変治療法の開発

研究課題名（英文）Liver organoid derived from iPSCs transplant to Cynomolgus monkey with liver cirrhosis

研究代表者

谷口 英樹（Taniguchi, Hideki）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70292555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：カニクイザルiPS細胞を樹立し、我々が以前より開発しているiPS細胞由来肝芽の作製を試みた。中山大学の研究者とプロトコルの打ち合わせとサルの調達を行い、日中共通のプロトコルで肝線維化モデルを作製した。TAA投与により従来より短期間で肝硬変を誘導できるカニクイザルモデルの構築に成功した。肝硬変の肝表面に組織を移植するための被覆剤を開発し、カニクイザル肝硬変モデルへの移植において実践した。またカニクイザルiPS細胞を用いて、我々が以前より開発しているiPS細胞由来肝芽を作製し、カニクイザル肝硬変モデルへの移植と生着に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変は様々な原因で発症する慢性肝疾患の終末像であり、肝移植以外に根治療法がない。肝硬変患者は国内に数十万存在し、毎年肝不全等で1万7000人程度が亡くなっているが、圧倒的な肝移植ドナー不足の状態である。カニクイザルは肝臓の構造がヒトに類似しているため前臨床試験の有用性が極めて高いが、安定的な入手が困難である。中国の中山大学ではカニクイザルを数万頭飼育する施設が存在し、国際共同研究によってサルを有効活用できる大きなメリットがある。

研究成果の概要（英文）：We aimed to explore the allogeneic transplantation of iPS cells derived liver organoid in cynomolgus monkeys with liver fibrosis. First of all, we reprogrammed monkey peripheral blood mononuclear cells into iPS cells using the auto-erasable Sendai virus vector and identified the cellular characteristics of monkey iPS cells in vitro. Based on the experience on human iPS differentiation, we have optimized the protocols and differentiated monkey iPS cells into hepatic endoderm, endothelial progenitor cells and mesenchymal progenitor cells. By co-culturing these three progenitor cells in a three-dimensional microwell culture plate, we successfully generated monkey iPS cells derived liver organoid. After 8 weeks of subcutaneous injection of Thioacetamide, we generated novel method of monkey liver fibrosis model.

研究分野：再生医学

キーワード：ips細胞 カニクイザル 肝硬変

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は様々な原因で発症する慢性肝疾患の終末像であり、肝移植以外に根治療法がない。肝硬変患者は国内に数十万存在し、毎年肝不全等で1万7000人程度が亡くなっているが、圧倒的なドナー不足の状態である。カニクイザルは肝臓の構造がヒトに類似しているため前臨床試験の有用性が極めて高いが、安定的な入手が困難である。中国の中山大学ではカニクイザルを数万頭飼育する施設が存在し、国際共同研究によってサルを有効活用できる大きなメリットがある。

2. 研究の目的

肝硬変症の治療を実現化するためには、移植後の生着組織量を格段に向上するための新たな要素技術開発が必須である。これまでのヒト細胞を用いた研究では異種移植による免疫拒絶反応が根本的な課題であった。本研究開発では、サルiPS細胞を肝内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞に分化誘導し、サルiPS細胞由来肝芽を確立することにより、肝硬変治療に適応可能なiPS細胞由来肝芽による肝硬変治療の可能性を探究することを目的とする。

学術的独自性：肝硬変症に対する既存の競合品/技術としては、ヒト肝細胞シート・ヒト間葉系幹細胞・ヒト骨髄細胞などがあるが、既存技術では移植細胞の生着率・機能的な肝組織の再構築能力において限界があった。我々が開発したヒトiPS細胞由来肝芽は胎児期の肝発生に類似した構造体であり、移植された体内で増殖・成熟化して肝組織化される特性を有する。したがって、患者数が膨大な肝硬変症に対する全く新しい治療法を提案できる可能性が高い。今回、サル肝硬変モデルを確立し、サルiPS細胞由来の肝芽を移植して治療効果を検討することは、同種移植による免疫拒絶の少ない条件下でiPS細胞由来肝芽の可能性を検証できる極めて有意義な研究である。

3. 研究の方法

・研究課題1：カニクイザル肝硬変モデルの確立

これまでのカニクイザルを用いた肝線維化モデルの既報では四塩化炭素(CCl₄)を16週間以上連続投与する必要があるとあり、誘導された肝線維化モデルは十分な肝硬変にはなっていないのが現状である。本研究ではまず、中山大学との共同研究により短期間で臨床的な肝硬変に近似したカニクイザル肝硬変モデルを作製する手法を確立する。誘導する薬剤の候補として、チオアセタミド(TAA)が挙げられる。TAAはこれまでのマウス・ラットの検討から、肝線維化の誘導に優れた薬剤であることが報告されている。しかしながら、毒性が高く、サルに投与する際の投与期間や投与量を詳細に検討する必要がある。本研究ではTAA、CCL₄の2種の薬剤を用いて肝硬変を誘導し、最も肝硬変導入に優れた手法を採用する。

・研究課題2：肝表面移植法の確立

研究課題1で確立した肝硬変モデルを用いて、中型動物における肝表面移植法を検討する。肝硬変モデルの肝臓漿膜を電気メス等、臨床で使用可能なデバイスを用いて剥離し、剥離した肝臓表面に同種iPS細胞由来肝芽を移植し、アルギン酸等を用いた被覆剤

を用いて被覆固定する。再び薬剤を追加投与し、サンプリングを行う。

・研究課題3: カニクイザル iPS 細胞由来肝芽の作製および治療効果の検討

肝硬変症の患者へのヒト iPSC 肝芽の経門脈移植には大きなリスクが伴うため、肝臓表面への移植を目指し、これに適した肝芽作製法を開発することが求められる。また、臨床応用を見据えるとマトリゲルなどのマトリクスを使用せずに肝芽の大型化を実現する必要がある。同種サル iPS 細胞を用いてヒト iPS 細胞と同様に内胚葉細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞の分化誘導を試みる。さらに分化誘導した 3 種類の細胞からサル iPSC 肝芽の作製が可能か試みる。

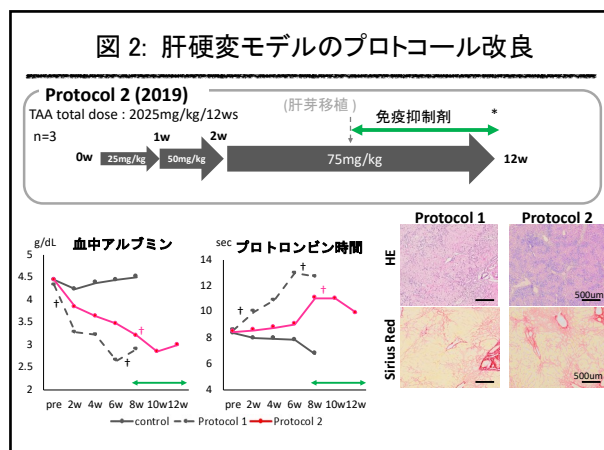
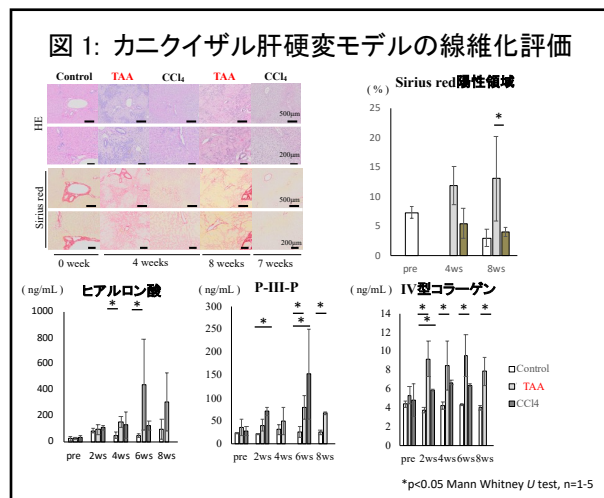
4. 研究成果

・研究課題1: カニクイザル肝硬変モデルの確立

本研究では中山大學との共同研究により短期間で臨床的な肝硬変に近似したカニクイザル肝硬変モデルを作製する手法を確立した。本研究ではTAAを用いた短期間での肝硬変導入手法を検討する為中山大學の研究者とプロトコルの打ち合わせを行い、サルを調達した。カニクイザルをcontrol群、TAA投与群、CCl4投与群の3群に分けて線維化を比較した。TAA投与群は他群と比較して体重減少が見られた。肝表面はTAAを8週投与した段階で肝硬変様の所見が見られたが明らかな腹水は超音波上観察できなかった。脾臓容積は薬剤投与4週時点でTAA、CCl4とも増加傾向が認められた。組織学的には、肝線維化を赤く識別可能な

sirius red染色においてTAA群がCCl4群より線維化が増悪していた(図1左上、右上)。血清の各種肝線維化マーカーを定量化するとヒアルロン酸、P-III-P、IV型コラーゲンのいずれにおいてもTAA群は増悪が見られた(図1下)。これらのことからTAAの8週間投与により比較的短期間にカニクイザル肝硬変モデルの作製が可能であることが明らかになった(Scientific Reports 2020, 文献1)。

また、今回確立したプロトコルではTAA投与開始時のサルへの負担が大きく、初期に死亡する個体も認められた。そのため、日中両国でTAAを漸増する改良型プロトコルを検討し、双方でカニクイザル肝硬変モデル作成を実施した。改良型プロトコル(protocol 2)においては初期死亡例はなく、線維化も図1と同程度に見られたことから本プロトコルの有効性が示唆された(図2)。



・研究課題 2: 肝表面移植法の確立

ラット肝線維化モデルの肝表面に胎仔肝組織を移植し、被覆剤を用いて組織を固定する手法を確立した。胎仔肝組織の表面を臨床使用実績のあるアルギン酸ナトリウム、フィブリン、酸化セルロース、ヒアルロン酸ナトリウムで被覆し、生着組織の生着面積と血管領域を定量的に評価した。その結果、アルギン酸ナトリウムで被覆した組織が最も生着面積、血管領域ともに大きいことが確認された (*Scientific Reports* 2020, 文献 2)。

・研究課題 3: カニクイザル iPS 細胞由来肝芽の作製および治療効果の検討

同種サル iPS 細胞を用いてヒト iPS 細胞と同様に肝内胚葉細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞の分化誘導に成功した。また、肝表面への移植に適した disc 状の肝芽をマトリゲルなどのマトリクスを用いずに作製することに成功した。カニクイザル iPS 細胞由来肝芽を研究課題 1 のカニクイザル肝硬変モデルの肝表面に移植し、生着を確認した。

国際共同研究としての成果: 中国 広州の中山大学の肝移植チームとカニクイザル肝線維化モデル動物のさらなる改良に取り組み、両国で共通プロトコールを実施した。更にカニクイザル iPS 細胞由来肝芽の培養、輸送、中国 広州での移植などの計画も打ち合わせており、将来の共同研究の基盤が構築された。

COVID19 感染の世界的な蔓延に伴う計画変更について: 当初計画では日中共同でカニクイザル肝線維化モデルを確立した後、中国から研究者を招聘しカニクイザル iPS 細胞の分化誘導や肝芽作製法の検討を行う事としていた。さらに肝芽の中国への輸送や現地での移植など、これまでの国際共同研究の枠を越えた新たな試みを実施する予定であった。しかしながら、COVID19 の世界的な蔓延に伴い、研究者が相互訪問することが全く不可能となりオンラインでの打ち合わせ等に終始することを余儀なくされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Megumi Matsuo, Soichiro Murata, Shunsuke Hasegawa, Yumi Hatada, Masayuki Ohtsuka, Hideki Taniguchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel liver fibrosis model in Macaca fascicularis induced by thioacetamide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58739-4"	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rong Qiu, Soichiro Murata, Katsutomo Oshiro, Yumi Hatada, Hideki Taniguchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Transplantation of fetal liver tissue coated by ultra-purified alginate gel over liver improves hepatic function in the cirrhosis rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65069-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Murata S, Okamoto S, Sekine K, Ueno Y, Tadokoro T, Taniguchi H
2. 発表標題 Effect of human induced pluripotent stem cell derived liver buds in a immunodeficient liver fibrotic rodents.
3. 学会等名 Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association(A-PHPBA), Seoul, Korea (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Soichiro Murata, Satoshi Okamoto, Keisuke Sekine, Yasuharu Ueno, Tomomi Tadokoro, Hideki Taniguchi
2. 発表標題 Therapeutic effect of human induced Pluripotent Stem cell derived liver buds in a immunodeficient liver fibrosis animals
3. 学会等名 28th APASL (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 線維化を伴う疾患の予防及び/又は治療剤	発明者 谷口 英樹、村田 聡一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/000043	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 被覆固定剤	発明者 谷口 英樹、村田 聡一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 11144	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 線維化を伴う疾患の予防及び/又は治療剤	発明者 谷口 英樹、村田 聡一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-001578	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 被覆固定剤	発明者 谷口 英樹、村田 聡一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-05047	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	村田 聡一郎 (Murata Soichiro) (40436275)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	鄭 允文 (Zheng Yun-Wen) (80404995)	横浜市立大学・医学研究科・客員准教授 (22701)	
研究分担者	聶 運中 (Nie Yunzhong) (00831330)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	久世 祥己 (Kuse Yoshiki) (70837806)	東京大学・医科学研究所・特任研究員 (12601)	

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			
中国	中山大学			