様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３４４１７
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ２２７４７

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来肝細胞のフルクトース代謝経路を利用した精製法の開発

研究課題名（英文）Development of purification method using fructose metabolic pathway of human iPS cell-derived hepatocytes

研究代表者
山下　裕美（YAMASHITA, Hiromi）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：３０５９４８９０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：　代表者はヒトiPS細胞由来肝細胞(hiHep)を代謝的に高純度に精製することを目的として、条件検討を行った。正確な肝純度測定法に問題があるものの、hiHepをある程度、濃縮することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　ヒトiPS細胞を用いた再生医療に対する社会的期待は極めて高い。しかし、iPS細胞から意図せず分化した増殖性細胞や残存iPS細胞による腫瘍形成リスクは重大な懸念である。そこで代表者らは以前にヒトES/iPS細胞由来心筋細胞の高度大量精製法を開発したが、肝細胞にはそのような精製法が無く、移植hiHepの安全性が担保されていない。
本研究成果によって、レポーターや自殺遺伝子を導入するような遺伝子改変を伴わずに安全、かつ低コストな肝細胞大量精製を実現し肝臓再生医療に貢献出来る。

研究成果の概要（英文）：The representative examined the conditions for the purpose of metabolically purifying human iPS cell-derived hepatocytes (hiHep) with high purity. Although there was a problem with the accurate liver purity measurement method, we succeeded in enrichment of hiHep to some extent.

研究分野：再生医学

キーワード：肝細胞精製

※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

重篤な肝疾患には肝臓移植しか治療法が無いが、日本では深刻なドナー不足である。代わりに生体肝移植が多く行われているが、ドナーの死亡や合併症の報告もあり、ヒト iPS 細胞を利用した肝臓再生医療が期待されている。解決すべき課題の一つに、移植臓器への未分化 iPS 細胞や意図せず分化した増殖性細胞の混入による腫瘍化リスクがある。この課題を解決するため、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を高純度に精製する技術が必須である。既に、代表者らは、多能性幹細胞由来心筋細胞において、乳酸代謝を利用した精製法を開発し腫瘍形成されないことを証明した。肝細胞の精製法は現状、FACS(fluorescence-activated cell sorting)による方法に限られており、大量精製が必要な臨床応用には適さない。ヒト iPS 細胞由来肝細胞(iHep)の代謝的大量精製法の開発は、肝臓再生医療の推進のために重要である。

２．研究の目的

本研究では、肝細胞の代謝的特徴に着目し、iHep の精製法を独自に開発することを目的とした。

３．研究の方法

①肝細胞の代謝に関する遺伝子（X,Y,Z）がヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導の過程で発現が上昇するかを mRNA の Real time PCR で調査した。

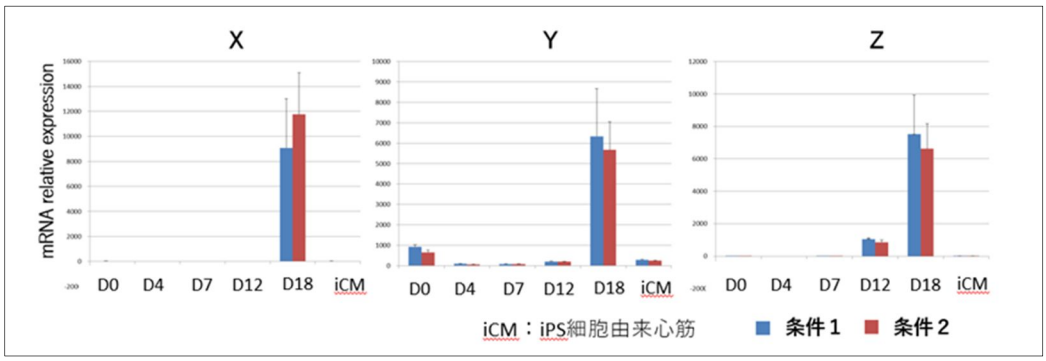
②iHep を肝細胞のみ生存可能な代謝環境にし、精製後の肝細胞特異的抗体による FACS 解析によって肝細胞純度測定を行った。

４．研究成果

①iHep の誘導過程における代謝に関する遺伝子発現(図 1)

ヒト iPS 細胞を肝細胞に誘導する過程（分化開始 0 日目、4 日目、7 日目、12 日目、18 日目）において、18 日目で X,Y,Z の発現が上昇しており、この時期以降に精製することが適していることが分かった。また、0 日目(iPS 細胞)や iCM(iPS 細胞由来心筋細胞)ではほとんど発現していないことが確認出来た。

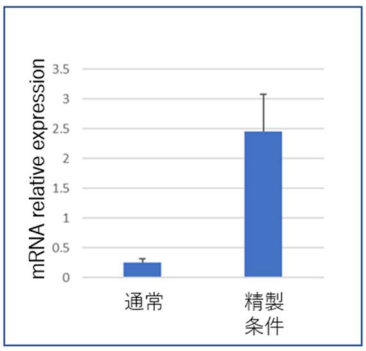
【図 1】



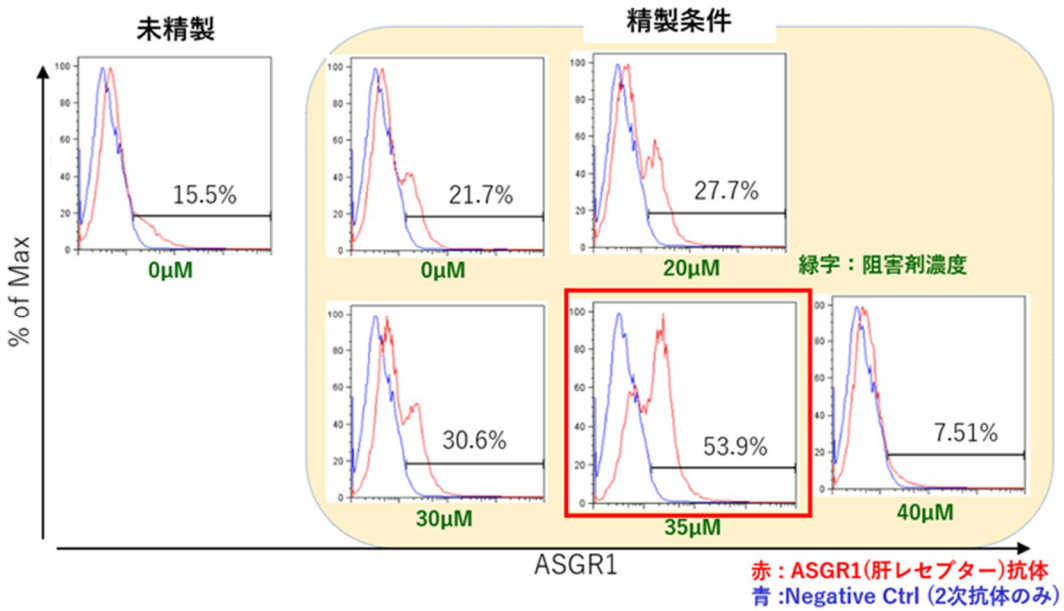
②iHep の精製結果

非肝細胞を精製条件下におくと、ある代謝に有利なタンパク質の遺伝子発現が上昇することをつきとめた(図 2)。そこで、精製条件とこのタンパク質の阻害剤を組み合わせることによって、完全な非肝細胞の死滅を試みた(図 3)。

【図 2】



【図 3】



阻害剤の濃度 35μM の時に、ASGR1 陽性細胞が 53.9%となり一番良い結果が得られた。しかし 40μM まで濃度を上げると死ぬ肝細胞もあった。また、ASGR1 はヒト iPS 細胞由来肝細胞では成熟した一部の細胞しか発現しておらず、正確な肝細胞純度測定が行えていない可能性がある。また、他の肝特異的抗体も検討したが、FACS 解析では iPS 細胞においても陽性になってしまい、肝細胞の特異性が確認出来なかった。そこで、正確な肝細胞純度測定を実施するために、肝細胞特異的に発現する Albumin のプロモーター配下にレポーター遺伝子を連結した配列を導入した細胞株を作製した。また、本精製法では再現性が乏しかったため、より再現よく精製出来る代謝的精製法を見出している。

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