

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08685

研究課題名(和文)急性肝不全に対する自己iPS細胞を用いた革新的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the innovative treatment using self iPS cell for acute liver failure

研究代表者

原田 昇 (HARADA, Noboru)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80419580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は急性肝不全を含めた再生医療への応用が期待されるが、肝移植に代わる人工肝臓の作成には至っていない。これまでに我々は脱細胞化したScaffoldにiPSから分化させた肝細胞(iPS-Heps)、胆管細胞、血管内皮細胞を再細胞化したミニ人工肝臓を作成した。しかしながら、このミニ人工肝臓を臨床応用するためには、サイズアップが必要であり、iPS-Hepsに安全かつ容易に大量培養することが必要と考えた。独自の方法で分化させたiPS-HepをiPS-Steと共培養し、iPS-Hepsの細胞増殖を検討し、その肝細胞としての増殖機能を確認し、HGF濃度、肝細胞分化マーカーのチェックを施行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性肝不全はいまだに肝移植を行うことでしか救命できない疾患であるが、肝移植では脳死ドナーや生体肝移植ドナーが必要であり、必ずしも患者の究明には至らないこともある。今回検討している脱細胞化したScaffoldにiPSから分化させた肝細胞(iPS-Heps)、胆管細胞、血管内皮細胞を再細胞化したミニ人工肝臓を作成し、作成した人工肝臓は生体内で機能を有することを明らかにし、iPSを用いた肝再生グラフトを作成することによって、未来の治療へとつながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As for the iPS cells, application to regenerative medicine including acute liver failure is expected, but does not lead to making of the artificial liver as a substitute for the liver transplant. We made the mini-artificial liver which made hepatocytes (iPS-Heps), cholangiocyte, the blood vessel endothelium which let Scaffold which became the cell again differentiate from iPS the re-cell so far. However, size up was necessary, and it thought to culture in large quantities easily that we won iPS-Heps safely so that clinical practice applied this mini-artificial liver that necessary. We cocultivated iPS-Hep which let you differentiate by an original method with iPS-Ste and examined cell proliferation of iPS-Heps and enforced the increase function as the hepatocytes, HGF density, the check of the hepatocytes differentiation marker.

研究分野：肝移植、肝再生

キーワード：iPS細胞 scaffold 人工肝臓 急性肝不全

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性肝不全とは「正常肝に肝障害が生じ、その機能が短期間に著しく低下して、肝不全症候を呈する」症候群である。2011年に厚生労働省が急性肝不全の診断基準を発表したが、我が国における急性肝不全の実態は、同研究班が全国調査を実施しており、肝炎症例が主体であるが、ウイルス性が減少傾向であり、成因不明例が増加している。予後は非常に不良であり、肝再生不全によって、肝機能の改善が得られず、現時点では肝移植以外では救命出来ない症例が多い。一方で脳死肝移植は2018年末までに507例施行され、生体肝移植術は9136例施行されているが、脳死肝移植の提供者の年次推移は欧米と比較して非常に少なく、生体肝移植術が我が国の大多数を占めている。当科肝移植グループでは自己増殖の困難な iPS-肝細胞(iPS-Heps)の効率的な培養プロトコールに成功しており、そのため、ドナー不足である肝移植以外での肝再生、肝機能補助の法として、生体肝移植という健常者の生体を手術する方法ではなく、患者自身の細胞から iPS 細胞を作成し、肝機能維持、補助を目的とし、救命する方法として本研究を草案した。

2. 研究の目的

現在急性肝不全に対する根本的治療は肝移植であるが、肝臓提供者の不足と肝移植後の拒絶反応が重大な問題である。また本邦では生体部分肝移植術が中心であり、肝移植後のグラフト容積不足によって引き起こされる過少グラフト症候群(高ビリルビン血症及び難治性腹水)が術後生存率を大きく低下させる。

本研究において急性肝不全に対する治療法として、肝移植以外の方法として患者本人の細胞から iPS 細胞(iPS-Heps)を作成し、肝臓内に導入し、人工的に肝臓機能補助を行う方法によって、救命治療することを目的とした。

3. 研究の方法

これまで、iPS 細胞については、ヒト iPS 細胞からヒト iPS 細胞由来肝細胞(iPS-Heps)を作成する方法が報告されているが、臨床応用に至っていない。その理由のひとつに iPS-Heps は正常肝細胞のような生体内での自己複製能を持ち合わせておらず、未熟であるためである。これまでに報告がある iPS-Heps をラットに移植したものの成績が良いもので 9 ヶ月後に 9% Repopulation しているのみであった。当研究室では、iPS-Heps を作成する新たなプロトコールを創設することに成功している。このプロトコールをさらに改良し作成した iPS-Heps はラットに移植後 2 ヶ月で 50%以上の Repopulation を認めた。このことは、この iPS-Heps が生体内において、これまで報告されている iPS-Heps に比べ、成熟肝細胞のように自己複製能をもっていることを表している点で、学術的に独自性があり、この方法を用いて手法の安全性を確認したのちに、臨床応用を計画することは非常に革新的であり、創造性を持つと考えられた。

まず iPS 細胞由来肝細胞(iPS-Heps)の急性肝不全の治療効果を検討するために、本研究ではまずヒト iPS 細胞を内胚葉(endoderm)に分化し、single cell passage を施行する。

検体から単離した hepatocyte を効率的に増殖させる新規方法を確立する。蛍光免疫染色に

よる細胞確認と機能確認を施行し、さらに癌化しないという安全性確認を施行する予定とした。

4 . 研究成果

基礎実験は繰り返しており、ヒト iPS 細胞の分化を行っている。

ヒト iPS 細胞を内胚葉に分化を行い HGF, DMSO にて 10 日間培養し、新規 iPS-Heps プロトコールで iPS-Heps を作成に成功している。

新規手法によって培養した細胞が iPS 細胞あることを確認 : Oct3/4、Nanog、DAPI にて蛍光免疫染色を施行したが、Oct3/4 と Nanog が描くで染色されており、iPS 細胞であることを確認した。

iPS 細胞の single cell passage : 培養細胞が endoderm に分化する前段階として single cell passage を施行後に endoderm への分化を施行した。

現在 iPS-Heps を大量培養する方法として取組んでいるのが、iPS 由来星細胞 (iPS-Ste) との共培養および免疫不全ラットへの細胞移植である。独自の方法で分化させた iPS-Hep を iPS-Ste と共培養し iPS-Heps の細胞増殖を検討し、その肝細胞としての増殖機能、HGF 濃度、肝細胞分化マーカーのチェックを施行し、iPS-Ste の機能解析ののちに経門脈的な細胞移植を行い、現在大量培養するシステム構築を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武石一樹、原田 昇、吉住朋晴
2. 発表標題 ヒトiPS技術を利用した肝再生グラフトの臨床応用への今後の展開
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武石一樹、原田昇、吉住朋晴
2. 発表標題 ヒトiPSの肝細胞への分化誘導と人工肝臓作成による肝不全治療への展開
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	戸島 剛男 (TOSHIMA Takeo) (40608965)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	武石 一樹 (TAKEISHI Kazuki) (50733713)	九州大学・大学病院・特別教員 (17102)	

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	栗原 健 (KURIHARA Takeshi) (50823598)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	吉住 朋晴 (YOSHIZUMI Tomoharu) (80363373)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	伊藤 心二 (ITO Shinji) (90382423)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

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