

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590977

研究課題名(和文) iPS細胞由来肝細胞を用いた肝不全治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the cell therapy for liver failure using hepatocytes derived from induced pluripotent stem cells

研究代表者

山本 和秀 (Yamamoto, Kazuhide)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90140491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、マウス尾細胞からiPS細胞を作成し、これを肝細胞へ分化誘導したうえで肝不全モデルに自家移植し、評価することである。これを達成するため、任意のマウス尾切片より線維芽細胞を抽出し、培養する方法を確立した。次いで京都大学で確立されたレトロウイルスベクター法を用いてOct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc遺伝子を導し、iPS細胞を樹立した。得られたマウスiPS細胞に添加物を段階的に付与し、肝細胞に類似した遺伝子発現、代謝機能をもつ細胞を得た。この細胞を、免疫不全マウスの門脈内に移植したが、奇形腫が形成された。細胞移植の安全性を高めるため、分化誘導方法の改善を行っている。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study are 1) to generate induced pluripotent stem (iPS) cells from the mouse tail, 2) to differentiate iPS cells to functional hepatocytes, and 3) to autograft differentiated cells into mice with liver failure. We isolated mouse fibroblast from mouse tail, transduced Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc genes by using retroviral vectors established in Kyoto University, and generated mouse iPS cell lines. These mouse iPS cells were successfully differentiated into hepatocyte-like cells with supplementation of several growth factors and chemicals. We modified and improved the differentiation protocol and transplanted these cells into the portal vein of the immunodeficiency mouse, but teratomas were still formed. We conclude that further improvement of differentiation protocol for iPS cells is required to establish cell therapy for liver failure patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：iPS細胞 肝細胞分化 肝不全 細胞移植 再生医療

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝硬変患者数は、約 30 万人と推定され、毎年約 2 万人の患者が肝硬変で死亡している。現時点で肝硬変に対する根治療法は肝移植以外にはないが、肝移植治療はドナー数の絶対的な不足、長期にわたる免疫抑制剤の使用などの諸問題を抱えている。近年開発された人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS 細胞)は、これらを克服する肝細胞の供給源として期待されている。すなわち、iPS 細胞は実験系において無限に増殖し、かついかなる体細胞へも分化するという、胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES 細胞)に極めて類似した生物学的特性を有しているうえ、iPS 細胞は、各個体の体細胞から作成することが可能である。したがって、患者由来の iPS 細胞を作成し、これを肝細胞へ分化させることにより、免疫抑制剤が不要な肝細胞移植治療を行うことができるのである。しかしながら iPS 細胞由来肝細胞の研究成果は現在のところ in vitro(試験管内)の報告にとどまり、in vivo(生体内)における有効性については未だ報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、われわれが確立した iPS 細胞を肝細胞へと分化誘導する方法(Iwamuro M: Hepatic Differentiation of Mouse iPS Cells In Vitro, Cell Transplantation, 2010)(特願 2009-181891: iPS 細胞からの肝細胞の分化誘導方法)を用い、肝不全モデルマウスにおいて、iPS 細胞由来肝細胞が肝機能および予後を改善することを確認する。また生体内における移植細胞の安全性についても評価し、将来的な iPS 細胞を用いた肝再生・移植医療への礎としたい。

現在までに ES 細胞を用いた肝細胞分化誘導については諸家の報告があるが、ES

細胞を樹立する際に胚を破壊しなければならず、倫理上の問題があること、ES 細胞由来の肝細胞は宿主免疫をまめがれることができないため、長期の免疫抑制剤を必要とすること、の 2 点が臨床応用に際して問題となる。これに対し、iPS 細胞は各個体の体細胞から作成することができるため、患者由来の iPS 細胞を作成し、これを肝細胞へ分化させることにより、自家移植が可能である。したがって倫理的問題を生じることなく、かつ免疫抑制剤が不要な肝細胞移植治療を行うことができると期待されている。iPS 細胞の臨床応用を目指すうえで、動物実験によるは不可避である。特に動物疾患モデルにおいて、iPS 細胞由来肝細胞を自家移植することにより、肝機能が改善するか、生存率が向上するか、安全性(拒絶反応や奇形腫形成など)の面で問題がないか、等を評価する必要があると考えられる。

iPS 細胞を用いた肝細胞分化誘導については、われわれの報告も含め 5 編の報告がある(Song Z,2009)(Li W, 2010)(Sullivan GJ, 2010)(Si-Tayeb K, 2010)(Iwamuro M, 2010)が、いずれも in vitro(試験管内)の報告にとどまり、in vivo(生体内)すなわち動物モデルにおける有効性や安全性については未だ報告がない。そこでわれわれは本研究において、急性および慢性肝不全モデルマウスを作成し、このマウスから iPS 細胞を樹立し、肝細胞へ分化させた後に自家移植を行うことを計画した。この研究の成果をヒト iPS 細胞に応用することにより、再生・移植医療への重要な橋渡しとなると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、マウス尾細胞から iPS 細胞を作成し、これを肝細胞へ分化誘導したうえで急性または慢性肝不全モデルに自家移

植し、各種の評価を行うことを最終目的とする。これを達成するため、1) ウイルスベクターキットを用いたマウス尾細胞からの iPS 細胞の作成・品質評価、2) マウス iPS 細胞の肝細胞分化、3) 分化細胞のマウスへの移植を研究機関内に実施予定であった。

4. 研究成果

1) マウス尾細胞からの iPS 細胞の作成・品質評価について、まず任意のマウス尾切片より線維芽細胞を抽出し、培養する方法を確立した。すなわち、マウスをエーテル麻酔下に尾の先端 5mm を鉗で切断し、シャーレ上で表皮を剥離したのち、0.5mm 径の細断片とし、ゼラチンコートしたプラスチックプレート上に静置し、培地 (L-glutamine、non-essential amino acid を加えた DMDM) を加えて 37℃、5%CO₂ 環境下で 1 週間培養する方法である。シャーレに付着した線維芽細胞をアキュターゼを用いて剥離し、継代したうえで実験に用いた。次いで、4 種類のリプログラミング因子 (Lin28、NANOG、SOX2、OCT4) と、レポーターとして GFP 遺伝子を組み込んだ環状 DNA である minicircle DNA (システムバイオサイエンス社製) を、マウス尾細胞に電気穿孔法で形質導入し、蛍光活性化セルソーターで抽出したうえでさらに細胞化学薬品による形質導入を行い、iPS 細胞の作出作業を行ったが、iPS 細胞の作出に至らなかった。また、4 種類のリプログラミング因子 (cMyc、NANOG、SOX2、OCT4) をもつ市販のレンチウイルスベクター (システムバイオサイエンス社製) を用い、iPS 細胞の作成作業を行ったが、iPS 細胞の樹立に至らなかった。このため、京都大学で確立されたレンチウイルスベクター (パッケージング細胞である PLAT-E 細胞およびアッドジーン社製プラスミドを使

用) 法に変更し、マウス iPS 細胞の樹立に至った。

2) 急性および慢性肝不全モデルマウスの作成については、障害肝の再生を防ぐため、アルカロイド系薬剤であるレトロルシンを事前投与し、四塩化炭素を 8 週間 (2 回/週) 連続投与し、慢性肝不全モデルを作成した。肝不全の評価として経時的に NH₃ 値を測定した。NH₃ 値は、マウス尾静脈より静脈血 10ul を採取し、アンモニア専用測定器富士ドライケム 100 タイプ N を用いて測定した。また 4~12 週後に肝を摘出し、組織標本にて肝重量、肝線維化 (マッソン・トリクローム染色など) を評価し、疾患モデルマウスとしての妥当性を評価した。このモデルマウスでは、アンモニア値上昇、腹水などの肝不全症状がみられ、組織標本でも肝線維化が確認でき、疾患モデルマウスとして妥当であると考えられた。

3) 肝不全モデルマウスへの分化肝細胞の投与方法を検討するための予備実験として、理研細胞バンクよりマウス iPS 細胞 (京都大学にて樹立された 4 株、雄マウス由来) の提供を受け、われわれが開発した肝細胞分化誘導方法を用いて肝細胞へ分化させた。分化誘導としてはまず浮遊培養にて胚様体を形成し、その後アクチビン A (100ng/ml) および塩基性線維芽細胞増殖因子 (100ng/ml) を用いて胚体内胚葉を誘導、さらに肝細胞増殖因子 (100ng/ml)、デキサメサゾン (40ng/ml) を用いて肝細胞へと誘導した。得られた細胞について、RT-PCR 法、定量 PCR 法にて肝細胞に特異的な遺伝子の発現を確認し、電子顕微鏡および PAS 染色でグリコーゲン貯蔵能があることを確認した。またアルブミン産生、尿素合成、アルファ-1 アンチトリプシン産生、ハプトグロビン産生能を有していることを確認した。以上より、マウス iPS 細胞から肝細胞に類似した遺伝子発現、代謝機能をもつ細

胞を得た。これらの結果については、一部を Biomed Eng Online 誌(Iwamuro M, et al. 2012)に発表した。

4) 上記のマウス iPS 細胞由来肝細胞を用いて、SCID マウスに門脈経由で細胞移植を行った。しかしながら 12 週間後の時点で奇形腫の形成があり、分化誘導の最終段階においても未分化細胞が残っている可能性が示唆された。奇形腫形成の危険性を除去し、細胞移植の安全性を高めるため、分化誘導方法の改善を行っている状況である。

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)

1) Masaya Iwamuro, Hidenori Shiraha, Shuhei Nakaji, and Kazuhide Yamamoto. Prospects for Creating Bioartificial Liver System with Induced Pluripotent Stem Cell Technology. Journal of Biotechnology & Biomaterials 3(2):157, 2013 (査読無) doi: 10.4172/2155-952X.1000157

2) Masaya Iwamuro, Hidenori Shiraha, Shuhei Nakaji, Masumi Furutani, Naoya Kobayashi, Akinobu Takaki, and Kazuhide Yamamoto. A Preliminary Study for Constructing a Bioartificial Liver Device with Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes. Biomedical Engineering OnLine 11:93, 2012 (査読有) doi: 10.1186/1475-925X-11-93.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等：得られた成果についてわかりやすくまとめた内容をホームページに掲載するため、原稿を準備中である。

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 和秀 (YAMAMOTO KAZUhide)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90140491

(2)研究分担者

能祖 一裕 (NOUSO KAZUHIRO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10314668

白羽 英則 (SHIRAHA HIDENORI)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：40379748