

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791530

研究課題名（和文）

microRNAによるiPS化ADSCを用いた肝組織の再設計・構築と肝不全治療

研究課題名（英文）

liver failure treatment and redesign and construction of liver tissue using iPS-ADSC

研究代表者

谷田 司（TANIDA TSUKASA）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30571377

研究成果の概要（和文）：

肝不全に対し脳死または生体をドナーとした肝移植療法が行われている。しかしドナー不足によりその恩恵にあずかる患者は限られており、生体肝移植においては、ドナーへの過大な負担の上に成り立っている。従って肝不全に対する肝再生療法の開発は急務である。本研究では ADSC, iPS-ADSC を用いて肝組織を in vitro で再構築・設計し、それを移植時に打ち込み composite graft としてレシピエントに移植する又は肝不全患者の肝臓に直接組織移植する次世代型の肝再生療法の開発を行う。新しいストラテジーの臨床応用により脳死肝移植の成績向上はもちろん、生体肝移植では切除する生体肝グラフト量を減らすことが可能となり、生体ドナーの負担を軽減し、安全な移植医療を実現できると考えている。

研究成果の概要（英文）：

We design liver tissue in vitro using ADSC, iPS-ADSC and transplant into recipient as composite graft. Furthermore we transplant ADSC, iPS-ADSC directly into the liver of a patient with liver failure. As a result, we can achieve a safe liver transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

現在、肝硬変末期や急性肝不全患者にとって肝臓移植が唯一の救命法である。しかし肝移植療法は脳死患者からの臓器移植はドナー不足という移植医療全体の問題があり、依然生体肝移植に頼っているのが現状である。しかし生体肝移植におけるドナー肝臓は健常者からの提供であり、肝切除は少なからずドナーに負担を掛けることになる。またレシピエントサイドから見れば、必要十分量のグラフトを移植することが肝不全患者の救命のポイントになるが、大量肝切除はドナーへの負担が増大してしまう。そこで現在、劇症肝炎、肝酵素疾患の治療に新たな治療法として肝細胞移植が臨床において試験的に試みられている（Fox I.J., *Transplantation*,

1998)。しかし成熟肝細胞は生体外で増殖させることは困難であり、生体肝移植の代替治療にはまだ未熟である（Andrew W.D., *Gastroenterology*, 2009）。

再生医療に利用されつつある生体に存在する組織幹細胞を応用した肝再生療法に着目した。組織幹細胞を利用した肝疾患治療としては、自己骨髄細胞の移植により肝硬変患者の肝機能改善例や、骨髄由来間葉系幹細胞（bone marrow-derived MSC; BMSC）を肝細胞様細胞に分化させ動物実験で肝障害の改善例が報告されている（Terai S, *Stem Cells*, 2006）。また ES 細胞のサイトカイン刺激により in vitro 実験で肝幹細胞に分化した報告もある（Hamazaki T, *FEBS*, 2001）。骨髄由来 stem cell は、採取時の

患者への負担が大きく採取量も限界がある。そこで本研究では脂肪組織から分離した脂肪組織由来幹細胞(adipose tissue-derived stromal cells; ADSC)に着目した。ADSCは皮下脂肪組織に存在する体性幹細胞(Zuk PA, *Tissue Eng*, 2001)であり、ラット肝障害モデルにおいてADSCの門脈内投与により血中肝逸脱酵素、Alb値が改善したと報告している(Liang L, *Hepatology Research*, 2009)。また血管への分化と新生血管誘導作用を持ち、さらに多分化能を有する(Planat-Benard V, *Circulation*, 2004)ため肝細胞そのものへの分化も可能と考えられる。しかしADSCの多分化能はiPS細胞に比べればまだ弱く、肝組織としての再生(肝細胞,胆管上皮細胞)は難しいと考えられており、ADSCに山中因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC)を遺伝子導入することでiPS化したADSC(iPS-ADSC)を作成できたという報告がある(Ning Sun, *PNAS*, 2009)。しかし、この方法ではc-MYCが変異を起こして細胞が無限に増殖することによる癌化の可能性が高いことが報告されている。そこで、当科では多能性幹細胞において高発現を示す数種のmicroRNAを選定・抽出し、これらを用いてADSCのreprogrammingを行う方法を開発した。さらに、reprogrammingを行ったADSC(miPS-ADSC)はさまざまな細胞に分化することを示した(*Nature*, 2010 submitted)。このわれわれオリジナルの方法を用いることで癌化の可能性を下げ、安全にiPS-ADSCを作成することができる。このiPS-ADSCを利用すればより効率よく肝細胞,胆管上皮細胞へ分化すると言われている肝幹細胞,オーバル細胞の再生が期待できる。ヒト骨髄間葉系細胞、皮膚線維芽細胞に長時間トリプシン処理を行い、幹細胞培養で用いられる

また、浮遊培養を行うと、ヒトES細胞の胚様体と非常によく似た細胞塊を形成されることを見出し、その細胞はMuse細胞と呼ばれ、3胚葉性の細胞に分化する能力を有するヒト生体由来の多能性幹細胞である(Kuroda et al, *PNAS*, 2010)。すなわち、脂肪組織より分離したADSCの中にも一定のpopulationでMuse細胞の様に多分化能を持った細胞集団が存在することが予測され、iPS化まで修飾しなくてもADSCだけでも肝再生に用いることができると考えており、実際に劇症肝炎モデルマウスの静脈内にMuse細胞を投与した実験ではこれらの細胞は傷害肝にフォーミングし肝細胞へと分化したことを示した。臨床の現場で、肝不全患者の生体内にADSCを移植することで、ADSCが傷害肝にフォーミングし、肝細胞に分化する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

レシピエントにおける移植肝の再生増大を組織幹細胞によって促進し、生体肝移植ドナーへの負担を軽減し、より安全な移植を可能にする。

3. 研究の方法

(1)肝炎モデルを用いて、ADSCの有効性の解析:脂肪組織より分離したADSCの中にも一定のpopulationで多分化能を持った細胞集団が存在することが考えられ、iPS化しなくてもADSCだけで肝再生に用いることができると予測される。4週齢雄ラットを四塩化炭素の腹腔内投与により、肝障害を誘導する。肝炎モデルマウスの静脈内にレンフェラーゼをトランスフェクトしたADSCを移植することで、ADSCが傷害肝にフォーミングし、肝細胞に分化するかどうか評価する。また、ADSCをGFPマウスから採取して静注することにより肝細胞への分化誘導や抗炎症効果の有無を評価する。採血を行い、肝障害マーカー(AST,ALT)、アルブミン、サイトカイン等を計測し炎症、肝再生の評価を行う。

(2)肝移植モデルを用いてADSCの有効性の解析:ADSCそのものを肝グラフトにinjectionして移植実験を行うことで肝グラフトへ新生血管が分化・誘導されることを確認する。移植に最適なADSCの細胞数を同定する。また、miPS-ADSC、さらにはADSC+miPS-ADSCのhybridを肝グラフトに注入し移植実験を行う。こちらも肝グラフト内で肝細胞が分化・誘導されることを確認する。

(3)肝移植モデルにおいてADSC, iPS-ADSCから分化誘導した細胞を利用したcomposite graft移植の有効性を検討:
ADSCそのものからサイトカイン

(aFGF,HGF,OSM,Dex,ITS)刺激により肝幹細胞, オーバル細胞を再生し、肝組織構成細胞成分である Alb+細胞である肝細胞, CK19+細胞である胆管上皮細胞に分化可能か検討する。また miPS-ADSC から肝幹細胞, オーバル細胞を再生し、肝組織成分である肝細胞,胆管上皮細胞への分化を誘導する。それらを combindして *in vitro* で肝組織を再構築すること。それを肝炎、または肝不全マウスに移植することで有効性を検討する。

(4)miPS-ADSC の安全性の検討:

実際にマウスを用いて癌化しないかを検討する。miPS細胞の癌化率を抑制し効率的な iPS-ADSC を樹立し Composite liver graft として移植モデルを用いて有効性をみる。また p53 KO mice, Nanog-GFP mice から iPS-ADSC を樹立し、miPS-ADSC との癌化率を比較検討する。

4. 研究成果

iPS-ADSC などの研究の準備段階であり成果はない。

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 0 件)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷田 司 (TSUKASA TANIDA)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30571377