

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591999

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞由来肝細胞の分化誘導法確立と細胞移植における有用性の検討

研究課題名(英文) Establishment of hepatocytes differentiation from human multipotent stem cells and investigation for the effectiveness of cell transplantation

研究代表者

安近 健太郎 (Yasuchika, Kentaro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00378895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト間葉系幹細胞(hMSC)を、すでに報告されているin vitro分化誘導法により分化誘導したうえで、retroorsinelにより肝障害を与えた免疫不全(X-SCID)ラットに経門脈的に移植した。移植細胞はラット肝臓組織に生着し、ヒトアルブミン発現およびCYP3A4活性を確認できた。また、一部の生着細胞にはPCNA発現を認め、増殖活性も確認できた。さらに、細胆管マーカーであるDPPIV発現を検証することでラット細胆管との連続性が確認できたことから移植細胞がラット肝の正常組織構築に参画していることを確認した。一方、腸間膜内肝細胞移植実験も行い、移植細胞による残存肝への組織保護効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Human hepatocytes which derived from human MSCs in vitro as previously reported were transplanted into X-SCID rat via portal vein. The transplanted human hepatocytes were incorporated into rat liver and produce albumin and CYP3A4, which represented functional hepatocytes. In addition, several transplanted hepatocytes showed PCNA activity, which represented the cell progression. Furthermore, the DPPIV expression assay revealed the histological contiguity of transplanted human hepatocytes with rat liver tissue, which represented the physiological incorporation of transplanted cells. On the otherhand, hepatocytes transplantation into mesentery revealed the effectiveness of hepatocyte transplantation for the rescue of acute lethal liver damage occurred by 90% hepatectomy. Transplanted hepatocytes work not only as compensation for hepatic function but also protection of remnant liver tissue, which identified by histological findings and ATP status in remnant liver.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：再生医学 間葉系細胞 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

致死性肝疾患に対する移植手術の適応拡大とともに、慢性的なドナー不足が問題となっており、肝組織、肝細胞の安定供給の確保は火急の問題である。現在、本邦では生体肝移植が主流であり、1997年10月の脳死臓器移植法案の施行、さらに2010年1月17日の法改正を経て、脳死肝移植の症例も増加はしているが、ドナー不足の解決にはほど遠い状況である。さらに2010年5月のWHO年次総会にて承認された新指針においては、海外渡航移植を自粛するように求めており、国内においてますますドナー不足が深刻となる可能性がある。また生体肝移植では、生体ドナーへの手術侵襲および移植肝の容量不足 (small-for-size graft) が問題となる。

そこで近年肝細胞移植が肝移植の代替もしくは補助手段として、検討されるようになってきた。我々の研究グループでは致死性肝障害モデルマウスに対して、マウス由来の成熟肝細胞および幼若な胎仔肝細胞、ES細胞由来内胚葉系細胞の移植実験を行い、これらが肝障害マウスの生存率改善に貢献することを明らかにした[1, 2]。また、ES細胞由来内胚葉系細胞や幼若肝細胞などの未成熟な細胞と比較して、成熟した肝細胞のほうが、傷害肝への生着割合および生存率改善への貢献が高いことも我々の実験にて明らかになった。

臨床応用を考慮すると、移植肝細胞の供給源としては、ヒト肝臓の他に、多分化能を有する胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)から肝細胞を作成する方法が考えられている。1998年にヒトES細胞が樹立され、ここから肝細胞を分化誘導する方法が数多く報告され、またiPS細胞についても、これらに準じた方法での分化誘導法が報告されている。我々のグループも独自に分離した肝細胞の成熟化を促す

間葉系細胞との共培養を用いたES細胞からの肝細胞誘導法を確立し、報告している[3-5]。しかし、ヒト受精卵由来のES細胞を肝疾患の治療に用いることは、倫理的な問題を有するだけでなく、他人由来の組織であるため拒絶反応を引き起こす可能性が予測される。また、iPS細胞については、作成の際に癌遺伝子であるc-Mycを用いること、また分化が不十分なiPS細胞自体が腫瘍原性を持つことが指摘されており、臨床応用に至るまでには、重大な問題が未解決の状態である。

これに対し、近年間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の存在が注目されるようになった。MSCは骨髄や脂肪組織中にごく少数存在する多能性幹細胞で、*in vitro*で増殖し、様々な系統の細胞へ分化させることが可能で、肝細胞様の細胞への分化も報告されている[6]。さらに採取が比較的容易であり、患者本人から採取することも可能であるため、倫理的問題や拒絶反応の問題の解決が可能である。臨床においても、肝硬変の患者に患者自身のMSCを含む骨髄細胞を自家移植することで、肝機能を改善させたとの報告もある[7]。ただ、MSC由来肝細胞移植の臨床応用においては、まず治療効果改善のために、より成熟肝細胞に近い状態までの分化誘導法の開発が必要であり、また急性肝障害も含めた致死性肝疾患全体に対するMSCおよびMSC由来肝細胞の治療効果や生体内での増殖・生着についての解析が必要となる。

2. 研究の目的

ヒト間葉系幹細胞(hMSC)由来肝細胞を免疫不全動物(ラット)に移植する。この実験動物には急性および慢性の肝障害を加え、hMSC由来肝細胞移植による救命と、移植細胞の生体肝への生着および増殖の状態を評価し、幹細胞由来肝細胞の細胞移植における有用性を検証する。

3. 研究の方法

1. ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の肝細胞への分化誘導

a) 培地・分化誘導因子の選択、投与量・投与期間の検討

2. ヒト間葉系幹細胞(hMSC)由来肝細胞の分化度および肝細胞機能評価

a) 形態学的評価およびRT-PCRによる遺伝子発現の経時的解析、分化効率の評価

b) アルブミン産生能、アンモニア除去能、肝細胞特異的酵素活性などの肝細胞機能の評価

3. 肝障害を誘導した X-SCID ラットへの hMSC 由来肝細胞移植実験

a) 肝障害誘導ラット肝における、hMSC 由来肝細胞の生着・増殖能および分化形態の解析

b) 致死性肝障害誘導ラットに対する、未分化 hMSC、hMSC 由来肝細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞の細胞移植による生存率改善効果および生着能・分化形態の比較検討

4. 研究成果

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を、すでに報告されている *in vitro* 分化誘導法により分化誘導したうえで、retrosine により肝障害を与えた免疫不全 (X-SCID) ラットに経門脈的に移植した。移植細胞はラット肝臓組織に生着し、ヒトアルブミン発現および CYP3A4 活性を確認できた。また、一部の生着細胞には PCNA 発現を認め、増殖活性も確認できた。さらに、細胆管マーカーである DPPIV 発現を検証することでラット細胆管との連続性が確認できたことから移植細胞がラット肝の正常組織構築に参画していることを確認した。一方、大量肝切除に伴う致死的肝障害モデルマウスに対して腸間膜内肝細胞移植実験も行い、細胞移植による救命効果を確認するとともに、移植細胞による肝機能補助効果だけでなく、残

存肝への組織保護効果を ATP 活性により確認した。

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)

The protective effect of transplanted liver cells into the mesentery on the rescue of acute liver failure after massive hepatectomy.

Kita S, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kawai T, Yasuda K, Fukumitsu K, Mizumoto M, Uemoto S.

Cell Transplant. 2016 Feb 15

Engraftment and terminal differentiation of hepatocyte-like cells derived from human mesenchymal stem cells in the immunodeficient rat liver.

Kita S, Yasuchika K, Mashimo T, Kunihiro Y, Katayama H, Yoshitoshi EY, Kawai T, Yasuda K, Sasaki N, Kajiwara M, Ishii T, and Uemoto S
Under submission

〔学会発表〕(計 2 件)

S. Kita, K. Yasuchika, T. Ishii, H. Katayama, T. Kawai, S. Ogiso, E.Y. Yoshitoshi, K. Yasuda, M. Kajiwara, K. Fukumitsu, T. Ochiya, E. Hatano, T. Kaido, S. Uemoto

The new possibility of autologous hepatocyte transplantation to prevent from liver failure after massive hepatectomy

64th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver diseases, 2013

Washington DC

S. Kita, K. Yasuchika, T. Ishii, H. Katayama, T. Kawai, S. Ogiso, E.Y. Yoshitoshi, K. Yasuda, M. Kajiwara, K. Fukumitsu, T. Ochiya, E. Hatano, T. Kaido, S. Uemoto

THE NEW POSSIBILITY OF AUTOLOGOUS HEPATOCYTE TRANSPLANTATION TO PREVENT ACUTE LIVER FAILURE AFTER MASSIVE HEPATECTOMY

49th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2014

London

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安近 健太郎 (YASUCHIKA, Kentarou)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号： 00378895

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号： 40252449

石井 隆道 (ISHII, Takamichi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号： 70456789

(3) 連携研究者

()

研究者番号：