

Title	ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた肝細胞移植基盤技術の開発
Author(s)	長基, 康人
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56182
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (長基 康人)

論文題名

ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた肝細胞移植基盤技術の開発

論文内容の要旨

本邦における主な死亡原因の一つに肝疾患があり、その多くを劇症肝炎、肝硬変、肝がんなどが占めている。現在、これらの疾患に対する有効な根治治療は肝臓の臓器移植のみであるが、世界的にドナー数が不足しており、移植を受けることなく死亡する患者が増加しているのが現状である。そのため、肝臓移植の代わりとなる新規治療法が開発が求められている。肝細胞移植療法はその新規治療法候補の一つであり、臓器移植の代替、もしくは臓器移植までの橋渡し (bridge use) としての利用が注目されている。現在では、ヒトES細胞やヒトiPS細胞が無限に増殖可能な自己複製能と、様々な細胞に分化可能な多分化能を有していることに着目し、これらの細胞から分化誘導した肝細胞 (ヒトES/iPS細胞由来肝細胞) をヒト肝細胞の代替細胞供給源とすることが期待されている。近年、肝障害モデル動物へ、経脾移植や経門脈移植によりヒト肝細胞やヒトES/iPS細胞由来肝細胞を投与することが試みられている。しかし、これらの報告では移植方法や移植する細胞の性質に起因して、生着効率が低いことが指摘されている。その原因として、ヒトiPS細胞由来肝細胞が胎児型であること、すなわち成熟化が不十分であることや、肝細胞移植療法に用いられる移植法、すなわち経脾移植法や経門脈移植法自体の要因が指摘されている。そこで本研究においては、より成熟した肝細胞を作製するため、3次元培養法を駆使することで肝細胞への分化誘導法の改良を試みた。続いて、3次元培養法を利用して作製した肝細胞による肝細胞移植療法への応用性を検討するため、肝障害モデルマウスへの移植検討を行った。

細胞積層法は特殊な温度応答性高分子ポリマーを表面に結合させた温度応答性ディッシュを利用することで細胞をシート状に回収し、別種、もしくは同種の細胞の上に細胞シートを接着させることで複数の層からなる細胞集積体を作製することが可能な培養法である。本研究ではまず、ヒトES細胞及びヒトiPS細胞由来肝細胞を細胞積層法により3次元共培養することで肝成熟化を促進できないか検討を行った (1)。その結果、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞とSwiss 3T3細胞を細胞積層法を用いて3次元共培養することで各種肝関連遺伝子 (*ALB*, *glutathione S-transferase (GST) A1*, *cytochrome P450 (CYP) 2C9*, *CYP1A2*, *CYP3A5*) の発現量が大きく増加することが分かり、肝成熟化が促進されていることが示唆された。続いてSwiss 3T3細胞による肝成熟化促進機構の解明を試みた。一般に肝分化にはextracellular matrix (ECM) が重要であることが知られていることから、Swiss 3T3細胞が産生するECMによる肝成熟化促進効果を検討した。これまでにSwiss 3T3細胞は豊富にコラーゲンを産生し、その産生するコラーゲンのほぼ全てがI型コラーゲンであることが報告されている。そこで、I型コラーゲンゲルをヒトES細胞由来肝細胞に重層して検討を行ったところ、Swiss 3T3細胞を積層した場合と同様に、I型コラーゲンゲルを重層したヒトES細胞由来肝細胞はALBの遺伝子発現量が上昇した。また、Swiss 3T3細胞を積層したヒトES細胞由来肝細胞にI型コラーゲンゲルを重層しても同様の結果が得られた。次に、コラーゲン合成阻害剤である2,2'-Bipyridyl存在下でヒトES細胞由来肝細胞とSwiss 3T3細胞を3次元共培養し、肝関連遺伝子の発現を解析した。その結果、Swiss 3T3細胞と共培養したときのALB遺伝子の発現上昇が減弱することが明らかとなった。これらの結果から、I型コラーゲンは、Swiss 3T3細胞による肝成熟化促進に重要な因子の一つであることが明らかとなった。

一方、肝細胞移植療法の移植法には、単細胞に分散させた移植細胞を経血管的に標的臓器 (肝臓) へ送達させる移植法である経脾移植法や経門脈移植法が用いられている。これらの移植法は動物モデルに対しても共通して用いられており、これまでもヒト肝細胞やヒトiPS細胞由来肝細胞を経脾移植法、もしくは経門脈移植法により動物モデルへ移植できることが報告されている。しかしながら、これらの移植法は操作が簡便である一方、anoikisなどによる移植細胞のアポトーシスが誘導される、血流によって目的外の臓器にも移植細胞が分布するといった問題点が指摘されている。これらの問題点を解決することができれば、ヒトiPS細胞由来肝細胞の肝細胞移植療法への応用の進展が期待できる。そこで、肝細胞移植方法の改良を試みることで、これらの問題点を解決できないか検討した。

まず移植細胞に抗アポトーシス遺伝子Bcl-xLの機能増強型変異体FNKを遺伝子導入することでヒトiPS細胞由来肝細

胞の生着効率改善を試みた(2)。Bcl-xLは肝細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしており、Bcl-xLを過剰発現させることで移植細胞の抗アポトーシス活性が上昇し、生着効率を改善できることが期待できる。そこでFNK発現AdベクターであるAd-FNK、もしくはコントロールとしてLacZ発現AdベクターであるAd-LacZを作用させたヒトiPS細胞由来肝細胞を、慢性肝障害免疫不全マウスであるuPA/SCIDマウスに移植した。以下では、Ad-FNKを作用させたヒトiPS細胞由来肝細胞を移植したマウス群をFNK mice、もしくはAd-LacZを作用させたヒトiPS細胞由来肝細胞を移植したマウス群をLacZ miceとした。その結果、マウス肝臓への生着効率の指標としてマウス血中ヒトアルブミン濃度を測定したところ、移植4週間後のFNK miceは約24,000 ng/ml、LacZ miceは約7,400 ng/mlに達した。また、FNK miceの血中ヒトアルブミン濃度はLacZ miceの濃度と比較して、移植2~4週後の間、有意に高値を示した。続いてヒトの α AT特異的な抗体を用いてマウス肝臓の免疫抗体染色を行った。マウス肝臓全体の面積に対するヒト α AT陽性コロニーの面積比を計算することで、FNK miceおよびLacZ miceの肝臓置換効率を測定したところ、FNK miceの肝臓置換率はLacZ miceの置換率と比較して有意に高いことが明らかとなった。以上の結果から、Ad-FNKを作用させたヒトiPS細胞由来肝細胞は肝臓への生着効率に優れており、再生医療などへの応用に有用であると考えられる。

次にヒトiPS細胞由来肝細胞の生着効率を改善するため、ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞をシート状にマウス肝臓表面へ移植することを試みた(3)。細胞シート工学技術を用いることで、トリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく、細胞が分泌、構成した細胞外マトリクスと結合した状態で細胞をシート状に回収することができる。そのため、anoikisなどを起こすことなく大量の細胞を目的の部位に届けることが可能であり、細胞シート工学技術は第一章で用いたような3次元培養のみならず、再生医療への応用が検討されている。肝細胞シート移植法の生着効率を評価するため、移植前日にルシフェラーゼ発現Adベクターを作用させたヒトiPS細胞由来肝細胞をマウスに移植し、その翌日にマウス肝臓のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、肝細胞シート移植法を用いて移植したマウス

(sheet-mice) および従来法である経脾移植法を用いて移植したマウス (intrasplenic-mice) のどちらにおいてもマウス肝臓からルシフェラーゼ活性が検出されたものの、その活性値はsheet-miceで有意に高値を示した。さらに、移植2週間後にマウス血清中のヒトアルブミン濃度を測定したところ、sheet-miceの血清中ヒトアルブミン濃度(約241 \pm 40 ng/ml)はintrasplenic-miceの血清中ヒトアルブミン濃度(約92 \pm 33 ng/ml)よりも有意に高かった。これらの結果より、移植後の生着効率という観点から、肝細胞シート移植法は従来法である経脾臓移植法よりも優れることが示唆された。続いて、肝細胞シート移植法の再生医療への応用性を検証するため、前日に致死量の四塩化炭素 (CC14) を投与した急性肝障害モデルマウスへ、肝細胞シート移植法、もしくは経脾移植法によりヒトiPS細胞由来肝細胞を移植した。その結果、sheet-miceの生存率(14日目; 63.2%)はintrasplenic-miceの生存率(14日目; 33.3%)や偽移植群 (sham-mice) の生存率(14日目; 16.7%)と比較して有意に高かった。しかしながら、intrasplenic-miceの生存率とsham-miceの生存率には有意な差が見られなかった(P=0.381)。以上の結果から、肝細胞シート移植法は急性肝障害の治療に有用であることが示唆された。

以上、本研究では、治療効果の高いヒトiPS細胞由来肝細胞移植法の開発を目指し、ヒトiPS細胞由来肝細胞の作成法およびその移植法の最適化を行った。2007年にヒトiPS細胞が樹立され、難治性疾患の治療に繋がることから、再生医療への期待が高まっている。2014年9月には加齢黄斑変性の患者に対し、患者本人の皮膚細胞から樹立したiPS細胞を用いて網膜色素上皮細胞を作製し、移植する世界初の試みが行われた。その他にも、ホモ型のHLAを有するヒトiPS細胞を事前にストックすることで、患者本人からヒトiPS細胞を樹立せずとも利用できるようにするというバンク事業が京都大学iPS細胞研究所において開始されている。TALENやCRISPR/Cas9といったゲノム編集技術も急速に発達しており、遺伝子疾患の治療への応用も期待されている。今後、本研究成果が、ヒトiPS細胞由来肝細胞移植療法の一日も早い実現に役立つことを期待する。

参考論文

- 1 Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Hayakawa H., Furue MK., Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets, *Biomaterials*, 2012 Jun;33(18):4526-34.
- 2 Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene, *Cell Transplantation*, 2015 Jun; 24(6):1127-1138.
- 3 Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Okamoto R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Transplantation of human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure, *Journal of Hepatology*, in press.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (長 基 康 人)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 水口 裕之
	副 査	教 授 中川 晋作
	副 査	教 授 土井 健史

論文審査の結果の要旨

本邦における主な死亡原因の一つに肝疾患があり、その多くを劇症肝炎、肝硬変、肝がんなどが占めている。現在、これらの疾患に対する有効な根治治療は肝臓の臓器移植のみであるが、世界的にドナー数が不足しており、移植を受けることなく死亡する患者が増加しているのが現状である。そのため、肝臓移植の代わりとなる新規治療法の開発が求められている。肝細胞移植療法はその新規治療法候補の一つであり、臓器移植の代替、もしくは臓器移植までの橋渡し (bridge use) としての利用が注目されている。現在では、ヒトES細胞やヒトiPS細胞が無限に増殖可能な自己複製能と、様々な細胞に分化可能な多分化能を有していることに着目し、これらの細胞から分化誘導した肝細胞 (ヒトES/iPS細胞由来肝細胞) をヒト肝細胞の代替細胞供給源とすることが期待されている。近年、肝障害モデル動物へ、経脾移植や経門脈移植によりヒト肝細胞やヒトES/iPS細胞由来肝細胞を投与することが試みられている。しかし、これらの報告では移植方法や移植する細胞の性質に起因して、生着効率が低いことが指摘されている。その原因として、ヒトiPS細胞由来肝細胞が胎児型であること、すなわち成熟化が不十分であることや、肝細胞移植療法に用いられる移植法、すなわち経脾移植法や経門脈移植法自体の要因が指摘されている。そこで、申請者は肝細胞成熟化技術の開発と移植技術の改良に取り組み、以下の結果を得た。

- (1) Swiss 3T3 細胞と3次元共培養することでヒトES/iPS細胞由来肝細胞を肝成熟化できることを明らかとした。また、その肝成熟化機構の主要な要因として、Swiss 3T3細胞が産生するI型コラーゲンがあることを示した。
- (2) 抗アポトーシス遺伝子 *Bcl-FNK* を移植時一過的に過剰発現させることにより、ヒトiPS細胞由来肝細胞のマウス肝臓への生着効率の向上できることを示した。また、マウス肝臓に生着後、ヒトiPS細胞由来肝細胞の肝関連遺伝子の発現量が顕著に増加することを明らかにした。
- (3) ヒトiPS細胞由来肝細胞シート移植法を新規に開発した。本移植法が従来法である経脾移植法と比較して、生着効率、生着位置の制御の観点で優れていることを示した。また、本移植法を用いることで急性肝障害マウスの生存期間を有意に改善することに成功した。これらのことから、本移植法は再生医療に応用できる可能性が示唆された。

以上、本研究では治療効果の高いヒトiPS細胞由来肝細胞移植法の開発を目指し、ヒトiPS細胞由来肝細胞の作成法およびその移植法の最適化を行った。2007年にヒトiPS細胞が樹立され、難治性疾患の治療に繋がることから、再生医療への期待が高まっている。2014年9月には加齢黄斑変性の患者に対し、患者本人の皮膚細胞から樹立したiPS細胞を用いて網膜色素上皮細胞を作製し、移植する世界初の試みが行われた。今後、本研究はヒトES/iPS細胞由来肝細胞を用いた再生医療の確立に大きく貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。