

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：iPS 細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点
2. 研究開発代表者：谷口 英樹（横浜市立大学大学院医学研究科）
3. 研究開発の成果

我々はヒト iPSC 肝芽の創出技術を再生医療へ応用するために、均一性と安全性を担保しながら、大量に、かつ、低コストで、iPS 細胞からヒト肝芽（ヒト iPSC 肝芽）を創出可能な製造工程を産学連携体制で構築することを目標に研究を進めている。さらに、ヒト iPSC 肝芽移植の安全性および有効性を評価することを目標として、代謝性肝疾患（OTC 欠損症、CPS1 欠損症等）を対象とした臨床研究の早期実現を目指している。

このため、本年度は（1）A11-iPS 細胞由来肝芽（A11-iPSC 肝芽）の大量創出のための基礎プロトコルの確立（2）ヒト iPSC 由来細胞/臓器の品質評価法の確立（3）ヒト iPSC 肝芽移植操作技術の確立およびヒト iPSC 肝芽による肝疾患治療モデルの検証を中心に実施した。

これまでにヒト iPSC 肝芽（肝細胞  $1 \times 10^8$  個相当）の一次的製造を目的にマイクロパターンプレートを用いたヒト肝芽創出法の開発とヒト iPSC 細胞由来肝内胚葉細胞の大量調製法の確立を目指して研究開発を推進し、(株)クラレの開発した大面積化マイクロウェルプレートを用いて、一次的な製造量を大幅に拡大することに成功している。これまで、ヒト iPSC 肝芽作製には臍帯より分離した血管内皮細胞（HUVEC）および骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を利用していた。しかし、各細胞材料の標準化および今後の発展性を考慮すると、全ての細胞材料（現時点では3種類）を iPS 細胞から分化誘導して使用することが望ましいと考えられる。

そこで、全てがヒト iPSC 細胞由来のヒト器官原基の作製を目指し、ヒト iPSC 細胞から血管内皮細胞および間葉系幹細胞の分化誘導を試みた。ヒト iPSC 細胞より分化誘導した血管内皮細胞および間葉系幹細胞を用いてヒト iPSC 肝芽を作製するとこれまでのヒト臍帯由来血管内皮細胞および間葉系幹細胞を用いて作製した場合と同様に、三次元的な組織構造の再構成が観察された。さらに、免疫不全マウスに移植したところ移植したヒト iPSC 肝芽の血管化が観察された。これらのことから、ヒト iPSC 細胞から肝臓前駆細胞だけではなく、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の分化誘導を行うことにより、「全てがヒト iPSC 細胞由来の A11-iPS 細胞由来肝芽（A11-iPSC 肝芽）」の作製基礎プロトコルを確立した。

また、ヒト iPSC 肝芽を臨床グレードで作製するため、京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）において構築される「再生医療用 iPS 細胞ストック」の利用を想定し、CiRA においてストック用 iPS 細胞の作製法に準じて作製された iPS 細胞を用いて iPSC 細胞由来肝内胚葉細胞の分化誘導および iPSC 肝芽作製を実施した。また、ヒト iPSC 肝芽用の培地開発、安全性・品質担保のためのヒト iPSC 肝芽およびその細胞材料の品質評価法の確立へ向けた、網羅的遺伝子発現解析およびメタボローム解析を実施した。

一方、ヒト iPSC 肝芽の生着効率とリスク評価を行うことで、最適な移植方法の検討を実施している。本年度においては、ヒト iPSC 肝芽の移植実験および動物細胞の同種移植モデルを中心にヒト肝芽を移植する際の効果的な移植法・サイズ・量・投与回数等の詳細な条件検討を実施した。さらに、ヒト iPSC 肝芽を用いた臨床研究の対象疾患である、尿素サイクル異常症（Urea Cycle Disorders）について実験動物中央研究所等との連携のもと、ヒト細胞を移植可能な重篤な免疫不全状態を背景に持つモデルマウスの樹立を進めている。