

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：肝細胞移植に向けたヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の維持・増殖技術の開発
2. 研究開発代表者：水口 裕之（大阪大学大学院薬学研究科）
3. 研究開発の成果

本研究では、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」を即した培養方法を用いて、ヒト iPS 細胞から肝幹前駆細胞、さらには肝細胞を分化誘導する技術を開発することを目標としている。さらに、作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞の治療有効性をモデル動物を用いて評価するとともに、その安全性についても検証する。平成 27 年度は、以下の 3 課題に取り組んだ。

1. 再生医療のためのヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の維持・増幅法の開発（臨床グレード細胞の作出）

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に即した条件下、ヒト iPS 細胞から肝幹前駆細胞、肝細胞への分化誘導法を開発した。ヒト iPS 細胞は、中核拠点（再生医療用 iPS 細胞ストック開発拠点；京都大学 iPS 細胞研究所）で再生医療用 iPS 細胞作製法に準拠する方法で作製されたヒト iPS 細胞株（no6；1383D6）を用いた。未分化ヒト iPS 細胞の維持をフィーダーフリー法（AK03 培地と iMatrix を使用）で実施し、肝細胞分化誘導過程においてアデノウイルスベクター及び血清を使用せずに、ヒト iPS 細胞 no6 から α フェトプロテイン陽性率 95% 以上の肝幹前駆細胞、アルブミン（ALB）陽性率 90%以上の肝細胞を作製することに成功した。また、ALB 産生量も約 5,000 μ g/ml/24hr/mg protein であることを確認した。以上のことから、アデノウイルスベクター及び血清を使用せずに機能的な肝幹前駆細胞や肝細胞を効率よく分化誘導可能であることが分かった。

2. 再生医療のためのヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の維持・増幅法の開発（ブタへの移植）

作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞の治療有効性を検証するために、H27 年度は、脱細胞化したブタ肝臓への肝細胞充填とその移植を行った。本実験は慶応義塾大学・北川雄光教授のグループと共同で実施した。ブタに移植するためにヒト iPS 細胞由来肝細胞（ 2×10^8 程度）を準備した。ラージスケールで肝幹前駆細胞、肝細胞を調製したときに、ALB 陽性率が低下しない（90%以上の陽性率）ことを確認した。さらに、予定を前倒してブタへの移植実験を行い、移植 1 週間後のブタ肝臓内にヒト ALB 陽性のヒト iPS 細胞由来肝細胞の生着を認めた。

3. 維持・増幅したヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞および肝細胞の安全性評価

ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の安全性を評価するため、未分化細胞混入率の評価、テラトーマ試験、ゲノム安定性の評価を行った。ラミニン 111 の E8 フラグメント（LN111-E8）を用いて純化した肝幹前駆細胞に混入しているコロニー形成可能な Tra1-60 陽性の割合は 0.003%程度であった。LN111-E8 を用いた純化をしない場合の混入率は 0.3%程度であった。LN111-E8 で純化することにより、未分化細胞の混入率を 100 倍以上減らすことが可能になった。また、これまでに 60 匹以上の免疫不全マウスである NOG マウスの皮下にヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞を移植したが、テラトーマの形成は 1 例も認められなかった。さらに、作製したヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞における造腫瘍性関連遺伝子の変異検出も試みた。本実験は東京医科歯科大学・森尾友宏教授とともに行った。次世代シーケンサーを用いた解析を行ったところ、肝幹前駆細胞の分化誘導過程、肝幹前駆細胞の維持過程において、造腫瘍遺伝子に新規変異が認められなかった。

ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の凍結技術の開発をリプロセル社と共同で実施した。ヒト iPS 細胞株 no6 から分化誘導した肝幹前駆細胞を H26 年度までに策定した条件で凍結し、解凍後、肝細胞への分化誘導を行った。肝幹前駆細胞の凍結により、その分化能や細胞生存率が低下しないことを確かめた。