

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患・組織別実用化研究拠点
(英語) **Centers for Clinical Application Research on Specific Disease/Organ**

研究開発課題名： (日本語) iPS細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点
(英語) Center for development of innovative technologies for metabolic organs using induced pluripotent stem (iPS) cells

研究開発担当者 (日本語) 横浜市立大学・教授・谷口英樹

1. 所属 役職 氏名： (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Professor, Hideki Taniguchi

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) All-iPSC 肝芽大量作製法の確立

開発課題名： (英語) Establishment and validation of all-iPSC-liver bud.

研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学・准教授・武部貴則

所属 役職 氏名： (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Associate Professor, Takanori Takebe

分担研究 (日本語) ヒト iPSC 肝芽による肝疾患治療モデルの検証(Proof-of-Concept (POC) の確認)

開発課題名： (英語) Evaluation of mass production of hiPSC-liver bud at a clinical grade.

研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学・准教授・村田聡一郎

所属 役職 氏名： (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Associate Professor, Soichiro Murata

分担研究 (日本語) 網羅的遺伝子発現解析に基づく iPSC 肝芽の品質評価法の確立
開発課題名: (英語) Establishment of transcriptomic evaluation method for quality control of iPSC-liver buds.
研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学・助教・関根圭輔
所属 役職 氏名: (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Assistant Professor, Keisuke Sekine

分担研究 (日本語) タンパク質および代謝レベルの解析に基づく iPSC 肝芽の品質評価法の確立
開発課題名: (英語) Establishment of proteomic and metabolomic evaluation methods for quality control of iPSC-liver buds.
研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学・助教・上野康晴
所属 役職 氏名: (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Assistant Professor, Yasuharu Ueno

分担研究 (日本語) 臨床グレードでのヒト iPSC 肝芽大量製造に向けた検討
開発課題名: (英語) Evaluation of mass production of iPSC-liver bud at a clinical grade.
研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学・特任講師・岡本理志
所属 役職 氏名: (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Project Lecturer, Satoshi Okamoto

分担研究 (日本語) GCTP に準拠したヒト iPSC 肝芽の搬送法 (含保存) の検討
開発課題名: (英語) Establishment of storage and conveyance systems for iPSC-liver buds conformable with GCTP.
研究開発分担者 (日本語) 横浜市立大学・助教・田所友美
所属 役職 氏名: (英語) *Department of Regenerative Medicine,*
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Assistant Professor, Tomomi Tadokoro

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者による報告の場合

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、安定的かつ大量に iPSC 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-iPSC 細胞由来肝芽(A11-iPSC 肝芽)の大量作製法および品質評価法の確立、(2) ヒト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、(3) 臨床研究に向けた実施体制整備強化および施設・設備の整備を中心に研究開発をすすめた。

まず、平成 27 年度に確立した「全てがヒト iPSC 細胞由来の A11-iPSC 細胞由来肝芽(A11-iPSC 肝芽)」の作製基礎プロトコールをさらに改良し、ヒト iPSC 細胞由来肝内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞の大量調製法を確立した。また、ヒト iPSC 細胞由来肝内胚葉細胞の分化誘導に必要な培地の組成について、生物由来原料基準に準拠可能なプロトタイプ組成の設計が完了した。A11-iPSC 肝芽はヒト成人肝細胞株で作製した肝芽とほぼ同等のアンモニア代謝能を有し、クラレ社製 Elplasia マイクロウェルプレートを用いて大量製造が可能であることが確認された。さらに A11-iPSC 肝芽の品質評価を実施するため、シングルセルレベルでの網羅的遺伝子発現解析やタンパク質および代謝レベルの評価系の構築を進めた。

また、A11-iPSC 肝芽を中心に移植操作法について検討をすすめた。大量製造した A11-iPSC 肝芽をマウス肝不全モデルの腎被膜に移植すると、このマウスの生存率が有意に改善された。また、OTC 欠損マウスへの A11-iPSC 肝芽移植による治療効果検討が進捗した。A11-iPSC 肝芽を用いた治療対象疾患を尿素サイクル異常症だけでなく、より症例の多い肝硬変に適応拡大するため、免疫不全肝線維化モデルを確立し、移植効果の検討をすすめた。また、ブタは臨床と同等の移植手技を検討できる優れた前臨床研究モデルであることから、明治大学・国立成育医療研究センターと共同で肝芽移植の安全性・有効性検討を行った。OTC 欠損ブタは生後早期に死亡するが、薬物治療による生存期間の延長がみられたため、今後、肝芽移植の有効性検討を目指す。

一方、臨床研究の実施に向けて、国立成育医療研究センターを中心に臨床研究プロトコールの作成を進めた。尿素サイクル異常症の症例蓄積施設にアンケートを行い、本研究への参加(新生児期の患者移送)の可能性について、関東甲信越の施設から協力的な回答を得た。今後、これらの施設との協力体制を構築・強化していくことにより、臨床研究の対象症例数の増加が見込まれる。また、臨床研究の実施可能な施設要件を満たすため、本学に建設された細胞加工施設 (Cell Processing Facility, CPF) 及びその中に導入された細胞製造システムに関して改修工事を行った。

We are aiming at the early realization of clinical research for metabolic liver disease (OTC deficiency and CPS 1 deficiency, etc.) using the human induced pluripotent stem cell liver bud (iPSC-LB). For applying iPSC-LB generation technology to regenerative medicine, we are going to build a manufacturing process capable of creating human iPSC-LBs from iPSCs stably and in large quantities via joint efforts of both industry and academia.

Therefore, in this fiscal year, we have (1) established a mass production method and quality evaluation technique for all iPSC-derived LBs, (2) optimized a human LB transplantation technique, (3) consolidated an implementation system for clinical research, and improved the facilities. We have further improved the basic protocol for preparation of all iPSC-derived LBs. In addition, we have redesigned the composition of the culture medium required for the induction of differentiation in human iPSC-derived hepatic endoderm to comply with an appropriate standard. It was confirmed that all iPSC-LBs exhibited an ammonia metabolizing ability almost equivalent to that of human adult hepatocytes. Furthermore, comprehensive gene expression analysis at the single-cell level and an evaluation system for the protein and metabolism level were advanced to evaluate the quality of all iPSC-LBs. We also studied the transplantation procedures for all iPSC-LBs. When mass produced all iPSC-LBs were transplanted into the kidney capsules of a mouse liver failure model, the survival rate of the mouse significantly improved. To expand target diseases using all iPSC-LBs for more frequent hepatic cirrhosis, we established an immunodeficient liver fibrosis model and studied the effects of transplantation. In addition, we studied the safety of clinically equivalent transplantation techniques of LB transplantation by using a porcine model in collaboration with the Meiji University and National Center for Child Health and Development. Furthermore, we continued establishing clinical research protocols. Also, we renovated the cell processing facility built at our university and the cell manufacturing system introduced therein.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5 件、国際誌 9 件)

1. Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Taniguchi H. Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-chain amino acid metabolism. *Development*. 2017, 15;144(6):1018-1024.
2. Zhang RR, Zheng YW, Taniguchi H. Generation of a Humanized Mouse Liver Using Human Hepatic Stem Cells. *J Vis Exp*. 2016, 29;(114). doi: 10.3791/54167.
3. Ogasawara A, Yamada Y, Torimoto N, Tsuda N, Aohara F, Ohashi R, Taniguchi H. New screening criteria setting on evaluation of cytochrome P450 induction using HepaRG cells with multiplex branched DNA technologies in early drug discovery. *Drug Metab Lett*. 2016;10(3):152-160.
4. Sekine K, Takebe T, Taniguchi H. Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud. *Methods Mol Biol*. 2017, 1597:207-216.
5. Kagimoto S, Takebe T, Kobayashi S, Yabuki Y, Hori A, Hirotohi K, Mikami T, Uemura T, Maegawa J, Taniguchi H. Autotransplantation of Monkey Ear Perichondrium-Derived Progenitor Cells for Cartilage Reconstruction. *Cell Transplant*. 2016, 25(5):951-62.
6. 谷口 英樹「臓器の再生に向けて 総論 ヒト臓器の再生研究は如何にして始まったのか？」*Medical Science Digest* (1347-4340)43 巻 1 号 Page12-13, 2017.
7. 武部 貴則, 谷口 英樹「肝疾患に対する再生治療戦略」*Medical Science Digest* (1347-4340)43 巻 1 号 Page22-25, 2017.
8. 松崎 賢寿, 吉川 洋史, 谷口 英樹, 武部 貴則「バイオマテリアルを基盤とした生命科学研究 (Materials-based biology)～人工細胞外基質の硬さと器官原基の自己組織化～」*バイオマテリアル-生体材料* (1347-7080)35 巻 1 号 Page58-61, 2017
9. 谷口 英樹「人工臓器 ～最近の進歩 人工肝臓 ヒト肝臓オルガノイドの創出技術～」*人工臓器* (0300-0818)45 巻 3 号 Page179-182, 2016
10. 谷口 英樹「iPS 細胞からヒト臓器を創る! 如何にして器官発生を模倣するのか?」*神奈川医学会雑誌* (0285-0680)43 巻 2 号 Page252-259, 2016.
11. 谷口 英樹「再生医療の進歩と臨床応用 肝疾患を対象とした再生医療の現況」*Journal of Clinical Rehabilitation* (0918-5259)25 巻 7 号 Page704-707, 2016.
12. 武部 貴則, 谷口 英樹「腎臓発生学と再生医学への応用 ～ヒト器官原基創出と臨床応用～」*医学のあゆみ* (0039-2359)257 巻 11 号 Page1163-1168, 2016.
13. 谷口 英樹, 武部 貴則「iPS 細胞と消化器疾患 ～iPS 細胞と肝疾患 臓器としての肝臓の再生～」*G.I.Research* (0918-9408)24 巻 2 号 Page101-105, 2016.
14. 谷口英樹「iPS 細胞を用いたヒト臓器の創出技術」*PHARM STAGE* 16(2)10-13, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(国際学会・シンポジウム)

1. Taniguchi H, Takebe T: GENERATION OF FUNCTIONAL HUMAN LIVER FROM PLURIPOTENT STEM CELL. 25th conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver Invited Speaker Feb. 23, 2016 Tokyo
2. Taniguchi H, Murata S, Yunzhong N, Miyakawa K, Ryo A: Generation of new cell culture system using human iPS cells for infection with hepatitis virus. **2016 APASL Single Topic Conference on Hepatitis C** Invited Speaker, 2016/6/10-12, Taiwan.
3. Taniguchi H, Sekine K, Okuda R, Ueno Y: Development of a human pancreatic cancer organoid recapitulating the tumor microenvironment. **The 41st Naito Conference**, Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance Invited Speaker, 2016/7/5-8, Japan.
4. Taniguchi H: Generation of functional human organ from pluripotent stem cell. **Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference (APASL STC)** Invited speaker, 2016/4/8-10, Korea.

(国内学会・シンポジウム：招待講演)

1. 谷口英樹：iPS細胞を用いたヒト臓器創出技術の開発 **東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター主催 AMED「革新的先端研究開発支援事業 LEAP」協賛シンポジウム** 招待講演、口頭 2017/3/6, 国内
2. 谷口英樹：iPS細胞を用いたヒト組織の三次元的再構成 **第80回日本皮膚科学会** 東京支部学術大会 招待講演 2017/2/11 国内
3. 谷口英樹：iPS細胞を用いたヒト肝臓創出技術の開発 **第39回日本分子生物学会年会** バイオテクノロジーセミナー1BT17 招待講演 2016/11/30 国内
4. 谷口英樹、武部貴則：ヒト臓器の創出を目指す戦略的 iPS 細胞研究 **第31回日本薬物動態学会シンポジウム** 招待講演 2016/10/15

(国内学会・シンポジウム：一般演題)

1. 松崎賢寿、吉川洋史、谷口英樹、武部貴則：人工細胞外基質の硬さと器官原基の自己組織化. **第16回日本再生医療学会総会** 口頭 2017/3/7-9, 国内
2. 小井土大、木村昌樹、谷口英樹、武部貴則：ゲノムデータを活用した iPS 細胞研究の新展開. 第16回日本再生医療学会総会 口頭 2017/3/7-9, 国内
3. 高橋禎暢、武部貴則、小池直人、関根圭輔、谷口英樹：血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立. **第16回日本再生医療学会総会** ポスター 2017/3/7-9, 国内
4. 森淳祐、村田聡一郎、相馬勤、出田立郎、岸本治郎、谷口英樹：ヒト毛包由来間葉系細胞による毛包新生作用の検討. **第16回日本再生医療学会総会** ポスター 2017/3/7-9, 国内
5. 高橋禎暢、武部貴則、小池直人、関根圭輔、谷口英樹：血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立. **第44回日本膵・膵島移植研究会** 口頭 2017/3/10-11, 国内
6. 奥田諒、関根圭輔、上野康晴、佐藤準也、高橋正希、祖父江瑤子、井上直、濱中香織、谷口英樹：腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドの創出. **第39回分子生物学会**, 2016/11/30-2016/12/2, 国内

7. 奥田諒, 高橋正希, 佐藤準也, 関根圭輔, 上野康晴, 谷口英樹: 腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドの創出 **第75回日本癌学会総会**, 口頭, 2016/10/8, 国内
8. 村田聡一郎: iPS 細胞を用いた三次元組織作製のための基盤技術開発と臓器再生への応用 第52回日本移植学会総会 口頭 2016/10/1, 国内
9. 村田聡一郎: Generation of functional human organ from induced pluripotent stem cell (iPS cell) 第71回日本消化器学会総会 口頭 2016/7/14, 国内
10. 谷口英樹: 糖尿病の再生医療実現化に向けたアプローチ **第33回神奈川糖尿病研究会** 招待講演, 2016/6/25, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 谷口英樹: iPS 細胞を用いたヒト臓器創出技術の開発 **東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター主催 AMED 「革新的先端研究開発支援事業 LEAP」 協賛シンポジウム** 招待講演、口頭 2017/3/6, 国内

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム
(英語) Centers for Clinical Application Research on Specific
Disease/Organ

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点
(英語) Center for development of innovative technologies for metabolic
organs using induced pluripotentstem (iPS) cells

研究開発担当者 (日本語) 横浜市立大学・教授・谷口英樹

1. 所属 役職 氏名： (英語) Department of Regenerative Medicine,
Yokohama City University Graduate School of Medicine
Professor, Hideki Taniguchi

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合
研究開発代表者： 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・内分泌代謝科・堀川玲子
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 2件）

1. Baba C, Kasahara M, Kogure Y, Kasuya S, Ito S, Tamura T, Fukuda A, Horikawa R, Suzuki Y. Perioperative management of living-donor liver transplantation for methylmalonic acidemia. Paediatr Anaesth. 2016. 26,694-702.
2. Matsunami M, Fukuda A, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Hirata Y, Kanazawa H, Horikawa R, Nakazawa A, Suzuki T, Mizuta K, Kasahara M. Pediatr Transplant. Living donor domino liver transplantation using a maple syrup urine disease donor: A case series of three children - The first report from Japan. Pediatr Transplant. 2016. 20, 633-9.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患・組織別実用化研究拠点
(拠点B)

(英語) Centers for Clinical Application Research on Specific Disease/Organ

研究開発課題名：(日本語) iPS 細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点

(英語) Centers for Clinical Application Research on Specific Disease/Organ

研究開発担当者 (日本語) 長嶋 比呂志 農学部 教授

所属 役職 氏名：(英語) Hiroshi Nagashima Professor, School of Agriculture

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) なし

開発課題名：(英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：横浜市立大学 大学院医学研究科 谷口英樹 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 1件）

1. 渡邊将人, 長嶋比呂志. ブタでのゲノム編集. 実験医学増刊. 2016, 34(20):175-179.
2. Kobayashi E, Enosawa S, Nagashima H. Experimental hepatocyte transplantation in pigs. Methods in Molecular Biology. 2017, 1506:149-160.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Combining breeding and advanced reproduction techniques for regenerative medicine, 招待講演, Nagashima H, Plant and Animal Genome Asia 2016, 6-8 Jun 2016, Singapore, Singapore, 海外.
2. 動物のゲノム編集とその医学応用, 招待講演, 長嶋比呂志, 日本ビタミン学会第68回大会, 17-18 Jun 2016, 富山, 国内.
3. Pig model of rare monogenic diseases, 招待講演, Nagashima H, 18th International Congress of Animal Reproduction, SALAAM-Workshop, 28 Jun 2016, Tours, France, 海外.
4. Genetically modified pigs with ornithine transcarbamylase deficiency produced by genome editing and somatic cell cloning, 口頭, Matsunari H, Watanabe M, Fukuda T, Yashima S, Takeishi T, Asano Y, Hatae S, Uchikura A, Nakano K, Umeyama K, Nagaya M, Enosawa S, Umezawa A, Nagashima H, 18th International Congress on Animal Reproduction, 26-30 Jun 2016, Tours, France, 海外.
5. ブタにおけるゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト, ポスター, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 梅山一大, 高柳就子, 長屋昌樹, 宮川周士, 花園豊, 中内啓光, 長嶋比呂志, 日本ゲノム編集学会第1回大会, 7-8 Sep 2016, 広島, 国内.
6. 疾患モデルブタ・ミニブタ開発の現状と展望, 招待講演, 長嶋比呂志, 第4回日本先進医工学ブタ研究会, 7-8 Oct 2016, 三島, 国内.
7. OTC遺伝子ヘテロ変異雌ブタの雄産仔におけるOTCD発症, ポスター, 松成ひとみ, 渡邊将人, 福田暢, 八島紗耶香, 内倉鮎子, 中野和明, 梅山一大, 絵野沢伸, 梅澤明宏, 長嶋比呂志, 第58回日本先天代謝異常学会, 27-29 Oct 2016, 東京, 国内.

8. クローン動物と遺伝子改変, 招待講演, 長嶋比呂志, 染色体学会第67回年会 (市民講座), 3 Nov 2016, 東京, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 医農工連携研究最前線 クローンブタに託す最先端医療, 長嶋比呂志, 明治大学校友会世田谷区地域支部総会, 23 Apr 2016, 国内.
2. 再生医療研究最前線: 長寿社会の次ぎに何を望むのか!?, 長嶋比呂志, 第55回東京兵庫県人会ふるさとひょうごふれあいセミナー, 20 Jun 2016, 国内.
3. 難治性疾患・希少疾患を再現する遺伝子改変ブタ開発の現状と展望—ブタを用いたトランスレシヨナルリサーチの可能性—, 招待講演, 長嶋比呂志, 神戸再生医療勉強会 (第4回), 22 Nov 2016, 神戸, 国内.
4. ブタを用いた再生医療研究最前線, 招待講演, 長嶋比呂志, 日本技術士会平成28年12月期農業部会講演会, 3 Dec 2016. 東京, 国内.

(4) 特許出願