

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：

再生医療実現拠点ネットワークプログラム

Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名：

幹細胞パッケージングを用いた臓器再生技術と新規移植医療の開発

Development of organ regeneration techniques and new transplantation methods, using stem cell packaging

研究開発担当者 慶應義塾大学医学部 教授 北川雄光

所属 役職 氏名： School of Medicine, Keio University, Professor, Yuko Kitagawa

実施期間： 平成25年 7月 4日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究開発課題名：

新鮮肝細胞を用いたグラフトの肝障害ブタへの移植による POC の取得とヒト iPS 由来肝細胞を用いたグラフト移植へ向けた体制の確立

The acquisition of POC for the transplantable engineered liver graft regenerated with fresh porcine liver cells on the porcine hepatic injury model, and the establishment of the methods for transplantation of the engineered liver graft regenerated with human iPS derived liver cells.

研究開発分担者 慶應義塾大学医学部 講師 八木 洋

所属 役職 氏名： Keio University School of Medicine, Assistant Professor, Hiroshi Yagi

分担研究開発課題名：

ヒト iPS 由来肝細胞を用いたグラフトの移植へ向けた体制の確立 (ブタ生検組織を用いた肝機能評価)

The establishment of the methods for transplantation of the engineered liver graft regenerated with human iPS derived liver cells. (Evaluation of the function of transplanted liver using biopsy instrument)

研究開発分担者 慶應義塾大学薬学部 教授 登実斉俊

所属 役職 氏名： Faculty of Pharmacy, Keio University, Professor, Masatoshi Tomi

分担研究開発課題名：

ヒト iPS 由来肝細胞を用いたグラフトの移植へ向けた体制の確立（ラットを用いた類洞構造再生と iPS 細胞培養条件の検討）

The establishment of the methods for transplantation of the engineered liver graft regenerated with human iPS derived liver cells. (Regeneration of sinusoid structure in rat, and consideration of the method for iPS cell culture)

研究開発分担者 慶應義塾大学理工学部 准教授 須藤 亮

所属 役職 氏名： Faculty of Science and Technology, Associate Professor, Ryo Sudo

分担研究開発課題名：

新鮮肝細胞を用いたグラフトの肝障害ブタへの移植による POC の取得（ブタモデルの企業導出）

The acquisition of POC for the transplantable engineered liver graft regenerated with fresh porcine liver cells on the porcine hepatic injury model. (Introduction of the porcine hepatic injury model to the companies)

研究開発分担者 慶應義塾大学医学部 特任教授 小林英司

所属 役職 氏名： Keio University School of Medicine, Project Professor, Eiji Kobayashi

II. 成果の概要（総括研究報告）

ブタ肝臓を脱細胞化処理して得られた細胞外マトリックス骨格の門脈・肝静脈を用い、他のブタから抽出した分離肝細胞および血管内皮細胞を体外で 3 日間循環再細胞化して作製したグラフトを、1.5 ヶ月前よりレトロルシンを腹腔内投与して肝障害を惹起したミニブタに 60%肝切除を施した後、同日異所性に移植した。門脈吻合部の留置カテーテルからの持続ヘパリン及び免疫抑制剤経口投与下で、経過中の開腹生検を経て 1 ヶ月後にグラフトを摘出し、経時的な血液データ、組織解析、グラフト代謝機能解析を行った。その結果、組織学的にグラフト内部での肝細胞の増殖、胆管様構造とビリルビン染色陽性細胞の出現、グラフトの CYP 活性の上昇が認められ、また血中 NH₃、PT%の改善を認めた。以上の結果により再生肝臓移植によって肝障害の是正が示されたことから、臓器骨格を基盤とした本肝再生治療モデルの POC を取得したと評価できる。

次に大阪大学大学院薬学研究科の協力で大量（5~8x10⁸ 個）のヒト iPS 由来肝細胞様細胞を培養して搬送し、ブタ肝臓由来部分骨格へ血管内皮細胞と共に循環再細胞化して作製したグラフトを、正常肝ミニブタへ異所性に移植した。持続ヘパリン及び免疫抑制剤投与下で、経過中の開腹生検を経て 1 ヶ月後にグラフトを摘出し各種解析を行った。その結果、充填した細胞数は減少し多くの炎症性細胞や線維芽細胞がグラフト内へ浸潤する中で、ビリルビン染色、ALB および CK19 陽性細胞が複数箇所観察され、グラフト内の CYP 活性が体外培養と比較して上昇していた。この結果は、今後、免疫抑制剤の至適使用および肝障害モデルへの移植を実施することによって、ヒト iPS 細胞を用いた同様のモデルでも POC を取得できる可能性を示唆し、ひいては今後の臨床試験への発展が大いに期待される。

To establish clinically reliable bioengineered liver graft, we have been investigated a tissue engineering approach “decellularized organ frame” by discarding viable cells from native tissues, which can maintain large number of different cell types required for organ regeneration. The aim of this study was to generate native tissue derived organ frame for the development of liver regenerative therapy, with primary porcine derived cells or human iPS

derived cells. De/recellularization protocols such as organ harvest, de/recellularization and transplantation were standardized to establish pre-clinical large animal model for organ regenerative therapy. Especially, the procedure for introduction of a large number of different cell types into the expected location of the parenchymal/non-parenchymal space was critical and was finally established by using pressure monitoring system. In addition, angiography after transplantation of the liver graft revealed the continuous blood flow throughout the graft from surgically connected portal vein through inferior vena cava. Interestingly, the histological analysis of the tissue from the liver graft in 30 days after the implantation into porcine revealed that not only sufficient angiogenesis spread through the graft but also bile

production and accumulation from the repopulated hepatocytes. Finally, a large number of human iPS derived hepatic progenitor cells and mesenchymal stem cells were introduced into the porcine scaffold and successfully transplanted into the porcine body under immune suppression. The liver graft with iPS derived cells were evaluated 7 days after the surgery, which showed clusters of hepatocyte like cells with hepatic markers. We believe that this large animal model could help developing a novel therapeutic strategy using regenerative approach with an attractive tissue engineering technology.

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 3件、国際誌 4件）

1. Takagi C, Yagi H, Hieda M, Tajima K, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Kitagawa Y. Mesenchymal stem cells contribute to hepatic maturation of human induced pluripotent stem cells. *European Surgical Research*, 58(1-2): 27-39, 2016.
2. Katsuki Y, Yagi H, Okitsu T, Kitago M, Tajima K, Kadota Y, Hibi T, Abe Y, Shinoda M, Itano O, Takeuchi S, Kitagawa Y. Endocrine pancreas engineered using porcine islets and partial pancreatic scaffolds. *Pancreatology*, 16(5): 922-930, 2016.
3. Kitahara H, Yagi H, Tajima K, Okamoto K, Yoshitake A, Aeba R, Kudo M, Kashima I, Kawaguchi S, Hirano A, Kasai M, Akamatsu Y, Oka H, Kitagawa Y, Shimizu H. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 22(5): 571-579, 2016.
4. Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, Handa K, Matsubara K, Fukumitsu K, Dorko K, Presnell SC, Yagi H, Soto-Gutierrez A. Liver-Regenerative Transplantation: Regrow and Reset. *American Journal of Transplantation* 16(6): 1688-1696, 2016.

5. 八木洋, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光: 診療科各科と再生医療の最前線 消化器疾患と再生医療. 先進医療フォーラム 編, 先進医療 NAVIGATOR 今日の再生医療, 日本医学出版, 東京, 2016, p. 32-36.
6. 八木洋, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光. 人工臓器と再生医療の融合 iPS 細胞の新たな足場—脱細胞化肝臓骨格—. 人工臓器 45(1): 67-70, 2016.
7. 八木洋, 田島一樹, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光. 脱細胞化臓器骨格を用いた臓器再生医療. 最新医学 71(7): 163-168, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Yagi H, 口頭, Whole-organ re-engineering: a regenerative medicine approach. Asian Transplantation Week 2016 Incheon, Korea, 2016.10, 国外
2. Yagi H, Tajima K, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Kitagawa Y, 口頭, Long-term implantation of bioengineered liver using organ scaffold with/without human iPS derived cells in large animal. The Liver Meeting 2016, American Association for the study of liver disease (AASLD), Boston, 2016.11, 国外
3. Yagi H, Tajima K, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Kitagawa Y, 口頭, Pre-clinical model of liver regenerative therapy using organ derived scaffold with/without human iPS derived cells. The International Society for Stem Cell Research (ISSCR), San Francisco, 2016. 06, 国外
4. 八木洋, 田島一樹, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光, 口頭, 生体由来三元臓器骨格素材の開発. 第54回日本人工臓器学会大会. 米子, 2016. 11, 国内
5. 八木洋, 下田啓文, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光, 口頭, 脱細胞化臓器骨格を用いた再生医療研究開発の現状. 第14回日本消化器外科学会大会(第24回日本消化器関連学会週間) 神戸, 2016. 11, 国内
6. 下田啓文, 八木洋, 板野理, 篠田昌宏, 北郷実, 阿部雄太, 日比泰造, 田島一樹, 北川雄光, 口頭, 肝切除後の肝再生を誘導する新しい生体由来骨格素材の開発. 第14回日本消化器外科学会大会(第24回日本消化器関連学会週間) 神戸, 2016. 11, 国内
7. 東尚伸, 八木洋, 高木知聡, 稗田麻記子, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光, 口頭, Novel technology for application of iPS cell derived human hepatocytes to regenerative therapy. 第71回日本消化器外科学会総会 徳島, 2016. 7, 国内
8. 下田啓文, 八木洋, 板野理, 篠田昌宏, 北郷実, 阿部雄太, 日比泰造, 田島一樹, 稗田麻記子, 北川雄光, 口頭, 肝切除後肝再生における脱細胞化肝臓骨格の有用性の検討. 第71回日本消化器外科学会総会 徳島, 2016. 7, 国内
9. 八木洋, 田島一樹, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 北川雄光, 口頭, 多面的医工連携による臓器骨格を用いた三次元立体臓器再生への挑戦. 第71回日本消化器外科学会総会 徳島, 2016. 7, 国内

10. 八木洋, 田島一樹, 日比泰造, 阿部雄太, 北郷実, 篠田昌宏, 板野理, 小林英司, 水口裕之, 北川雄光, 口頭, ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた立体臓器再生の実現化に向けて. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 大阪, 2016. 4, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし

平成 28年 委託 研究 開発 成果 報告 書

I. 基本情報

事業名：再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名：幹細胞パッケージングを用いた臓器再生技術と新規移植医療の開発
Development of organ regeneration techniques and new transplantation methods,
using stem cell packaging

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学 医学部 北川 雄光

所属 役職 氏名： (英語) School of Medicine, Keio University, Professor, Yuko Kitagawa

実施期間：平成 28年 4月 1日から平成 29年 3月 31日

分担研究 幹細胞パッケージングに用いるブタ肝臓細胞の分離手技の開発
開発課題名： Development of technique to isolate porcine hepatocytes for liver
regeneration using stem cell packaging

研究開発分担者 国立大学法人東京大学 生産技術研究所 特任教授 興津 輝

所属 役職 氏名： Teru Okitsu, Project Professor, Institute of Industrial Science, The University
of Tokyo

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学医学部 教授 北川雄光
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 0件、国際誌 0件）
該当なし

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

- (4) 特許出願
なし