

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 技術開発個別課題
(英語) Project for Technological Development, Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Self-renewal of human iPS cell-derived hepatoblast-like cells for hepatocyte transplantation
- 研究開発担当者 (日本語) 大学院薬学研究科 教授 水口 裕之
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor, Hiroyuki Mizuguchi
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

【和文】

研究開発項目 1：再生医療のためのヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞・肝細胞の作製法の開発

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に準拠した肝幹前駆細胞・肝細胞の作製することを目指し、フィーダー細胞や血清、アデノウイルスベクター、マトリゲルを用いない肝細胞分化誘導法の開発を行った。種々のラミニンアイソフォームやコラーゲンを使用することによって、ほぼ組成が明らかな条件で肝細胞を効率的に作製できることを確認した。

作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞が急性肝障害および慢性肝障害に対して治療効果を有するか検討した。急性肝障害モデルマウスに対してヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植することによって、マウスの生存率が有意に回復した。また、慢性肝障害モデルマウスに対してヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植することによって、肝線維化レベルが有意に軽減した。以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が急性肝障害および慢性肝障害に対して治療効果を有することが示唆された。

さらに、ブタモデルを用いて、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の治療有効性を検証した。脱細胞化したブタ肝臓に対して、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を充填し、ブタへの移植実験を行った。移植後 1 か月に渡り経過観察したが、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は排除されることなく、ブタ肝臓内に高効率に生着できることが示唆された。ブタを用いた実験については、慶應大学医学部の北川雄光教授のグループとの共同研究である。

研究開発項目 2：ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞・肝細胞の特性評価

ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞および肝細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。未分化マーカーは分化とともに減少し、肝特異的マーカーは分化とともに増加することが確認できた。網羅的遺伝子発現解析の結果からも、本分化プロトコルを用いて効率的に肝細胞への分化が実施できることが確認できた。

免疫不全マウスを用いた異所性および同所性移植によるヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞・肝細胞の安全性評価を行った。数か月に渡り観察した場合においてもテラトーマや腫瘍が形成される例は 1 例もなかった。したがって、本分化プロトコルにて作製したヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞・肝細胞はテラトーマや腫瘍を形成するリスクが低いことが確認できた。

さらに、HLA 型ホモのヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の凍結試験を行った。これまで開発した凍結方法を使用して、HLA ホモ iPS 細胞由来肝幹前駆細胞も高い生存率と分化能を保持したまま凍結可能であることを確認した。また、再生医療応用を目指し、バンバンカーだけでなく、DMSO フリーの凍結保存液を用いてヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の凍結が可能であることも確認した。

【英文】

Project 1: Generation of human iPS cell-derived hepatoblasts and hepatocytes for regenerative medicine

In our project, we are trying to generate human iPS cell-derived hepatoblasts and hepatocytes for regenerative medicine without using feeder cells, serum, adenovirus vector, and Matrigel. We have developed the efficient hepatocyte differentiation method under the chemically defined condition using various laminin isoforms and collagen.

Next, we investigated whether the human iPS cell-derived hepatocytes can be applied for treatment of acute and chimeric liver injuries. We found that the survival rate of acute liver injury mice was significantly improved by transplantation of human iPS cell-derived hepatocytes. Also, we confirmed that the liver fibrosis levels of chronic liver injury mice were significantly reduced by transplantation of human iPS cell-derived hepatocytes. Taken together, the transplantation of human iPS cell-derived hepatocytes might be a powerful therapy for acute and chronic liver injuries.

The human iPS cell-derived hepatocytes were transplanted into pig model to further examine the therapeutic value of these cells. The human iPS cell-derived hepatocytes were injected into decellularized liver scaffold and transplanted into the pig. After 1 month from the transplantation, we confirmed that the human iPS cell-derived hepatocytes were stably engrafted. The transplantation experiment using pig model was performed by the collaboration of Dr. Yuko Kitagawa's group (Keio University).

Project 2: Characterization of human iPS cell-derived hepatoblasts and hepatocytes

To characterize the human iPS cell-derived hepatoblasts and hepatocytes, the global gene expression profiles of these cells were examined. During the hepatocyte differentiation, the gene expression levels of pluripotent and hepatic markers were decreased and increased, respectively. From this result, efficient hepatocyte differentiation could be performed by using our differentiation method.

Next, we assessed the risk of teratoma formation by transplanting the human iPS cell-derived hepatoblasts and hepatocytes into immunodeficient mice. No teratoma was observed in the transplanted mice. Thus, the teratoma formation risk of our human iPS cell-derived hepatoblasts and hepatocytes might be quite low.

Furthermore, we examined cryopreservation of human HLA homo iPS cell-derived hepatoblasts. We found that human HLA homo iPS cell-derived hepatoblasts could be cryopreserved with high cell viability and high hepatic differentiation capacity by using the method which we developed previously. In addition, we also confirmed that human HLA homo iPS cell-derived hepatoblasts could be cryopreserved by using DMSO-free freezing medium.

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）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 水口裕之、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導と細胞外マトリックス、iPS 細胞とマトリクソーム研究が拓く再生医療の最前線、大阪、2016 年 6 月 2 日（口頭発表）
2. 高山和雄、萩原康子、関口清俊、櫻井文教、水口裕之、組成が明らかな培養条件でのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製とその品質評価、第 23 回肝細胞研究会、大阪、2016 年 7 月 7-8 日（ポスター発表）
3. 水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞／小腸上皮細胞の作製と創薬・再生医療への応用、第 26 回日本医療薬学会年会、京都、2016 年 9 月 19 日（口頭発表）
4. 水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞および小腸上皮細胞の作製と創薬・再生医療への応用、日本薬物動態学会第 31 回年会、長野、2016 年 10 月 13 日（口頭発表）
5. 水口裕之、再生医療への応用を目指したヒト iPS 細胞由来肝細胞の調製、「幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム」第 1 回シンポジウム、大阪、2016 年 10 月 15 日（口頭発表）
6. 高山和雄、萩原康子、関口清俊、櫻井文教、水口裕之、ラミニンアイソフォームを駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞および胆管上皮細胞への分化誘導、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日（ポスター発表）
7. 水口裕之、創薬および再生医療への応用を目指したヒト iPS 細胞由来肝細胞／小腸上皮細胞の開発、第 5 回バイオ創薬研究会、大阪、2017 年 2 月 10 日（口頭発表）
8. 水口裕之、再生医療に向けたヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製 —細胞外マトリックスの最適化を中心に、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日（口頭発表）
9. 高山和雄、秋田尚毅、関口清俊、森尾友宏、小原収、櫻井文教、水口裕之、移植医療応用のためのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と品質評価、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日（口頭発表）
10. 秋田尚毅、高山和雄、櫻井文教、水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の慢性肝障害に対する治療有効性の評価、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日（ポスター発表）
11. 秋田尚毅、高山和雄、櫻井文教、水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の慢性肝障害に対する治療有効性の評価、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 25-27 日（口頭発表）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し

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 技術開発個別課題
(英語) Project for Technological Development, Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Self-renewal of human iPS cell-derived hepatoblast-like cells for hepatocyte transplantation
- 研究開発代表者 (日本語) 大阪大学大学院薬学研究科 教授 水口 裕之
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor, Hiroyuki Mizuguchi
- 分担研究 (日本語) ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の凍結技術の確認、ならびに、ブタ移植用ヒト iPS 細胞由来肝細胞調製
開発課題名： (英語) Confirmation of freezing technology of Self-renewal of human iPS cell-derived hepatoblast-like cells and preparation of hepatocytes derived from human iPS cells for porcine transplantation
- 研究開発分担者 (日本語) 株式会社リプロセル技術部 マネージャー 渡辺 朝久
所属 役職 氏名： (英語) ReproCELL, Inc Technology Department Manager Tomohisa Watanabe
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：大阪大学大学院薬学研究科・教授・水口裕之
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
該当なし