

学位論文の要旨

Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived
organ bud transplant

(iPS 細胞由来器官原基移植による血管化ヒト肝臓の創出)

Takanori Takebe

武部 貴則

Regenerative Medicine

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学

(Doctoral Supervisor : Hideki Taniguchi, Professor)

(指導教員 : 谷口 英樹 教授)

学位論文の要旨

Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant

(iPS 細胞由来器官原基移植による血管化ヒト肝臓の創出)

<https://www.nature.com/articles/nature12271>

1. 序論

1981年に個体を構成する多くの細胞へ分化が可能な胚性幹細胞が発見されたことにより、創薬応用や再生医療応用に有益なヒト機能細胞を分化誘導する方法が注目されている。しかし、肝臓などのように複雑な三次元構造を有する臓器においては、いまだ生体レベルの機能細胞への分化誘導は達成されていない。多能性幹細胞を用いた従来の分化誘導系は、器官発生過程で生じる生理的な細胞分化プロセスとは大きく異なり、目的とする単一種の機能細胞のみを平面分化誘導する方法が殆どであった (Si-Tayeb, K., et al. 2010)。一般に、臓器を構成する細胞は、機能を担う実質細胞のみならず、血管を形成する血管内皮細胞やそれらを支持する間葉系細胞、血管内腔を流れる血液細胞など複数存在する (Zaret, K.S. 2002)。胎内の細胞分化プロセスにおいては、これら多細胞系が秩序だった空間配置をとることによって協調的相互作用が惹起され、ダイナミックな時間変化を伴いながら最終的に終末分化を遂げた真の機能細胞が分化誘導される (Camp, G., et al. 2018)。そこで、われわれは複雑な器官発生プロセスの中でも、特にその初期過程に着目することにより、多能性幹細胞から血管などの高次構造が付加された「器官の再構成」を実現化するための培養・移植操作技術の確立を試みた。

2. 実験材料と方法

発生生物学研究により明らかとされてきた分子レベルの知見を活用し、平面培養によりヒト iPSC (induced Pluripotent Stem Cells; 人工多能性幹細胞) を分化誘導することで肝内胚葉細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系前駆細胞を得た。次に、任意の条件で未分化な3種類の細胞を共培養することにより、3次元組織 (肝芽) を誘導した。免疫組織化学染色、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) 解析、マイクロアレイなど遺伝子発現解析を実施し、プライマリー由来の組織と比較検証を行った。

次に、ヒト iPSC より作成した肝芽を免疫不全マウス体内へ移植を行い、肉眼的に移植片内部への血液灌流を評価した。機能的なヒト肝臓の形成の確認を目的として、マウス血清を対象としてヒト特異的なタンパク質の形成を ELISA 法により解析した。さらに、移植後 60 日目以降においては、タンパク質産生量の定量評価に加えて、組織学的解析・遺伝子発現解析によって、ヒト iPSC から成熟肝細胞の分化誘導を評価した。さらに質量分析装置を用いて、体内で成熟したヒト肝臓原基がヒト特異的な薬物代謝活性など肝臓特異的な代謝機能を有しているか否か解析した。最終的に、亜急性肝不全を発症する免疫不全マウスモデルを用いて、治療効果の検証を行った。

3. 結果

発生初期段階の模倣によるヒト iPSC 細胞由来肝芽の人為創出

肝発生の初期プロセスに必須である前腸由来肝内胚葉細胞と未分化血管内皮細胞と間葉系幹細胞との細胞間相互作用に着目し、前腸からの肝臓原基（肝芽）の出芽（budding）という、肝発生において極めて重要なイベントを人為的に再現することのできる新たな三次元培養系を開発した。本法では、異なる三系譜のヒト未分化細胞を特定条件下で培養を行うことにより、各細胞系列のダイナミックな空間的再配置が自律的に誘導され、ヒト iPSC 由来の肝芽（hiPSC-LB: human iPSC-Liver Bud）を人為的に構築することが可能となった。また、将来的なヒトへの応用を見据え、特殊なマイクロパターンプレートを用いた培養工程を確立することにより、一期的なヒト肝芽の創出容量を大幅に拡大することに成功した。

肝芽移植による機能発現と治療効果

hiPSC-LB が移植されたマウスの血液生化学検査の結果、肝細胞が産生するタンパク質であるヒト型 ALB 及び A1 アンチトリプシン（AAT）の生産及び分泌が確認された。また、hiPSC-LB を移植したマウスの尿・血清サンプルよりヒト特異的な代謝物の形成が確認された。さらにヌクレオチド代謝、アミノ酸及び糖質に関連した代謝物プロファイリングを目的として、hiPSC-LB 移植片のメタボローム解析を実施した結果、タウロコール酸をはじめ肝臓特異的な物質を含む 222 の代謝物が検出された。以上より、移植を行った hiPSC-LB は、ヒトの *in vivo* での生理機能を模倣し、ヒト特異的な代謝プロファイルを反映しうることが示された。すなわち、*in vitro* において作出した hiPSCs-LB を移植することで、われわれは血管構造を有する機能的なヒト肝組織を創生することに成功したと考えられる。

器官原基移植術 (organ bud transplantation) による治療効果の検証

以上の検討を踏まえ、この器官原基移植術 (organ bud transplantation) による治療効果の検証を目的として、肝炎モデルに対する hiPSC-LB 移植実験を実施した。免疫不全マウスを用いて作製した亜急性劇症肝炎モデルに hiPSC-LB を門脈近傍の腸間膜上へ移植したところ、30 日後の生存率は、非移植群では約 30%であったのに対し、移植群では 90%以上であり、著明に生存率が改善することが判明した。すなわち、器官原基移植という新しい治療概念が高い有効性を示すことが明らかとなった。

4. 考察

従来、肝疾患に対する再生医療開発が目指していたのは、機能的なヒト肝細胞など治療に有益と思われる「細胞」を創り出すことであった。しかし、肝疾患領域においては肝細胞移植の有効性は現時点では不明確である。われわれが取り組んでいるヒト肝芽の人為的創出とその移植に基づく肝疾患治療法の開発は、「臓器の芽 (organ bud)」を創り出し、それを患者さんの身体の中で「器官 (organ)」に育てるという、従来の細胞移植に基づく再生医療とは全く異なる新たな治療コンセプトである。すなわち、細胞移植でもなく臓器移植でもない、器官原基移植 (organ bud transplantation) という第三の新概念といえる。全世界における肝移植の待機患者数が少なく見積もっても年間 20,000 人超という現状を考慮すると、本研究に基づいて肝疾患に対する再生医療が実現化できれば、極めて革新性の高い治療技術となるとともに、大きな社会的・経済的インパクトをもたらすことが期待できる。

引用文献

Camp, J.G., Sekine, K., Gerber, T., Loeffler-Wirth, H., Binder, H., Gac, M., Kanton, S., Kageyama, J., Damm, G., Seehofer, D., *et al.* (2017). Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature*. 546, 533–538.

Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., and Duncan, S.A. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297-305.

Zaret, K.S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 3, 499-512.

論文目録

I. 主論文

Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R-R., Ueno, Y., Zheng, Y-W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., Taniguchi, H.:

雑誌名 : Nature Vol. 499, No. 7459, Page481-484, 2013

II. 副論文

Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells

Takebe, T., Sekine, K., Kimura, M., Yoshizawa, E., Funayama, S., Nakanishi, N., Hisai, T., Kobayashi, T., Mori, A., Ayano, S., Ejiri, Y., Amimoto, N., Yamazaki, Y., Ogawa, S., Ishikawa, M., Kiyota, Y., Ueno, Y., Taniguchi, H.:

雑誌名 : Cell Reports Vol. 21, No. 10, Page2661-2670, 2017