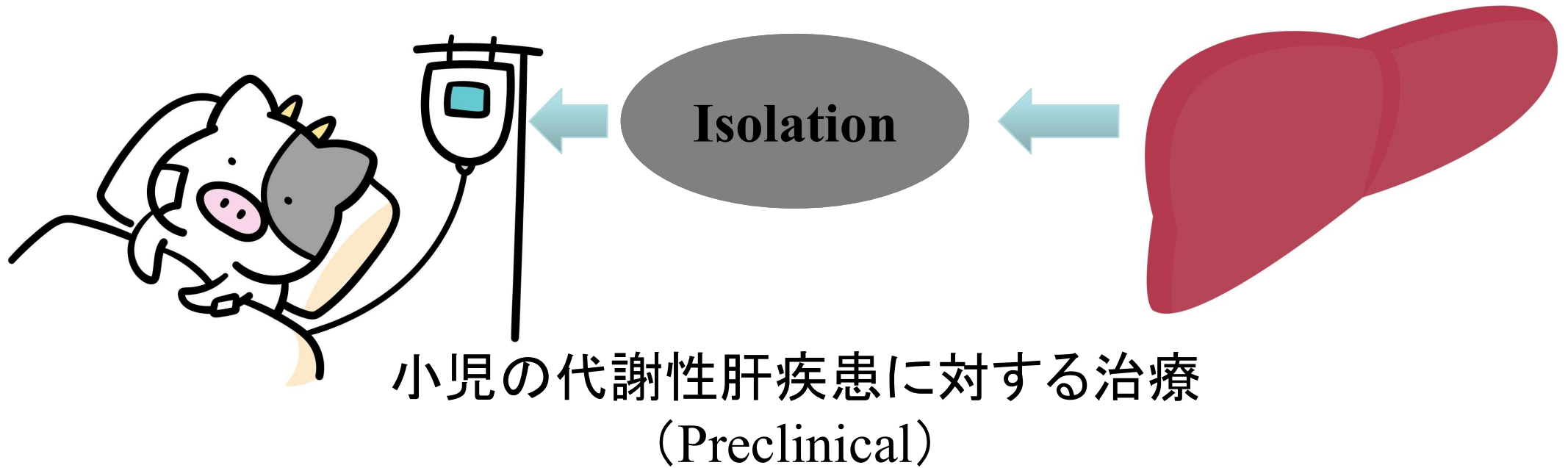


ヒトiPS細胞由来代謝異常性肝疾患治療製剤の創出を目指した研究

関西医科大学 医学部 iPS幹細胞再生医学講座
准教授 白水 泰昌

2024年11月19日

肝細胞移植

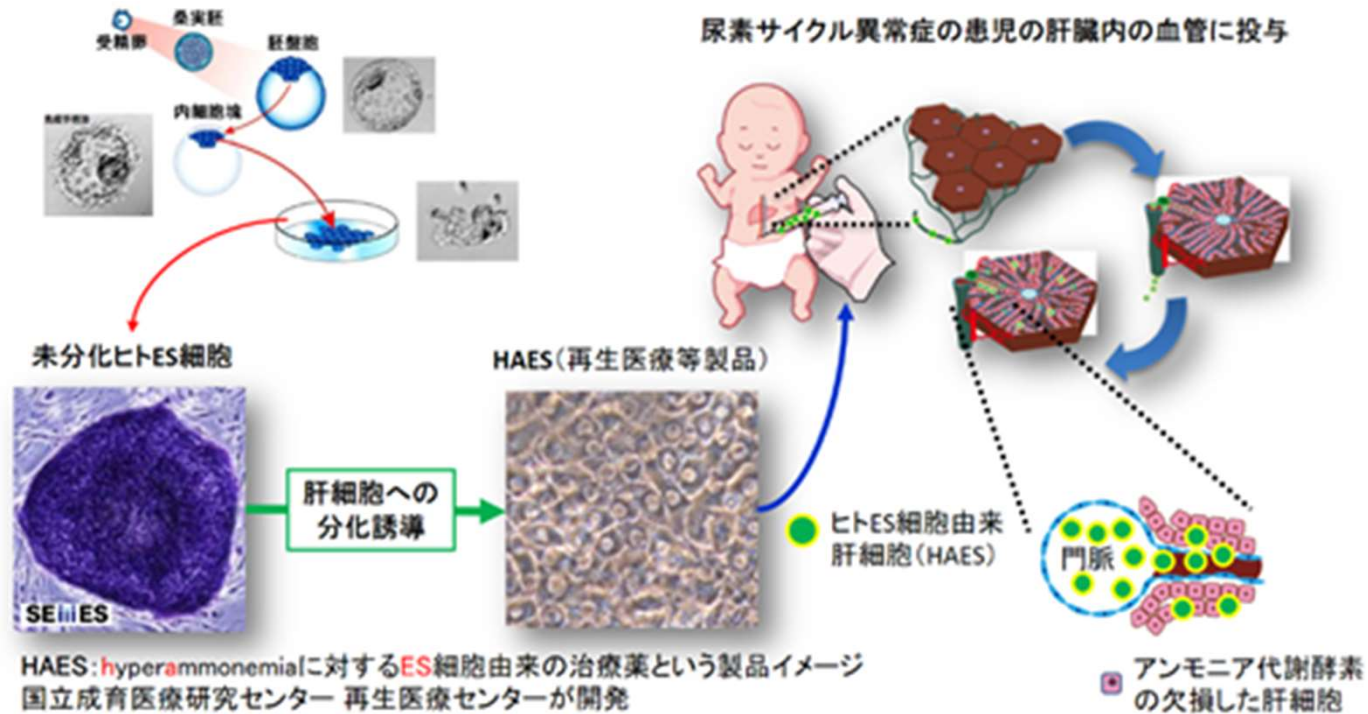


1. 全世界で150例以上の臨床肝細胞移植例が報告され（Gramignoli R et al, Eur Surg Res 2015; 54: 162）、主に代謝異常性肝疾患と急性肝不全治療への応用が提唱されている。
2. 代謝異常性肝疾患に対する肝細胞移植の基本原理は、肝臓における酵素や分泌タンパクの機能不全を有する患者において、異常肝細胞の機能を補填することである。
3. preclinical studyでは、代謝異常性肝疾患治療には5-10%のliver repopulation（Hamman K et al, Mol Ther 2005; 12: 337）が必要とされている。

肝臓移植と肝細胞移植の比較

	<u>臓器移植</u>	<u>細胞移植</u>
ドナー問題	必須	必須
適応疾患	広い	限定
Graft viability	短時間の冷保存で良好	細胞分散によりviability低下
凍結保存	不可能	可能
技術的難易度(治療侵襲)	高(大)	低(小)
治療効果(生着)	高い(長期生着)	低い(短期生着)
再移植	可能だが難易度増加	容易(何度でも可能)

先天性尿素サイクル異常症に対するヒトES細胞由来肝細胞様細胞移植治療の医師主導治験



再生医療等製品として国に承認申請

肝移植が比較的安全に施行可能とされる体重が6Kglになるまでの橋渡しの治療

背景(1)

先天性代謝異常性肝疾患は重症例では短期予後が不良である一方、非重症例であっても中枢神経障害を発症することが特徴である。肝臓移植が唯一の根治療法であるが、その介入が遅れれば脳障害の回復は困難で、また腹腔内容積の小さい新生児にとっては、高度の血管吻合手技を要する患者負担の大きい難度の高い治療法である (Shirouzu Y et al, Liver Transpl 2006; 12: 1224)。

**先天性代謝異常性肝疾患はtimely
な治療が困難**

背景(2)

ヒト肝細胞移植は新生児に対しても臍帯静脈を介して投与可能な低侵襲治療であるが、isolationに伴い細胞はdegradationし、移植後長期にわたって生着できない (Iansante V et al, *Pediatr Res* 2018; 83: 232)。肝細胞移植を長期的に有効な治療法へと発展させるためには、造血幹細胞移植のような増殖可能な組織幹細胞を含んだ肝細胞移植方法の重要性も示唆されている (Spada M et al, *Stem Cell Rev Rep* 2020; 16: 186)。

ヒト肝細胞移植の治療効果は限定的

背景(3)

ヒト induced pluripotent stem cell (iPSC) から肝細胞へと分化誘導する技術はここ数年で著しく進歩した (Si-Tayeb K et al. Hepatology 2010; 51: 297)が、その分化誘導過程で経時的に増殖能が低下し、成熟した肝細胞様細胞の段階では、ヒト肝細胞と同様ほとんど増殖せず (Zhang R et al, Transplant Proc 2014; 46: 1201) また肝幹細胞様細胞の誘導方法も確立していない。

**ヒトiPS細胞由来肝幹細胞様細胞
作成技術の確立が必要**

従来技術とその問題点

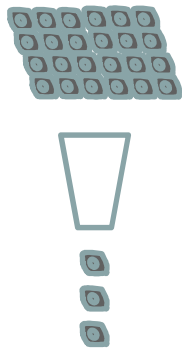
ヒト肝細胞とヒトiPS細胞由来肝細胞様細胞の比較

	ヒト肝細胞	hiPS細胞由来肝細胞様細胞
ドナー問題	あり	なし
成熟度	成熟	未熟
増殖能 (in vitro)	乏しい	乏しい
quality保持 (in vitro)	難しい	難しい

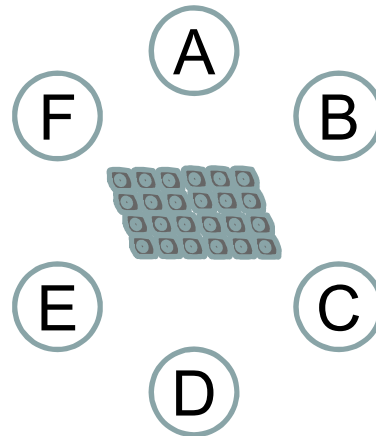
移植(治療)に用いるための細胞の
数および品質の確保が難しい

ヒトiPS細胞由来増殖能を有する肝細胞様細胞樹立の研究の比較

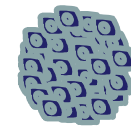
	Zhang M et al, Transl Med 2015	Fukuda T et al, Exp Cell Res 2017	Zhang R et al, Stem Cell Reports 2018	Mun SJ et al, J Hepatol 2019	Pan T et al, Stem Cell Res Ther 2019	Chen S et al, Cell Research 2020	*本研究
添加因子	EGF, CHIR99021, SB431542, Sphingosine-1-Phosphate, Lysophosphatidic acid	FGF7, HGF, SB431542, Y27632	FGF2, VEGF, EGF, CHIR99021, A83-01, Y27632	EGF, HGF, A83-01, Forskolin, R-spondin, FGF10	A8301, BMP4, CHIR99021, EGF, HGF, SAG	forskolin, SB431542, EGF, CHIR99021, Sphingosine-1-Phosphate, Lysophosphatidic acid	X, Y, Z
作用機序解析	No	No	No	No	No	No	Yes
肝幹細胞マーカー発現	No	No	No	No	No	No	Yes



細胞
分取



多くの添
加因子



3次元
培養

これまでの増殖能を有する肝細胞様 細胞研究の問題点

多くの添加因子を含む複雑な培養工程

血清をはじめとした異種由来成分

立体培養

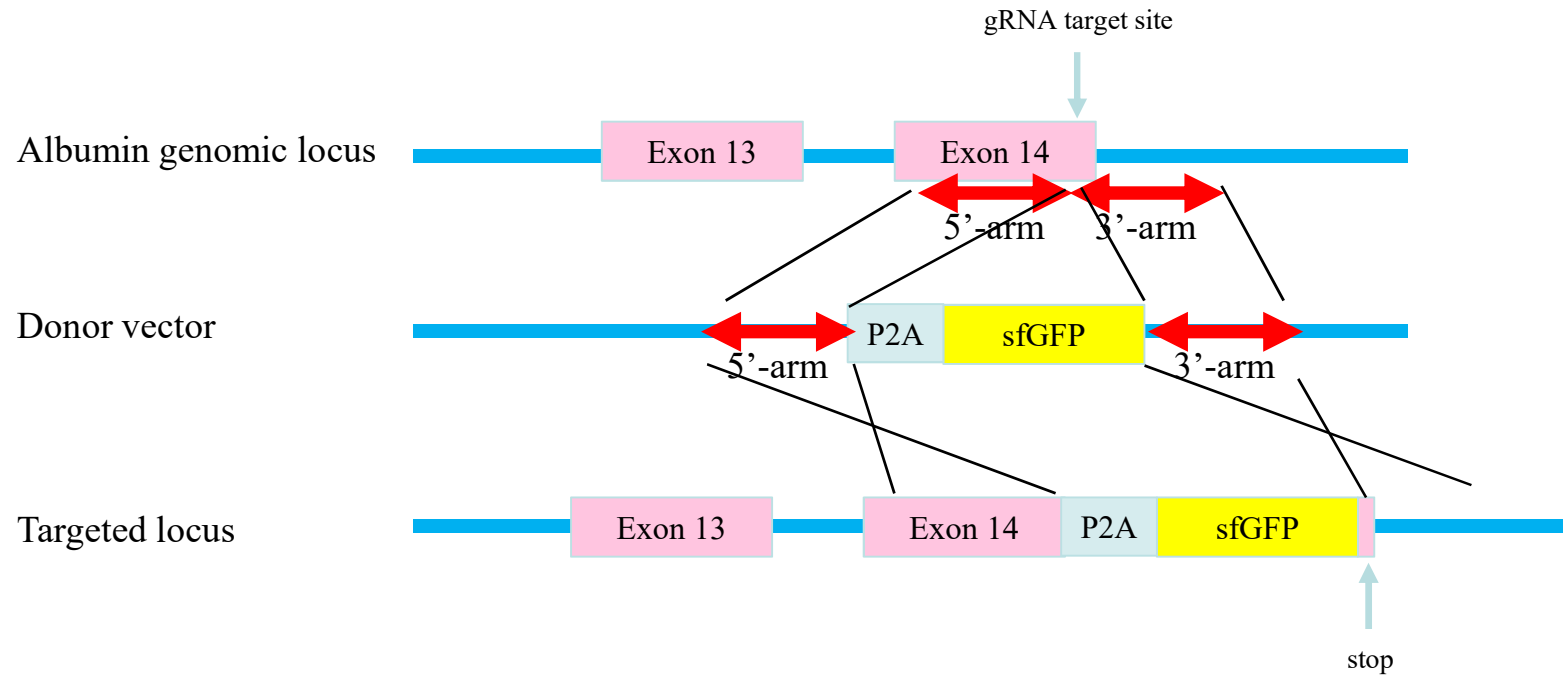
細胞分取

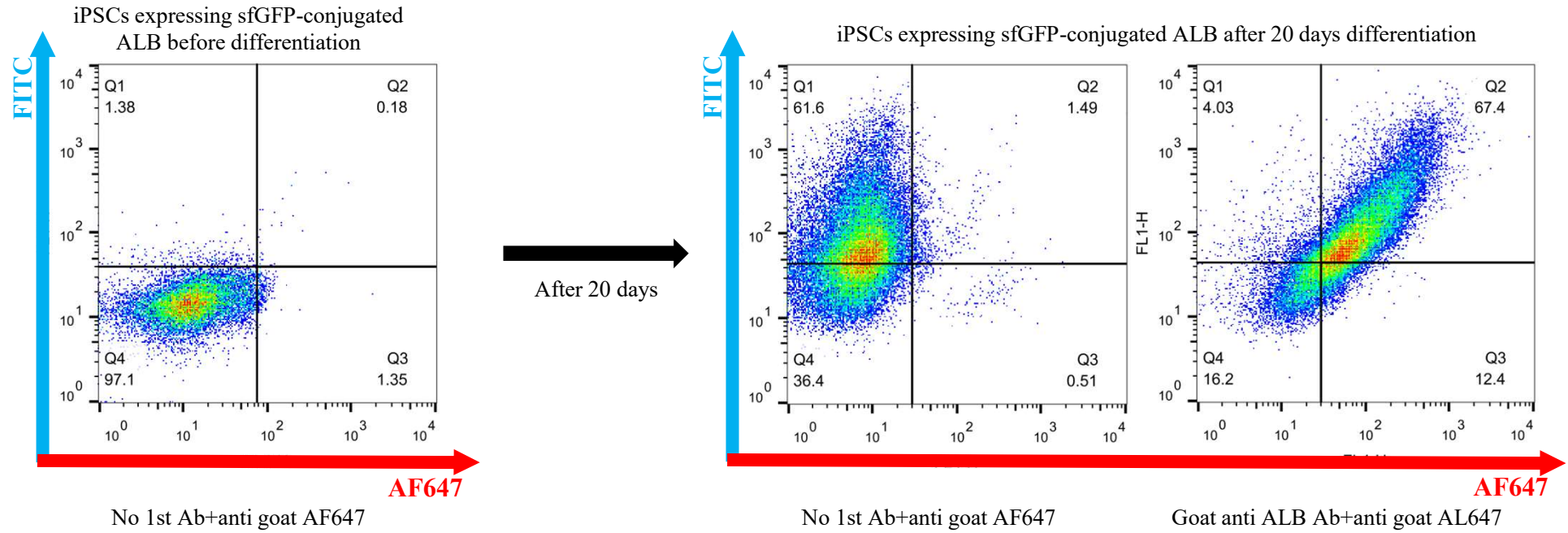


本研究で樹立された細胞

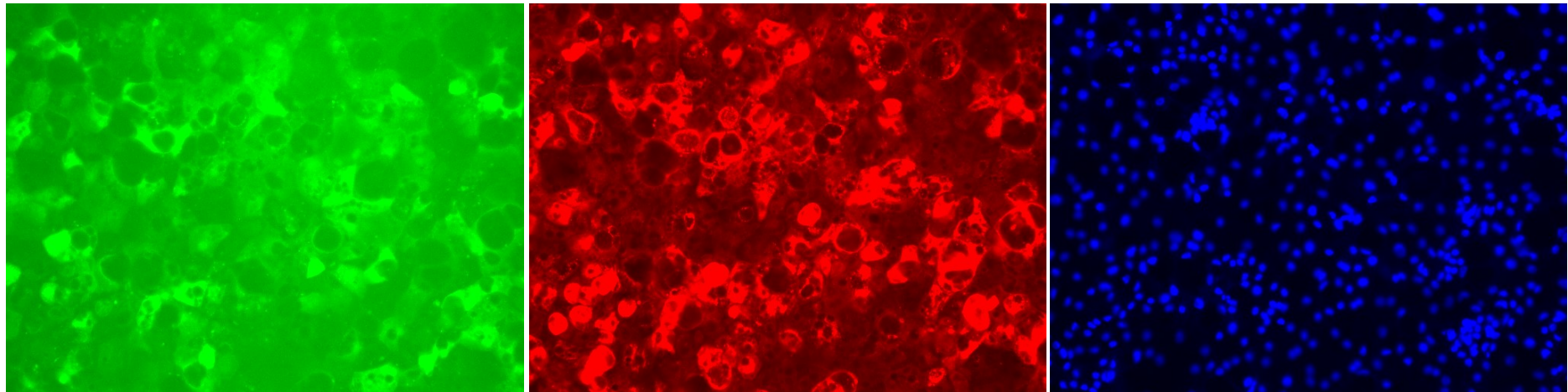
細胞分取や3次元培養を必要とせず、3つの添加因子のみで維持される安全安価な肝幹細胞マーカーを発現する細胞

Construction of Albumin-sfGFP iPSC





iPSCs expressing sfGFP-conjugated ALB after 20 days differentiation reacted with goat anti ALB Ab followed by anti goat AF647 Ab



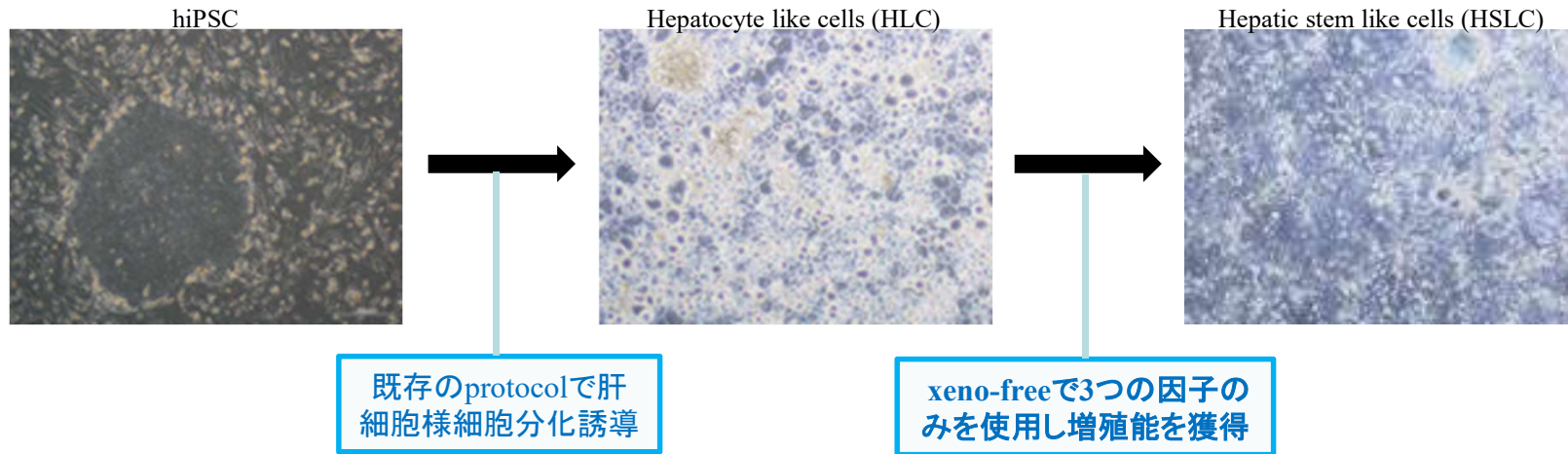
FITC

AF647

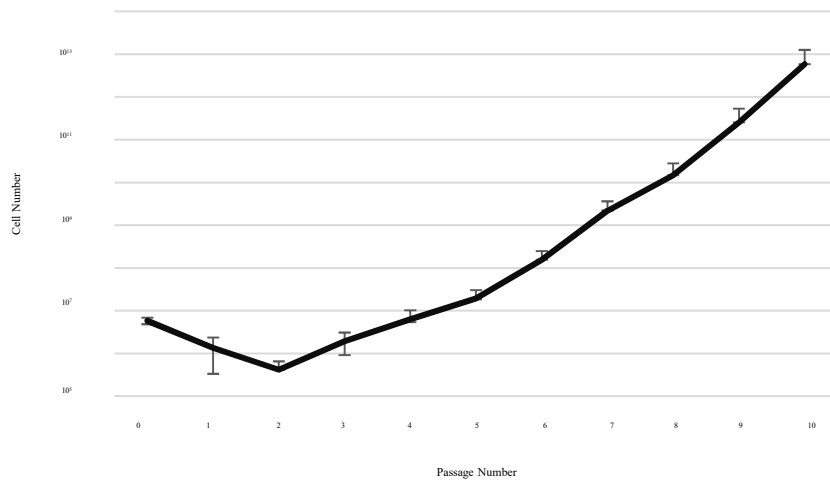
Hoechst33342

ヒトiPS細胞由来肝幹細胞様細胞 (hepatic stem cell-like cell: HSLC) 樹立

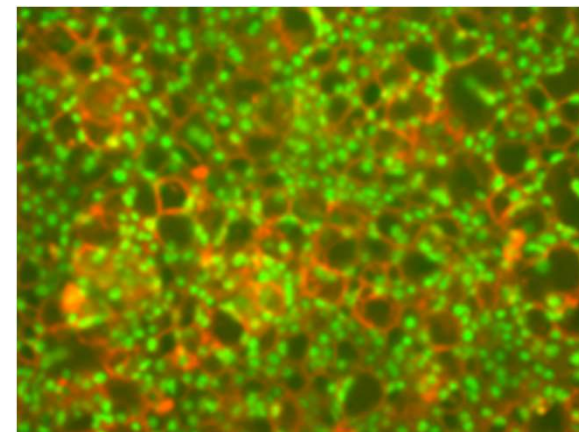
Establishment process of HSLCs—HSLCs were successfully made from the three lines of human induced pluripotent stem cells (hiPS)



Growth curve of HSLCs



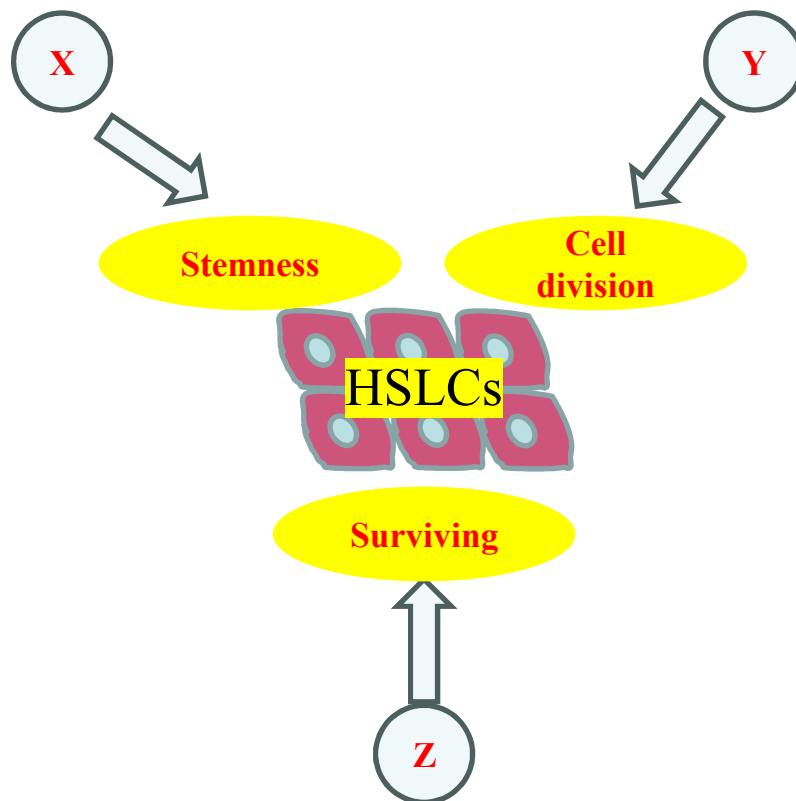
HSLCs after repeated passages



HNF4a (FITC)
EpCAM (Alexa647)

3因子の役割

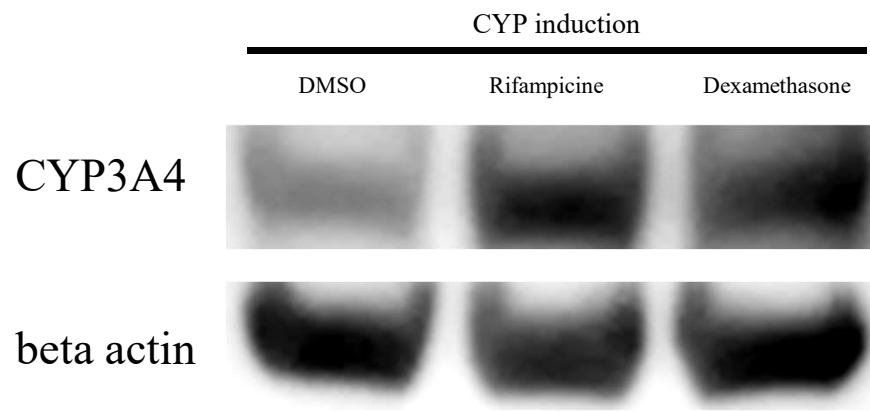
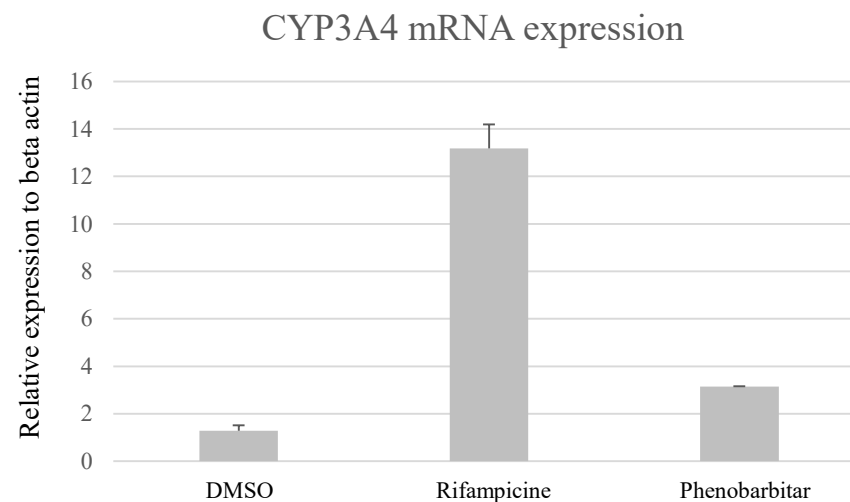
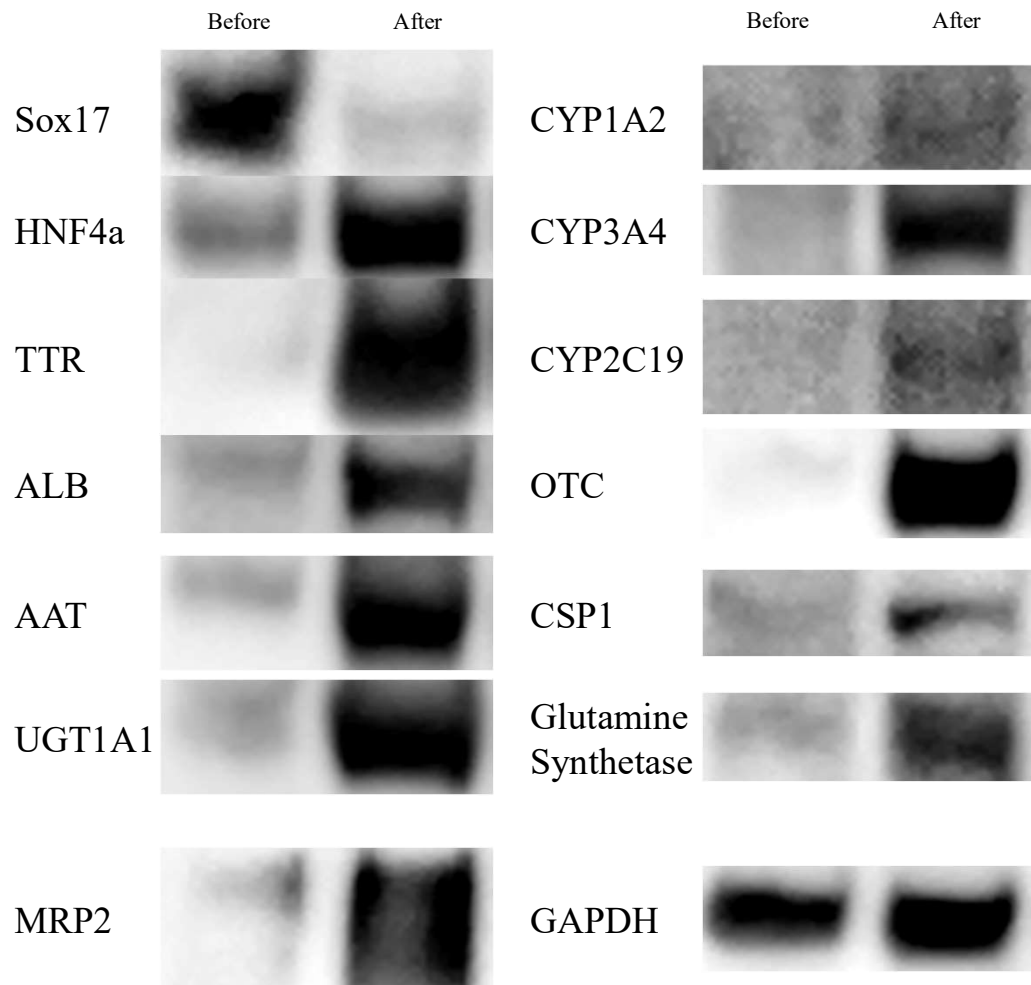
Factor Xは肝幹細胞性の維持に必須



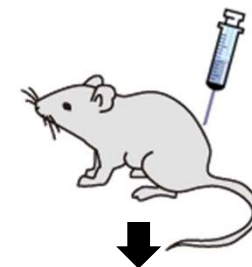
Factor Yは細胞の増殖に必須

Factor Zは細胞の生存に必須

HSLCの再分化及び機能



HSLCの再分化及び機能

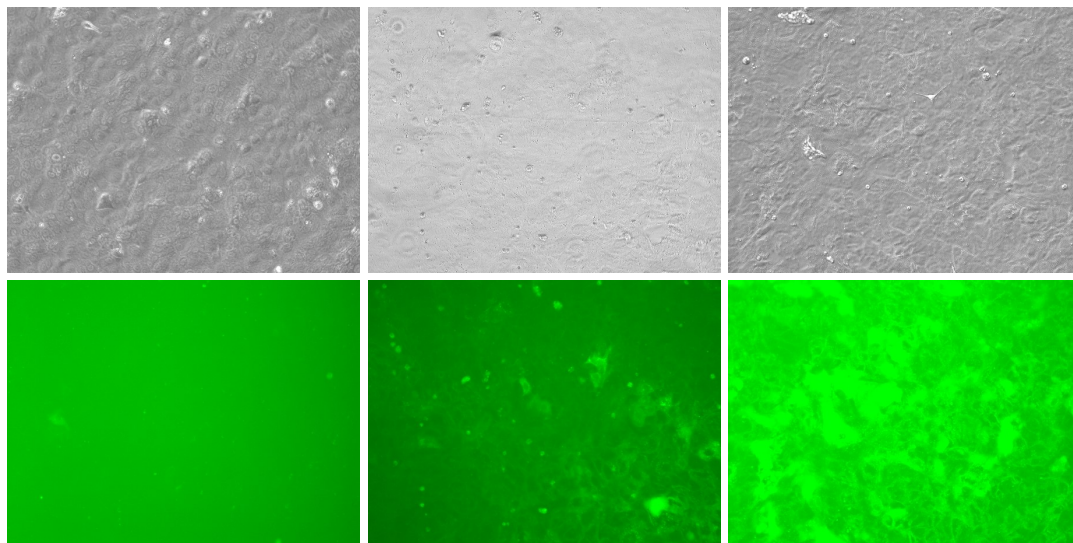


After redifferentiation of HSLCs

4 days

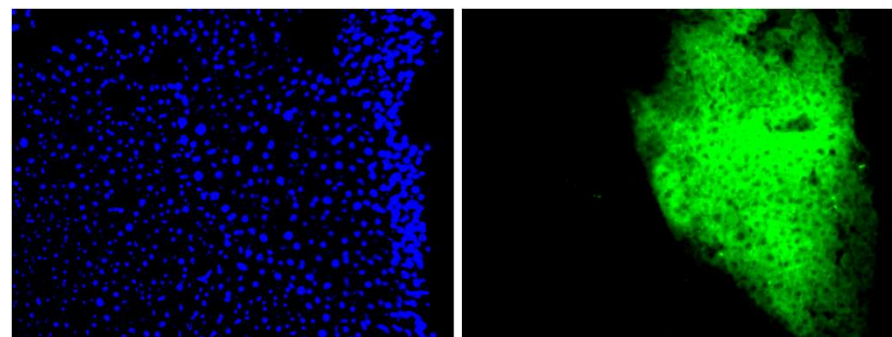
7 days

10 days



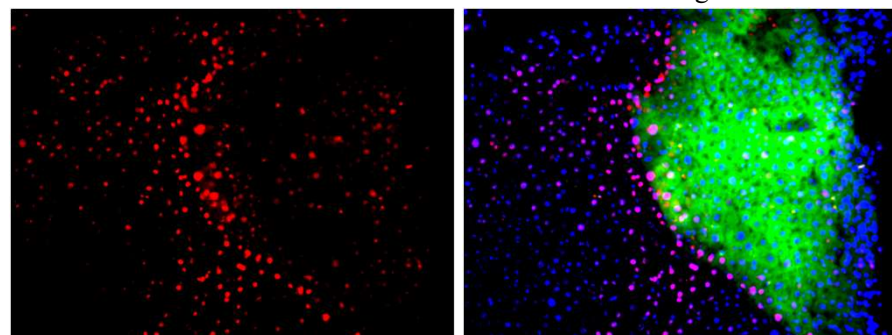
Hoechst33342

Albumin



HNF4a

Merge



実用化に向けた課題(1)

～肝細胞移植の臨床応用に向けたハードル～

1. 細胞のソースと質 → 本研究
2. 肝実質への生着 → Host preconditioning
3. 免疫拒絶反応 → Immunoisolation device

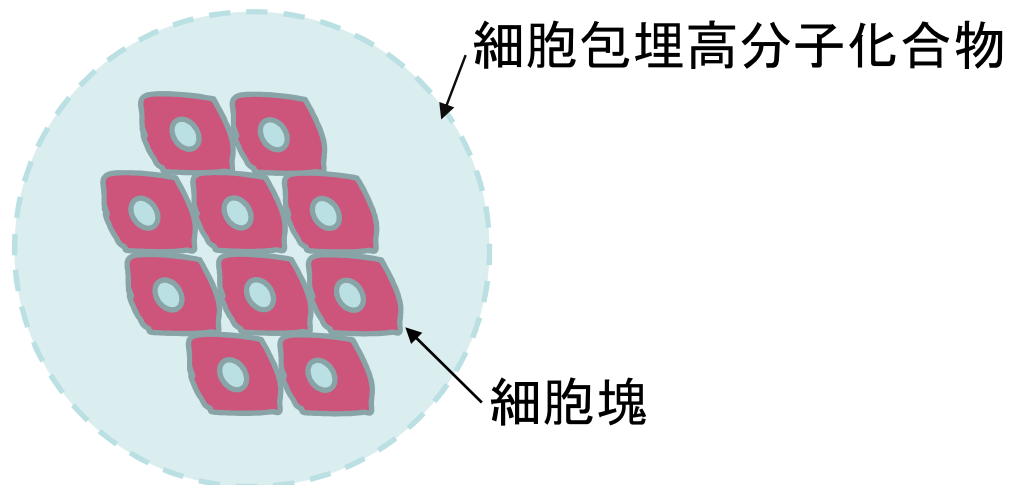
実用化に向けた課題(2)

～肝細胞移植の臨床応用に向けたハードル～

肝臓以外の場所への細胞移植



生体適合高分子化合物を用いた移植治療
用細胞デバイスの開発



想定される用途

- 細胞治療製剤
- 薬剤スクリーニング
- 疾患モデル作成

企業への期待

- ポリビニルアルコールなどの生体適合性のある高分子化合物の製造技術をもつ企業との細胞治療デバイスの共同開発
- Ready-to-useの凍結細胞製剤の作成のため生存率を落とさない細胞凍結保存技術の導入

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は安価で再現性が高く、薬剤スクリーニングや肝幹細胞研究ツールとしての利用が可能
- 本技術では肝幹細胞として安定して増殖および凍結保存が可能であることから、再現性の高い人肝細胞の分化研究や疾患モデルとしての利用が可能
- 本格導入にあたっての技術指導等

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 肝幹細胞の製造方法
- 出願番号 : 特願2023-210649
- 出願人 : 関西医科大学
- 発明者 : 白水 泰昌

お問い合わせ先

関西医科大学

産学知財統括室 URA/顧問 弁理士 佐々木健一

T E L 072-804-2324

e-mail sasakikn@hirakata.kmu.ac.jp

研究部研究課産学知財統括係 壺林・田中

T E L 072-804-2328

e-mail sangaku@hirakata.kmu.ac.jp