

移植可能 iPS 由来人工肝臓作成の臨床応用への展開

九州大学別府病院 外科
武石一樹

背景：わが国では肝臓病は第2の国民病とされ、年間30万人が死亡している。肝不全に対する唯一の根治治療は肝移植であるが、ドナー不足は深刻で移植を断念せざる得ない場合も多い。また、移植後の拒絶反応も重大な問題である。患者本人の細胞から人工肝臓を作成することができれば、これらの問題が解決できる可能性がある。山中教授らが報告したinduced pluripotent stem cells(iPS細胞)は多分化能を持ち(Yamanaka S *et al.* *Cell* 2007)、再生医療への応用が期待されている。しかしながら、これまでにiPS細胞由来肝細胞(iPS-Heps)はいくつか報告されているが、再生医療として臨床応用に至ったものはない。我々は、iPS細胞を肝細胞、胆管細胞、血管内皮細胞に分化させ、ラット肝を脱細胞化したScaffoldにそれらの分化させた細胞を再細胞化することで、世界で初めて、ヒトiPS細胞由来人工肝臓を作成し報告した(Takeishi K, *et al.* *Cell Rep* 2020)。この技術を臨床応用するためには、スケールアップする必要があり、大量のiPS由来肝細胞が必要である。しかしながら、iPS-Hepsは自己で増殖能を持たないため、実験室のみでヒト一人分のiPS-Hepsを作成するためには、約9億円ほどの費用が必要であり、臨床応用を難しくしている。

我々は、これまでにiPS細胞やES細胞から肝細胞を分化させる研究を行っており、肝細胞特異的転写因子の発現に着目したiPS-Hepsの新たなプロトコルを創出した。IL2rg遺伝子をノックアウトした免疫不全ラットに細胞移植を試みたところ、これまで報告されているプロトコルで作成したiPS-Hepsはラットの肝臓内でほとんど増殖しなかったのに対して、我々のプロトコルで作成したiPS-Hepsはラット肝内で60~70%の再分布を認め、ラット肝内で増殖させることに成功した。このラットよりiPS-Hepsを抽出することができれば、ラット肝臓を利用してiPS-Hepsを大量に培養するシステムを構築できると考えた。

ミニ人工肝臓を臨床応用するためには、Scaffoldのスケールアップも必要である。スケールアップするscaffoldとしては、ブタ肝臓をラット肝臓と同じように脱細胞化し、抗原性が消失していることを明らかにし、Scaffoldとする予定である。これまでにパイロットスタディーではあるが、ブタの脱細胞化にも成功しており、実施可能と考える。

今回の研究の目的は、iPS細胞から独自の方法にて分化させたiPS-Hepsを免疫不全ラットに移植し、ラット肝内で増殖させる。その移植したラット肝から、iPS-Hepsを含む肝細胞を抽出し、MACSを用いて、ラット由来細胞とヒト由来細胞に免疫学的に分離する。分離したヒト由来iPS-Hepsをブタから作成したScaffoldに再細胞化することで、人工肝臓のスケールアップを行い、肝機能の評価を行うことである(図1)。

今回の申請概要

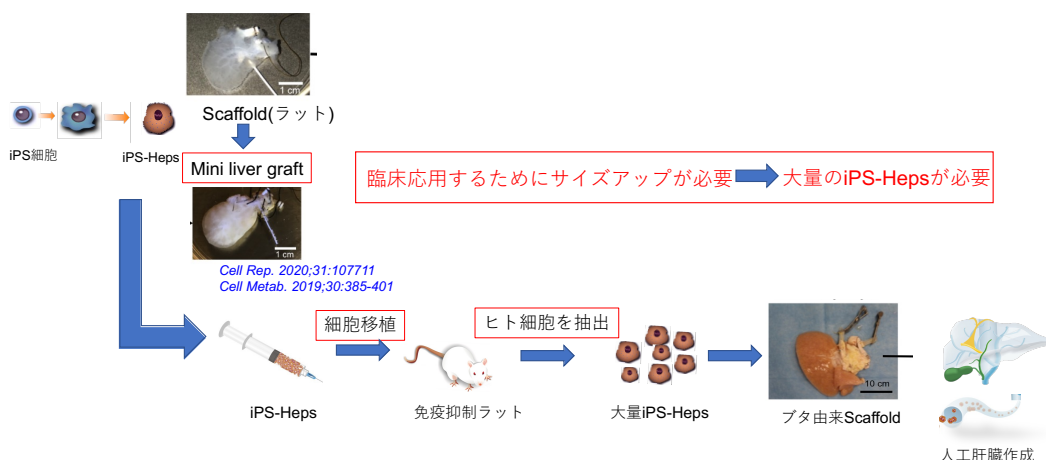


図1 今回申請概要図

結果：

1. iPS-Heps細胞移植

独自の方法にて作成したiPS-Hepsを免疫不全ラットに移植した。移植後2週目にはラット血中にヒトアルブミンを検出した(図2)。移植60日目にラット肝を摘出し、同様にヒトアルブミンで免疫染色を行なったところ、一部のラットにて、移植後に拒絶反応があり、移植後の再分布にバラツキが見られることがわかった(図3左)。この結果より安定したiPS-Hepsの再分布を得るためには、さらに強力な免疫不全ラットが必要と考えた。

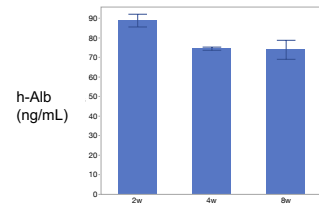


図2 iPS-Heps移植後ラット血中のヒトアルブミン濃度

2. IL-2/Rac2 doubleノックアウトラットの作成

さらに強力な免疫不全ラットを作成するため、遺伝子改変技術を利用して、IL-2(sKO)にRac2をダブルでノックアウトしたラット(dKO)を作成することに成功した(図4)。dKOラットは、B細胞、T細胞に加え、NK細胞もノックアウトしていた(図4)。このラットに同じようにiPS-Hepsを細胞移植したところ、全く拒絶反応を認めなかった(図3右)。今後の移植実験にはこのdKOラットを使用することとした。

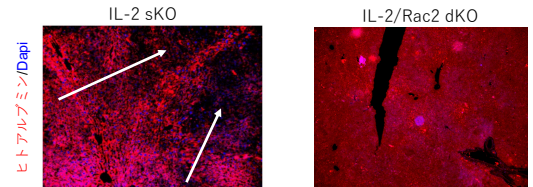


図3 IL-2single KO(sKO)とIL-2/Rac2 double KO(dKO)に対するiPS-Heps移植60日目の比較。sKOでは一部拒絶(矢印)を認めているが、dKOでは、拒絶を認めず、90%以上の陽性率となった。

3. 移植後再分布の評価

dKOラットにiPS-Hepsを 1.0×10^6 cellsを経門脈的に細胞移植を行なった。移植60日目にラット肝を摘出し、免疫染色にて評価を行った(図5)。移植を行ったラット肝内では、ヒトアルブミン陽性となる細胞が95%となり、同様にSTEM121(ヒト特異的抗体)での免疫染色でも95%以上が陽性となった。さらにラット肝臓よりgDNAを抽出し、ラット、ヒト特異的配列にてPCRを行ったところ、移植を行ったラット肝のみヒトDNAを検出した(図6)。

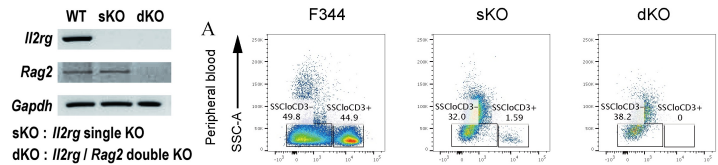


図4 IL-2 sKOラットおよびIL-2/Rac2 dKOラットの比較(左)ノーザンプロットにてIL-2/Rac2の発現の評価(右)dKOでは、B,T Cellに加え、NK細胞もノックアウトできた

4. 肝細胞の抽出

移植したdKOラットをコラゲナーゼ処理することで、肝細胞を抽出した。抽出した肝細胞をサイトスピンにて貼り付け、同様にヒトアルブミン、STEM121にて免疫染色を行ったところ、90%以上がヒトアルブミンおよびSTEM121陽性細胞となった(図7)。抽出した肝細胞が 500×10^6 cellsであったため、移植したiPS-Hepsの500倍の細胞が得られたことになる。

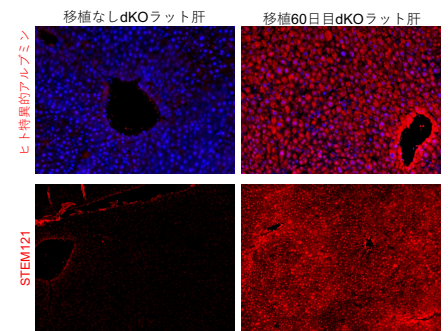


図5 iPS-Heps移植60日後のヒトアルブミンおよびSTEM121の免疫染色に比較。(左)移植なしをコントロールとした。

5. ラット由来細胞の除去

単離した肝細胞より完全にラット由来細胞を除去する必要があり、細胞表面マーカーを用いて、MACSでラット細胞を除去することとした。これまでの報告でヒト、動物を分離する方法として、MHCを用いて分離できることが、肺や心筋細胞で報告があったため、ラット特異的MHC抗体を用いて、MACSで分離を試みた。しかしながら、分離を行った後の細胞にもラット細胞を混入した。次に、抗体をヒト特異的MHC抗体に変更し、ヒト由来細胞を吸着させるようにしたが、ヒト細胞を吸着することができなかった。その原因を明らかにするため、iPS-HepsのMHCの発現をPCRにて評価したところ、移植前のiPS-HepsはMHCの発現を認めたが、移植後に単離した肝細胞

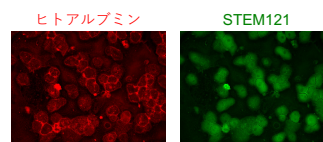


図7 ラット肝から単離した細胞の免疫染色。ヒト特異的アルブミンおよびSTEM121が90%以上で陽性となった。



図6 ゲノムDNAの評価。ヒトiPS細胞(左2つ)、iPS-Hepsを移植していないラット肝(中2つ)、iPS-Hepsを移植したラット肝(右3つ)よりDNAを抽出し、ラットおよびヒト遺伝子配列にてPCRを施行。移植したラット肝のみヒトおよびラットの遺伝子配列を認めた。

胞からはヒトおよびラットの両者ともにMHCの発現を認めなかった。このことは移植を行うことで、生体内では、免疫寛容が発生し、MHCの発現が低下することが予想された。

6. iPS細胞の変更

MHCの発現が低下するため、分離できないと考え、遺伝子改変技術を用いて、iPS細胞にヒト特異的MHCもしくは、遺伝子X(MACSの抗体が存在する表面マーカー2種類)が強制発現するiPS細胞を作成した。まず、ヒトMHCを強制発現したiPS細胞は分化後に移植するも、ラット肝内で拒絶反応を認め、上記実験と同じような再分布率を認めなかった。さらに、遺伝子Xを強発現したiPS細胞は肝細胞への分化が低下した。このことより、iPS細胞の種類により肝細胞への分化度にバラツキがあることも明らかとなった。

考察: iPS細胞から肝細胞への分化後にラットに移植を行ったところ、一部のラットにて拒絶反応を認めた。拒絶反応を認めた原因としては、sK0ラットでは、不完全免疫不全のため、タクロリムスの皮下注射を行っていたが、皮下注を行ってもタクロリムスの血中濃度が一定化しないために拒絶を認めるものや、免疫不全が強くなり、感染症で死ぬラットが存在した。ばらつきがある状態では、臨床応用した際に、一定の結果を得られない可能性が高いと判断し、タクロリムスが完全に不要となるより強力な免疫不全ラットが必要と考えた。そこで、sK0ラットにRac2をノックアウトしたdK0ラットの作成に成功した。このラットは、NK細胞も完全にノックアウトしており、タクロリムスを必要としない強力な免疫不全ラットであった。このラットを使用することで、拒絶反応は抑えることができ、また、動物実験施設のクリーンルームを使用することで、感染症も予防でき、細胞移植が格段と安定した。このラットに移植したiPS-Hepsは移植90日後には、ラット肝内で95%の再分布率を認めた。

移植したラット肝より肝細胞を単離することができた。単離した肝細胞のヒト抗体陽性率は90%以上となった。移植したiPS-Hepsが 1.0×10^5 cellsであり、単離した肝細胞がラット1匹より 500×10^6 cellsであり、約500倍の細胞数のヒト由来肝細胞を抽出したことになった。この方法を利用すれば、一人一人分のiPS-Hepsを作成するのに、5匹分のラットで十分となることになり安価にヒトiPS-Hepsを大量に培養することが期待された。

ラット由来細胞を完全に除去するためにMACSを用いて免疫学的に分離する方法を試みた。しかしながら、分離することはできなかった。この理由として、ラットに移植することで、移植前に発現していたMHCが移植後に発現していないことがわかった。この結果よりラット由来細胞を除去することはできなかったが、新たな知見を得られた。iPS-Hepsはラット肝に移植することで、ラット肝内でその発現プロファイルを変えることがわかった。つまり、ラット肝は、Bioreactorとして、iPS-Hepsを成熟し、より生体内にて適応できる細胞にしている可能性が示唆された。実際、肝細胞は成熟するとMHCの発現を弱め、免疫寛容を得ることが報告されている。このことは、実臨床の肝移植が比較的拒絶反応が少ないことからわかる。

ラット由来細胞を分離するために、iPS細胞の遺伝子改変を行い、MHCを強制発現するモデルを作成したが、拒絶のため、上手くいかなかった。さらに、MACSにて分離できるように他の遺伝子を強制発現させたiPS細胞を用いて行ったが、肝細胞への分化度にばらつきが出て、使用できないことがわかった。

今後の展開については、この技術を安定化させ、ラット由来細胞を完全に除去する方法を検討する必要がある。まず、ラット由来細胞の除去であるが、動物の遺伝子改変技術は安定しているので、ラットの全細胞にある遺伝子(現在GFPを候補にしている)を強制発現させ、その発現した細胞をFACSにて分離することを考えている。次にiPS細胞の肝細胞への分化のばらつきについては、まず成熟した肝細胞を移植し、移植後にラット肝内での再分布率を確認し、どの遺伝子の発現が必要なかを再検討する。さらに、ラット肝内に移植することで、iPS-Hepsの成熟度が増し、プロファイリングを変えていたため、患者さんから採取した病気肝でもラット肝内で肝細胞が戻る可能性がある。肝細胞を移植の細胞源として利用できれば、iPS細胞の癌化のリスクを低下させ、移植までの期間を短縮できる可能性がある。