

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

プロジェクト 責任者

関西医科大学医学部 iPS幹細胞再生医学講座

講師 白水 泰昌

プロジェクト概要

尿素サイクル異常症は、体内で作られたアンモニアを肝臓に取り込んで尿素を生成する過程で、肝細胞が本来有する分解酵素が生まれつき存在しないために、有毒なアンモニアの代謝ができずに高アンモニア血症を呈する疾患群である。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不可逆的な神経障害をきたす可能性があり、日本では8000～44000人に1人の頻度で発症する(Morioka D et al, Liver Transpl 2005; 11: 1332)。

日本においては生体肝臓移植が唯一の根治療法であるが、腹腔内容積の小さい小児、中でも体重6 Kg未満の乳児にとっては、速やかな治療の介入が困難な難度の高い治療法である(Shirouzu Y et al, Liver Transpl 2006; 12: 1224)。

一方ドナー肝臓由来の肝細胞、あるいはヒトembryonic stem cell (ESC) や induced pluripotent stem cell (iPSC)由来肝細胞を用いた細胞移植治療は、門脈カニューレーションにより実施可能な低侵襲治療である(図1)。新生児に対しても臍帯静脈を介して安全に施行でき、移植後の肝代謝異常の改善に寄与することも証明されている。一方、移植細胞が長期的に機能することは難しいことから、肝臓移植が可能になるまでの一時的機能補助を目的とした治療としての位置づけにとどまり、肝内に存在する組織幹細胞の重要性が示唆されている(Iansante V et al, Pediatr Res 2018; 83: 232)。

我々は、ヒトiPSC由来肝細胞から長期継代可能なiPSC由来肝幹細胞様細胞の作成に成功した(図1-3)。この細胞は肝前駆細胞として増殖する傍ら、培地組成を変更することで成熟肝細胞へと分化する(図4)。あらかじめ細胞を凍結保存し製品化することで、緊急性の高い代謝異常性肝疾患患者に対しても速やかな供給が可能であることから、新規の細胞治療製剤になりうると考え、現在実験的Proof Of Conceptの取得を目指し移植実験の準備中である。

図1 既存の治療法との比較

	肝臓移植	ドナー肝由来肝細胞移植	ヒトiPSC由来増殖性肝前駆細胞 (肝幹細胞様細胞) 移植
ドナー問題	必須	必須 (一般に細胞の質不良)	なし
凍結保存	不可	可能	可能?
移植臓器 (細胞) 中の幹細胞	+	±	+
治療侵襲	大	小	小
治療成績	長期生存良好	短期間補助的に機能するが長期生存は困難	長期的に機能?
技術的難易度と治療侵襲	高 (大) → 生後早期の介入困難	低 (小) → 出産直後から介入可能	

図2 iPS細胞由来肝幹細胞様細胞の増殖曲線

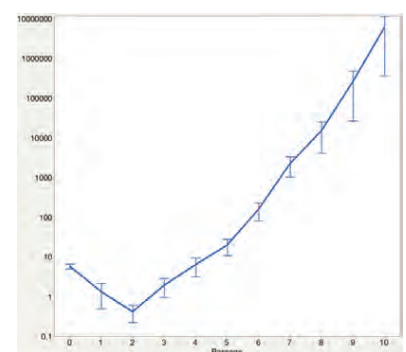


図3 細胞染色による長期継代後 (146日目) の肝細胞特異的蛋白発現の確認

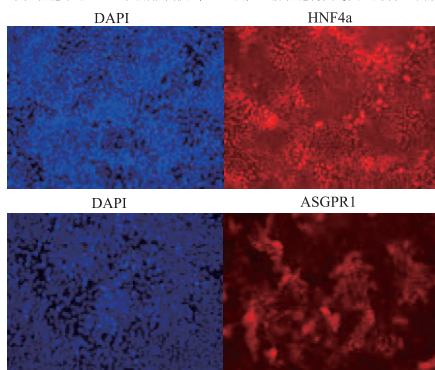
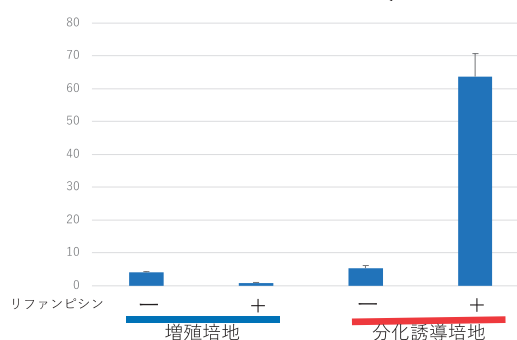


図4 長期継代後のCYP3A4 mRNA expression



iPSC由来肝幹細胞様細胞は、増殖培地ではなく、分化誘導培地におくことで、48時間Rifampicin treatment後にCYP3A4 mRNAの発現が誘導された。

対象疾患: 先天性代謝異常性肝疾患

特許情報: なし

技術の特徴: 血清や精製過程を必要とせずに長期にわたり継代培養可能なヒトiPSC由来肝前駆細胞

市場性、開発における課題: 対象疾患が少なく将来的な臨床POC取得の難しさ

Regenerative medicine

Study aiming to produce human iPSC-derived cell formulation for metabolic hepatic disorder

Principal Investigator

Department of iPS Stem Cell Regenerative Medicine,
Kansai Medical University

Associate Professor (Lecturer) Yasumasa SHIROUZU

Project Outline

Urea cycle disorder exhibits the symptoms of hyperammonemia caused by the inborn error of the metabolic enzyme of urea cycle. Severe cases show the short-term poor prognosis, while non-severe cases may also show the irreversible nerve system damage. The prevalence is considered to be 1: 8,000–44,000 live births (Morioka D et al, Liver Transpl 2005; 11: 1332). Living donor liver transplantation (LDLT) is a complicated treatment for infants less than 6 Kg who have smaller abdominal cavity, and the earlier introduction of LDLT is supposed difficult although it is only a curative therapy in Japan (Shirouzu Y et al, Liver Transpl 2006; 12: 1224).

Meanwhile, cell transplantation using hepatocytes from deceased donor livers or hepatocytes differentiated from embryonic stem cells (ESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) is regarded as minimally invasive treatment by intraportal administration (Figure 1). Even new born babies can undergo the hepatocyte transplantation therapy via the umbilical vein, and it brings about the revision of hepatic metabolic disorders. However, it remains only a temporal or adjunctive treatment before liver transplantation suggesting the importance of hepatic stem cells as transplanted cells don't work for a long time (Iansante V et al, Pediatr Res 2018; 83: 232).

We successfully developed iPSC-derived hepatic stem cell-like cells which can be proliferated under chemically defined condition and maintained for a long time (Figure 2, 3). They can self-renew as the hepatic progenitors and are differentiated into matured hepatocytes by the alteration of the medium composition (Figure 4). Cryopreserving them as the products make the emergent transplantation feasible because the infants suffering from the severe hepatic metabolic disorders require the immediate revision. Transplantation experiments are currently being prepared aiming to find the proof of concept.

Figure 1 The comparison with the existing treatments

	Liver transplantation	Hepatocyte transplantation	iPSC-derived hepatic stem cell-like cell transplantation
Problems about donors	Yes	Yes (Quality is usually poor)	No
Cryopreservation	No	Yes	Yes
Inclusion of stem cells	Yes	No	Yes
Treatment invasion	Highly	Minimally	Minimally
Effectiveness	Permanent	Short-term	Long-term ?
Technical difficulty	Yes→Not applicable to new born babies		No→Applicable to new born babies

Figure 2. Growth curve of iPSC-derived hepatic stem cell-like cells

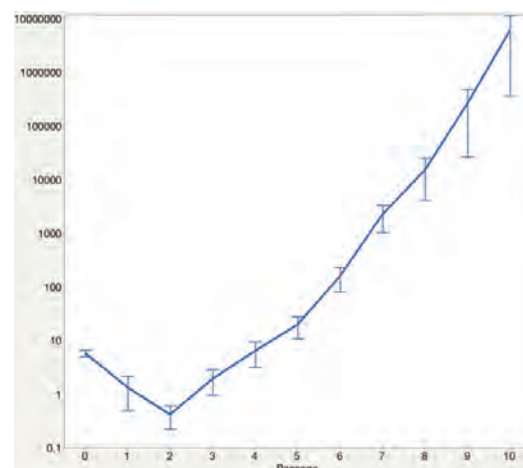


Figure 3. Immunostaining of iPSC-derived hepatic stem cell-like cells after 146-day culture

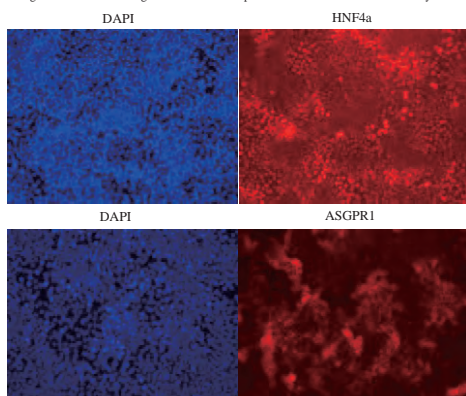
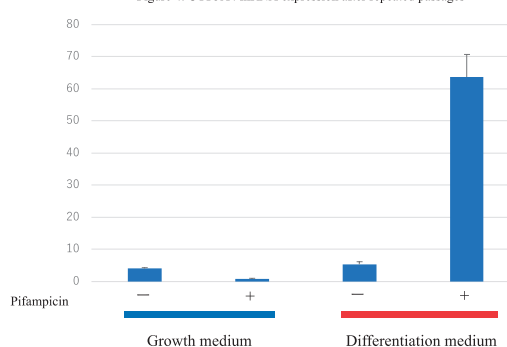


Figure 4. CYP3A4 mRNA expression after repeated passages



iPSC-derived hepatic stem cell-like cells expressed CYP3A4 mRNA following 48-hour Rifampicin treatment not in growth medium but in differentiation medium.

Object: Congenital metabolic hepatic disorder

Patent: No

Characteristics: iPSC-derived hepatic progenitors that are expandable with neither serum nor purification

Development subject: Difficulties of clinical trials for a scarcity of patients