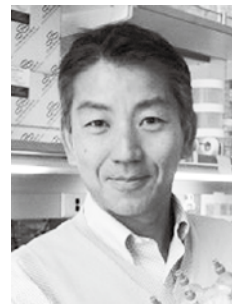


幹細胞が拓く人工肝臓の新たな可能性

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Keck School of Medicine,
University of Southern California

三木 敏生

Toshio MIKI



1. 人工肝臓, その治療対象と要求分析

アメリカの移植臓器分配機構 [United Network for Organ Sharing (UNOS)] の統計によると, 現在アメリカにおける肝臓移植待機患者数は約 15,000 人であり, 移植医療を取り巻く環境や医療技術の向上に関わらず, その数はこの 10 年改善されていない。すなわち, 待機中に移植治療を受けることなく亡くなる患者数も改善されず, 年間約 2,000 人が亡くなっている。この現状を打破するためには, 新しい医療技術の開発が急務であり, 人工肝臓の開発・応用もアプローチの 1 つとして期待されている¹⁾。

人工肝臓の寄与しうる治療対象としては, 急性肝不全や慢性肝不全の増悪期における肝機能補助, すなわち移植までのブリッジとしての役割などが提唱されているが, 移植後初期肝機能不全 (primary non-function, PNF) における肝機能補助としての使用も直接的に肝臓移植待機患者数の減少に寄与すると考えられる²⁾。

非細胞型人工肝臓としては, 血漿交換と高流量血液濾過透析の組み合わせなどによる装置が幾つか提唱されており, 水分出納管理, 窒素代謝改善, ビリルビン除去などの面での有用性が知られている一方, 亜急性肝障害に対しては救命率の改善は認められていない。このことから自己肝の再生誘導を含めた生物学的補正が必要と考えられ, ハイブリッド人工肝臓として血液浄化機器とバイオリクターを組み合わせた体外設置型肝補助装置の開発が求められてきた³⁾。

急性・亜急性肝障害あるいは慢性肝不全の急性増悪期に

対応する人工肝臓の要求条件を考察すると, いずれの対象疾患においても, 想定される運用期間は 1~2 週間であり, 期待される効果としては一時的な肝機能の補助および自己肝再生促進作用が考えられる。血液浄化装置によりアンモニア除去・アルブミン補充など一部肝機能は代償できるので, バイオリクター部分には成長因子・凝固因子の産生や糖代謝・脂肪代謝を含む生体恒常性維持への貢献が求められる。次に, 必要とされる最小細胞量を肝再生に必要な量である肝実質の 30% と概算すると, およそ 7×10^{10} 個と推定できる。すなわち, 人工肝臓としては最低湿重量 440 g の細胞を培養する機器が求められる⁴⁾。

過去十数年における先達の精力的な研究開発により, 工学的には十分量の細胞を培養し血液浄化機器に接続するバイオリクターがいくつか提唱されている³⁾。しかし, これらのバイオリクターに充填する肝細胞不足のため人工肝臓の臨床応用は妨げられてきた。理想的な細胞の条件としては, ヒト由来であり, 高度な肝機能を保持し, また増殖性を有することがあげられる。臓器不足の現状から, ヒト成熟肝細胞は入手困難であり, 肝芽腫細胞や不死化したヒト肝細胞では十分な肝機能を得られない⁵⁾。異種動物の肝細胞では, やはり機能的に不十分であることに加え, ブタ内在性レトロウイルス (porcine endogenous retrovirus, PERV) などの動物由来感染症の可能性などから応用が難しいと考えられる⁶⁾。そこで, ヒト幹細胞から肝細胞を分化させることができれば, 常に十分量の新鮮で高度な肝機能を保持するヒト細胞をハイブリッド型人工肝臓に用いることができるのではないかと期待されている。

2. 幹細胞由来肝細胞の作出方法

幹細胞とは, 自己複製能 (自分と同じ能力をもった細胞を複製する能力) と多分化能 (異なる系列の細胞に分化す

■ 著者連絡先

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Keck School of Medicine, University of Southern California
E-mail. toshiomi@usc.edu

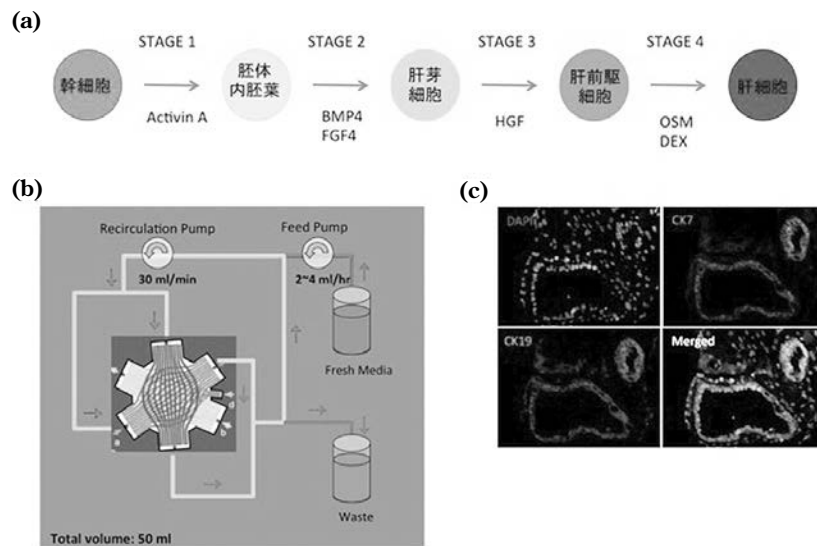


図1 段階的分化誘導法を用いたES細胞から肝細胞の作出
 (a) 肝細胞の段階的誘導法, (b) バイオリアクター内での培養液の灌流, (c) 胆管細胞マーカー (CK7, CK9) 陽性細胞による管腔構造。

る能力)を併せもった細胞である。幹細胞の中でも人工肝臓に用いるためには、機能的な肝細胞に分化する能力が高い胚性幹細胞やinduced pluripotent stem (iPS) 細胞などのヒト万能幹細胞が適している。これらの幹細胞は*in vitro*での自己複製方法が比較的確立しており、同質の細胞を多量に入手することができるという点でも優れている。一方、臨床応用に向けての欠点としては、がん化の可能性を完全に否定できないことが挙げられるが、人工肝臓としての応用であれば中空糸と血漿交換装置の2重のバリアによって幹細胞由来の肝細胞が生体内に流入することはまず考えられないため、臨床応用のハードルが細胞移植などに比べて低いと考えられる。

多くのヒト万能幹細胞から肝細胞への分化が報告されているが、現在主流となっている方法は、段階的分化誘導と呼ばれ、胎生期における肝臓の発生を模して段階的に肝細胞への分化を誘導するものである⁷⁾。また、その応用としてウイルスなどを用い肝細胞分化に必須とされる転写因子を段階的に強制発現させることによって肝細胞を作出することができる⁸⁾と報告されている。肝臓の発生は、まず原腸陥入の間に中内胚葉と呼ばれる内胚葉と中胚葉の共通の前駆細胞が形成され、transforming growth factor (TGF)- β シグナルにより胚体内胚葉に分化する。原腸形成の過程で内胚葉は、前腸、中腸と後腸に区別され、腹側の前腸内胚葉が心臓中胚葉からのfibroblast growth factor (FGF)シグナルと、横中隔間充織からのbone morphogenetic protein (BMP)シグナルの刺激により肝芽を形成する。肝芽細胞は、肝細胞や胆管細胞に分化し肝臓の最終的な成熟

は出生後まで続くとされている。このような肝臓の発生を段階を追って培養皿上で再現する為に、大きくステージ1から4まで分け、それぞれ異なる成長因子を添加した培養液で分化を誘導していく(図1a)。

3. 幹細胞由来肝細胞充填バイオリアクターの作出

次に、この段階的分化誘導方法を用いバイオリアクター内でヒトES細胞から肝細胞への分化を行った我々の研究を紹介する⁹⁾。我々の用いたバイオリアクターは、二束の親水性中空糸と一束の疎水性中空糸を約60度の角度で交差するように織り込んだ円盤型のバイオリアクターである¹⁰⁾。角度をつけた親水性中空糸内を比較的高い流速で培養液を循環させることによって、中空糸外の細胞培養区間を均等に効率良く灌流することができる(図1b)。実験用の小型バイオリアクターの細胞培養区間容積は8 mlであり、これを基礎培地で馴化し1%マトリゲルでコーティングした後、ヒトES細胞 30×10^6 個を播種した。分化誘導21日後の肝特異的遺伝子の発現やアルブミンなどの分泌量において3D環境下で誘導されたヒトES細胞由来肝細胞は有意に高い分化度を示した。また、免疫化学/蛍光染色を用いた形態解析においても、糖新生/貯蔵能、薬物代謝酵素の発現など肝細胞特異的な機能を示した。興味深いことに、バイオリアクター内の細胞塊内に筒状に整列した胆管細胞マーカー(CK7, CK19)を発現する細胞群が観察された(図1c)。これらは肝細胞分化誘導の過程において偶発的に胆管系に分化誘導された細胞が管構造を構築したものと思われる。このことから3D培養環境は上皮系細胞に

自発的な極性獲得と組織構築を許容すると考えられ、この特性が肝細胞にも高度な分化を誘導したものと考えられる。しかし、ヒト肝細胞を同型バイオリクターに播種した場合と同等の高密度培養および機能分化を達成することはできずさらなる改善が求められる。

4. おわりに

移植待機患者をなくすための究極のゴールは、体内に移植可能な人工肝臓を開発することである。現時点においての体外型ハイブリッド人工肝臓の作成は、そのゴールに向かう過程におけるひとつの実現可能な目標とも言うことができる。工学的には実用レベルに達したものの内蔵する細胞の不足によりハイブリッド型人工肝臓の開発は長らく停滞してきた。しかし、近年の幹細胞研究の発展により、ヒト幹細胞由来肝細胞の供給がこの問題を解決する可能性が示されている。コストや機能的分化効率など解決されなければならない問題点は多々あるが、大きな視点から見ると幹細胞由来肝細胞の人工肝臓への応用は確実に踏み出すべき一歩である。いままで開発されてきた工学的資産を生かして、多くの研究結果が生み出され、1日も早い臨床応用に向けて進んで行くことが期待されている。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

文 献

1) Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, et al: Cell and tissue

engineering for liver disease. *Sci Transl Med* **6**: 245sr2, 2014

- 2) Nanashima A, Pillay P, Verran DJ, et al: Analysis of initial poor graft function after orthotopic liver transplantation: experience of an Australian single liver transplantation center. *Transplant Proc* **34**: 1231-5, 2002
- 3) Lee KC, Stadlbauer V, Jalan R: Extracorporeal Liver Support Devices for Listed Patients. *Liver Transpl*, [Epub ahead of print], 2016
- 4) Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, et al: An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* **40**: 463-71, 2013
- 5) van Wenum M, Chamuleau RA, van Gulik TM, et al: Bioartificial livers in vitro and in vivo: tailoring biocomponents to the expanding variety of applications. *Expert Opin Biol Ther* **14**: 1745-60, 2014
- 6) Frühauf JH, Mertsching H, Giri S, et al: Porcine endogenous retrovirus released by a bioartificial liver infects primary human cells. *Liver Int* **29**: 1553-61, 2009
- 7) Miki T: Hepatic differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. In: Kallos MS, ed. *Embryonic stem cells: differentiation and pluripotent alternatives*. InTech, Rijeka, 2011, 303-20.
- 8) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, et al: Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J Hepatol* **57**: 628-36, 2012
- 9) Miki T, Ring A, Gerlach J: Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods* **17**: 557-68, 2011
- 10) Ring A, Gerlach J, Peters G, et al: Hepatic maturation of human fetal hepatocytes in four-compartment three-dimensional perfusion culture. *Tissue Eng Part C Methods* **16**: 835-45, 2010