

201008030A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系
構築のための基盤研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成23（2011）年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系
構築のための基盤研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成23（2011）年4月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基盤研究	1
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)	
II. 分担研究報告	
遺伝子導入技術を利用したヒトiPS細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発	6
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)	
iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理技術の開発	32
古江 美保 (独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室)	
iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究	42
高橋 一郎 (独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 難病資源研究室)	
iPS細胞等の幹細胞の再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発	46
梅澤 明弘 (国立成育医療センター 生殖医療研究部)	
レンチウイルスベクターを利用したiPS 細胞の作製とその評価に関する研究	49
形山 和史 (大阪大学大学院薬学研究科)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	60
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基盤研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞（ES 細胞）や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。

本年度は、iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導法の開発、ハイスループットな内胚葉分化誘導効率評価方法の開発、バイオインフォマティクス的手法を用いた iPS 細胞の未分化性評価、およびアデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞の作製等を行った。その結果、

- ①SOX17、HEX、HN4 α の 3 種の遺伝子を順次導入することにより、高い薬物代謝酵素活性を有する成熟肝細胞を分化誘導することができた。
- ②本研究で確立した内胚葉分化プロトコルを用いて、肝細胞への分化効率を予測することが可能となった。
- ③再現性のある iPS 細胞未分化評価法を確立した。
- ④アデノウイルスベクターが iPS 細胞の作製を阻害していること、その阻害効果は外来遺伝子導入効率とは相関しないことが明らかとなった。

分担研究者

古江美保 （独）医薬基盤研究所
高橋一朗 （独）医薬基盤研究所
梅澤明弘 国立成育医療センター研究所
形山和史 大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこ

れまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞（ES 細胞）や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。

本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、

- ①遺伝子導入法の最適化等による iPS 細胞の作製
- ②再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発
- ③遺伝子導入技術の応用による高効率分化誘導技術の開発及び生体機能類似細胞評価手法の開発

などに関して研究を実施し、ヒト由来の iPS 細胞等各種幹細胞及び分化誘導細胞コレクションの構築、創薬研究として実用性・汎用性の高い新規細胞評価系開発の基盤構築を行う。本年度は特に 体細胞と iPS 細胞への遺伝子導入法の最適化、iPS 細胞の未分化性安定評価法の開発、および多分化能安定性評価法の開発を行う。

このようなヒト特異的毒性の予測精度向上およびヒトへの外挿性向上実現のための基盤構築を行うことにより、安全性の向上、創薬初期段階での簡便な有効性・安全性評価が可能となり、創薬後期段階での開発中止の低減、新薬開発コストの低減、新薬開発期間の短縮などが期待される。

B. 研究方法

本研究は、主任研究者水口、分担研究者 4 名（古江、高橋、梅澤、形山）の計 5 名が遂行した。当該年度においては、主にヒト iPS 細胞から肝細胞への成熟化、肝細胞分化効率の予測法開発、iPS 細胞の未分化

評価法開発、iPS 細胞作製法の改良、に分けて遂行された。

（倫理面への配慮）

「ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究」文部科学大臣確認済み（医薬基盤研究所）

「ヒト ES 細胞樹立・使用研究」文部科学大臣確認済み（国立成育医療センター）

C. 研究結果

1. 遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発

アデノウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞から分化誘導した中内胚葉に SOX17 遺伝子を導入し、そこから得られた内胚葉に HEX 遺伝子を導入し、さらにそこから得られた肝幹前駆細胞に HN4 α 遺伝子を導入することにより、高い薬物代謝酵素活性を有する成熟した肝細胞を効率良く分化誘導することに成功した。

2. iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理技術の開発

Pluripotency PCR アレイを用いて未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析を行った結果、ヒト ES 細胞と iPS 細胞、ならびにヒト EC 細胞において、未分化マーカー遺伝子、あるいは早期分化マーカー遺伝子の発現において大きな発現の差は見られなかった。また、ヒト iPS 細胞培養における hESF9 培地の有用性を示した。さらに、ヒト iPS 細胞から内胚葉への簡便かつ効率良い分化誘導プロトコルを確立した。

3. iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究

リプログラミング遺伝子として既存の

iPS 細胞で発現が昂進している NANOG 遺伝子を加えて体細胞をリプログラミングすることができた。分離した細胞はすべてアルカリフォスファターゼ陽性であった。さらにその中の 8 株について発現解析をおこなったところ、初期化遺伝子の POU5F1, SOX2 遺伝子の発現が体細胞に比べ 400 倍以上上昇していた。

4. iPS 細胞等の幹細胞の再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発

ヒト羊膜由来組織から iPS 細胞を樹立し、これまで確立した未分化性評価に関する検証を行った。また、バイオインフォマティクス的手法を用いた包括的な解析を行い、再現性のある品質評価手法を確立した。

5. レンチウイルスベクターを利用した iPS 細胞の作製とその評価に関する研究

効率良く、安全性に優れたアデノウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞を作製するための基礎的知見を得た。アデノウイルスベクターが iPS 細胞の作製を阻害していること、その阻害効果は外来遺伝子導入効率とは相関しないことを明らかにした。

D. 考察

創薬に応用可能なヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を作製する技術を開発し、HNF4 α 遺伝子が肝分化を促進するメカニズムを明らかにした。しかしながら、ある種のチトクローム P450 (CYP) 酵素活性は初代培養肝細胞と比較して同等であるのに対して、初代培養肝細胞と比較し今なお低い CYP 群も存在するため、今後はそれらの CYP に関してもより高い活性を有した肝細胞を作製することが必要となる。肝細胞関連遺伝子の発現は初代培養肝細胞とほぼ同等の細胞が得られ

たので、今後は CYP 活性が高い細胞を作製するために技術を開発する予定である。また、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導に関して、培養条件(3 次元培養等)の検討や更なる機能遺伝子の導入を組み合わせることで、初代培養肝細胞とほぼ同等の機能を有した細胞の分化誘導法を確立できるものと期待される。

多くのヒト iPS 細胞が樹立され、さらに分化誘導技術が進む中、分化効率のより良い細胞株を未分化状態から予測することも今後の重要な課題となると考えられる。今回、我々は未分化状態における遺伝子プロファイリングを検討したが、一般的に使用されている未分化マーカー遺伝子発現を解析しても、顕著な所見が得られないことが明らかとなった。むしろ、癌関連遺伝子などの発現の解析を行うことにより細胞株の評価を行えることが示唆された。品質評価を行うに当たり、従来解析されてきた遺伝子群では十分ではないとすれば、より多くの遺伝子発現について解析が可能な DNA アレイを用いた解析などの使用が考えられるが、PCR 法を用いて発現を再確認する必要があり、また、高価となる。癌関連遺伝子やシグナル関連遺伝子などの PCR アレイを用いて、解析していくことにより、評価に用いることが可能な遺伝子群が明らかとなることが予測される。今後、評価に用いる遺伝子群の同定を行う予定である。また、今回報告した内胚葉細胞への分化プロトコールは、これまで報告されている内胚葉細胞への分化誘導方法に比べ、安価で簡便な方法である。さらに、内胚葉細胞への分化効率が、本研究事業の成果であるアデノウイルスベクターによる高効率な成熟肝細胞への分化 (Inamura et al. 2010) と相関性があることが示唆された。この結果から、分化誘導せず、早期の分化段階での選択が可能になり、評価のコストおよび

時間短縮が期待される。

ヒト iPS 細胞の未分化マーカーによる評価系について経時的安定性について検証し品質管理技術をほぼ確立できた。また、最もシビアな問題として考えられているゲノム変異について、染色体レベルおよびゲノムレベルでの検証法を確立した。本年度は特にエピゲノムまで解析範囲を広げた手法を確立することができた。この評価系を用いるで染色体異常を認める iPS 細胞の細胞形質を詳細に解析し、正常な iPS 細胞と比較検証する基盤ができ、毒性安全性評価および創薬開発に必要な良質な iPS 細胞とは何かということの規定することが可能となる。未分化性評価とゲノム安定性評価による結果は現在の培養システムがヒト iPS 細胞を長期にわたって安定的に培養できていることを示している。今後、フィーダフリー、血清フリー培養条件で長期安定的に未分化性を維持できる細胞培養条件が課題となる。その評価を行う対象となる培養システムが確立できたことは、フィーダフリー、血清フリー培養下で長期にわたって安定した培養環境を構築し、品質管理・評価法の確立へとつながると考えられた。

昨年度の研究では、レンチウイルスベクターを用いた場合には、山中 4 因子を同時に発現するレンチウイルスベクターと Oct3/4 を単独で発現するレンチウイルスベクターを HDF 細胞へ共導入した時にのみヒト iPS 細胞のコロニーが多く出現し、効率よくヒト iPS 細胞を誘導するためには Oct3/4 の発現量が他の因子よりも多く必要であることを明らかにした。現在のところ、同様の方法でヒト iPS 細胞を再現性良く作製することに成功している。一方、Ad ベクターを用いた場合には、ファイバー改変型 Ad ベクターを用いることでヒト繊維芽細胞への高効率遺伝子導入を達成したが、ヒト iPS 細胞の作製には成功していなかった。

そこで本研究では、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を検討した。また、Ad ベクターによる iPS 細胞作製阻害メカニズムを考察するために、タイプの異なるファイバー置換型 Ad ベクターや HDAd ベクターを用いて検討した。汎用されている E1 欠損型 Ad ベクターは、Ad ゲノム (約 36kbp) の複製の開始に必須な E1 領域を欠損しているため、E1 遺伝子を持たない通常の細胞では増殖しない。しかしながら、E1 領域以外の Ad ゲノムが残っているため、弱いながらもウイルス由来遺伝子の転写・翻訳が起こること (VA-RNA、pIX、Hexon、E2、E4 等) が知られている。それに対して、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域 (左端約 0.4kb、右端約 0.2kb) 以外のすべてのウイルス遺伝子を欠損させた HDAd ベクターでは、ウイルス由来 RNA やタンパクは産生されない。そのため、従来型 Ad ベクターあるいは HDAd ベクターを細胞へ加えた場合の iPS 細胞作製効率が異なれば、Ad ゲノムが iPS 細胞作製へ何らかの影響を与えていることが予想される。本研究では、Ad ベクターを高タイターで細胞へ加えた場合には、いずれの Ad ベクターを加えた場合にもヒト ES 細胞様のコロニーが出現しなくなった。そのため、Ad ベクターは iPS 細胞作製を阻害している可能性が考えられた。また、細胞へ加える Ad ベクターの量を減らした場合においてもヒト ES 細胞様コロニーの出現効率は減少し、その減少率は Ad ベクターの種類により異なっていた。これらの結果は Ad ベクターを加えるタイミングを変更しても同様であった。HDAd ベクターを加えた場合には、従来型 Ad ベクターに比べて阻害効果が減弱し、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が認められた。本結果から、Ad 由来ゲノム配列の存在が iPS 細胞作製阻害へ何らかの影響を与えている可能性も考えられた。ただし、

原因は不明であるが HDF 細胞では HDAd ベクターの遺伝子導入効率が極めて低い為、Ad ゲノムが iPS 細胞作製阻害へ与える影響については検討の余地があると考えられる。一方、従来型 Ad ベクターの量を減らした場合には、細胞への外来遺伝子の導入効率が低いにも関わらず、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が強く阻害された。また、ファイバーを 35 型へ置換した Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP) を加えた場合には、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が認められた。従来型 Ad ベクターは細胞表面上の CAR を受容体として利用するのに対して、35 型ファイバーは CD46 を受容体として利用する。このような違いが iPS 細胞作製阻害効果の違いに反映される可能性も考えられた。なお、外来遺伝子の導入効率と iPS 細胞作製阻害効果の相関は、本研究では確認できなかった。

Ad ベクターを用いた iPS 細胞作製に関する論文は 2 報存在するが、それらの iPS 細胞作製効率は非常に低く、また特定の細胞からのみ樹立されている (マウス成体肝細胞より 0.0005% の効率で 3 株; ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 (IMR-90) より 0.0002% の効率で 3 株)。これまでに、染色体への挿入がない一過的な遺伝子発現によるヒト iPS 細胞樹立の報告は存在するが、一過的な方法での iPS 細胞樹立効率は非常に低いことが知られており、改善の余地があると考えられる。本研究では、Ad ベクターが iPS 細胞の作製を阻害することを明らかとした。今後は、Ad ベクターによる iPS 細胞阻害メカニズムを明らかにし、それらを回避可能な Ad ベクターを開発することで、安全なヒト iPS 細胞を効率良く作製する新規基盤技術の開発が期待できる。

E. 結論

①ヒト ES 細胞や種々のヒト iPS 細胞に対

して Ad ベクターを用いた高効率遺伝子導入法を用いて、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞に対して、SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子をそれぞれ導入することによって成熟肝細胞への分化を促進できることが明らかとなった。

②我々が開発したハイスループットな内胚葉分化誘導効率評価方法は、ヒト肝細胞への分化効率を予測することが可能であることが示唆され、安定で簡便、安価な方法であり、細胞機能評価方法としての利用が期待される。

③ヒト iPS 細胞による新規細胞評価系構築にとって重要なことは、元々の iPS 細胞が安定的に培養できるかどうかである。ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、iPS 細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。また、ゲノムレベル、エピゲノムレベルでの安定性に関しての解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。

④数種類のファイバー置換型 Ad ベクターおよび HDAd ベクターを利用し、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を見出した。

分担研究報告書

遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発

分担研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

本研究の目的は、薬物の毒性評価系などへの応用可能なヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞由来の肝細胞を効率良く分化誘導させる技術を開発することである。我々は昨年、SOX17 遺伝子および HEX 遺伝子を中内胚葉系細胞および内胚葉系細胞に対してそれぞれ導入することにより、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞の前駆体である肝幹前駆細胞を効率良く誘導できることを報告した。今後は、肝幹前駆細胞から成熟肝細胞に効率良く分化させる技術開発が必要となる。そこで本年度では、遺伝子導入効率が優れているアデノウイルス (Ad) ベクターを用いて肝細胞への分化に必須の遺伝子である HNF4 α 遺伝子を導入し、肝細胞の成熟化を試みた。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から分化誘導した肝幹前駆細胞に HNF4 α 発現 Ad ベクターを作用させ、定量的 RT-PCR 法、フローサイトメトリー、およびシトクロム P450 (CYP) 活性測定などを用いて成熟肝細胞の分化誘導効率を測定した。また、肝臓で毒性を示すトログリタゾンなどの薬剤を分化誘導した肝細胞に作用させた後の細胞毒性について検討した。HNF4 α 遺伝子を導入することにより、薬物代謝の第一相反応に関わる CYP450 遺伝子群の発現量および活性の増加が確認された。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞の 80% 以上はアジアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1) などの肝細胞特異的表面抗原を発現することも明らかになった。さらに、分化誘導した肝細胞はトログリタゾンなどに対して初代培養肝細胞と同様に細胞毒性を示した。以上のことから、HNF4 α 遺伝子を導入することにより、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から成熟肝細胞への分化効率が向上しただけでなく、薬物の毒性評価に使用可能な成熟した肝細胞を作製できることが明らかとなった。

研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科

川端健二 (独)医薬基盤研究所

大阪大学大学院薬学研究科

稲村 充

(独)医薬基盤研究所

大阪大学大学院薬学研究科

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

高山和雄 (独)医薬基盤研究所

A. 研究目的

細胞を用いた in vitro アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に

用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞(ES細胞)や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。

そこで本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、ヒト ES 細胞や多種多様なヒト 人工多能性幹細胞(iPS細胞)への高効率遺伝子導入による成熟肝細胞への分化誘導法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は *improved in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミドは pHMEF5 を使用した。そのマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMEF5-LacZ を作製した。さらに、EFプロモーター制御下でヒト SRY-box containing gene 17 (SOX17)、hematopoietically expressed homeobox transcription factor (HEX)、または hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-SOX17、pHMEF5-HEX、pHMEF5-HNF4 α を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化した K7 型ベクタープラスミドに挿入することにより、pAd-K7-EF-LacZ、pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-HNF4 α を作製した。作製した Ad ベクタープラスミ

ドを *Pac I* で消化し、SuperFect (Qiagen 社)を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-SOX17、Ad-K7-EF-HEX、Ad-K7-EF-HNF4 α を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。各 Ad ベクターの物理学的(*particle*)タイターは Maizel らの方法により測定した。

B-2. ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 H9 (WiCell research institute)やヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学、山中伸弥教授から供与)は 5 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma 社)を含む霊長類 ES 細胞用培地「ReproStem」(ReproCell 社)を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞(MEF, Chemicon 社)上で培養した。ヒト iPS 細胞の 201B7 株は 4 因子 (OCT-3/4, SOX2, KLF-4, C-MYC)をヒト皮膚繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts, HDF) へ遺伝子導入することにより樹立された。ヒト iPS 細胞株 Dotcom および Tic は 10ng/mL の bFGF を含む iPS 細胞用培地「iPSellon」(Cardio 社)を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Dotcom および Tic は、4 因子 (OCT-3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC)をそれぞれヒト胎児肺線維芽細胞(MRC-5)へ遺伝子導入することにより樹立された。5-8 日ごとに 0.1mg/mL デイスパーゼを用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

B-3. ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞株 H9 やヒト iPS 細胞株 201B7、Dotcom、Tic から内胚葉系細胞への分化誘導は以下の方法で行った。ヒト ES

細胞やヒト iPS 細胞を分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Furue MK et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105, 13409-13414)で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase (Invitrogen 社) を用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を回収後、6 因子(10 µg/mL human recombinant insulin、5 µg/mL human apotransferrin、10 µM 2-mercaptoethanol、10 µM ethanolamine、10 µM sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin)および 100 ng/mL Activin A (R&D systems 社)を含む hESF-DIF (Cell Science & Technology Institute 社)培地に懸濁後、マトリゲル (BD 社) コートした細胞培養用 12 プレーットの各ウェルに 6.0×10^4 cells/cm² の細胞密度で播種した。6 日後にフローサイトメトリーを用いて内胚葉系細胞への分化効率を測定した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト ES・iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、培養 3 日目の内胚葉系細胞に、各 Ad ベクター(Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-SOX17) を 3,000 vector particles(VP)/cell の濃度で作用させた。培地は上記のものと同じものを使用した。

B-4 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞株 H9 やヒト iPS 細胞株 201B7、Tic、Dotcom から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3 の方法で 5 日間培養することで分化誘導されたヒト ES・iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を、0.0125% trypsin-0.01325 mM EDTA で回収し、B-3 に記載された 6 因子および 100 ng/mL Activin A を含む hESF-DIF 培地 (Cell Science & Technology Institute 社) に懸濁後、マトリゲルコートした細胞培養用 12 プレーットの各ウェルに 1.2×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種した。24 時間後

に各 Ad ベクター (Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-HEX) を 3,000 vector particles(VP)/cell の濃度で作用させた後、B-3 に記載された 6 因子および 20 ng/mL FGF4 (R&D systems 社)と 20 ng/mL BMP4 (R&D systems 社)を含んだ hESF-DIF 培地で培地交換を行った。また、3 日後にフローサイトメトリーにより肝幹前駆細胞への分化効率を測定した。

B-5. 肝細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞株 H9 やヒト iPS 細胞株 201B7、Tic、Dotcom から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-4 の方法で 3 日間培養することで分化誘導されたヒト ES・iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞に各 Ad ベクター (Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-HNF4a) を 3,000 vector particles(VP)/cell の濃度で作用させた後、conditioned CL15 medium (8.3% tryptose phosphate broth [BD 社]、8.3% fetal bovine serum [Vita 社]、10 µM hydrocortisone 21-hemisuccinate [Sigma 社]、1 µM insulin、25 mM NaHCO₃ [Wako 社]、20 ng/mL HGF [R&D Systems 社]、20 ng/mL Oncostatin M [R&D Systems 社]、10⁻⁶ M dexamethasone [Sigma 社]を添加した L15 medium [Invitrogen 社])を用いて培養した。11 日後に肝細胞への分化効率の測定および機能性の評価を行った。

B-6. LacZ 発現解析

B-5 において遺伝子導入効率を測定するため、下記の方法で X-gal 染色を行った。各細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.5%グルタルアルデヒド溶液を加えて室温で 5 分間静置した。PBS で洗浄し、X-gal 染色溶液 (1.3 mM MgCl₂、15 mM NaCl、44 mM Hepes (pH8.0)、3 mM K₃Fe(CN)₆、3 mM

$K_4Fe(CN)_6$ 、0.05% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)を加えて LacZ 発現細胞を染色した。

B-7. 定量的リアルタイム PCR

各細胞集団から ISOGEN (Nippon gene 社)を用いて Total RNA を抽出した。ヒト初代培養肝細胞(CellzDirect 社)はコラーゲンコートした細胞培養用 12 プレート の各ウェルに 1.2×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種した後、48時間培養したものを使用した。各 Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen 社)を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA)を合成した。定量的リアルタイム PCR による解析は Taqman gene expression assays (Applied Biosystems 社)を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems 社)により定量した。PCR に用いたプライマーは Supporting Table 1 に示した。

B-8. 免疫抗体染色

12 well プレートに播種した各細胞を PBS にて2回洗浄し、メタノール(Wako 社)もしくは4% paraformaldehyde (Wako 社)を用いて室温で10分処理後、2% BSA (Sigma 社)、0.2% Triton X-100 (Sigma 社)を添加した PBS で45分間ブロッキングを行った。各1次抗体を4°Cで一晩反応させ、続いて Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 594 で標識した2次抗体(Molecular Probe 社)を室温で1時間反応させた。その後、DAPI (Invitrogen)を用いて核染色を行った後2% paraformaldehyde にて固定し、蛍光顕微鏡(BIOREVO、キーエンス社)にて観察した。免疫抗体染色に用いた1次抗体は Supporting Table 2 に示した。

B-9. 薬剤代謝酵素の活性測定

B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞またはヒト初代培養肝細胞に 10 μ M omeprazole (Sigma 社)、25 μ M rifampicin (Sigma 社)、または DMSO を添加し、48時間後に P450-GloTM CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4 Assay Kit (Promega 社)を用いて CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4 の活性を測定した。活性はルミノメーター (Lumat LB 9507、Berthold 社)を用いて定量した。

B-10. フローサイトメトリー

B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞に 1mM EDTA/PBS を加え、37°Cで15分反応させて細胞を回収し、PBS にて2回洗浄した後、メタノール(Wako 社)を用いて4°Cで20分処理した。得られた細胞に各1次抗体を4°Cで1時間反応させ、続いて Alexa Fluor 488 で標識した2次抗体(Molecular Probe 社)を4°Cで1時間反応させた。抗原陽性細胞の割合は LSRFortessa (BD 社)フローサイトメーターを用いて解析した。フローサイトメトリーに用いた1次抗体は Supporting Table 2 に示した。

B-11. 細胞周期の解析

B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞に 1mM EDTA/PBS を加え、37°Cで15分反応させて細胞を回収し、5% FBS/PBS にて2回洗浄した。得られた細胞を 10 μ g/ml Hoechst33342 (Sigma 社)、40 μ g/ml Verapamil (Sigma)、10 mM HEPES、2% FBS/DMEM (Invitrogen)に懸濁し、37°Cで40分反応させた。さらに、5% FBS/PBS にて2回洗浄した後、細胞を 0.5 μ g/ml Pyronin Y (Sigma 社)、10 mM HEPES、2% FBS/DMEM に懸濁し、37°Cで20分反応させた。分裂中の細胞の割合は

LSRFortessa (BD 社)フローサイトメーターを用いて解析した。

B-12. Indocyanine Green (ICG)の取り込み能と排泄能の評価

B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞を 1 mg/ml ICG/conditioned L15 medium を用いて 37°C で 1 時間培養した後、ICG を取り込んだ細胞を観察した。ICG を含まない conditioned L15 medium に培地交換したのち、37°C で 6 時間培養することにより、ICG を取り込んだ細胞から ICG を排泄させた。

B-13. グリコーゲン貯蔵能の評価

B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞を PBS にて 2 回洗浄し、4% paraformaldehyde (Wako 社)を用いて室温で 10 分処理した後、Peridic Acid-Schiff 染色キット(Sigma 社)を用いて、グリコーゲンを貯蔵している細胞を染色した。

B-14. Low density lipoprotein (LDL)の取り込み能の評価

B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞を 20µg/ml/conditioned L15 medium を用いて 37°C で 1 時間培養した後、2% paraformaldehyde にて固定した。DAPI (Invitrogen)を用いて核染色を行った後、蛍光顕微鏡(BIOREVO、キーエンス社)にて観察した。

B-15. 薬物毒性評価

ヒト ES 細胞、B-5 の方法により分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞、およびヒト初代培養肝細胞を Troglitazone (Wako 社)、Acetaminophen (Wako 社)、

Cyclophosphamide (Wako 社)、Carbamazepine (Wako 社)をそれぞれ含む培地を用いて 37°C で 48 時間培養した。0.5 mg/ml Aramar Blue (Invitrogen)を用いて 37°C で 3 時間培養した後、プレートリーダー (Sunrise 社)を使用して 570 nm および 600 nm の吸光度を測定することによって細胞生存率を評価した。

B-9. 薬剤代謝酵素 P450 3A4 の活性測定

B-6 の方法により分化誘導されたヒト iPS 細胞由来の肝細胞またはヒト肝癌細胞株 HepG2 に 25µM rifampicin (Sigma 社)または DMSO を添加し、72 時間後に P450-Glo™ CYP3A4 Assay Kit (Promega 社)を用いて CYP3A4 の活性を測定した。活性はルミノメーター (Lumat LB 9507、Berthold 社)を用いて定量した。

C. 研究結果

ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞の分化において重要な役割を果たしている遺伝子を調べるために、Gene Expression Omnibus (GEO)に公開されている Si-Tayeb らのマイクロアレイのデータを解析した (GEO accession: GSE14897)。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞への分化において有意に上昇している遺伝子を Significant Analysis of Microarray (SAM) 法を用いて 302 遺伝子抽出した (Fig. 1a)。転写因子や細胞増殖・代謝に関連した遺伝子が成熟肝細胞を作製するために重要であると仮定し、これら 302 遺伝子のうち、転写因子でかつ、細胞増殖・代謝に関連した遺伝子を抽出した (Fig. 1b)。その結果、hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) 遺伝子が唯一の候補遺伝子として得られた。また、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程において内在性の HNF4 α 遺伝子が発現上昇していることを確認した (Fig. 1c)。

ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞からの肝分化に HNF4 α 遺伝子が重要であると予想されたため、HNF4 α 遺伝子を導入することによって肝分化を促進できるのではないかと考えた。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から誘導された細胞に HNF4 α 遺伝子を効率良く遺伝子導入するために、本研究では HNF4 α 遺伝子を搭載したアデノウイルス (Ad-HNF4 α) ベクターを用いた。まず、HNF4 α 遺伝子を導入する時期を検討した。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程において、培養 6 日目に内胚葉系細胞 (Figs. 2、Fig. 3a)、培養 9 日目に肝幹前駆細胞 (Figs. 2、Fig. 3b)、培養 12 日目に肝細胞と胆管上皮細胞 (Fig. 2、Figs. 3c) の混合集団が得られることを FACS によって確認した。

HNF4 α 遺伝子を培養 6、9、12 日目の細胞に遺伝子導入し、培養 20 日目において RT-PCR 法を用いて評価した。培養 9 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入するにより、最も選択的かつ効率良く肝細胞を分化誘導できることが示唆された (Fig. 4a)。また、培養 9 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって、胆管上皮細胞への分化は抑制され、膵分化には影響を及ぼさないことが示唆された (Figs. 4b、4c)。これに対し、培養 6 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって、肝分化が促進されるだけではなく、膵分化も促進されることが示唆された。また、培養 12 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって、肝分化が促進されるだけではなく、胆管分化も促進されることが示唆された。以上の結果より培養 9 日目の肝幹前駆細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって高効率に肝細胞を誘導できることが示唆された。Ad ベクター由来の外来遺伝子の発現の持続期間を調べるために、培養 9 日目の肝幹前駆細胞に Ad-LacZ 遺伝子を導入し、同時に X-gal 染色を実施した。Ad ベクター由来の LacZ 遺伝子の発現は培養 14 日目まではほぼすべての細胞で持続し、培養 18 日目にはほぼ消失した (Fig. 5)。以上の結果から培養 20 日目における肝細胞関連遺伝子の発現などは Ad 由来の HNF4 α 遺伝子の直接的な制御によるものではなく、内在性の遺伝子の制御によるものであることが確かめられる。

ヒト ES 細胞を Fig. 6a に記載されたプロトコールにしたがって培養した結果、ヒト ES 細胞は肝細胞様の形態 (明瞭な輪郭など) を有した細胞へと変化した (Fig. 6b)。得られた肝細胞の一部は 2 核であり、それらは ALB、CK18、CYP2D6、CYP3A4 陽性であることが確認された (Fig. 7)。HNF4 α 遺伝子を培養 9 日目の肝幹前駆細

胞に導入することによって誘導された肝細胞の遺伝子発現および表面抗原などの発現を培養 20 日目にさらに詳しく調べた。CYP1A2、CYP2C9、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP7A1 の遺伝子発現はいずれも Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-HNF4 α 導入細胞（3 遺伝子導入細胞）の方が Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-LacZ 導入細胞（2 遺伝子導入細胞）よりも高いことが確認された (Fig. 8a)。また、CYP が正常に機能するために必要だと考えられる CYP レダクターゼ (POR) 遺伝子の発現も 3 遺伝子導入細胞の方が高かった (Fig. 8b)。第 2 相抱合酵素 (Fig. 9a) およびトランスポータ関連遺伝子 (Fig. 9b) の発現に関しても 3 遺伝子導入細胞の方がその遺伝子発現が高いことが確認された。本研究で調べた 3 遺伝子導入細胞の遺伝子発現は初代培養肝細胞と同程度もしくはそれ以上のものもあったが、初代培養細胞よりも劣るものもあった。次に、これらの結果がヒト ES 細胞だけでなく、ヒト iPS 細胞においても同様の結果が得られるか調べた。3 株のヒト iPS 細胞を肝分化させたのち、培養 20 日目に real-time RT-PCR 法を用いて解析した (Fig. 10)。その結果、これら 3 株のヒト iPS 細胞の間に肝分化能の違いを観察した。2 株のヒト iPS 細胞 (Dotcom および Tic) は他のヒト iPS 細胞 (201B7) よりも肝分化能が高いことが確認された。

分化誘導した肝細胞を再生医療に応用するためには細胞集団が均質である必要があるので、本研究において得られた肝細胞がどの程度均質であるかフローサイトメトリーで確かめた。アジアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1) 陽性細胞、c-Met 陽性細胞 (Fig. 8c)、ALB 陽性細胞 (Fig. 8d) の割合を調べたところ、3 遺伝子導入細胞では約 80% であったのに対し、2 遺伝子導入細胞では約 50% であった。以上の結果から、3 遺

伝子 (SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子) を順次導入することによって、ほぼ均質な肝細胞が得られることが確認された。

次に本研究においてヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から誘導した肝細胞が十分な肝機能を有しているか評価した。培養 20 日目に培地に含有されている LDL を取り込む細胞の割合を調べたところ、3 遺伝子導入細胞では約 87% であったのに対して、2 遺伝子導入細胞では約 44% であった (Fig. 11)。次に誘導された肝細胞における CYP 誘導能を評価した。細胞内の CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 の活性を調べたところ、3 遺伝子導入細胞では 2 遺伝子導入細胞よりも CYP 活性が高いことが確認された (Fig. 12a)。CYP 誘導能を評価するために、CYP3A4 および CYP2C9 を誘導できるリファンピシン、CYP1A2 を誘導できるオメプラゾールを細胞に作用させた。ヒト ES 細胞ではこれらの化合物に対して CYP 誘導は確認されなかったが、ヒト ES 細胞由来肝細胞およびヒト初代培養肝細胞では CYP 誘導能が確認された。ヒト ES 由来の肝細胞では CYP 種によって、その活性は大きく異なっていたが、CYP3A4 に関してはヒト初代培養肝細胞と同程度であった。以上の結果から、高いレベルの CYP 活性を有した細胞をヒト ES 細胞から分化誘導できたことが示された。

肝細胞の化合物を取り込み、抱合し、排泄する能力も非常に重要であることが知られているので、本研究においてはインドシアングリーン (ICG) の取り込み能を評価した (Fig. 12b)。培養 20 日目に ICG を含有した培地で 6 時間培養することによって、3 遺伝子導入細胞の方が 2 遺伝子導入細胞よりも多くの ICG の取り込みが観察された。肝細胞は細胞質にグリコーゲンを多く貯蔵していることが知られているので、ヒト ES 細胞由来の肝細胞が細胞質にグリ

コーゲン貯蔵しているか PAS 染色によって評価したところ、3 遺伝子導入細胞の方が 2 遺伝子導入細胞よりも多くのグリコーゲンを貯蔵していることが確認された (Fig. 12c)。以上の結果より、3 遺伝子を導入することによって多くの肝機能が向上したことが明らかとなった。

多くの薬物は CYP によって代謝産物が活性を獲得し、細胞毒性を生じることが知られている。より安全な創薬のために、この細胞毒性を事前に予想することが必要である。ヒト初代培養肝細胞は同一ロットを大量に入手することが困難であり、ロット差のばらつきが大きいために、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞由来の肝細胞がこの代用品となることが期待されている。本研究において誘導した肝細胞が薬剤による細胞毒性を予測することに利用できるか調べるために、肝臓において CYP による代謝を受けて毒性を示すことが知られている種々の化合物 (トログリタゾン、アセトアミノフェン、シクロフォスファミド、カルバマゼピン) を細胞に作用させたのち、細胞生存率を評価した (Fig. 12d)。いずれの化合物においての 3 遺伝子導入細胞の細胞生存率は 2 遺伝子導入細胞およびヒト ES 細胞よりも低かった。この結果より、3 遺伝子導入細胞は 2 遺伝子導入細胞やヒト ES 細胞より、CYP による薬物代謝能が高く、毒性評価に利用可能であることが示唆された。しかしながら、3 遺伝子導入細胞の細胞生存率はヒト初代培養肝細胞よりも高かったため、今後はよりヒト初代培養肝細胞に近い細胞を作製する技術の開発が必要とされる。

これまでの実験結果により、HNF4 α 遺伝子は肝分化を促進することが明らかとなったが、そのメカニズムは明らかになっていない。過去に HNF4 α 遺伝子は繊維芽細胞 (NIH3T3 細胞など) において間葉上皮移

行 (MET) を促進することが知られているので、本研究におけるヒト ES 細胞から肝細胞への分化においても MET が促進されているか調べた。培養 9 日目の細胞に Ad-LacZ もしくは Ad-HNF4 α を細胞に感染させ、培養 12 日目にどのような細胞集団が誘導されているかフローサイトメトリーを用いて評価した (Fig. 13a)。HNF4 α 遺伝子を導入することによって、ALB 陽性の肝細胞の割合は増加し、N-cadherin 陽性の肝幹前駆細胞の割合は減少した。CK 7 陽性の胆管上皮細胞の割合は変化しなかった。この結果が HNF4 α 遺伝子によって促進された MET によるものかどうか調べるために、上皮細胞マーカーおよび間葉系細胞マーカーの発現を免疫抗体染色によって評価した。HNF4 α 遺伝子を導入することによって、N-cadherin 陽性である間葉系細胞は減少し、E-cadherin 陽性の上皮細胞が増加したことが確認された (Fig. 13b)。以上の結果より、HNF4 α 遺伝子によって、肝幹前駆細胞からの MET が促進されることが示唆された。また、興味深いことに HNF4 α 遺伝子を導入することによって分裂中の細胞の割合が減少した (Fig. 13c)。肝細胞はほぼ分裂しない細胞であることが知られているので、この結果は HNF4 α 遺伝子によって肝成熟化が進行したためだと考えられる。また、各種肝細胞マーカー (AFP、PROX1) および上皮細胞マーカー (Cecam、E-cadherin) の発現が上昇し、間葉系細胞マーカー (N-cadherin、Snail) および細胞周期阻害因子 (p15、p21) の発現が減少した (Fig. 14a)。以上の結果から HNF4 α 遺伝子は肝分化において MET を促進することが明らかとなった (Fig. 14b)。

D. 考察

創薬に応用可能なヒト ES 細胞やヒト iPS

細胞から成熟肝細胞を作製する技術を開発し、HNF4 α 遺伝子が肝分化を促進するメカニズムを明らかにした。しかしながら、ある種のチトクローム P450 (CYP) 酵素活性は初代培養肝細胞と比較して同等であるのに対して、初代培養肝細胞と比較し今なお低い CYP 群も存在するため、今後はそれらの CYP に関してもより高い活性を有した肝細胞を作製することが必要となる。肝細胞関連遺伝子の発現は初代培養肝細胞とほぼ同等の細胞が得られたので、今後は CYP 活性が高い細胞を作製するために技術を開発する予定である。また、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導に関して、培養条件(3次元培養等)の検討や更なる機能遺伝子の導入を組み合わせることで、初代培養肝細胞とほぼ同等の機能を有した細胞の分化誘導法を確立できるものと期待される。

E. 結論

ヒト ES 細胞や種々のヒト iPS 細胞に対して Ad ベクターを用いた高効率遺伝子導入法を用いて、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞に対して、SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子をそれぞれ導入することによって肝分化を促進できることが明らかとなった。また、これらの結果は、薬物毒性スクリーニングに応用可能な細胞が作製できる技術の基盤となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by

transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19, 400-407 (2011)

(2) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Rerogram.*, 12, 501-507 (2010)

(3) 川端健二、田代克久、水口裕之、iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、*薬学雑誌*、130、1527-1534 (2010)

2. 学会発表

(1) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日

(2) 川端健二、水口裕之、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日

(3) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日

(4) 水口裕之、遺伝子導入技術を駆使した幹

細胞の分化制御 –ヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導技術の開発の開発を中心に–、第7回ナノバイオ国際シンポジウム、東京、2011年2月16日

(5)水口裕之、遺伝子導入技術を駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導と毒性評価系への応用、第2回大阪大学 iPS 細胞臨床研究シンポジウム、大阪、2011年1月27日

(6)水口裕之、ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築 –遺伝子導入技術を駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導–、第60回日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪、2010年10月30日

(7)稲村充、川端健二、高山和雄、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導、第16回肝細胞研究会、秋田、2010年6月18-19日

(8)高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第16回肝細胞研究会、秋田、2010年6月18-19日

(9)水口裕之、川端健二、ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築に向けた基盤整備の現状と肝細胞への分化誘導、第26回 DDS 学会、大阪、2010年6月17-18日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1)水口裕之、川端健二、古江美保、稲村充（発明人）；幹細胞から肝細胞への分化誘導方法；特願 2010-154225（基礎出願：特願 2009-247342（2009/10/28）、特願 2010-121282（2010/05/27）

(2)水口裕之、川端健二、古江美保、稲村充（発明人）；幹細胞から肝細胞への分化誘導方法；GP10-1027/PCT

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

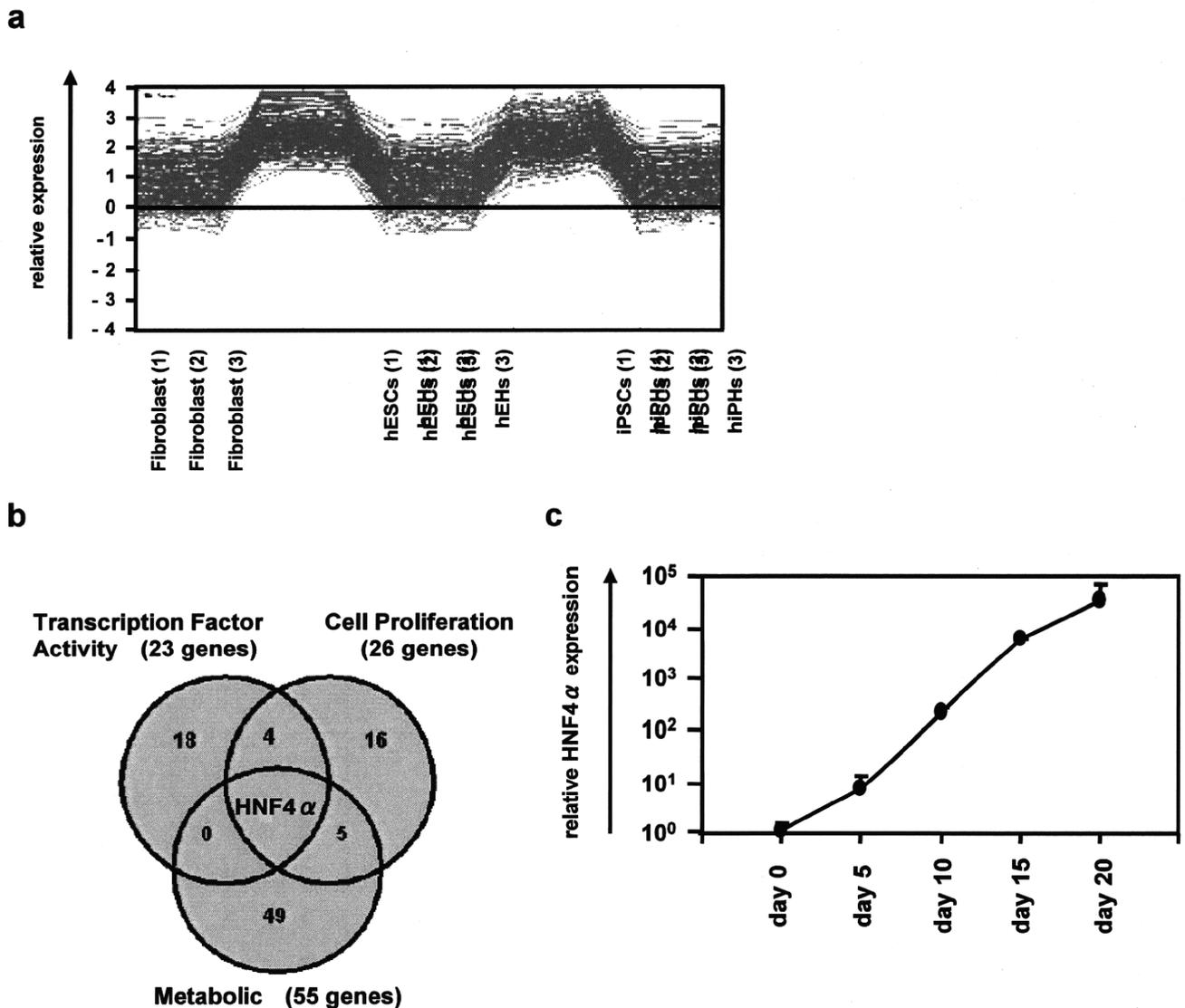


Fig. 1 Genome-wide screening of transcription factors involved in hepatic differentiation emphasizes the importance of the transcription factor *HNF4 α* .

Si-Tayeb et al. had provided a data set of gene array analysis, which compared undifferentiated human ESCs or iPSCs and human ESC- or iPSC-derived hepatocytes, in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) repository (GEO accession: GSE14897). (a) According to the method of Significant Analysis of Microarray (SAM) method, 302 genes that were differentially upregulated in hepatic differentiation from human ESCs and iPSCs were picked up. (b) As we hypothesized that the hepatic transcriptional network, metabolic function, and regulating proliferation of cells are important for efficient generation of functional hepatocytes, the transcriptional factors and the genes related to cell proliferation and metabolism were extracted from these 302 genes according to the description in the Gene Ontology (GO). This selection emphasized that transcriptional factor *HNF4 α* is an important functional gene that fulfilled all these conditions. (c) Human ESCs (H9) were differentiated into hepatocytes according to the protocol described in Fig. 6a (without *HNF4 α* transduction). On day 0, 5, 10, 15, and 20 of differentiation, the gene expression level of *HNF4 α* was examined by real-time RT-PCR. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

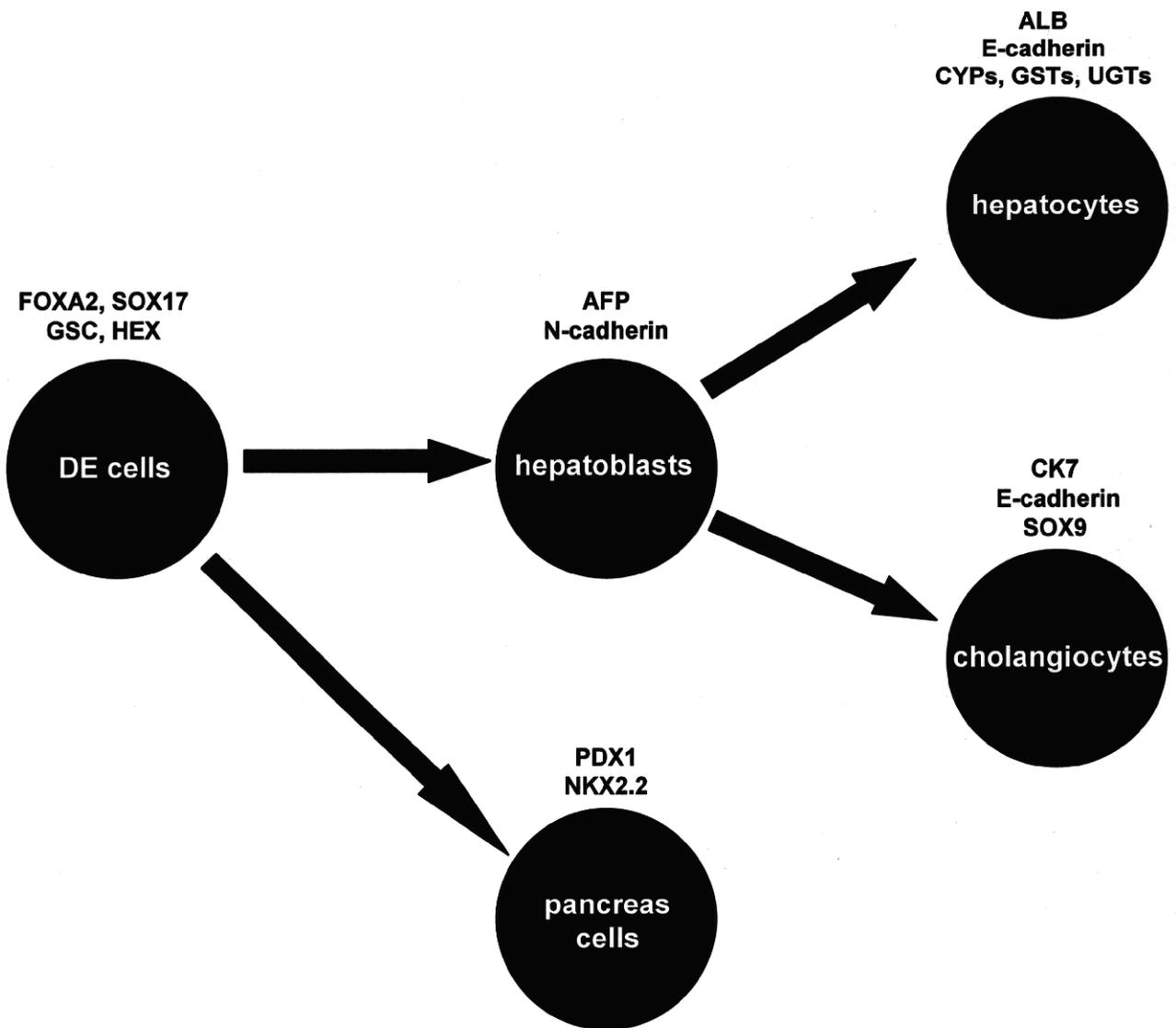


Fig. 2 Summary of specific markers for DE cells, hepatoblasts, hepatocytes, cholangiocytes, and pancreas cells.