

201110031A

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 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した  
新規毒性評価系の開発

平成23年度 研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成24（2012）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 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した  
新規毒性評価系の開発

平成23年度 研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成24（2012）年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を利用した新規毒性評価系の開発	-----	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

ヒトiPS細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発	-----	5
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)		

ヒトiPS細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発	-----	22
川端 健二 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)		

肝細胞への分化誘導に適したヒトiPS細胞のスクリーニング	-----	38
梅澤 明弘 (独立行政法人国立成育医療センター 生殖・細胞医療研究部)		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
---------------------	-------	----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した新規毒性評価系の開発

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

ヒト iPS 細胞は再生医療だけではなく、創薬への応用も強く期待されている。なかでも、iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、薬物の毒性評価や動態評価への応用が期待でき、産業界からの需要が最も高いものの一つである。医薬品の開発プロセスの早期に肝毒性を精度高く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらし、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。しかしながら、肝細胞は効率の良い分化誘導が困難であり、創薬応用の障害となっている。

本年度は、肝分化に重要な遺伝子を導入することによるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発、分化誘導された肝細胞における薬物応答能の解析、および 500 種類のヒト iPS 細胞を用いた肝細胞への分化誘導に適した iPS 細胞株の選別、を行った。その結果、

- ① 肝分化に重要な転写因子である FOXA2 と HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入して作製された分化誘導肝細胞は、ヒト初代培養肝細胞と同程度の肝関連遺伝子の発現が確認された。
- ② 分化誘導肝細胞について、シトクロム P450 酵素などで代謝される薬物の代謝プロファイルを調べたところ、その薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞より低いものの、いずれの薬物に対しても代謝能を有していることが確認された。さらに、分化誘導肝細胞は肝毒性を示す薬剤に対してヒト初代培養肝細胞と同様に細胞毒性を呈した。
- ③ ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、肝細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。さらにゲノムレベル、エピゲノムでの安定性に関する解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。

分担研究者

川端健二 (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

A. 研究目的

新薬開発では、開発費に1000億円超、期間に10～15年を要する。また、約2万件の候補化合物の中から、薬効・毒性などの評価を経て医薬品として承認を受けるのは1件程度である。この過程でしばしば問題となるのが薬物誘発性肝障害（肝毒性）であるが、医薬品の開発プロセスの早期に肝毒性を確度良く予測することは、創

薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらし、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。ヒト初代培養肝細胞の利用により肝毒性評価の向上が見込まれるものの、我が国においては入手が困難であり、安定供給、継続性の観点からその利用には限界がある為、より安定かつ容易に使用できる肝毒性評価系の確立が望まれている。そこで本研究では、①肝細胞に分化しやすい iPS 細胞株のスクリーニング法の開発、②ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発、および③ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した肝毒性評価系の確立を行う。

## B. 研究方法

本研究は、主任研究者水口、分担研究者2名（川端、梅澤）の計3名が遂行した。当該年度においては、主に、肝分化に重要な遺伝子を導入することによるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発、分化誘導された肝細胞における薬物応答能の解析、および500種類のヒト iPS 細胞を用いた肝細胞への分化誘導に適した iPS 細胞株の選別、に分けて遂行された。

## C. 研究結果

### 1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発

ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞における第一相反応酵素（CYP 遺伝子）、第二相反応酵素（UGT、GST 遺伝子）、第三相反応酵素（肝関連トランスポーター）の発現を調べたところ、多くの遺伝子はヒト初代培養肝細胞と同程度であった。しかしながら、9種類の薬剤の代謝プロファイ

ルを調べたところ、分化誘導肝細胞の薬物代謝能は確認されたものの、ヒト初代培養肝細胞よりも劣るものであった。今後、分化誘導肝細胞の三次元培養、共培養、新たな肝成熟化転写因子の探索、肝成熟化に関与する新規 miRNA の探索などを行うことによりさらなる肝成熟化の促進が期待される。

### 2. ヒト iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって促進できることを明らかにした。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を作製するための基盤技術となることが期待される。

### 3. 肝細胞への分化誘導に適したヒト iPS 細胞のスクリーニング

ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、肝細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。さらにゲノムレベル、エピゲノムでの安定性に関する解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。今後はフィーダフリー、血清フリー培養条件下での細胞についてこの評価系を応用して、創薬開発に資する安定した肝細胞スクリーニング技術の開発を行っていく。

## D. 考察

我々はこれまでに SOX17、HEX、HNF4 $\alpha$  遺伝子を導入することによるヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への効率良い分化誘導方法を開発したが、分化誘導肝細胞を毒性スクリーニングに応用するためには、さらなる成熟化が必要であった。そこで、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化の各過程において、7種類の遺伝子（FOXA2、HEX、

HNF1α、HNF1B、HNF4α、HNF6、SOX17 遺伝子) をそれぞれ導入し、分化を促進できる遺伝子のスクリーニングを実施することによって、最も効率良く肝成熟化を行うことが可能である遺伝子の組み合わせを探索した。中内胚葉から内胚葉への分化過程においては FOXA2 遺伝子、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程においては FOXA2 と HNF1α 遺伝子、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においては FOXA2 と HNF1α 遺伝子 (あるいは FOXA2 と HNF4α 遺伝子) を組み合わせて導入することによって、効率良く肝細胞を誘導できることを明らかにした。肝細胞への分化過程に HNF1α もしくは HNF4α 遺伝子を導入した場合、肝幹前駆細胞マーカーの発現上昇は確認されなかったが、FOXA2 遺伝子を導入した場合は肝幹前駆細胞マーカーの発現上昇が確認された。成熟化を促進するためには、肝成熟化マーカーのみ選択的に発現上昇させることができる HNF4α、HNF1α 遺伝子を組み合わせたことが好ましいと予想されたが、FOXA2、HNF1α 遺伝子あるいは FOXA2、HNF4α 遺伝子を組み合わせて導入することによって最も肝成熟化が促進された。これは、肝成熟化には肝幹前駆細胞と肝細胞が共存することが必要であることを示唆している。また、FOXA2 遺伝子は *in vivo* の発生においても、中内胚葉から発現が確認され、FOXA2 および HNF1α 遺伝子は肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においていずれも発現が上昇することが知られている。これらの知見から、*in vivo* の胚発生を模倣した遺伝子発現の制御が重要であることが示唆される。

我々は過去の報告において、培養 9 日目

に導入した Ad 由来遺伝子は 14 日目まで発現が確認され、培養 18 日目には完全に消失することを確認している。本プロトコールにしたがって、分化誘導肝細胞を作製した場合においても、培養 20 日目には Ad 由来の遺伝子の発現はほぼ消失していると考えられる。そのため、各種遺伝子の発現は Ad 由来の遺伝子の発現の直接の制御を受けていないことが示唆される。

過去の我々の知見では、分化誘導肝細胞における肝関連遺伝子の発現の評価したところ、ヒト初代培養肝細胞は同程度であったが、分化誘導肝細胞の薬剤代謝能はヒト初代培養肝細胞よりも劣ることが確認された。遺伝子発現と薬剤代謝能の差がみとめられた原因のひとつとして、分化誘導肝細胞の肝関連核内受容体の遺伝子発現がヒト初代培養肝細胞と比較して低い可能性が考えられる。肝関連核内受容体は CYP3A4 遺伝子などの主要な CYP 遺伝子が正しく機能するために必須の遺伝子であることが知られているため、肝関連核内受容体を分化誘導肝細胞に導入することによってさらなる肝成熟化が期待される。

分化誘導肝細胞を薬剤スクリーニングに応用可能か検討するために、本研究ではベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じるか調べた。分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様にベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じることが確認された。今後は、これらの肝毒性を示す薬剤を作用させたときに細胞毒性が CYP 酵素を介したものであるかどうか詳細に検討する必要がある。また、他の肝毒性を有する薬剤に対する応用についても網羅的に検討する必要があると考えられる。

ヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化が、FOXA2 および HNF1α 遺伝子を導入することによって促

進できることを明らかにした。本研究において作製した分化誘導肝細胞は薬剤代謝能を有することが示された。今後は、肝毒性を有する化合物に対する応答能を網羅的に調べるとともに、肝毒性マーカーをヒト初代培養肝細胞と比較することによって、どの程度正確な毒性評価が可能であるか調べる必要がある。

ヒト iPS 細胞の肝分化マーカーによるスクリーニング系について検証し、その培養技術について検討した。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した。この評価系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、創薬開発に必要な良質な iPS 細胞由来肝細胞とは何かということの規定することが可能となる。また肝分化指向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肝分化指向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。

## E. 結論

FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって作製した分化誘導肝細胞における

第一相反応酵素 (CYP 遺伝子)、第二相反応酵素 (UGT、GST 遺伝子)、第三相反応酵素 (肝関連トランスポーター) の発現を調べたところ、多くの遺伝子はヒト初代培養肝細胞と同程度であった。しかしながら、薬剤の代謝プロファイルを調べたところ、分化誘導肝細胞の薬物代謝能は確認されたものの、ヒト初代培養肝細胞よりも劣るものであった。今後、分化誘導肝細胞の三次元培養、共培養、新たな肝成熟化転写因子の探索、肝成熟化に関与する新規 miRNA の探索などを行うことによりさらなる肝成熟化の促進が期待される。

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発

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

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞の機能解析と薬物の毒性評価系への応用のための基盤技術の開発を行った。分化誘導肝細胞の肝機能を評価するために、グリコーゲンの貯蔵、インドシアニングリーンの取り込み能、低濃度リポタンパク質の取り込み能などが調べられることが一般的である。しかしながら、分化誘導肝細胞を薬物の毒性評価系へ応用できるかどうか判断するためにはこれらの評価法のみでは不十分であり、薬物の代謝プロファイルを LC-MS/MS を用いて評価し、ヒト初代培養肝細胞とどの程度類似するものが作製できているか正確に調べる必要がある。我々はこれまでに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化における適切な時期に FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって成熟肝細胞への分化を促進する技術を開発したので、本研究では、分化誘導肝細胞の薬剤代謝能をヒト初代培養肝細胞と比較した。また、分化誘導肝細胞の薬剤の毒性評価系へ応用できる可能性について検討するため、肝臓で毒性を示すベンゾブロマロンなどの薬剤を分化誘導肝細胞に作用させた後の細胞毒性についても検討した。シトクロム P450 酵素などで代謝される 9 種類の薬物 (Phenacetin、Bupropion、Paclitazell、Tolbutamide、S-mephenytoin、Bufuralol、Midazolam、Testosterone、Hydroxyl coumarin) の代謝プロファイルを調べたところ、分化誘導肝細胞の薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞より低いものの、いずれの薬物に対しても代謝能を有していることが確認された。さらに、分化誘導肝細胞は肝毒性を示す薬剤に対してヒト初代培養肝細胞と同様に細胞毒性を呈した。以上のことから、FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することにより、ヒト ES/iPS 細胞から薬物代謝能を有する肝細胞を効率良く分化誘導できるだけでなく、薬物の毒性スクリーニングに使用可能な分化誘導肝細胞を作製可能であることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞 (ヒト ES 細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) は無限に増殖し、かつ臓器を構成するあらゆる細胞に分化することが可能な多能性幹細胞である。したがって、これらの幹細胞から機能を有した細胞を分化誘導することにより、

研究協力者

川端健二 (独)医薬基盤研究所  
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  
大阪大学大学院薬学研究科



創薬への応用が期待できる。中でも肝臓は、種々の疾患や薬物代謝等に関与する主要な臓器であるため、ヒト ES/iPS 細胞を分化誘導する細胞の中では最も有望な標的細胞の一つであるといえる。肝臓は 95% 以上の薬物が代謝される臓器であることから、分化誘導した肝細胞を薬物の *in vitro* 毒性スクリーニング系に応用することが期待される。ヒト初代培養肝細胞を用いた薬物毒性スクリーニング系は、動物実験による毒性評価系と比較して、時間短縮、費用削減、種差の壁の克服等を見込めるが、同一ロットの肝細胞は数に限りがあることから、安定的な *in vitro* 毒性スクリーニングを行うことは困難である。したがって、無限に増殖可能なヒト ES/iPS 細胞から肝細胞を安定的かつ大量に供給することができれば、実用性の高い *in vitro* 毒性スクリーニング系の構築が可能となる。さらに、個人の体細胞から樹立されるヒト iPS 細胞由来の肝細胞を用いることにより、個人間の性差・病態差などを反映した、質の高い *in vitro* 毒性スクリーニング系の構築が期待できる。しかしながら、従来の分化誘導法では、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化効率は不十分である。そこで、我々は FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって、効率良く肝細胞への分化誘導する技術を開発した。分化誘導肝細胞が薬剤の毒性評価系に応用可能かどうか正確に評価するため、本研究では FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって、分化誘導肝細胞における薬剤代謝能をヒト初代培養肝細胞と比較した。

## 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  $\beta$ -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 forkhead box protein A2 (FOXA2)、hematopoietically expressed homeobox transcription factor (HEX)、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 $\alpha$ )、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B (HNF1 $\beta$ )、hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 $\alpha$ )、hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6)、SRY-box containing gene 17 (SOX17)、を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-FOXA2、pHMEF5-HEX、pHMEF5-HNF1 $\alpha$ 、pHMEF5-HNF1 $\beta$ 、pHMEF5-HNF4 $\alpha$ 、pHMEF5-HNF6、pHMEF5-SOX17 を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-CeuI と PI-SceI 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、pAdHM41K7-EF-LacZ、pAdHM41K7-EF-FOXA2、pAdHM41K7-K7-EF-HEX、pAdHM41K7-EF-HNF1 $\alpha$ 、pAdHM41K7-EF-HNF1 $\beta$ 、pAdHM41K7-EF-HNF4 $\alpha$ 、pAdHM41K7-EF-HNF6、pAdHM41K7-EF-SOX17 を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを PacI 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、AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-FOXA2、

AdK7-EF-HEX、AdK7-EF-HNF1 $\alpha$ 、AdK7-EF-HNF1 $\beta$ 、AdK7-EF-HNF4 $\alpha$ 、AdK7-EF-HNF6、AdK7-EF-SOX17 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 iPS 細胞株 Dotcom は 10 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、Sigma 社) を含む iPS 細胞用培地「iPSellon」(Cardio 社) を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞 (MEF、Chemicon 社) 上で培養した。5-7 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼ (Roche 社) を用いてヒト ES/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/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 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 (Millipore 社) を用いてヒト ES/iPS 細胞を回収後、100 ng/ml Activin A (R&D systems 社) および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地 (6 因子 [10  $\mu$ g/mL human recombinant insulin、5  $\mu$ g/mL human apotransferrin、10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、10  $\mu$ M ethanolamine、10  $\mu$ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin (すべて Sigma 社より購入)] を

含む hESF-DIF 培地 [Cell Science & Technology Institute 社] に懸濁後、Matrigel (BD Biosciences 社) でコーティングした細胞培養用 12 プレート (住友ベークライト社) の各ウェルに  $6.25 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種したのち、5 日間培養した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導を行う場合は、ヒト ES/iPS 細胞を上記の方法で中内胚葉 (培養 2 日目) まで培養し、各 Ad ベクター (AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-FOXA2) を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で作用させた。培地は 100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いた。72 時間後 (培養 5 日目) に FACS (BD LSRFortessa; BD Biosciences 社) により内胚葉分化効率を測定した。

## B-4 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞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. に記載された方法に準じて、5 日間培養することにより分化誘導した内胚葉を、0.05% trypsin-0.053 mM EDTA で回収し、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、Matrigel でコーティングした細胞培養用 12 プレートの各ウェルに  $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。1 日後に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1 $\alpha$ ) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させたのち、20 ng/ml FGF4 (R&D systems 社)、30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D systems 社) を含む HCM (Lonza 社) に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、9 日目まで培養した。

## B-5. 肝細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3. および B-4. に記載された方法に準じて 9 日間培養して分化誘導した肝幹前駆細胞に各 Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1a) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させた後、10 ng/ml FGF1 (R&D systems 社)、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10 (R&D systems 社)、10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (R&D systems 社) を含む HCM に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin-0.053 mM EDTA で回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF (すべて 10 ng/ml の濃度で使用) を含む HCM に懸濁後、Matrigel でコーティングした細胞培養用 12 プレーットの各ウェルに  $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。1 日後に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1a) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems 社)、 $10^{-6}$  M Dexamethazone (DEX) を含む Differentiation CL15 medium (8.3% tryptose phosphate broth [BD Biosciences 社]、10% FBS [Vita 社]、10  $\mu$ M hydrocortisone 21-hemisuccinate [Sigma 社]、1  $\mu$ M insulin、25 mM NaHCO<sub>3</sub> [Wako 社] を添加した L15 medium [Invitrogen 社]) を用いて培養した。8 日後に肝細胞への分化効率の測定および肝機能の評価を行った。

## B-6. 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 社もしくは Xenotech 社) は type I collagen (新田ゼラチン社) をコートした細胞培養用 12 プレーットの各ウェルに  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種したのち、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。

## B-7. 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肝細胞に 1 mM EDTA/PBS を加え、37°C で 15 分反応させて細胞を回収した。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 30 分間反応させた。抗原陽性細胞の割合は BD LSRFortessa (BD Biosciences 社) フローサイトメーターを用いて解析した。

## B-8. 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/iPS 細胞由来肝細胞を 1 mg/ml ICG を含む conditioned L15 培地を用いて 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-9. 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/iPS 細胞由来肝細胞を 20 µg/ml を含む conditioned L15 培地を用いて 37°Cで 1 時間培養した後、2% paraformaldehyde にて固定した。DAPI (Invitrogen 社)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-10. 薬物に対する細胞毒性の評価

ヒト ES/iPS 細胞、B-5.の方法により分化誘導されたヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞、およびヒト初代培養肝細胞を Benzbromarone (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-11. 分化誘導肝細胞の薬物代謝能の評価

ヒト iPS 細胞、分化誘導肝細胞、ヒト初代培養肝細胞は Phenacetin (PHE)、Bupropion (BP)、Paclitaxel (PCT)、Tolbutamide (TB)、*S*-mephenytoin (MP)、Bufuralol (BF)、Midazolam (MDZ)、Testosterone (TS)、Hydroxyl coumarin (OHC) を以下の濃度で作用させられた。10 µM PHE、150 µM BP、20 µM PCT、500 µM TB、200 µM MP、50 µM BF、10 µM MDZ、100 µM TS、10 µM OHC。各基質は(PHE、BP、PCT、TB、MP、BF、

MDZ、TS、OHC)代謝されることにより、下記の代謝物になることが知られている (Acetaminophen [AAP]、Hydroxybupropion [OHBP]、6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel [OHPCT]、Hydroxytolbutamide [OHTB]、4'-hydroxymephenytoin [OHMP]、1'-hydroxybufuralol [OHBF]、1'-hydroxymidazolam [OHMDZ]、6 $\beta$ -hydroxytestosterone [OHTS]、7-Hydroxycoumarin glucuronide [G-OHC])。各基質を作用させた後、上清を 1、2、4、24 時間後に回収し、LC-MS/MS (Shimadzu Corporation)を用いて、代謝物量を測定した。代謝物量は総タンパク量で補正した。

### B-12. 尿素産生能の評価

ヒト ES/iPS 細胞、B-5.の方法により分化誘導されたヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞、およびヒト初代培養肝細胞を培地交換したのち、24 時間後に培地を回収し、産生された尿素をキット (BioAssay Systems 社)を用いて測定した。尿素産生量は総タンパク量で補正した。

## C. 研究結果

我々はこれまでに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化過程の適切な時期において FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって、効率良く肝分化を促進できることを見出している。そこで、本研究では、**Figure 1** のプロトコールにしたがって分化誘導した肝細胞における肝機能を評価した。成熟した肝細胞は尿素を産生することが知られているため、分化誘導肝細胞における尿素産生量を調べた。その結果、分化誘導肝細胞の尿素産生能はヒト初代培養肝細胞の半分程度であった (**Figure 2A**)。肝細胞は特定の薬剤を作用させることによって、シトクロム P450 (CYP) が誘導されることが知られており、なかでも CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 は市販の多くの薬剤によって誘導されることが知られている。分化誘導肝細胞の CYP 誘導能を評価するため、培養 20 日目の分化誘導肝細胞に対して、CYP1A2 の誘導剤である  $\beta$ -naphthoflavone (bNF)、CYP2B6 の誘導剤である phenobarbital (PB)、CYP3A4 の誘導剤である rifampicin (RIF) をそれぞれ作用させた (**Figure 2B**) (用いた誘導剤の使用濃度は **Figure 3** に記載した)。未分化なヒト iPS 細胞においてはこれらの薬剤に対する CYP 誘導が観察されなかったが (data not shown)、分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞においては、CYP 誘導がみとめられた (**Figure 2B**)。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞の CYP 誘導能と比較して、分化誘導肝細胞の CYP 誘導能は非常に低かった。

薬物の大半は肝臓において代謝されており、CYP、UGT 酵素が特に重要な役割を担うことが知られている。肝臓で機能する様々な薬剤代謝酵素のうち CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT 遺伝子の代謝能を **Figure 1** のプロトコールに

したがって作製した分化誘導肝細胞において評価した。9 つの薬剤、Phenacetin (PHE)、Bupropion (BP)、Paclitaxel (PCT)、Tolbutamide (TB)、S-mephenytoin (MP)、Bufuralol (BF)、Midazolam (MDZ)、Testosterone (TS)、Hydroxyl coumarin (OHC) はそれぞれ CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT の基質であり、これらをヒト iPS 細胞、分化誘導肝細胞、ヒト初代培養肝細胞に作用させ、その代謝生成物の量を 1、2、4、24 時間後測定した (**Figure 4**) (使用した基質とその代謝物の名称は **Figure 5** に記載した)。それぞれの CYP および UGT 酵素による代謝能は代謝物の産生に線形性が確認される時間において評価した (**Figure 6**)。その結果、分化誘導肝細胞の薬剤代謝能はヒト初代培養肝細胞よりも劣っていたものの、全ての薬剤の代謝生成物が検出可能であった。

肝臓における薬物代謝には第一相反応に関与する CYP 酵素、第二相反応に関与する UGT や GST 酵素のほかに第三相反応に関与する肝関連トランスポーターも重要であることが知られている。そこで、分化誘導肝細胞の肝関連トランスポーターの機能を評価するために、インドシアニンググリーン (ICG) の取り込み能を調べた (**Figure 7A**)。その結果、未分化なヒト iPS 細胞は ICG を取り込まなかったのに対して、分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞は ICG を取り込む能力を有していた。また、ICG を除去した培地で分化誘導肝細胞を 6 時間培養することによって、取り込んだ ICG を排泄することができることが確認された (**Figure 7A**)。以上の結果から、分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様に機能するトランスポーターを有していることが明らかとなった。また、肝臓は低濃度リポタンパク (LDL) を取り込むことができ

ることも知られている。そこで、Alexa-Flour 488 をラベルした LDL を分化誘導肝細胞が取り込むことができるかどうか調べた (Figure 7B)。その結果、未分化なヒト iPS 細胞は LDL を取り込まなかったのに対して、分化誘導肝細胞では 80% 以上の細胞が LDL を取り込む能力を有していた。以上の結果から、分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様に LDL を取り込む能力を有していることが明らかとなった。

分化誘導肝細胞を薬剤スクリーニングに応用できるかどうか検討するために、培養 20 日目の分化誘導肝細胞に対して肝毒性を示すことが知られるベンゾブロマロンを作用させ、48 時間後に細胞生存率を測定した (Figure 8)。分化誘導肝細胞の細胞生存率はベンゾブロマロンの濃度に依存して低下した。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞と比較して、分化誘導肝細胞の細胞毒性が弱いことが確認された。肝毒性を示す薬剤に対する分化誘導肝細胞の感度を向上させるために、細胞内のグルタチオンを枯渇させることができる Buthionine-SR-sulfoximine (BSO) を分化誘導肝細胞に作用させたのち、先ほどと同様にベンゾブロマロンを用いた評価を実施した。その結果、BSO を処理した分化誘導肝細胞は、よりヒト初代培養肝細胞に近い感度でベンゾブロマロンに対する細胞毒性を検出することが確認された。以上の結果から、グルタチオンを枯渇させた分化誘導肝細胞は薬剤スクリーニングに応用できる可能性が示唆された。

#### D. 考察

Figure 4 および Figure 6 において分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞の薬物代謝能を比較した。過去の我々の知見では、分化誘導肝細胞における肝関連遺伝子の発

現を評価したところ、ヒト初代培養肝細胞は同程度であったが、Figure 6 で示されたように分化誘導肝細胞の薬剤代謝能はヒト初代培養肝細胞よりも劣ることが確認された。遺伝子発現と薬剤代謝能の差がみとめられた原因のひとつとして、分化誘導肝細胞の肝関連核内受容体の遺伝子発現がヒト初代培養肝細胞と比較して低い可能性が考えられる。肝関連核内受容体は CYP3A4 遺伝子などの主要な CYP 遺伝子が正しく機能するために必須の遺伝子であることが知られているため、肝関連核内受容体を分化誘導肝細胞に導入することによってさらなる肝成熟化が期待される。

分化誘導肝細胞を薬剤スクリーニングに応用可能か検討するために、本研究ではベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じるか調べた。分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様にベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じることが確認された (Figure 8)。今後は、これらの肝毒性を示す薬剤を作用させたときに細胞毒性が CYP 酵素を介したものかどうか詳細に検討する必要がある。また、他の肝毒性を有する薬剤に対する応用についても網羅的に検討する必要があると考えられる。

ヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化が、FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって促進できることを明らかにした。本研究において作製した分化誘導肝細胞は薬剤代謝能を有することが示された。今後は、肝毒性を有する化合物に対する応答能を網羅的に調べるとともに、肝毒性マーカーをヒト初代培養肝細胞と比較することによって、どの程度正確な毒性評価が可能であるか調べる必要がある。

## E. 結論

FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって作製した分化誘導肝細胞における第一相反応酵素 (CYP 遺伝子)、第二相反応酵素 (UGT、GST 遺伝子)、第三相反応酵素 (肝関連トランスポーター) の発現を調べたところ、多くの遺伝子はヒト初代培養肝細胞と同程度であった。しかしながら、9 種類の薬剤の代謝プロファイル調べたところ、分化誘導肝細胞の薬物代謝能は確認されたものの、ヒト初代培養肝細胞よりも劣るものであった。今後、分化誘導肝細胞の三次元培養、共培養、新たな肝成熟化転写因子の探索、肝成熟化に関する新規 miRNA の探索などを行うことによりさらなる肝成熟化の促進が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Hayakawa H., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, in press..
- 2) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. *Mol. Ther.*, 20:127-37 (2012).
- 3) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct

endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*, 6, e21780 (2011).

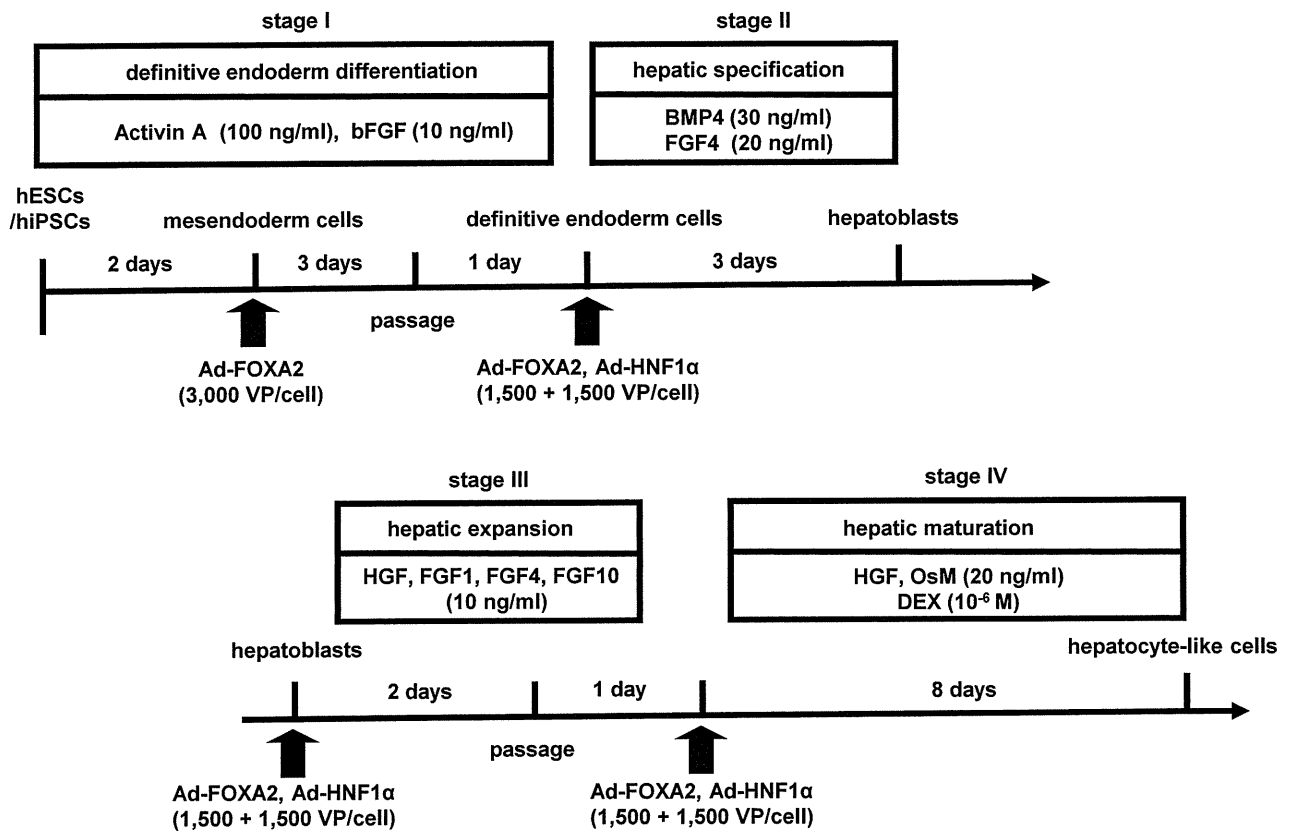
- 4) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.*, 416: 119-24, (2011).
- 5) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient Hepatic Differentiation of Human iPS Cells by Gene Transfer. *Methods Mol Biol.*, 826: 115-124 (2012)
- 6) Kawabata K., Takayama K., Nagamoto Y., Saldon M.S., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and Hepatic Differentiation from Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Stem Cell Res. Ther.*, in press.

### 2. 学会発表

- 1) 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：FOXA2・HNF1 $\alpha$  遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日
- 2) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之：3 次元共培養法によるヒト ES・iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

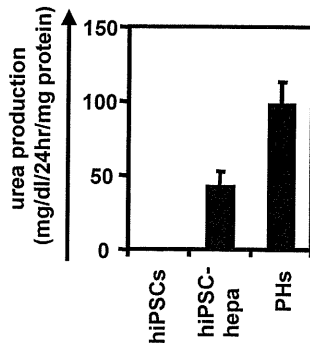
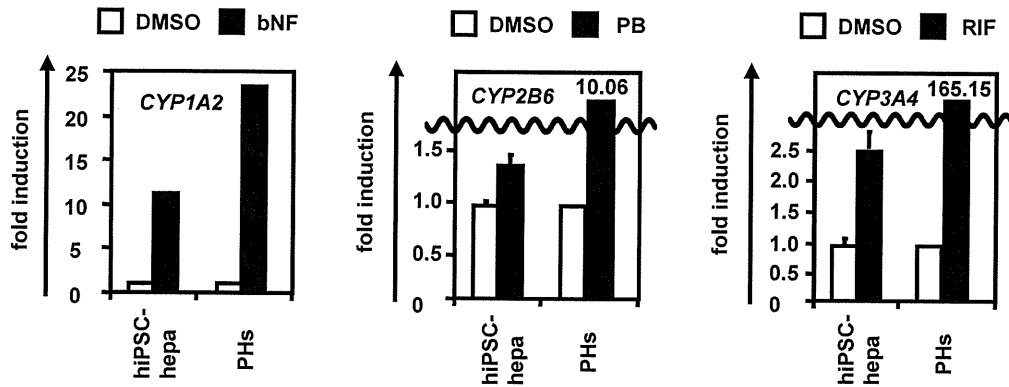
- 3) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: EFFICIENT GENERATION OF MATURE HEPATOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 $\alpha$  TRANSDUCTION, 第 26 回日本薬物動態学会年会, 広島, 2011 年 11 月 16-18 日
- 4) 水口裕之: 創薬応用を目指したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発、第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会、東京、2011 年 9 月 2-3 日
- 5) 水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発と in vitro 毒性評価系への応用、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2011 年 7 月 13 日
- 6) 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 $\alpha$  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、第 18 回肝細胞研究会、東京、2011 年 6 月 24-25 日
- 7) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: HNF4 $\alpha$  promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts., The 6<sup>th</sup> Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011
- 8) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: EFFICIENT GENERATION OF FUNCTIONAL HEPATOCYTES FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 $\alpha$  TRANSDUCTION., International Society for Stem Cell Research, Tronto, June, 2011
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Furue Miho, Inamura Mitsuru. ; METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION FROM STEM CELLS TO HEPATOCYTES』国際出願番号 : PCT/JP2010/068703
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 Hepatic differentiation of hESCs and hiPSCs by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction**

The procedure for differentiation of hESCs and hiPSCs into hepatocyte-like cells via definitive endoderm cells and hepatoblasts is presented schematically. Details of the hepatic differentiation procedure are described in the Materials and Methods section.

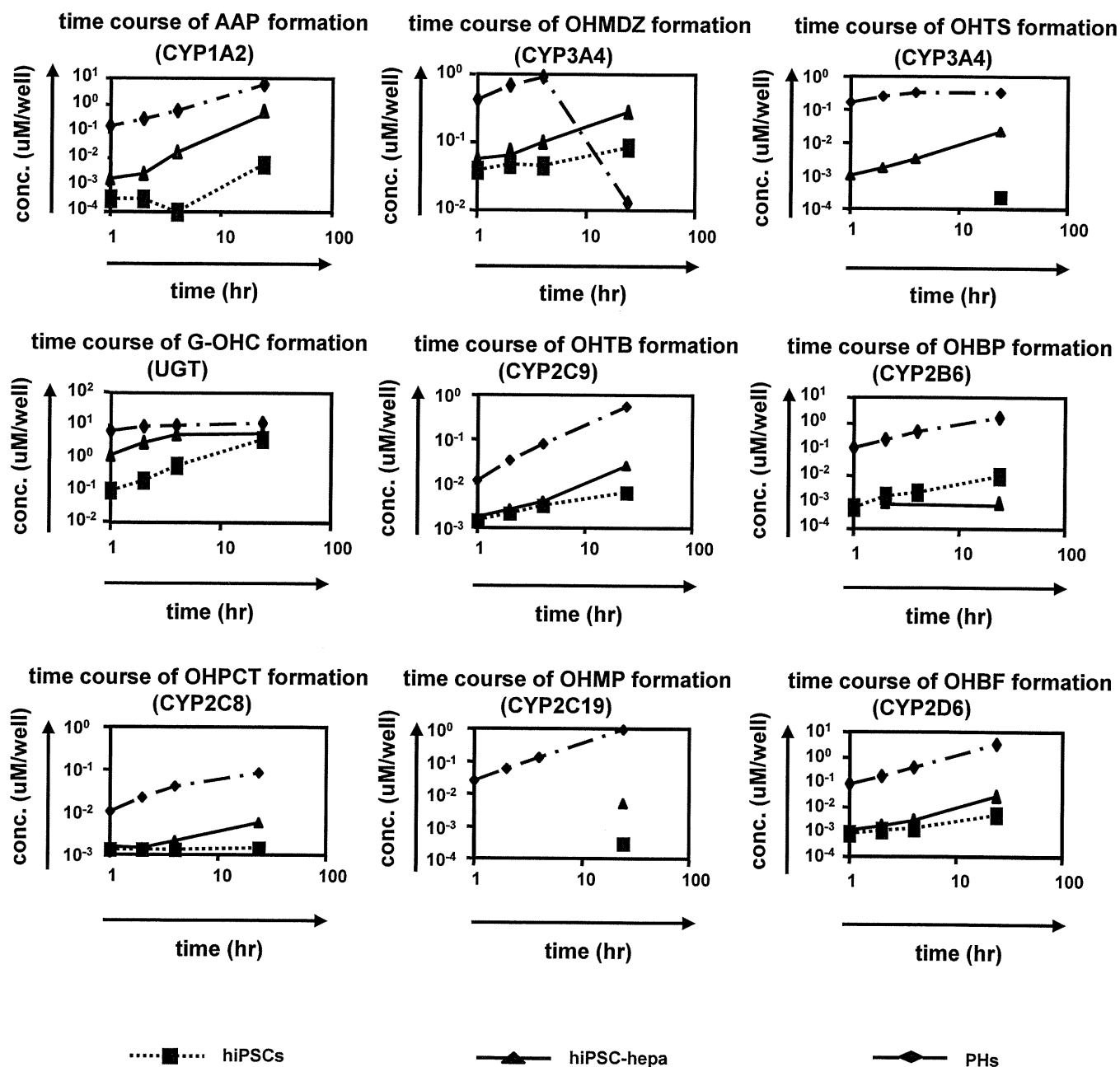
**A****B**

**Fig. 2 The urea secretion capacity and CYP induction potency of hiPSC-hepa**

hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in **Figure 1**. (A) The amount of urea secretion was examined in hiPSCs, hiPSC-hepa (day 20 of the differentiation), and primary human hepatocytes (48hr), which were cultured for 48 hr after plated. (B) Induction of *CYP1A2*, *2B6*, or *3A4* by DMSO (white bar) or inducer (black bar;  $\beta$ -naphthoflavone [bNF], phenobarbital [PB], or rifampicin [RIF]) of hiPSC-hepa and PHs, which were cultured for 48 hr after the cells were plated, was examined. The inducers used in this figure is summarized in **Figure 3**. On the y axis, the gene expression levels of *CYP1A2*, *2B6*, or *3A4* in DMSO-treated cells, which were cultured for 48 hr, were taken as 1.0. All data are represented as means  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

<b>CYP</b>	<b>Inducer</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
CYP1A2	$\beta$ -naphthoflavone	10
CYP2B6	Phenobarbital	750
CYP3A4	Rifampicin	10

**Fig. 3** List of CYP inducers used in this study



**Fig. 4** The time course of metabolites formation in hiPSCs, hiPSC-hepa, or PHs

hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocytes as described in Figure 1. Quantitation of metabolites in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs treated with nine substrates (Phenacetin [PHE], Bupropion [BP], Paclitaxel [PCT], Tolbutamide [TB], *S*-mephenytoin [MP], Bufuralol [BF], Midazolam [MDZ], Testosterone [TS], and Hydroxyl coumarin [OHC]) was performed. Supernatants were collected at 1, 2, 4, or 24 hr after incubation with each substrate, which were the probes for CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A4 and UGT, respectively. The quantity of metabolites (Acetaminophen [AAP], Hydroxybupropion [OHBP], 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel [OHPCT], Hydroxytolbutamide [OHTB], 4'-hydroxymephenytoin [OHMP], 1'-hydroxybufuralol [OHBF], 1'-hydroxymidazolam [OHMDZ], 6 $\beta$ -hydroxytestosterone [OHTS], 7-Hydroxycoumarin glucuronide [G-OHC], respectively) was measured by LC-MS/MS. The substrates and that metabolites used in this study are summarized in Figure 5. All data are represented as means  $\pm$  SD ( $n=3$ ).