

CYP	Substrate	Sub Abbr.	Conc. (µM)	Reaction
CYP1A2	Phenacetin	PHE	10	O-de-ethylation
CYP2B6	Bupropion	BP	150	Hydroxylation
CYP2C8	Paclitaxel	PCT	20	6α-Hydroxylation
CYP2C9	Tolbutamide	TB	500	Hydroxylation
CYP2C19	S-mephenytoin	MP	200	4'-hydroxylation
CYP2D6	Bufuralol	BF	50	1'-hydroxylation
CYP3A4	Midazolam	MDZ	10	1'-hydroxylation
CYP3A4	Testosterone	TS	100	6β-hydroxylation
UGT	Hydroxy coumarin	OHC	10	Glucuronidation

CYP	Metabolites	Metabolites Abbr.	Detection limit of metabolite (µM)
CYP1A2	Acetaminophen	AAP	0.0031
CYP2B6	Hydroxybupropion	OHBP	0.006
CYP2C8	6α-hydroxypaclitaxel	OHPCT	0.0031
CYP2C9	Hydroxytolbutamide	OHTB	0.001
CYP2C19	4'-hydroxymephenytoin	OHMP	0.003
CYP2D6	1'-hydroxybufuralol	OHBF	0.003
CYP3A4	1'-hydroxymidazolam	OHMDZ	0.003
CYP3A4	6β-hydroxytestosterone	OHTS	0.049
UGT	7-Hydroxycoumarin glucuronide	G-OHC	0.015

Fig. 5 List of CYP substrates and that metabolites used in this study

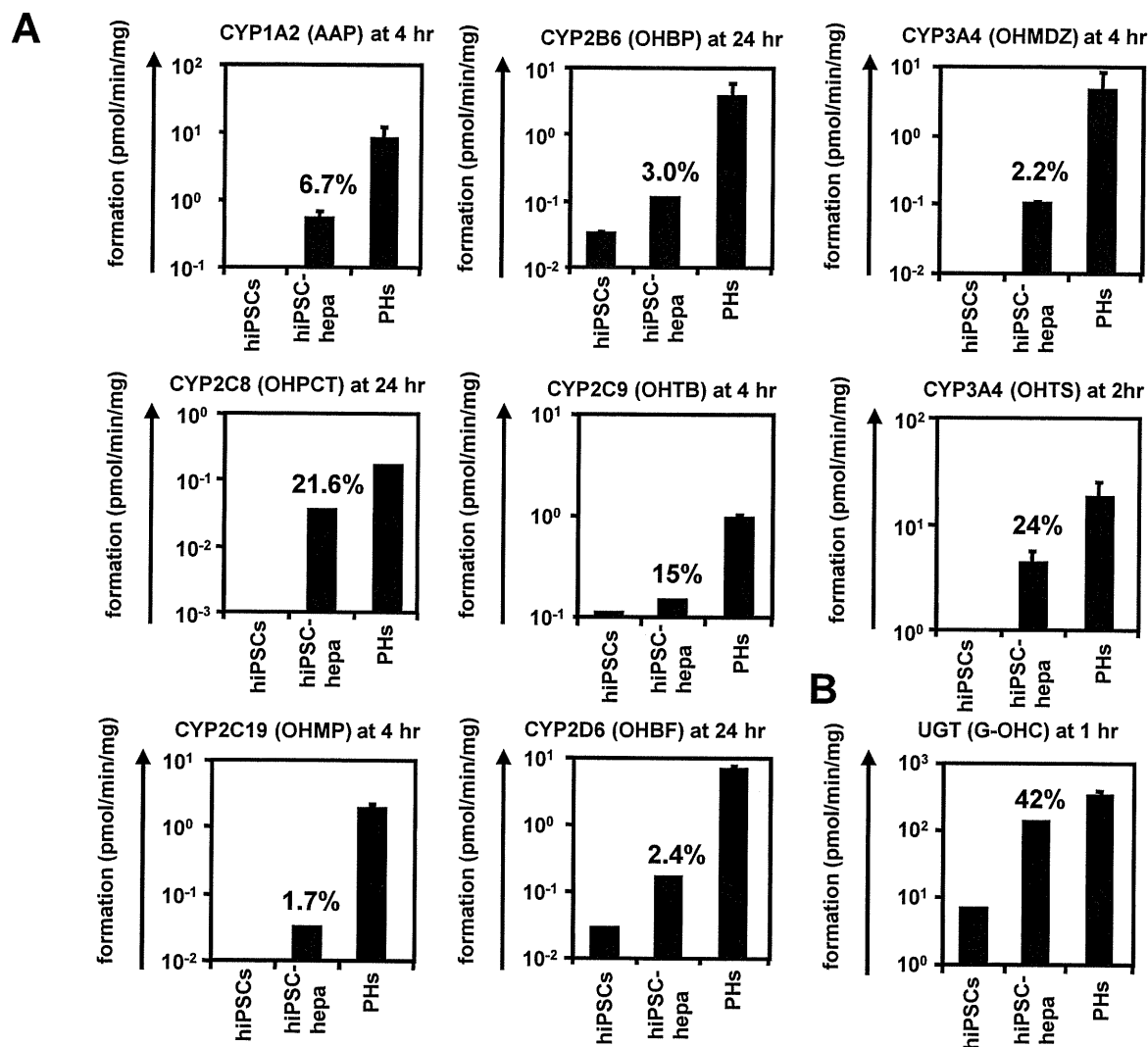


Fig. 6 Evaluation of the drug metabolism capacity and hepatic transporter activity of hiPSC-hepa

The hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocytes as described in **Figure 1**. (A and B) Quantitation of metabolites in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs, which were cultured for 48 hr after the cells were plated, was examined by treating nine substrates (Phenacetin, Bupropion, Paclitaxel, Tolbutamide, *S*-mephenytoin, Bufuralol, Midazolam, Testosterone, and Hydroxyl coumarin; these compounds are substrates for CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A4 (A) and UGT (B), respectively), and then supernatants were collected at the indicated time. The quantity of metabolites (Acetaminophen [AAP], Hydroxybupropion [OHBP], 6 α -hydroxypaclitaxel [OHPCT], Hydroxytolbutamide [OHTB], 4'-hydroxymephenytoin [OHMP], 1'-hydroxybufuralol [OHBF], 1'-hydroxymidazolam [OHMDZ], 6 β -hydroxytestosterone [OHTS], 7-Hydroxycoumarin glucuronide [G-OHC], respectively) was measured by LC-MS/MS. The substrates and their metabolites are summarized in **Figure 5**. The ratios of the activity levels in hiPSC-hepa to the activity levels in PHs rate are indicated in the graph. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

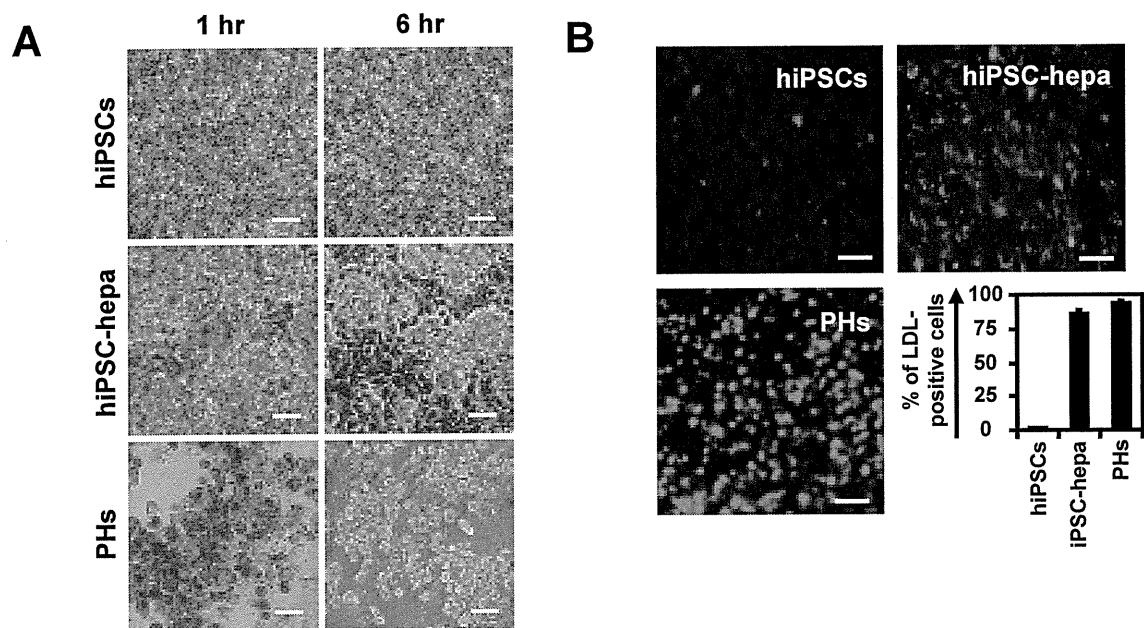


Fig. 7 The hepatic characterization of hiPSC-hepa

The hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocytes as described in **Figure 1**. (A) hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs were examined for their ability to take up ICG (left column) and release it 6 hr thereafter (right column). (B) hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs were cultured with medium containing Alexa-Flour 488-labeled LDL (green) for 1 hr, and immunohistochemistry was performed. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bars represent 50 μ m. The percentage of LDL-positive cells was also measured by FACS analysis. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

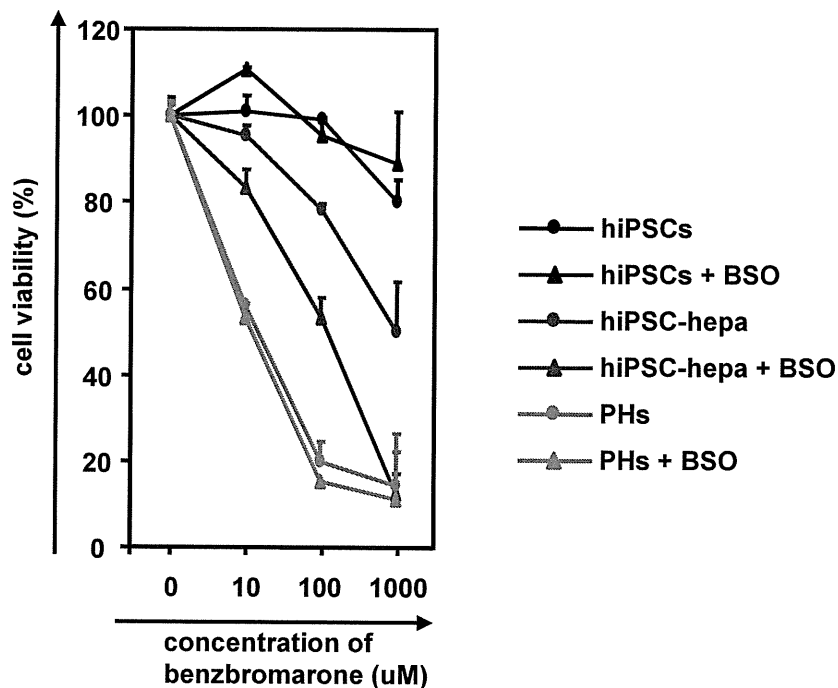


Fig. 8 hiPSC-hepa have a potential to be applied in drug screening

The hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocytes as described in **Figure 1**. The cell viability of hiPSCs (black bar), hiPSC-hepa (blue bar), PHs (red bar), and their BSO-treated cells (0.4 mM BSO was pre-treated for 24 hr) was assessed by Alamar Blue assay after 48 hr exposure to different concentrations of benzbromarone. The cell viability is expressed as a percentage of that in the cells treated only with solvent. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発

分担研究者 川端 健二

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 プロジェクトリーダー

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法を開発する。我々は昨年度、SOX17、HEX、HNF4α 遺伝子を中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞に対してそれぞれ導入することにより、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞を効率良く誘導できることを報告した。しかしながら、分化誘導肝細胞の一部の CYP 酵素活性がヒト初代培養肝細胞よりも劣ることが課題であったため、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化が要求されていた。そこで本年度では、非常に高い遺伝子導入効率を示すアデノウイルス(Ad)ベクターを用いて肝分化に必須の7種類の遺伝子(FOXA2、HEX、HNF1α、HNF1β、HNF4α、HNF6、SOX17)をヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への各分化過程において導入し、さらなる肝成熟化を促進できる遺伝子の同定を試みた。ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への各分化過程において、7種類の肝関連転写因子を遺伝子導入するスクリーニングを実施した結果、FOXA2 と HNF1α 遺伝子を組み合わせることで導入することによって、さらなる肝成熟化が確認された。FOXA2 と HNF1α 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。FOXA2 と HNF1α 遺伝子を導入することにより作製した分化誘導肝細胞は、SOX17、HEX、HNF4α 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よりも、より成熟化した肝細胞であった。本成果が創薬における *in vitro* 毒性スクリーニングに応用されることを期待する。

A. 研究目的

研究協力者

水口裕之 (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
大阪大学大学院薬学研究科

ヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cells ; ヒト ES 細胞) およびヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells ; ヒト iPS 細胞) は自己複製能と分化多能性を有しており、ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導された細胞は創薬研究などへの応用が期待されている。肝臓は薬物の代謝に関与する主要な臓器であり、創薬過程において医薬品候補化合物の肝毒性を正確に予測することがより安全な医薬品開発

のために重要である。ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、*in vitro* 毒性スクリーニングに適していると考えられるが、これまでの液性因子を用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法は分化効率が低いことが問題となっており、*in vitro* 毒性スクリーニングへの応用は困難であった。そこで、本研究ではヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化効率を上昇させるため、肝分化に必須の 7 種類の転写因子 (FOXA2、HEX、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、HNF6、SOX17) を肝細胞への分化過程の適切な時期の細胞に遺伝子導入した。

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 forkhead box protein A2 (FOXA2)、hematopoietically expressed homeobox transcription factor (HEX)、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 α)、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B (HNF1 β)、hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)、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 α 、pHMEF5-HNF1 β 、pHMEF5-HNF4 α 、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 α 、pAdHM41K7-EF-HNF1 β 、pAdHM41K7-EF-HNF4 α 、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 α 、AdK7-EF-HNF1 β 、AdK7-EF-HNF4 α 、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/iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 H1、H9 (WiCell research institute) やヒト iPS 細胞株 201B7、253G1 (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 細胞株 Dotcom、Tic、Toe 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。5-7 日ごとに 0.1mg/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 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 (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 6.25×10^4 cells/cm² 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 1.25×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種した。1 日後に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1α) 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-HNF1α) 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 プレーートの各ウェルに 1.25×10^5 cells/cm² 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-HNF1 α) 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 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate [Sigma 社]、1 μ M insulin、25 mM NaHCO₃ [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 プレーートの各ウェルに 1.2×10^5 cells/cm² 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。PCR に用いたプライマーは Table 1 に示した。

B-7. 免疫抗体染色

12 well プレー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 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 Table 2 に示した。

B-8. 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。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-9. アルブミン産生能の評価

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、産生されたアルブミンを ELISA キット (Bethy 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

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化を促進するために、分化誘導された中内胚葉（培養 2 日目）に対して、7 種類の転写因子をそれぞれ搭載した Ad ベクター (Ad-SOX17、Ad-FOXA2、Ad-HEX、Ad-HNF1 α 、Ad-HNF1 β 、Ad-HNF4 α 、Ad-HNF6) を作用させた (**Figure 1A**)。培養 5 日目に CXCR4 (内胚葉マーカー) 陽性細胞率を FACS で計測することによって内胚葉への分化誘導効果を評価した。FOXA2 もしくは SOX17 遺伝子を導入することによって、CXCR4 陽性細胞率が最も増加した (**Figure 1B**)。FOXA2 もしくは SOX17 遺伝子を導入することによって分化誘導した内胚葉の性質の相違を調べるために、FOXA2 もしくは SOX17 遺伝子導入細胞における内胚葉マーカー、中胚葉マーカー、胚体外内胚葉マーカー、未分化マーカーの遺伝子発現を培養 5 日目に調べた。内胚葉マーカーは FOXA2 遺伝子導入細胞と SOX17 遺伝子導入細胞の間で同程度の発現量を示したが、胚体外内胚葉マーカーの発現量は SOX17 遺伝子導入細胞の方が高発現であった (**Figure 1C**)。したがって、FOXA2 遺伝子導入によって内胚葉へ分化を選択的に促進できることが示された。

内胚葉から肝幹前駆細胞への分化を促進するため、培養 6 日目の内胚葉に対して、7 種類の転写因子をそれぞれ搭載した Ad ベクター (Ad-SOX17、Ad-FOXA2、Ad-HEX、Ad-HNF1 α 、Ad-HNF1 β 、Ad-HNF4 α 、Ad-HNF6) を作用させた (**Figure 1D**)。肝幹前駆細胞への分化誘導効果は AFP (肝幹前駆細胞マーカー) 陽性細胞率を培養 9 日目に FACS で計測することによって評価した。FOXA2 あるいは HNF1 α 遺伝子を導入することによって、AFP 陽性細胞率は最も増加した (**Figure 1E**)。FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を組み合わせて導入することによっ

て、肝幹前駆細胞への分化をさらに促進できることを期待し、培養 9 日目に肝幹前駆細胞のマーカーである *CYP3A7* 遺伝子の発現量を調べることによって肝幹前駆細胞への分化誘導効果を評価した。FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を組み合わせることによって、FOXA2 あるいは HNF1 α を単独で導入した場合と比較して、*CYP3A7* の遺伝子発現量が上昇したことから、FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を組み合わせて導入することによって、肝幹前駆細胞への分化をさらに促進できることが確認された (**Figure 1F**)。

肝幹前駆細胞から成熟した肝細胞への分化を促進するために、培養 9 日目の肝幹前駆細胞に対して 7 種類の転写因子をそれぞれ搭載した Ad ベクター (Ad-SOX17、Ad-FOXA2、Ad-HEX、Ad-HNF1 α 、Ad-HNF1 β 、Ad-HNF4 α 、Ad-HNF6) を作用させた (**Figure 2A**)。成熟した肝細胞への分化誘導効果はアジアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1、成熟した肝細胞のマーカー) 陽性細胞率を培養 20 日目に FACS で計測することによって評価した。FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子を導入することによって、ASGR1 陽性細胞は最も増加した (**Figure 2B**)。FOXA2、HNF1 α 、あるいは HNF4 α 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の性質の相違を調べるために、FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子導入細胞における肝幹前駆細胞マーカー、肝細胞マーカー、胆管上皮細胞マーカーの遺伝子発現を培養 20 日目に調べた。成熟肝細胞マーカー (mature hepatic markers) は FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子導入細胞の間で同程度の発現を示したが、肝幹前駆細胞マーカー (early hepatic markers) は FOXA2 遺伝子導入細胞で最も高発現であった (**Figure 2C**)。FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子を組み合わせて導

入ることによってさらなる肝成熟化が促進されることを期待し、培養 20 日目に成熟肝細胞のマーカーである *CYP2C19* 遺伝子の発現量を調べた。*FOXA2*、*HNF1α* 遺伝子もしくは *HNF1α*、*HNF4α* 遺伝子を組み合わせることによって、単独導入時と比較して、*CYP2C19* 遺伝子の発現量が上昇したことから、*FOXA2*、*HNF1α* 遺伝子もしくは *FOXA2*、*HNF4α* 遺伝子を組み合わせることによって、さらなる肝成熟化を促進できることが確認された (Figure 2D)。以上の結果から、Figure 3A に示すプロトコルを用いてヒト ES/iPS 細胞から成熟した肝細胞への分化誘導を行うことによって、効率良く肝細胞を分化誘導できることが明らかとなった。また、*FOXA2* および *HNF1α* 遺伝子を組み合わせることによって作製した分化誘導肝細胞は、明確な輪郭や複数の核を有することが確認された (Figure 3B)。さらに分化誘導肝細胞は Albumin (ALB)、Cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*)、alpha-1-antitrypsin (α AT)、*CYP3A4*、*CYP7A1* などの肝関連タンパクを強く発現していることも示された (Figure 3C)。

分化誘導肝細胞を薬剤の毒性評価系などに応用する場合、その肝機能がヒト初代培養肝細胞に近いことが求められるため、肝分化能の高いヒト ES/iPS 細胞を探索した。2 種類のヒト ES 細胞株、5 種類のヒト iPS 細胞株を Figure 3A のプロトコルにしたがって肝分化させ、培養 20 日目に ALB 遺伝子発現量を比較した結果、ヒト iPS 細胞株である Dotcom が最も高い ALB 遺伝子発現を示した。したがって、ヒト iPS 細胞株 Dotcom が最も肝分化能が高いことが示唆された (Figure 4A)。分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能を比較するため、ALB 産生量や ALB 陽性細胞率をそれぞれの細胞において測定した (Figures 4B

and C)。その結果、分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞に近い ALB 産生能を有しており (Figure 4B)、約 80%以上の細胞が ALB 陽性細胞であること (Figure 4C) が確認された。さらに、詳細に分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能を比較するため、肝細胞において発現することが知られる薬物代謝の第 1 相反応に関与する *CYP* 遺伝子 (Figure 4D)、薬物代謝の第 2 相反応に関与する *UGT* 遺伝子や *GST* 遺伝子 (Figure 4E)、薬物代謝の第 3 相反応に関与する各種トランスポーター (Figure 4F)、*CYP* 誘導に関与する肝関連核内受容体 (Figure 4G) の発現を調べた。その結果、分化誘導肝細胞における各種遺伝子の発現はヒト初代培養肝細胞と同程度のものが多かった。しかしながら、分化誘導肝細胞における胎児型の *CYP* である *CYP3A7* の発現がヒト初代培養肝細胞と比較して高いことから、分化誘導肝細胞はさらなる成熟化の余地があると考えられる。また、Figure 4 において用いたヒト初代培養肝細胞は 48 時間培養したものであり、より生体内の肝細胞に近い細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導するためにはさらなる肝分化誘導技術の改良が必要である。

D. 考察

我々は昨年度までに *SOX17*、*HEX*、*HNF4α* 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*、*HNF1β*、*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 (Figures 1A-C)、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程においては FOXA2 と HNF1 α 遺伝子 (Figures 1D-F)、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においては FOXA2 と HNF1 α 遺伝子 (あるいは FOXA2 と HNF4 α 遺伝子) (Figure 2) を組み合わせることで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 HNF1 α もしくは HNF4 α 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 (Figure 2)。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 HNF4 α 、HNF1 α 遺伝子を組み合わせることが好ましいと予想されたが、FOXA2、HNF1 α 遺伝子あるいは FOXA2、HNF4 α 遺伝子を組み合わせることで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 HNF1 α 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

現を確認され、培養 18 日目には完全に消失することを確認している。Figure 3A の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、Figure 4 における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。

E. 結論

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、FOXA2 および HNF1 α 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。

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 α 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) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient Hepatic Differentiation of Human iPS Cells by Gene Transfer. *Methods Mol Biol.*, 826: 115-124 (2012)
- 5) 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 α 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 α 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 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、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 α promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts., The 6th 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 α 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

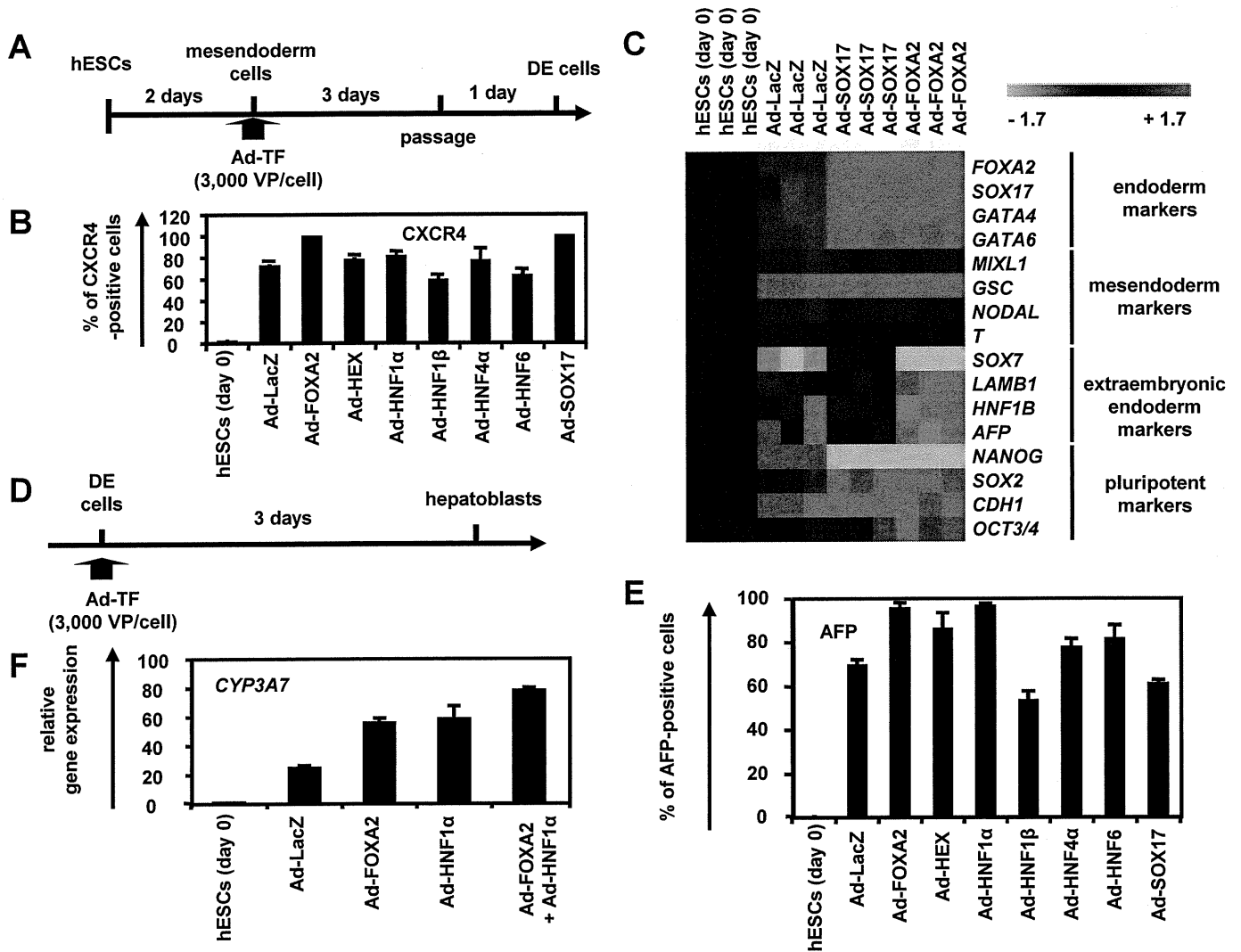


Fig. 1 Efficient hepatic specification from hESCs by FOXA2 and HNF1 α transduction

(A) The schematic protocol describes the strategy for definitive endoderm (DE) differentiation from hESCs (H9). The hESC-derived mesendoderm cells (day 2) were transduced with 3,000 VP/cell of transcription factor (TF)-expressing Ad vector (Ad-TF) for 1.5 hr and cultured as described in **Figure 3A**. (B) On day 5, the efficiency of DE differentiation was measured by estimating the percentage of CXCR4⁺ cells using FACS analysis. (C) The gene expression profiles were examined on day 5. (D) The schematic protocol describes the strategy for hepatoblast differentiation from DE. The hESC-derived DE cells (day 6) were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 hr and cultured as described in **Figure 3A**. (E) On day 9, the efficiency of hepatoblast differentiation was measured by estimating the percentage of AFP⁺ cells using FACS analysis. (F) The gene expression levels of *CYP3A7* were measured by real-time RT-PCR on day 9. On the y axis, the gene expression level of *CYP3A7* in hESCs (day 0) was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

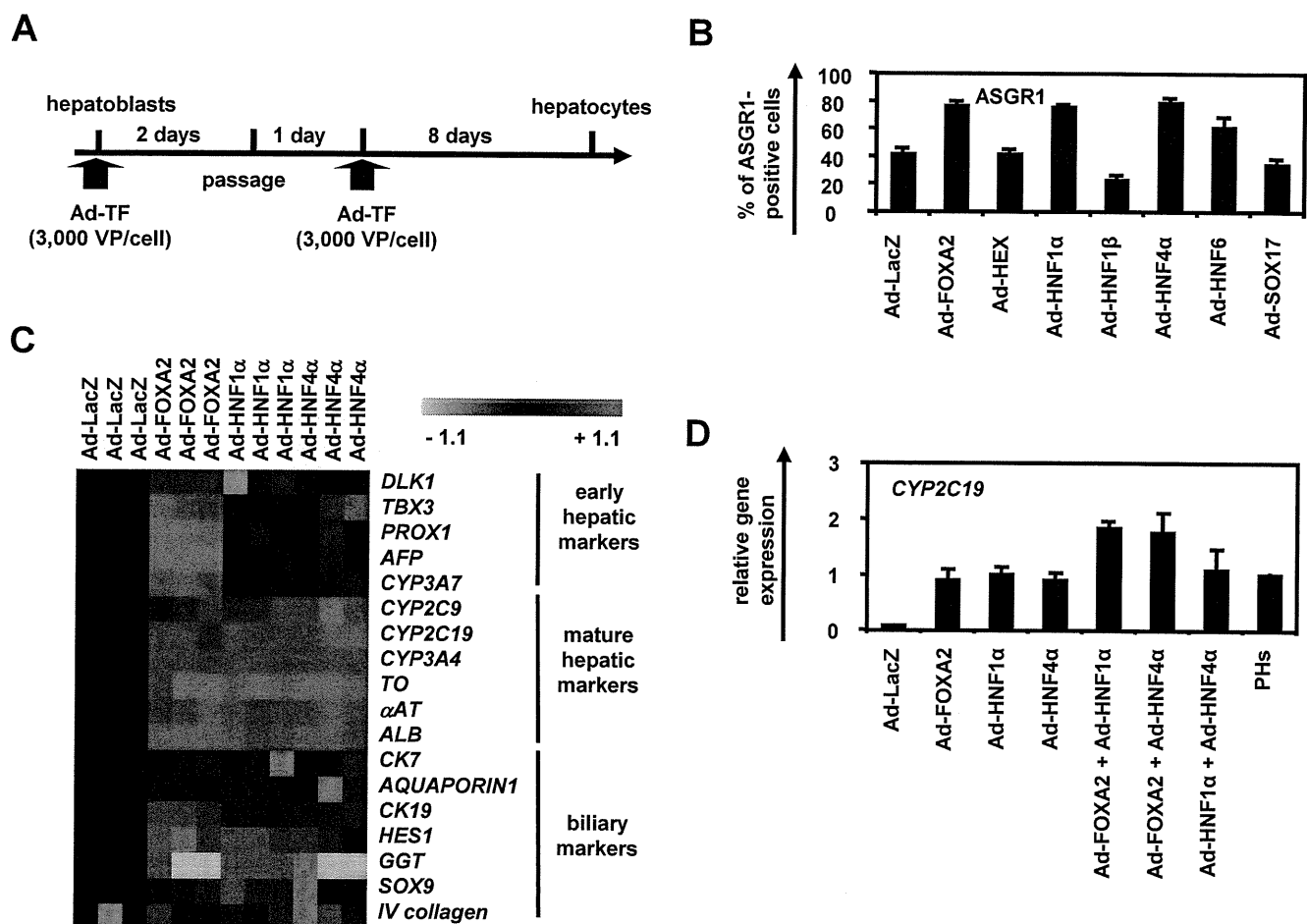


Fig. 2 Efficient hepatic maturation from hESC-derived hepatoblasts by FOXA2 and HNF1 α transduction

(A) The schematic protocol describes the strategy for hepatic differentiation from hepatoblasts. The hESC-derived hepatoblasts (day 9) were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 hr and cultured as described in **Figure 3A**. (B) On day 20, the efficiency of hepatic differentiation was measured by estimating the percentage of ASGR1+ cells using FACS analysis. (C) The gene expression profiles were examined on day 20. (D) The hESC-derived hepatoblasts (day 9) were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-TFs (in the case of combination transduction of two types of Ad vector, 1,500 VP/cell of each Ad-TF was transduced.) for 1.5 hr and cultured. The gene expression levels of *CYP2C19* were measured by real-time RT-PCR on day 20. On the y axis, the gene expression level of *CYP2C19* in primary human hepatocytes (PHs), which were cultured for 48 hr after the cells were plated, was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

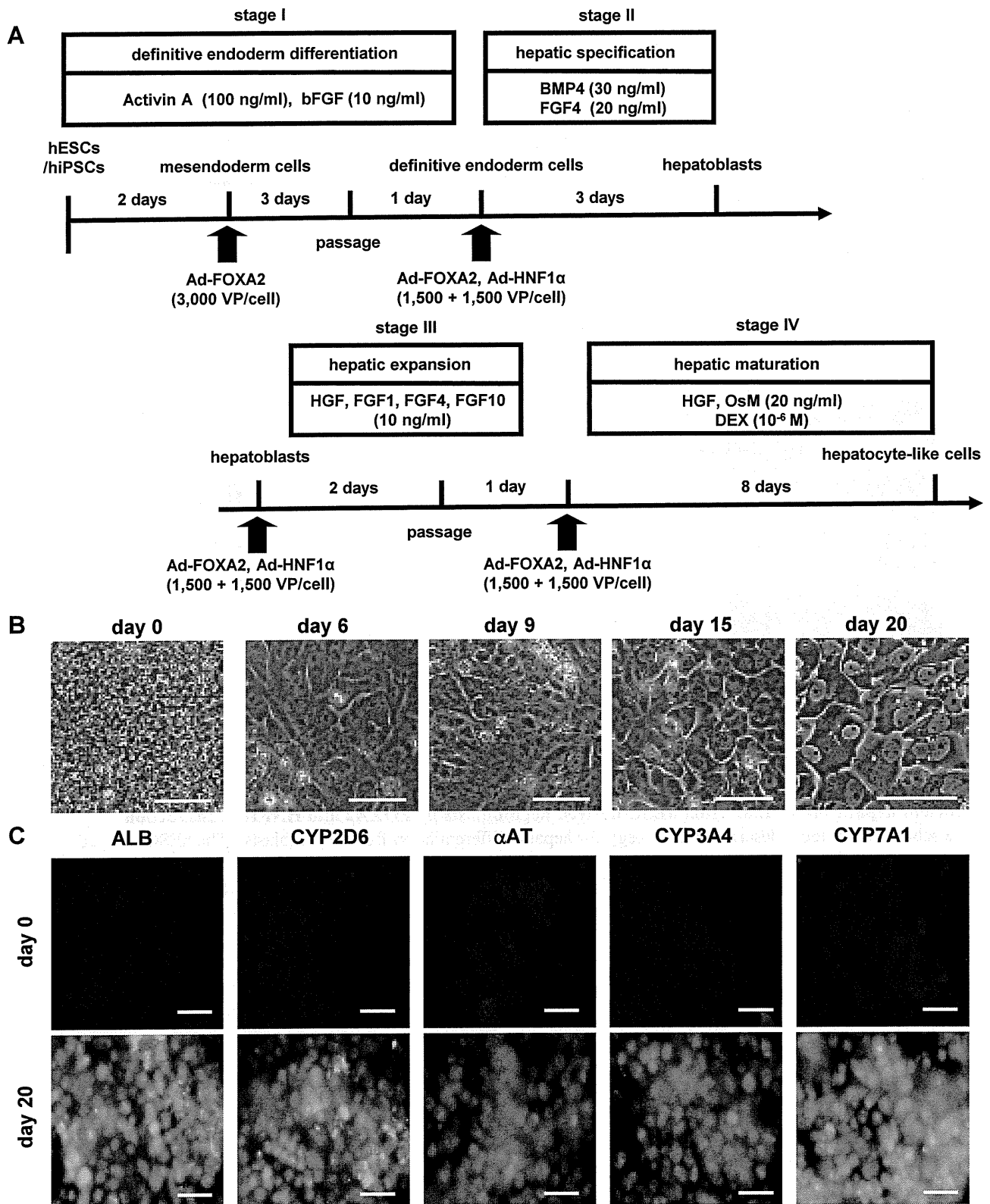


Fig. 3 Hepatic differentiation of hESCs and hiPSCs by FOXA2 and HNF1 α transduction

(A) 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. (B) Sequential morphological changes (day 0-20) of hESCs (H9) differentiated into hepatocytes are shown. (C) The expression of the hepatocyte markers (ALB, CYP2D6, α AT, CYP3A4, and CYP7A1 [all green]) was examined by immunohistochemistry on day 0 and 20. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bars represent 50 μ m.

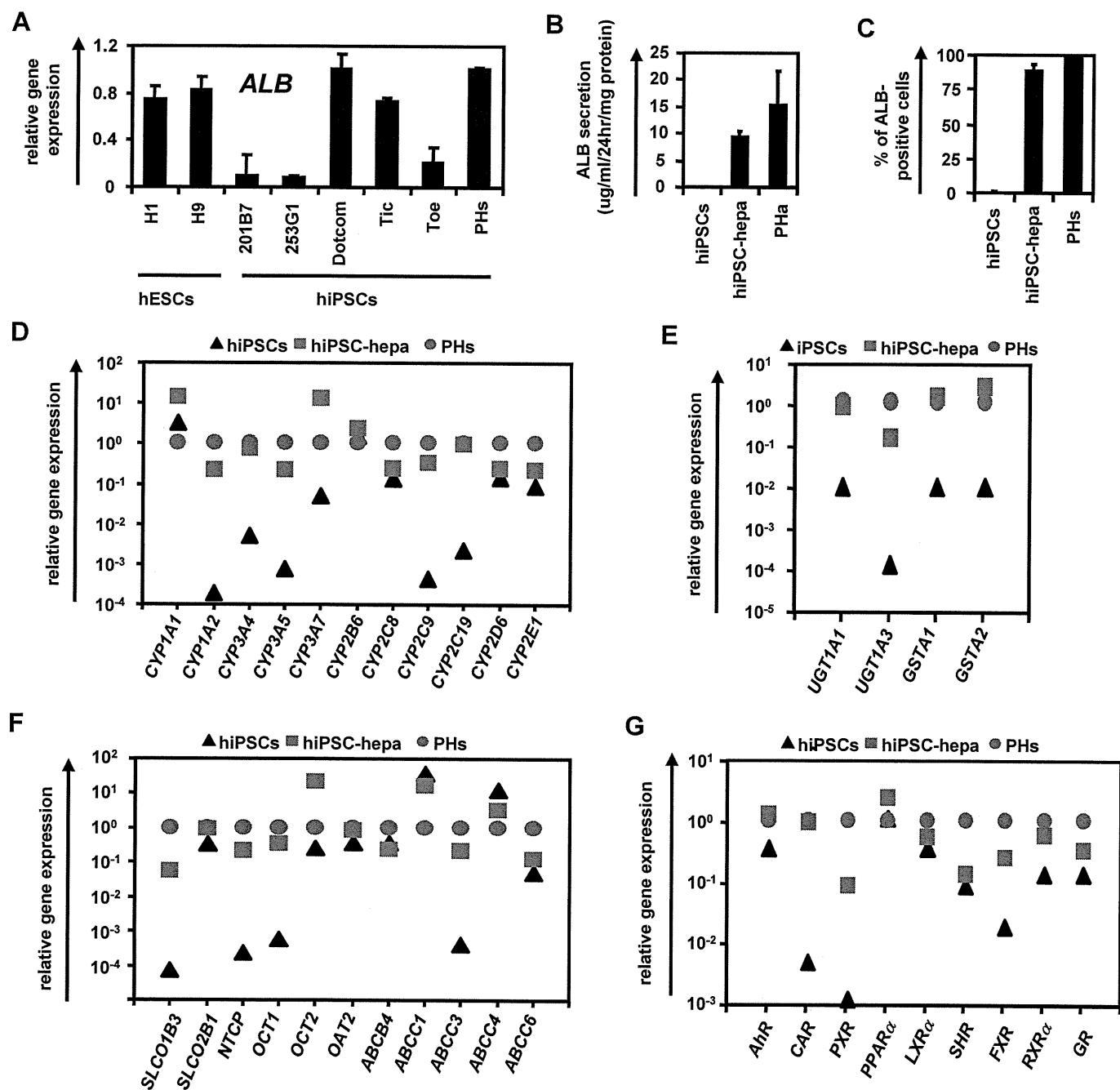


Fig. 4 The hepatic characterization of hiPSC-hepa

hESCs (H1 and H9) and hiPSCs (201B7, 253G1, Dotcom, Tic, and Toe) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in **Figure 3A**. **(A)** On day 20, the gene expression level of *ALB* was examined by real-time RT-PCR. On the y axis, the gene expression level of *ALB* in PHs, which were cultured for 48 hr after the cells were plated, was taken as 1.0. **(B-I)** hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in **Figure 3A**. **(B)** The amount of ALB secretion was examined by ELISA in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs. **(C)** hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs were subjected to immunostaining with anti-ALB antibodies, and then the percentage of ALB-positive cells was examined by flow cytometry. **(D-G)** The gene expression levels of CYP enzymes **(D)**, conjugating enzymes **(E)**, hepatic transporters **(F)**, and hepatic nuclear receptors **(G)** were examined by real-time RT-PCR in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs. On the y axis, the expression level of PHs. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

Gene Symbol	Primers (forward/reverse; 5' to 3')
FOXA2	GCGACCCCAAGACCTACAG/GGTTCTGCCGGTAGAAGGG
SOX17	GTGGACCGCACGGAATTTG/GAGGCCCATCTCAGGCTTG
GATA4	CATCAAGACGGAGCCTGGCC/TGACTGTCCGCCAAGACCAG
GATA6	CCATGACTCCAACCTCCACC/ACGGAGGACGTGACTTCGGC
MIXL1	CCGAGTCCAGGATCCAGGTA/CTCTGACGCCGAGACTTGG
GSC	TCTCAACCAGCTGCACTGTC/CGTTCTCCGACTCCTCTGAT
NODAL	CCGAGGGGACAGCATCATCC/CCATCCACTGCCACATCTTCT
T	TGCTTCCCTGAGACCCAGTT/GATCACTTCTTTCITTGCATCAAG
SOX7	ACGCCGAGCTCAGCAAGAT/TCCACGTACGGCCTCTTCTG
LAMB1	AGGAACCCGAGTTCAGCTACG/CACGTCCGAGGTCACCGAAA
HNF1 β	TCACAGATACCAGCAGCATCAGT/GGGCATCACCAGGCTTGTGTA
AFP	TGGGACCCGAACTTTCCA/GGCCACATCCAGGACTAGTTTC
NANOG	AGAAGGCCTCAGCACCTAC/GGCCTGATTGTTCCAGGATT
SOX2	GGCAGCTACAGCATGATGATGCAGGAGC/CTGGTCATGGAGTTGTACTGCAGG
E-cadherin	CGAGAGCTACACGTTACGGG/GTGTCCGAGGGAAAAATAGGCTG
OC13/4	CTTGAATCCCGAATG6AAAGGG/GTGTATATCCAGGGTGATCCTC
DLK1	GGGCACAGGAGCATTATAG/GACGGGGGAGCTCTGTGATAG
TBX3	GCCATGTACGTGTAGGGGTA/CTTCCACCTCCAGCAGCA
PROX1	TTGACATTGGAGTGAAGAGGACG/TGCTCAGAACCTTGGGGATTTC
CYP3A7	AAGGTCGCCTCAAAGAGACA/TGCACCTTCTGCTGGACATC
CYP2C9	GGACAGAGACGACAAGCACA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
CYP2C19	ACTTGGAGCTGGGACAGAGA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
CYP3A4	AAGTCGCCTCGAAGATACACA/AAGGAGAGAACACTGCTCGTG
TO	GGCAGCGAAGAAGACAAATC/TCGAACAGAATCCAACCTCCC
α AT	ACTGTCAACTTCGGGGACAC/CATGCCTAAACGCTTCATCA
ALB	GCACAGAATCCTTGGTGAACAG/ATGGAAGGTGAATGTTTTAGCA
CK7	AGACGGAGTTGACAGAGCTG/GGATGGCCCGGTTTCATCTC
Aquaporin1	GGTGGGGAAACAACCAGACG/TACATGAGGGCACGGAAGATG
CK19	CTCCCGGACTACAGCCACT/TCAGCTCATCCAGCACCCCTG
HES1	ATGGAGAAAAATTCCTCGTCCC/TCAGAGCATCCAAAATCAGTGT
GGT	GGAGAGCACCTCTTCTCAG/GCCTGGATTCTCCAGAGAT
SOX9	TTTTCAAGACACAAACATGA/AAAGTCCAGTTTCTCGTTGA
IV collagen	CCTTTCTCTCTGAAAGCCC/TGTGTTCTCGAAAAGGGGTC
CYP1A1	GAGGCCAGAAGAAACTCCGT/CCCAGCTCAGCTCAGTACCT
CYP1A2	CAATCAGGTGGTGGTGTGAG/GCTCCTGGACTGTTTTCTGC
CYP3A5	CGGCATCATAGGTAGGTGGT/TATGAACTGGCCACTCACCC
CYP2B6	GTCCCAGGTGTACCGTGAAG /CCCTTTTGGGAAACCTTCTG
CYP2CB	CAGTGCCAAACCAAGTTTTCA/CTCGGGACTTTATGGATTGC
CYP2D6	CTTTGCCCCAACGGTETC/TTTTGGAAGCGTAGGACCTTG
CYP2E1	ACCCGAGACACCATTTTCAG/TCCAGCACACACTCGTTTTTC
UGT1A1	TAAGTGGCTACCCCAAAACG/GCTTTGCATTGTCCATCTGA
UGT1A3	TCAGATGGACAATGCAAAGCG/GGCGCATGATGTTCTCCTTGA
GSTA1	CCGTGCATTGAAGTAGTGG/AATTCAGTTGTCGAGGCCAGG
GSTA2	TGCAACAATTAAGTGCTTTACCTAAGTG/TAACTAAGTGGGTGAATAGGAGTTGTATT
SLC01B1	TAAAGCTGAGTGACAGAGCTGC/AAACAGCAGAGGCACAACCT
SLC02B1	AGGGCTCTGCTTAGAGGGAG/GGAAATGCCCAAGGAAAAAC
NTCP	AGAAGGTGGAGCAGGTGGT/ATCTTGGTCTGTGGCTGCTC
ABCB4	AATTTATCCTGCCAATCGGA/GCATCAGCAGCAAACAAAAA
ABCC1	TGGGCAGGGATTCTTTTTA/TCATGCTCACTTCTGGCTG
ABCC3	GTCCGCAGAATGGACTTGAT/TCACCCTTGGGGATCATT
ABCC4	TCTCCGTTTATGGCCAATTT/CCGTGTACCAGGAGGTGAAG
ABCC6	TGTCGCTCTTTGGAAAATCC/AGGAACACTGCCAAGCTCAT
OC1/SLC22A1	TAATGGACCACATCGCTCAA/AGCCCTGATAGAGCACAGA
OC12/SLC22A2	ATACAGTTGGGCTCCTGGTG/GAGGC6GGTAGAGATTTTCC
Ahr	AGTTATCCTGGCCTCCGTTT/TCAGTTCTTAGGCTCAGCGTC
CAR	AGTTGCACAGGTGTTTGGTG/GTGCCTTAGATGCTGGCATGA
PXR	TCCGGAAAGATCTGTGCTCT/AGGGAGATCTGGTCTCGAT
LXR α	TGGGGTTGATGAATTCAC/ GGTACAACCTGGGAGTGAG
SHR	ACTTCACACAGCACCCAGTG/AGGGACCATCCTCTTCAACC
FXR	CACAGCGTTTTTGGTAATGC/TTGTTTGTGGAGACAGAGCCT
RXR α	TGTCATCAGGCAGTCCTTG/GAGTGTACAGCTGCGAGGG
GR	TGTTGTTGCTGTTGAGGAGC/TTCCCTGGTCCGAACAGTTTT
PPARA	AGAGTGGGCTTCCGTGTC/GCCGCCCTCAGGTACAGTAG

Table 1 List of Taqman probes and primers used in this study

Antigen	Type	Company
Alpha-1-Fetoprotein	rabbit	DAKO
ASGR1	goat	Santa Cruz Biotechnoogy
ALB	goat	Bethyl
T	goat	R&D Systems
CXCR4	mouse	R&D Systems
CYP2D6	goat	Santa Cruz Biotechnology
CYP3A4	goat	Santa Cruz Biotechnology
CYP7A1	goat	Santa Cruz Biotechnology
α AT	rabbit	DAKO

Table 2 List of antibodies used in this study