

201208024A

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24年度 研究報告書

研究代表者 水口裕之

平成25(2013)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24年度 研究報告書

研究代表者 水口裕之

平成25（2013）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	-----	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）		

ヒトiPS細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発	-----	23
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	-----	42
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	-----	44
---------------------	-------	----

### 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

研究代表者 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す、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、肝成熟化（肝幹前駆細胞から肝細胞への分化）を三次元培養条件下で行うことにより、ヒト iPS 細胞由来肝細胞をさらに成熟化させ、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のより広範な毒性評価系への応用、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 ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、ナノピラープレートを用いた三次元培養を行うことで、促進できることを明らかにした。
- ② ナノピラープレートを用いた三次元培養法と昨年度までに報告した肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。
- 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しての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

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す、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

**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

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、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を行う。

## B. 研究方法

本研究は、研究代表者水口、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、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 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発、および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、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

ナノピラープレートを用いた三次元培養法と昨年度までに報告した肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。今後、新たな三次元培養法・共培養法の開発ならびに新規肝成熟化因子の同定とその過剰発現などを行うことにより、分化誘導肝細胞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、ナノピラープレートを用いた三次元培養を行うことで、促進できることを明らかにした。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しての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

我々は昨年度までに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に、FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって、薬物代謝能を有する分化誘導肝細胞を作製した。しかしながら、FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入して作製した分化誘導肝細胞の薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞と比較して、数%から 40%程度であり、より薬物代謝能の高い分化誘導肝細胞の作製技術の開発が必要であった。本年度は、ナノピラープレートを用いた三次元培養法を用いて、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化および薬物代謝能の向上を目指した。

ナノピラープレート上で、分化誘導肝細胞の肝成熟化を促進させるために、細胞播種密度・使用する培地・作用させる液性因

子などの様々な条件を検討した。ナノピラープレート上で、スフェロイド形成させるためには  $2.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>以上の細胞密度が必要であった。我々の過去の検討から、ヒト ES/iPS 細胞由来肝幹前駆細胞を matrigel コートされた細胞に播種する場合（平面培養時）、 $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で十分であることから、スフェロイド形成させるためには、平面培養時よりの 2 倍量程度の細胞を必要とする。また、スフェロイド形成させるために、肝幹前駆細胞を  $5.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種したところ、スフェロイドの形成は確認されたが、*CYP3A4* および *2C9* の遺伝子発現量は低かった。細胞播種密度が高い場合は 100  $\mu$ m 以上のスフェロイドが形成され、すべての細胞に栄養成分や酸素が行き届かないために、*CYP* 遺伝子発現などの肝機能が低下したものだと考えられる。ナノピラープレート上で分化誘導肝細胞の成熟化させる培地は HCM が最適であった。平面培養時においても HCM を使用しており、スフェロイド形成に特化した培地を使用する必要はない。ナノピラープレート上で肝成熟化させる過程（計 23 日間培養；培養 12~35 日目）において、前半の 13 日間は HGF、OsM、DEX、FGF4 を作用させ、後半の 10 日間は OsM、DEX を作用させることによって、最も肝マーカーである *ALB* の遺伝子発現量が高かった。肝成熟化前半の 13 日間では、成熟化を促進する液性因子など（HGF、OsM、DEX）に加えて、細胞増殖シグナルを活性化する液性因子である FGF4 が必要であった。これはスフェロイドが効率良く形成されるには高い細胞増殖活性が必要であるためだと推察される。

平面培養あるいは三次元培養で作製された分化誘導肝細胞の肝マーカー遺伝子の発現を継時的に調べた結果、平面培養時は培養 20 日目をピークとして、急速に減少したが、三次元培養時は培養 35 日目まで肝マーカー遺伝子（アルブミン）の発現量は上昇し続けた。したがって、長期間に渡って分化誘導肝細胞の肝機能を維持するためには、三次元培養条件における細胞間相互作用などが重要な役割を果たすことが示唆される。また、培養 20~35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞は約 80-90% 以上 ASGR1 陽性であったことから、三次元培養条件下で胆管上皮細胞への分化および分化転換がほとんど起きていないと考えられる。本技術で作製したスフェロイドは高純度の肝細胞集団であることから、ほぼ均一な細胞集団を必要とする毒性スクリーニングなどに応用できる可能性がある。

これまでの肝分化誘導法と本研究の肝分化誘導法で作製した分化誘導肝細胞の各種肝機能を比較した結果、本研究の分化誘導法の方がより肝機能の高い分化誘導肝細胞を作製できることが示された。三次元培養することによって、薬物代謝において重要な役割を担う *CYP1A2* や *CYP2C19* などの遺伝子発現量は上昇したが、胎児肝マーカーである *CYP3A7* の遺伝子発現量も上昇したことから、本研究において作製した分化誘導肝細胞はいまだ胎児型肝細胞であることが示唆される。また、三次元培養で作製された分化誘導肝細胞は微細胆管構造を有している可能性が確認された。したがって、今後は BSEP、FIC1、MDR3 欠損などの原因によって、微細胆管構造が形成されにくい進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者から

iPS細胞を作製し、肝細胞へ誘導することで、新たな疾患モデル細胞を構築できるとともに、新規治療薬の開発に繋がると期待される。

また、ナノピラープレートを用いた三次元培養で作製されたヒト iPS 細胞由来肝細胞 (3D iPS-hepa 細胞) の CYP 活性および誘導能は、いずれも、単層培養で作製されたヒト iPS 細胞由来肝細胞 (mono iPS-hepa 細胞) よりも高かった。3D iPS-hepa 細胞は mono iPS-hepa 細胞と比較して、約 2 倍以上の期間培養しているため、CYP タンパクがより多く蓄積することで、CYP 活性が上昇したと考えられる。しかしながら、3D iPS-hepa 細胞の CYP 活性および誘導能はいずれもヒト初代培養肝細胞よりも低かった。以上のことから、三次元培養法を用いることによって、分化誘導肝細胞の CYP 活性および誘導能を有意に高めることができるものの、大幅な改善は見られないことが分かった。

3D iPS-hepa 細胞の CYP 活性は mono iPS-hepa 細胞よりも高かったため、肝毒性を示す化合物に対する感受性も高いのではないかと考え、8 種類の化合物をそれぞれの細胞に作用させた。その結果、3D iPS-hepa 細胞の方が肝毒性化合物を作用させることで、より強い細胞毒性を生じた。Desipramine や Nefazodone などについては、mono iPS-hepa 細胞ではほとんど細胞毒性が観察されなかったが、3D iPS-hepa 細胞では非常に強い細胞毒性がみられた。三次元培養することによって、分化誘導肝細胞の CYP 活性は約 2 倍程度の上昇しか見られなかったのに対して、一部の肝毒性化合物に対する感受性が大幅に高まった理由として、その薬物の反応性代謝物の抱合・排泄に関与する第二相抱合酵素・トランスポーターの発現が低下したことが一因として考えられる。

本研究にて作製した 3D iPS-hepa 細胞は HepG2 細胞よりも肝毒性化合物に対する感受性が高かった。3D iPS-hepa 細胞を用いてさらに感度良く肝毒性化合物による細胞毒性を検出するためには、CYP の活性を上昇させる必要がある。これまでに HepG2 細胞において、細胞保護作用のある第二相抱合酵素の発現をブチオニンスルホキシミン (BSO) を用いて低下させることで、肝毒性化合物への感受性が高まることが報告されている。また、3D iPS-hepa 細胞の電子伝達系が正常であるならば、3D iPS-hepa 細胞において発現が不足している CYP 群を過剰発現させることによって、より肝毒性化合物による細胞毒性を高感度に検出できる可能性がある。

また、3D iPS-hepa 細胞に肝毒性化合物を作用させることによる細胞毒性は CYP による代謝を介したものである。したがって、本研究における肝毒性化合物による細胞毒性は、非特異的な細胞毒性でなく、CYP を発現する細胞に特異的な現象であるといえる。本研究では、肝毒性化合物に対する応答能の評価として細胞毒性を調べたが、今後はミトコンドリアにおける毒性、脂質代謝の異常、尿素サイクルの異常などについても検討する予定である。

さらに、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

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、ナノピラプレートを用いた三次元培養を行うことで、促進できることを明らかにした。また、ナノピラプレートを用いた三次元培養法と昨年度までに報告した肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。今後、新たな三次元培養法・共培養法の開発ならびに新規肝成熟化因子の同定とその過剰発現などを行うことにより、分化誘導肝細胞のさらなる肝成熟化の促進が期待される。

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。



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 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う。昨年度までに、ヒト 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。しかしながら、ヒト iPS 細胞由来肝細胞におけるシトクロム P450 (CYP) 1A2、CYP3A4、CYP2C9 などの酵素活性はヒト初代培養肝細胞よりも低かったため、さらなる成熟化が必要であった。本年度は、肝成熟化(肝幹前駆細胞から肝細胞への分化)を三次元培養条件下で行うことにより、ヒト iPS 細胞由来肝細胞をさらに成熟化させ、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のより広範な毒性評価系への応用を目指した。我々は三次元培養を行うために、ナノピラープレート(株式会社 日立ハイテクノロジーより供与)を用いた。その結果、三次元培養で作製されたヒト iPS 細胞由来肝細胞(3D iPS-hepa 細胞)は単層培養で作製されたヒト iPS 細胞由来肝細胞(mono iPS-hepa 細胞)に比べて、高い CYP2C9 および CYP3A4 活性を示した。また、Rifampicin による CYP2C9 および CYP3A4 の誘導能についても、3D iPS-hepa 細胞の方が高かった。ヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物毒性評価系へ応用できる可能性を検討するために、Acetaminophen や Benzbromarone などの肝毒性を生じることが知られる化合物(肝毒性化合物)を mono iPS-hepa 細胞および 3D iPS-hepa 細胞に作用させたところ、3D iPS-hepa 細胞の方がより強い細胞毒性が観察された。薬物毒性評価系に肝がん由来細胞である HepG2 細胞が用いられることがあるため、3D iPS-hep 細胞および HepG2 細胞の肝毒性化合物(合計 22 種類)に対する感受性を比較したところ、ほとんどの化合物について 3D iPS-hep 細胞の方がより強い細胞毒性を示した。また、3D iPS-hep 細胞での肝毒性化合物による細胞毒性は CYP 阻害剤によって減弱することから、細胞毒性は CYP を介したものであることが確認された。以上のことから、ナノピラープレートを用いて肝成熟化させることで、ヒト iPS 細胞から CYP 活性の高い肝細胞を作製できるだけでなく、多くの肝毒性化合物に対する感受性を持つヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製可能であった。

## 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

### A. 研究目的

薬物によって誘発される肝障害は、医薬品候補化合物の開発中止や医薬品の市場撤退の主な原因の1つである。現在は、ヒト初代培養肝細胞（ヒト凍結肝細胞を含めてヒト初代培養肝細胞と表記する）を用いた *in vitro* 毒性評価系で肝毒性を起こす医薬品候補化合物を創薬研究の早期段階において同定し、医薬品開発の効率および安全性を高めることが行われている。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞は高価であり、培養後急速に薬物代謝酵素をはじめとする肝機能が減弱すること、ロット差も大きい（高機能な肝細胞ロットの）安定供給が困難であるといった問題点を有する。そこで、ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem (iPS)) 細胞から分化誘導した肝細胞（分化誘導肝細胞）が、ヒト初代培養肝細胞の代替ソースとして期待されている。昨年度までに、ヒト 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。本年度は、肝成熟化（肝幹前駆細胞から肝細胞への分化）をナノピラープレートを用いた三次元培養条件下で行うことにより、分化誘導肝細胞をさらに成熟化させ、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のより広範な毒性評価系への応用を目指した。

### B. 研究方法

#### B-1. アデノウイルス (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、EF1 $\alpha$  プロモーター制御下でヒト forkhead box protein A2 (FOXA2) および hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 $\alpha$ ) を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-FOXA2、pHMEF5-HNF1 $\alpha$  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 (pAdHM41K7) に挿入することにより、pAdHM41K7-EF-LacZ、pAdHM41K7-EF-FOXA2、pAdHM41K7-EF-HNF1 $\alpha$  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、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いてヒト胎児腎細胞由来細胞である HEK293 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-HNF1 $\alpha$  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 iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 Dotcom (国立生育医療センター梅澤明弘教授から供与) は 10

ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学工業社)を含む iPS 細胞用培地である iPSellon (カルディオ社)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、ミリポア社)上で培養した。4-6 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼ (Roche 社)を用いてヒト iPS 細胞のコロニーを回収した後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

### B-3. ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト 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 (MK. Furue 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 cell detachment solution (日本ベクトン・ディッキンソン社)を用いてヒト iPS 細胞で細胞を剥離したのち回収し、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 霊長類 ES 細胞用分化誘導基礎培養液である hESF-DIF (株式会社細胞科学研究所))に懸濁後、50 µg/cm<sup>2</sup> Matrigel (日本ベクトン・ディッキンソン社)でコーティングした細胞培養用マルチプレート(12 ウェルプレート) (住友ベークライト社)の各ウェルに 6.25×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種したのち、2 日間培養した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞由来中内胚葉 (培養 2 日目) か

ら内胚葉への分化誘導を行う場合は、ヒト iPS 細胞を上記の方法で中内胚葉まで培養し、各 Ad ベクター(AdK7-EF-FOXA2)を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で 90 分間作用させた。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。その後、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いて毎日培地交換を行い、5 日目まで培養した。

### B-4. 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来内胚葉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分化誘導した内胚葉 (培養 5 日目) を、0.05% trypsin-0.053 mM EDTA で細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、50 µg/cm<sup>2</sup> Matrigel でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 ウェルプレート) の各ウェルに 1.25×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。継代した翌日に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1a) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で 90 分間作用させたのち、20 ng/ml FGF4 (R&D systems 社)、30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D systems 社) を含む HCM Hepatocyte Culture Medium (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. ナノピラープレートを用いた肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆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、AdK7-EF-HNF1 $\alpha$ ) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で 90 分間作用させた後、10 ng/ml FGF1、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10、10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (すべて 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 を用いて細胞を剥離したのち回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF (すべて 10 ng/ml の濃度で使用) を含む HCM に懸濁後、20  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Matrigel でコーティングした日立ナノピラー細胞培養 12 ウェルプレート (日立ハイテクノロジー社) の各ウェルに 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> 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 90 分間作用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems 社)、10 ng/mL FGF4、10<sup>-6</sup> M Dexamethazone (DEX、Sigma 社) を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、13 日間 (培養 12 日目から培養 25 日目まで) 培養した。分化誘導肝細胞をさらに成熟化させるため、Matrigel を分化誘導肝細胞の上に重層化させた。0.25 mg/mL Matrigel、4 mM L-Glutamine、50  $\mu$ g/mL gentamycin sulfate、1 $\times$ ITS (BD Biosciences 社)、20 ng/mL OsM、10<sup>-6</sup> M DEX を含む William's E Medium (Invitrogen 社) (以下、Matrigel Working Solution とする) を 4 $^{\circ}$ C で作製した。培養 25 日目の各 well に対して、1 mL の Matrigel Working Solution を添加し、24

時間培養した。培養 26 日目に余分な Working Solution を除去したのち、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems 社)、10<sup>-6</sup> M Dexamethazone (DEX、Sigma 社) を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、9 日間 (培養 26 日目から培養 35 日目まで) 培養した。なお、単層培養で分化誘導肝細胞を作製する場合は、我々の過去の報告 (K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.) にしたがって作製した。

#### 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 (ロット: Hu8072)) もしくは Xenotech 社 (ロット: HC2-14 および HC10-101) は 15  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> type I-A collagen (新田ゼラチン社) をコートした細胞培養用 12 ウェルプレートの各ウェルに 1.2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で 10% FCS (GIBCO-BRL 社) を含む HCM で播種したのち、6 時間後に一度上記培地で培地交換し、合計 48 時間培養した。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. 免疫抗体染色法

12 (あるいは 24) ウェルプレートにて培

養した各細胞を 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 分処理したのち、2% BSA (Sigma 社)、0.2% Triton X-100 (Sigma 社) を含む 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、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen 社) 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 BZ-9000、キーエンス社) にて観察した。

#### B-8. アルブミン・尿素産生能の評価

分化誘導肝細胞および 48 時間培養したヒト初代培養肝細胞について、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量を Human Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories 社)、産生された尿素量を QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems 社) を用いて測定した。アルブミンおよび尿素産生量は総タンパク量で補正した。なお、総タンパク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific 社) を用いた。

#### B-9. CYP 活性測定法

B-3~B-5 に示す方法により分化誘導されたヒト iPS 細胞由来肝細胞に 10  $\mu$ M Rifampicin (Wako 社)、または DMSO (終濃度 0.1% となるように使用; Wako 社) を作用させ、48 時間後に P450-Glo™ CYP2C9 (型番: V8791)、CYP3A4 (型番: V9001) Assay Kit (Promega 社) を

用いて 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。CYP 活性は総タンパク量で補正した。なお、総タンパク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific 社) を用いた。CYP2C9 および CYP3A4 を化合物により阻害する際も、同様に P450-Glo™ CYP2C9 (型番: V8791)、CYP3A4 (型番: V9001) Assay Kit を用いた。CYP2C9 を阻害する場合は 2  $\mu$ M Sulfaphenazole (シグマ社)、CYP3A4 を阻害する場合は 1  $\mu$ M Ketoconazole を用いた。CYP 誘導化合物 (Rifampicin) を含む培地は毎日交換した。

#### B-10. 肝毒性化合物を作用させることによる細胞毒性の評価

B-3~B-5 の方法により分化誘導されたヒト iPS 細胞由来肝細胞および HepG2 細胞を Acetaminophen (Wako)、Allopurinol (Wako)、Amiodaron (Sigma)、Benzbromarone (Sigma)、Clozapine (Wako 社)、Cyclizine (MP bio 社)、Dantrolene (Wako 社)、Desipramine (Wako 社)、Disulfiram (Wako 社)、Erythromycin (Wako 社)、Felbamate (Sigma 社)、Flutamide (Wako 社)、Isoniazid (Sigma 社)、Labetalol (Sigma 社)、Lefunomide (Sigma 社)、Maprotiline (Sigma 社)、Nefazodone (Sigma 社)、Nitrofurantoin (Sigma 社)、Sulindac (Wako 社)、Tacrine (Sigma 社)、Tebinafine (Wako 社)、Tolcapone (TRC 社)、Troglitazone (Wako 社)、Zafirlukast (Cayman 社) をそれぞれ含む培地を用いて 37°C で 24 時間培養した。また、肝毒性化合物による細胞毒性が CYP を介したものであるか調べる際は、B-3~B-5 の方法により分化誘導されたヒト iPS 細胞由来肝細

胞を Aflatoxin B1 (Sigma 社)、Benzbromarone をそれぞれ CYP 阻害剤含有 (CYP2C9 を阻害する場合は 2  $\mu$  M Sulfaphenazole、CYP3A4 を阻害する場合は 1  $\mu$  M Ketoconazole を用いた) 培地を用いて 37°C で 24 時間培養した。細胞生存率は WST-8 assay kit (Dojindo 社) を用いた。細胞生存率は DMSO 作用群を 100% としている。また、ATP Assay Kit, EnzyLight (BioAssay Systems 社)、alamarBlue Cell Viability Assay (Invitrogen 社)、Crystal Violet (Wako 社) staining assay は各メーカーのプロトコールのしたがって、実施した。

### C. 研究結果

昨年度までに、我々はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に対して 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。本年度は、肝分化誘導において上述の遺伝子導入技術と三次元培養法を組み合わせることで、分化誘導肝細胞をさらなる成熟化を試みた。

B-3~B-5 に記載されたプロトコールにしたがって、三次元培養条件下で分化誘導肝細胞を作製した。3D iPS-hepa 細胞において、肝マーカーであるアルブミン (ALB) や CYP3A4 が発現しているか確認するために、免疫抗体染色を実施した (Figure 1A)。その結果、3D iPS-hepa 細胞において、ALB および CYP3A4 タンパクの発現が確認された。分化誘導肝細胞を薬物毒性評価系に応用するためには、高い CYP 活性を有している必要があるため、mono iPS-hepa 細胞と 3D iPS-hepa 細胞における CYP 活性を比較した (Figure 1B)。その結果、3D iPS-hepa 細胞の方が有意に高い CYP2C9 および CYP3A4 活性を示した。肝細胞は Rifampicin などの化合物を作用させるこ

とによって CYP mRNA および活性が上昇することが知られる。そこで、mono iPS-hep 細胞および 3D iPS-hepa 細胞における CYP 誘導能を評価したところ、3D iPS-hepa 細胞における CYP 誘導能の方が高かった (Figure 1C)。また、3D iPS-hepa 細胞における CYP2C9 および CYP3A4 の誘導は、それぞれの CYP に対する阻害剤 (CYP2C9 を阻害する場合は Sulfaphenazole、CYP3A4 を阻害する場合は Ketoconazole を用いた) を作用させることによって減弱した。以上の結果から、ナノピラープレートを用いた三次元培養系で作製した分化誘導肝細胞は、これまで使用していた平面培養系で作製した分化誘導肝細胞と比較し、高い CYP 活性および誘導能を有していることが明らかとなった。

ナノピラープレートを用いて作製した 3D iPS-hepa 細胞が薬物毒性評価系に応用できる可能性を検討するため、3D iPS-hepa 細胞を肝毒性化合物を含む培地で培養したのち、細胞生存率を評価した。細胞生存率を評価するにあたり、WST-8 法、ATP 量測定法、Alamar Blue アッセイ、Crystal Violet 染色のうちどの方法が最も感度良く肝毒性化合物による細胞毒性を検出できるか調べた (Figure 2A)。また、各評価方法において、3D iPS-hepa 細胞に 40  $\mu$  M Benzbromarone を作用させたときの、細胞生存率 (あるいは ATP 活性) を Figure 2B にまとめた。その結果、肝毒性化合物である Benzbromarone を作用させた場合、有意な差はなかったものの WST-8 法を用いることによって、高感度に細胞毒性を検出することができた。以上の結果から、以後の肝毒性化合物に対する感受性を評価する実験では WST-8 法を用いた。

Mono iPS-hepa 細胞と 3D iPS-hepa 細胞の肝毒性化合物に対する感受性を比較するため、各細胞に対して 8 つの化合物

(Acetaminophen、Benzbromarone、Desipramine、Maprotiline、Nefazodone、Nitrofurantoin、Imipramine、Cyclosporin A)を様々な濃度で作用させた(Figure 3)。その結果、6つの化合物(Acetaminophen、Benzbromarone、Desipramine、Maprotiline、Nitrofurantoin、Cyclosporin A)について、3D iPS-hepa細胞の方が有意に強い細胞毒性が生じた。以上の結果から、3D iPS-hepa細胞はmono iPS-hepa細胞に比べてより広範の薬物毒性評価系に応用できる可能性が示唆された。

薬物が肝細胞の薬剤代謝酵素に代謝されることによって生成される反応性代謝物は、肝細胞の毒性を引き起こす場合があることが知られる。薬物の反応性代謝物による肝細胞毒性を予測するために、ヒト初代培養肝細胞を用いたhigh content analysisなどの各種解析が実施されているが、ヒト肝がん由来細胞であるHepG2細胞を用いた解析も汎用されている。HepG2細胞はヒト初代培養肝細胞と比較し、多くのCYP活性が劣っているものの、非常に安価であり、ほぼ無限に増殖でき、均質であるため、現在も創薬過程における薬物毒性評価系への適用が試みられている。そこで、本研究で作製した3D iPS-hepa細胞はHepG2細胞と比較して薬物毒性評価への応用に適しているかどうか調べるため、肝毒性化合物22種類を各細胞に作用させたのち、細胞毒性を評価した(Figure 4)。その結果、22化合物中18化合物について、3D iPS-hepa細胞の方がHepG2細胞より強い細胞毒性を生じた。なお、本研究ではHepG2細胞はナノピラープレート上でスフェロイド形成させたものを使用している。スフェロイド形成させたHepG2細胞(3D HepG2)は平面培養時よりも各種肝機能が高いことを確認している(Figure 5)。

肝毒性化合物を3D iPS-hepa細胞に作用

させることで生じる細胞毒性が、CYPを介したものであることを確認するために、以下に示す実験を行った。CYP3A4によって代謝されることで肝毒性を生じることが知られるAflatoxin B1をCYP3A4阻害剤であるKetoconazoleを併用した条件で、3D iPS-hepa細胞に作用させたのち、細胞毒性を評価した(Figure 6A)。また、CYP2C9によって代謝されることで肝毒性を生じることが知られるBenzbromaroneをCYP2C9阻害剤であるSulfaphenazoleを併用した条件で、3D iPS-hepa細胞に作用させたのち、細胞毒性を評価した(Figure 6B)。その結果、Aflatoxin B1、Benzbromaroneのいずれを作用させた場合においても、CYP阻害剤を併用することで、3D iPS-hepa細胞における細胞毒性が軽減した。以上のことから、3D iPS-hepa細胞における肝毒性化合物により細胞毒性はCYPを介することが示された。

#### D. 考察

本年度は、肝成熟化(肝幹前駆細胞から肝細胞への分化)をナノピラープレートを用いた三次元培養条件下で行うことにより、分化誘導肝細胞をさらに成熟化させること、ならびに、より広範な毒性評価系へ応用することを目指した。3D iPS-hepa細胞のCYP活性および誘導能は、いずれもmono iPS-hepa細胞よりも高かった(Figure 1)。3D iPS-hepa細胞はmono iPS-hepa細胞と比較して、約2倍以上の期間培養しているため、CYPタンパクがより多く蓄積することで、CYP活性が上昇したと考えられる。しかしながら、3D iPS-hepa細胞のCYP活性および誘導能はいずれもヒト初代培養肝細胞よりも低かった。以上のことから、三次元培養法を用いることによって、分化誘導肝細胞のCYP活性および誘導能を有意に高めることができるものの、大幅な改善

は見られないことが分かった。

3D iPS-hepa 細胞の CYP 活性は mono iPS-hepa 細胞よりも高かったため、肝毒性を示す化合物に対する感受性も高いのではないかと考え、Figure 3 に示す 8 種類の化合物をそれぞれの細胞に作用させた。その結果、3D iPS-hepa 細胞の方が肝毒性化合物を作用させることで、より強い細胞毒性を生じた。Desipramine や Nefazodone などについては、mono iPS-hepa 細胞ではほとんど細胞毒性が観察されなかったが、3D iPS-hepa 細胞では非常に強い細胞毒性がみられた。三次元培養することによって、分化誘導肝細胞の CYP 活性は約 2 倍程度の上昇しか見られなかったのに対して、一部の肝毒性化合物に対する感受性が大幅に高まった理由として、その薬物の反応性代謝物の抱合・排泄に関与する第二相抱合酵素・トランスポーターの発現が低下したことが一因として考えられる。

本研究にて作製した 3D iPS-hepa 細胞は HepG2 細胞よりも肝毒性化合物に対する感受性が高かった (Figure 4)。3D iPS-hepa 細胞を用いてさらに感度良く肝毒性化合物による細胞毒性を検出するためには、CYP の活性を上昇させる必要がある。これまでに HepG2 細胞において、細胞保護作用のある第二相抱合酵素の発現をブチオニンスルホキシミン (BSO) を用いて低下させることで、肝毒性化合物への感受性が高まることが報告されている。また、3D iPS-hepa 細胞の電子伝達系が正常であるならば、3D iPS-hepa 細胞において発現が不足している CYP 群を過剰発現させることによって、より肝毒性化合物による細胞毒性を高感度に検出できる可能性がある。

Figure 6 に示されるように、3D iPS-hepa 細胞に肝毒性化合物を作用させることによる細胞毒性は CYP による代謝を介したものである。したがって、本研究

における肝毒性化合物による細胞毒性は、非特異的な細胞毒性でなく、CYP を発現する細胞に特異的な現象であるといえる。本研究では、肝毒性化合物に対する応答能の評価として細胞毒性を調べたが、今後はミトコンドリアにおける毒性、脂質代謝の異常、尿素サイクルの異常などについても検討する予定である。

## E. 結論

ナノピラープレートを用いた三次元培養法と昨年度までに報告した肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。今後、新たな三次元培養法・共培養法の開発ならびに新規肝成熟化因子の同定とその過剰発現などを行うことにより、分化誘導肝細胞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) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- 2) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T.,



- 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*, 33, 4526-4534 (2012)
- 3) 水口裕之、高山和雄、長基康人、川端健二：ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用、*医薬品レギュラトリーサイエンス*、43、982-987(2012)
- 4) 早川堯夫、水口裕之：ヒトiPS細胞の再生医療及び創薬研究への応用の現状と展望、*Brain and Nerve*、64、47-57 (2012)
- 5) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawae T., Furue MK., Mizuguchi H., 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 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.*, S-10-002 (2012).
- 7) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用、*組織培養研究*、印刷中
- 8) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒトES/iPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその創薬応用、*最新医学*、68、141-144 (2013)
- 9) 川端健二、高山和雄、水口裕之：ヒト iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発、*BIO INDUSTRY*、30、19-24 (2013)
2. 学会発表
- 1) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by transduction of FOXA2 and HNF1 $\alpha$ , International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 神奈川, 2012年6月

- 2) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Tachibana M., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 神奈川, 2012年6月
- 3) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、SOX17、HEX、HNF4 $\alpha$ 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導、第85回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月
- 4) 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、Swiss 3T3細胞との積層3次元共培養下におけるヒトES/iPS細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析、第85回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月
- 5) 高山和雄、川端健二、稲村 充、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、c/EBP $\alpha$ およびc/EBP $\beta$ 遺伝子によるTGFBR2遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定、第19回大会肝細胞研究会、北海道、2012年6月
- 6) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江-楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞のSwiss 3T3細胞との積層3次元共培養下における成熟化・促進機構の解析、第19回肝細胞研究会、北海道、2012年6月
- 7) 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-楠田美保、水口裕之、FOXA2およびHNF1 $\alpha$ 遺伝子導入によるヒトES/iPS細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導、第39回日本毒性学会学術年会、宮城、2012年7月
- 8) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江-楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒトES/iPS細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子HEXの機能解明、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、兵庫、2012年10月
- 9) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction, 第27回日本薬物動態学会年会、千葉、2012年11月

10) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、ヒトES/iPS細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子HEXの機能解明、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日

11) 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、Nanopillarプレートを用いたヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用、第12回日本再生医療学会総会、神奈川、2013年3月

12) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、転写因子HEXによるヒトES/iPS細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化機構の解明、第12回日本再生医療学会総会、神奈川、2013年3月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

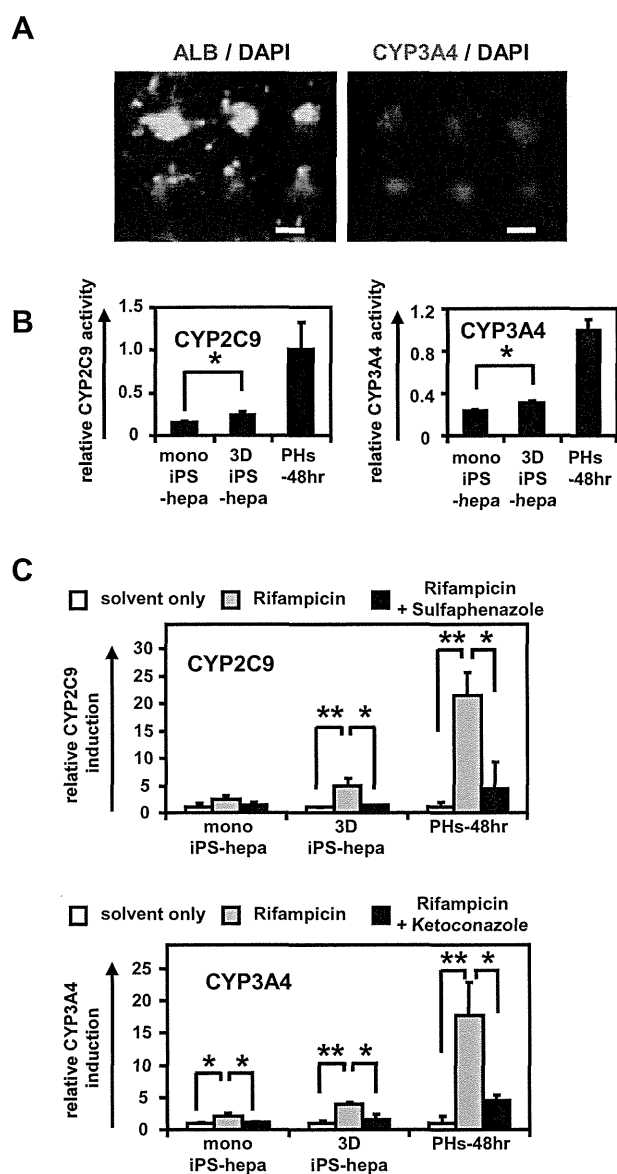
### 1. 特許取得

1) 水口裕之、川端健二、高山和雄(発明人)、幹細胞から肝細胞への分化誘導方法、特願2012-128872号

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

Figure 1



**Figure 1 Drug metabolism capacity and CYP induction potency were examined in the 3D iPS-hepa.** (A) The 3D iPS-hepa (day 35) were subjected to immunostaining with anti-ALB (green) or CYP3A4 (red) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar represents 100  $\mu$ m. (B) The CYP activity was measured in the mono iPS-hepa (day 20), the 3D iPS-hepa (day 35), and PHs-48hr. On the y axis, the CYP activity in PHs-48hr was taken as 1.0. (C) Induction of CYP2C9 (left) or CYP3A4 (right) by DMSO (solvent only; white bar), Rifampicin (gray bar), or rifampicin and CYP inhibitor (Sulfaphenazole or Ketoconazole, black bar) in the mono iPS-hepa, the 3D iPS-hepa, and PHs-48hr. On the y axis, the CYP activity of the cells that have been cultured in DMSO-containing medium was taken as 1.0. \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01.