

Figure 2

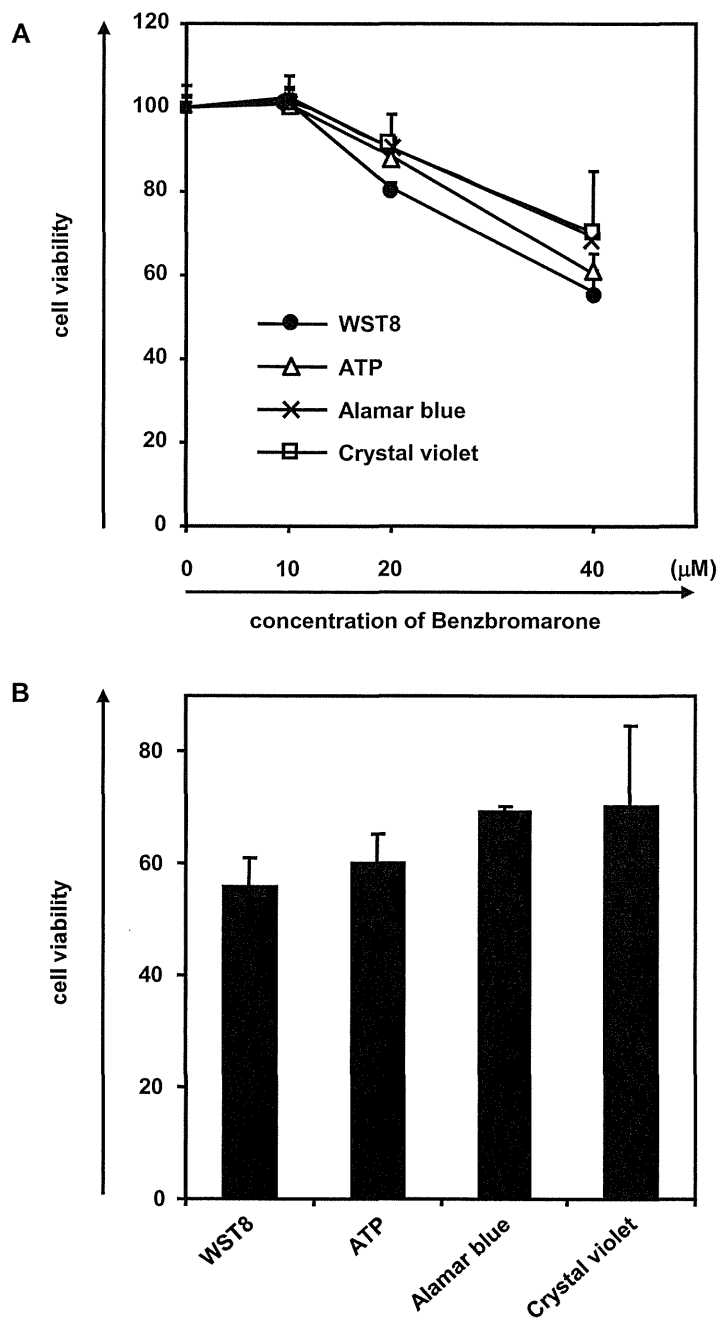


Figure 2 WST-8 assay was the most sensitive method for detecting the drug-induced cytotoxicity. (A) The cell viability of 3D iPSC (Dotcom)-hepa (day 35) was assessed by WST-8, ATP, Alamar blue, or Crystal violet assay after 24 hr exposure to different concentrations (or 40 μM (B)) of Benzbromarone. The cell viability is expressed as the percentage of cells treated with solvent only.

Figure 3

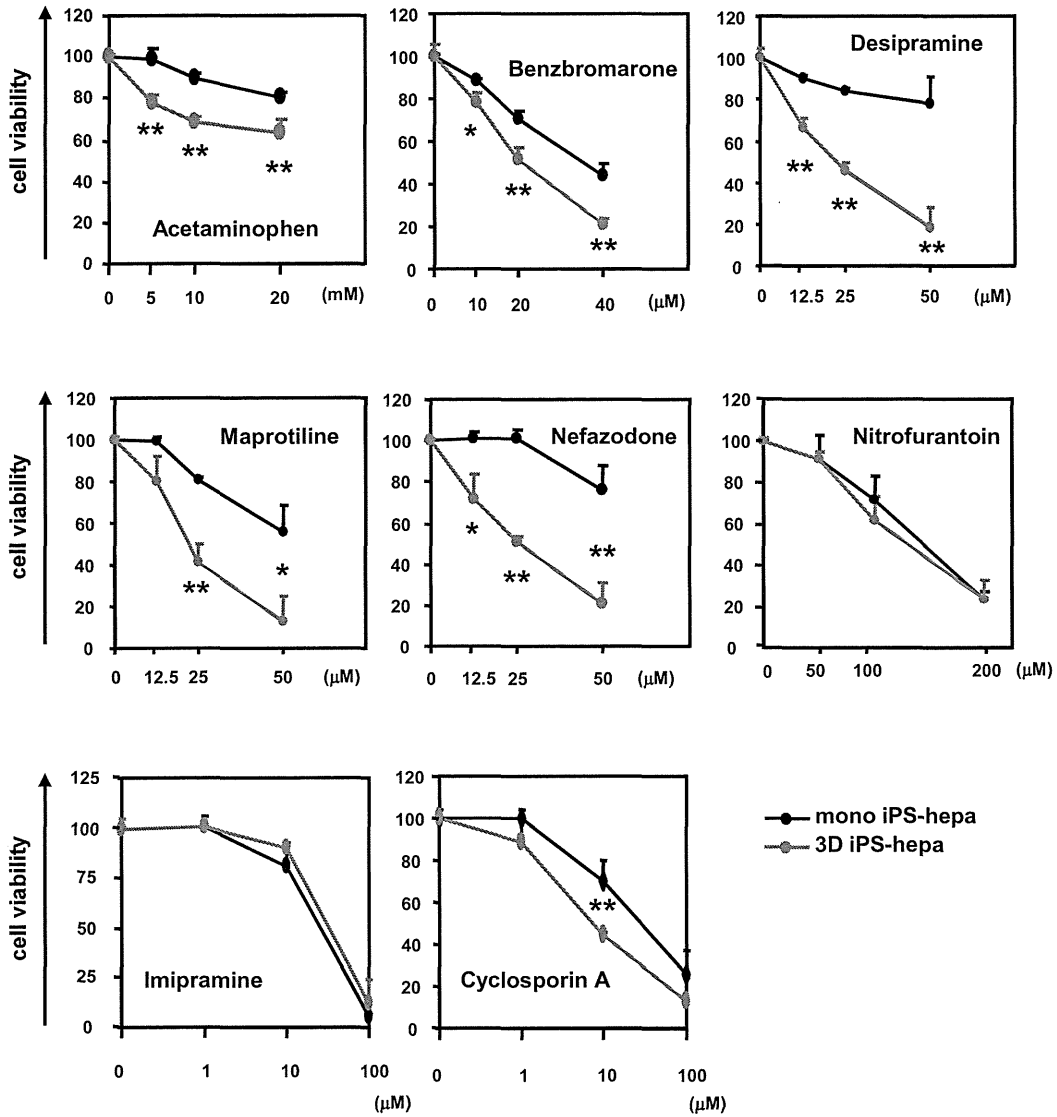


Figure 3 The drug-induced cytotoxicity was more sensitively detected in the 3D iPS-hepa than in the mono iPS-hepa.

On day 11, the hiPSC (Dotcom)-derived cells were plated onto the Nanopillar Plate or the flat plate, and then the cells were cultured until day 35. The cell viability of 3D iPS-hepa was assessed by WST-8 assay after 24 hr exposure to different concentrations of drugs. Cell viability is expressed as a percentage of cells treated with solvent only.

Figure 4

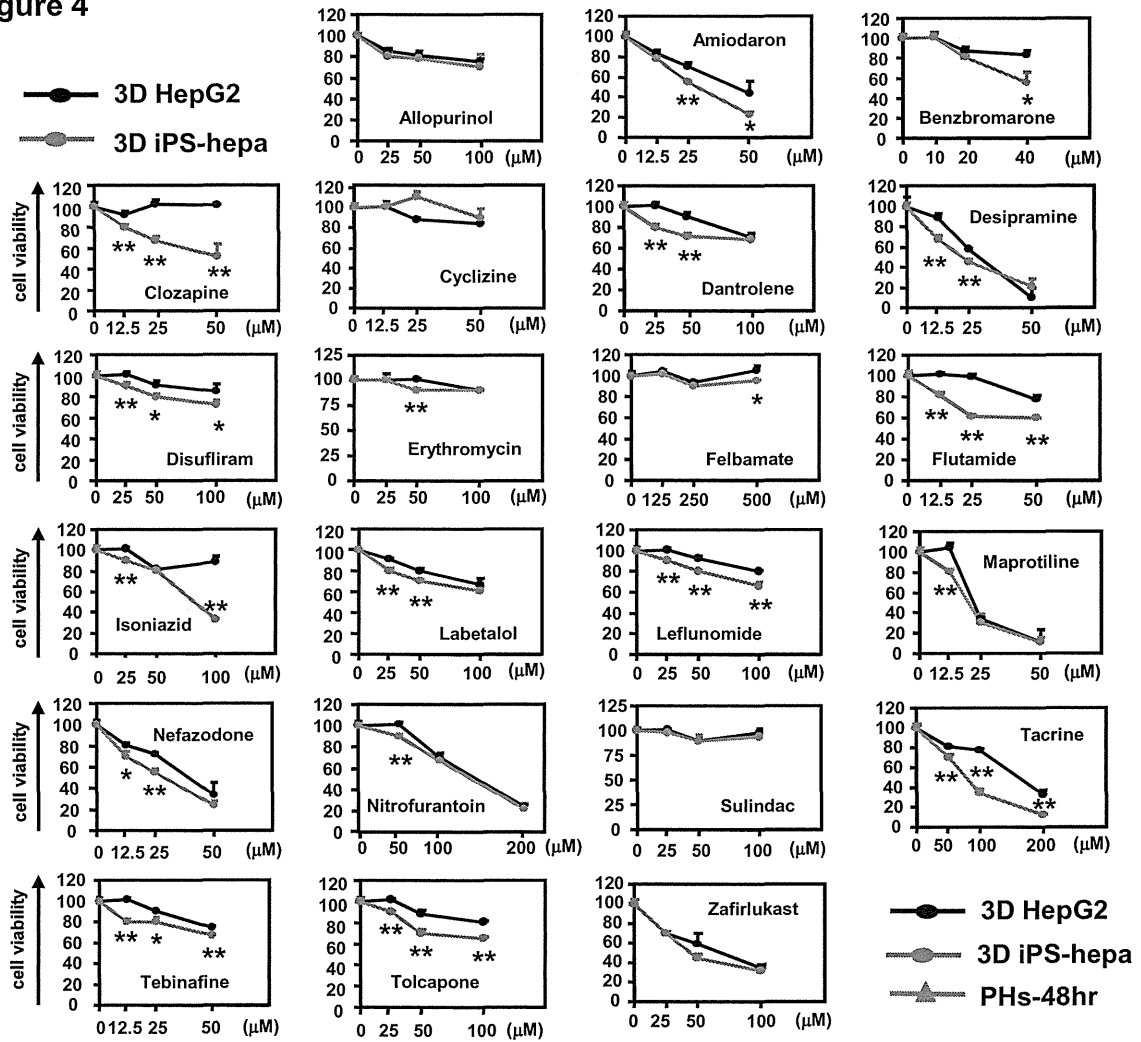


Figure 4 The possibility of applying 3D iPS-hepa to drug testing was examined.

The cell viability of the 3D HepG2 (black) and 3D iPS-hepa (red) were assessed by WST-8 assay after 24 hr exposure to different concentrations of 22 test compounds. Cell viability is expressed as a percentage of cells treated with solvent only. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (The data of 3D iPS-hepa was compared with that of 3D HepG2).

Figure 5

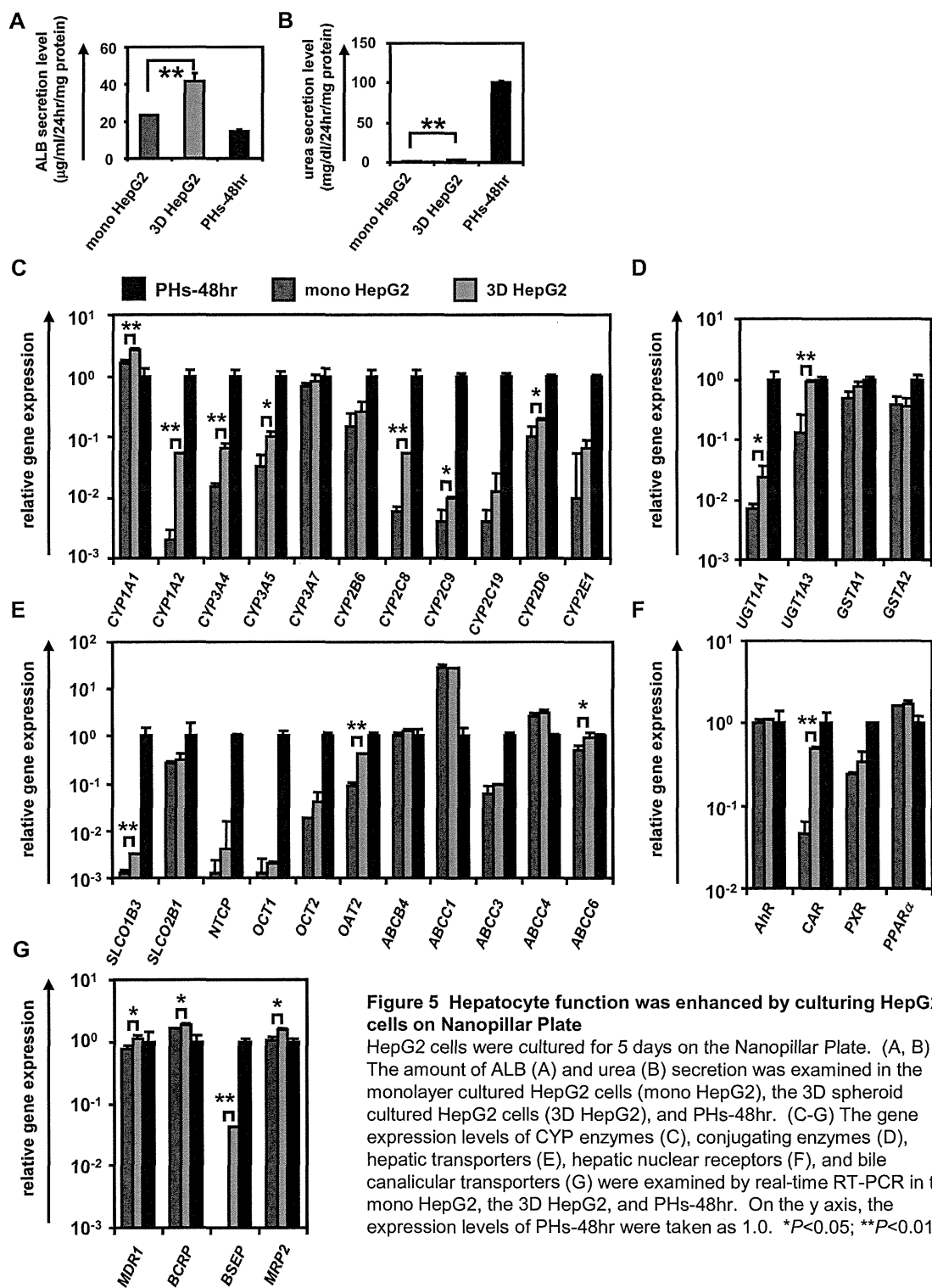
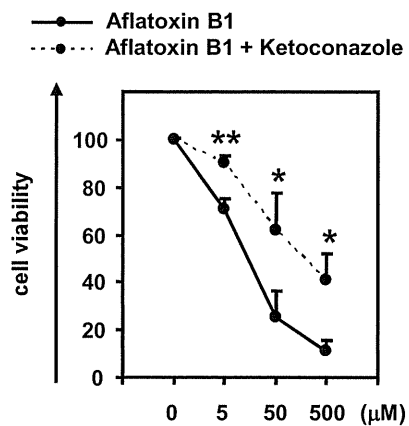


Figure 5 Hepatocyte function was enhanced by culturing HepG2 cells on Nanopillar Plate
HepG2 cells were cultured for 5 days on the Nanopillar Plate. (A, B) The amount of ALB (A) and urea (B) secretion was examined in the monolayer cultured HepG2 cells (mono HepG2), the 3D spheroid cultured HepG2 cells (3D HepG2), and PHs-48hr. (C-G) The gene expression levels of CYP enzymes (C), conjugating enzymes (D), hepatic transporters (E), hepatic nuclear receptors (F), and bile canalicular transporters (G) were examined by real-time RT-PCR in the mono HepG2, the 3D HepG2, and PHs-48hr. On the y axis, the expression levels of PHs-48hr were taken as 1.0. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Figure 6

A



B

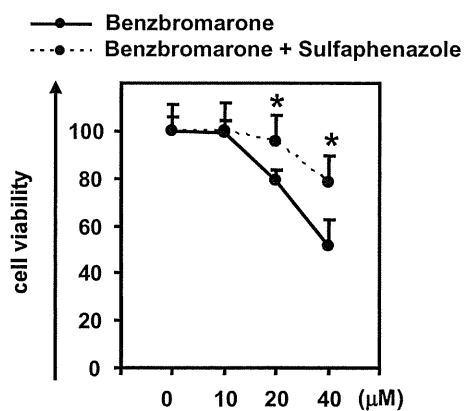


Figure 6 Drug-induced cytotoxicity in the 3D iPSC-hepa is mediated by cytochrome P450

(A, B) The cell viability of the 3D iPSC-hepa was assessed by WST-8 assay after 24 hr exposure to different concentrations of (A) Aflatoxin B1 and (B) Benzbromarone in the presence or absence of the CYP3A4 or 2C9 inhibitor, Ketoconazole or Sulfaphenazole, respectively. Cell viability was expressed as the percentage of cells treated with solvent only. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

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の開発を目的とする。我々は昨年度、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子をヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に対して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、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞（分化誘導肝細胞）のシトクロム P450 (CYP) 1A2、CYP3A4、CYP2C9 などの酵素活性がヒト初代培養肝細胞よりも劣っていたため、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化が必要であった。過去にヒト初代培養肝細胞を用いた検討では、スフェロイドを形成させることで、その肝機能が向上することが報告されている。そこで本年度は、肝成熟化（肝幹前駆細胞から肝細胞への分化）をこれまで用いていた単層培養条件下でなく三次元培養条件下で行うことにより、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化を目指した。我々は三次元培養を行うために、ナノ技術により底面に微細な凹凸構造（ナノピラー）を持つ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。ヒト ES/iPS 細胞由来肝幹前駆細胞をナノピラープレートに播種し、hepatocyte growth factor や oncostatin M などの液性因子を作用させることで肝成熟化を行った。その結果、昨年度までの単層培養の肝分化誘導法と比較して、より高い肝機能（各種肝関連遺伝子発現、アルブミン産生能、尿素産生能など）を有した分化誘導肝細胞の作製が可能になった。以上のことから、ナノピラープレートを用いて肝成熟化を行うことで、効率良く高い肝機能を有した分化誘導肝細胞を作製できることが明らかになった。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。

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

A. 研究目的

創薬過程において、新薬の開発費として多額の予算と長期に及ぶ非臨床・臨床試験を要する。この過程を迅速化させ、低コスト化させるための新たな技術のひとつとして、ヒト人工多能性幹細胞(human induced pluripotent stem cells ; ヒト iPS 細胞)を用いた技術が注目されている。ヒト iPS 細

胞は、ヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cells ; ヒト ES 細胞) と同様に、自己複製能と分化多能性を有する細胞であり、ヒト ES/iPS 細胞から分化させた細胞は創薬過程における薬効評価試験・毒性試験などの非臨床試験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るため、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞は新薬候補化合物の代謝や肝毒性の予測などに活用できると考えられる。しかしながら、現在のヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術では、ヒト初代培養肝細胞に類似した機能を有した肝細胞を効率良く分化誘導することが困難であった。そのため、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導技術の開発が急務となっている。そこで、我々は三次元培養法を用いて、ヒト ES/iPS 細胞から高い肝機能を有した肝細胞への効率良い分化誘導法の開発を試みた。

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、EF1 α 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 α) を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-FOXA2、pHMEF5-HNF1 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 (pAdHM41K7) に挿入することにより、pAdHM41K7-EF-LacZ、pAdHM41K7-EF-FOXA2、pAdHM41K7-EF-HNF1 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、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 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/iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 H1 (WA01)、H9 (WA09) (WISC Bank, WiCell Research Institute) やヒト iPS 細胞株 201B6、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、片山化学工業社) を含む霊長類 ES 細胞用培地である ReproStem (リプロセル社) 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。ヒト iPS 細胞株 Dotcom、Tic、Toe は 10 ng/mL の bFGF 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 MEF 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 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 (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 ES/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/cm² 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 6.25×10⁴ cells/cm² 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 ES/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 ES/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 ES/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/cm² 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 1.25×10⁵ cells/cm² 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-HNF1α) 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 ES/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-HNF1α) 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 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 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ズ社）の各ウェルに 2.5×10^5 cells/ cm^2 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 α ）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^{-6} 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate、1 \times ITS（BD Biosciences社）、20 ng/mL OsM、 10^{-6} M DEXを含むWilliam's E Medium（Invitrogen社）（以下、Matrigel Working Solutionとする）を4 $^{\circ}\text{C}$ 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^{-6} 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 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 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 1.2×10^5 cells/ cm^2 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. フローサイトメトリー

B-3~5の方法により分化誘導された肝細胞に1 mM EDTA/PBSで細胞を剥離したのち回収した。得られた細胞に各1次抗体を4 $^{\circ}\text{C}$ で30分反応させ、続いてAlexa Fluor 488で標識した2次抗体（Molecular Probe社）を4 $^{\circ}\text{C}$ 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. 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. CLF 取り込み能の評価

分化誘導肝細胞を 5 mM choly-lysyl-fluorescein (CLF、BD Bioscience 社) を含む HCM で 30 分間培養したのち、蛍光顕微鏡を用いて観察した。CLF のトランスポーターである bile salt export pump (BSEP) を阻害する場合は、CLF を作用させる 24 時間前に、1 μ M cyclosporin A (Wako 社) を作用させた。

C. 研究結果

ナノピラープレートを用いて肝成熟化を促進するために、まず最適な細胞播種密度を検討した。研究方法B-3 およびB-4 に準じて培養 11 日目の肝幹前駆細胞を作製したのち、様々な細胞密度でナノピラープレートに播種した。細胞播種密度が $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/cm² ではスフェロイドが形成されなかったのに対して、 2.5×10^5 cells/cm² 以上の細胞播種密度では、スフェロイドの形成が観察された (Figure 1A)。また、各細胞密度で播種したときの、各細胞の *CYP3A4* (Figure 1B) および *CYP2C9* (Figure 1C) の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。 2.5×10^5

cells/cm² の密度で播種した細胞において、最も高い *CYP3A4* および *CYP2C9* 遺伝子の発現量を示した。以上の結果から、ナノピラープレートを用いて肝成熟化を促進するためには、 2.5×10^5 cells/cm² の播種密度で肝幹前駆細胞をナノピラープレートに継代する条件が最適であることが示された。

次に、ナノピラープレートを用いた肝成熟化に適した培地を検討した。Differentiation hESF-DIF 培地、HCM、L15 培地の 3 種類の培地を用いて、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化を行った。Differentiation hESF-DIF 培地ではスフェロイドが形成されなかったのに対して、HCM あるいは L15 培地を用いることでスフェロイドの形成が観察された (Figure 2A)。また、各培地で培養したときの、各細胞の *CYP3A4* (Figure 2B) および *CYP2C9* (Figure 2C) の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。HCM で培養した細胞において、最も高い *CYP3A4* および *CYP2C9* 遺伝子発現量が確認された。したがって、ナノピラープレートを用いて肝成熟化を行うためには、HCM が最適な培地であることが明らかになった。

ナノピラープレートを用いた三次元培養系では、どの液性因子が成熟化に促進的に働くか調べた。培養 12~25 日目において、Figure 3A の condition 1~5 に示す液性因子を肝幹前駆細胞に作用させ、各細胞におけるアルブミン (*ALB*) の遺伝子発現量を調べた。その結果、この過程においては HGF、OsM、FGF4、DEX を作用させることで、最も高い *ALB* 遺伝子発現量を示した。次に、培養 25~35 日目においてはどの液性因子が肝成熟化に促進的に働くか調べた。培養 25~35 日目において、Figure 3B の condition 1~6 に示す液性因子を分化誘導肝細胞に作用させ、各細胞における *ALB* 遺伝子発現量を調べた。この過程では、OsM

と DEX を作用させることで、最も高い *ALB* 遺伝子発現量が確認された。以上の結果から、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過程前半では HGF、OsM、FGF4、DEX を、後半では OsM と DEX を作用させることで、最も肝成熟化を促進できることが明らかになった。

本研究で作製した分化誘導肝細胞を毒性評価などに応用する場合、スフェロイドに肝細胞が高純度で含まれている必要があるため、作製したスフェロイドにおける肝細胞集団の割合を肝細胞マーカーであるアシアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1) を指標に FACS を用いて調べた (Figure 4A)。その結果、培養 20 日目のスフェロイドでは 80% 程度の細胞が ASGR1 陽性細胞であり、培養 30~35 日目のスフェロイドでは 90% 程度の細胞が ASGR1 陽性細胞であった。また、平面培養時には ASGR1 陽性細胞は培養 20 日目をピーク (約 80%) とし、それ以降は ASGR1 陽性細胞は減少した。以上の結果から、平面培養系では分化誘導肝細胞を長期間維持することはできないが、ナノピラープレートを用いた三次元培養系では、非常に高い純度の肝細胞集団を作製できることが示された。スフェロイドが形成され、細胞が増殖するにつれて直径が大きくなることで、その中心部が壊死することが過去の報告で指摘されている。本研究で作製したスフェロイド型の分化誘導肝細胞 (3D ES-hepa 細胞) は 90% 以上の細胞生存率を示していた (data not shown)。また、平面培養で作製した分化誘導肝細胞 (mono ES-hepa 細胞) は培養 20 日目以降減少するのに対して、3D ES-hepa 細胞は培養 35 日目においても増加傾向を示した (Figure 4B)。以上の結果から、ナノピラープレートを用いることで、ヒト ES/iPS 細胞由来肝幹前駆細胞から高純度の肝細胞からなるスフェロイドを作製でき、それを

長期間維持できることが示された。

ここまでの結果から、確立された肝分化誘導プロトコールを Figure 5A に示す。ナノピラープレート (Figure 5B) に肝幹前駆細胞を播種することでスフェロイドが形成され、培養 35 日目には直径 100 μm 程度のスフェロイドになる (Figure 5C)。従来の平面培養系で作製した mono ES-hepa 細胞と本研究の三次元培養系で作製した 3D ES-hepa 細胞の肝機能を比較するために、以下に示す実験を行った。3D ES-hepa 細胞の *ALB* 遺伝子発現を継時的に調べたところ、培養 20 日目には 48 時間培養したヒト初代培養肝細胞 (PHs-48hr) に匹敵する発現量となり、培養 35 日目までその発現量は増加し続けた (Figure 6A)。また、培養 20、25、30、35 日目のいずれにおいても、3D ES-hepa 細胞は mono ES-hepa 細胞よりも有意に高い *ALB* 遺伝子発現量を示した。Mono ES-hepa 細胞は培養 20 日目、3D ES-hepa 細胞は培養 35 日目に *ALB* 遺伝子発現が最高値を示したため、以後の実験では mono ES-hepa 細胞は培養 20 日目、3D ES-hepa 細胞は培養 35 日目の細胞を解析に用いた。Mono ES-hepa 細胞および 3D ES-hepa 細胞における *ALB* 産生能 (Figure 6B) および尿素産生能 (Figure 6C) を調べたところ、3D ES-hepa 細胞の方が有意に高い産生能を有していた。続いて、Mono ES-hepa 細胞および 3D ES-hepa 細胞において、薬剤代謝酵素である CYP (Figure 6D)、抱合酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT) や glutathione *S* transferase (GST) (Figure 6E)、肝臓に薬物の輸送などに関与するトランスポーター (Figure 6F)、肝関連核内受容体 (Figure 6G)、微細胆管構造側に発現することが知られるトランスポーター (Figure 6H) の遺伝子発現を調べた。その結果、ほとんどの遺伝子について、3D

ES-hepa細胞の方がmono ES-hepa細胞よりも高発現であった。また、微細胆管構造が形成されていることを確認するために、肝細胞からBSEPなどのトランスポーターを介して微細胆管構造に蓄積されるCLFを培地に添加し、その蓄積能を調べた (Figure 6I)。Mono ES-hepa細胞では、CLFの取り込みはほとんどなかったが、3D ES-hepa細胞ではCLFの蓄積が観察された。また、3D ES-hepa細胞におけるCLFの取り込みはBSEP阻害剤であるcyclosporin Aを事前作用させることで、観察されなくなった。したがって、BSEPなどの微細胆管側のトランスポーターを介して、CLFが分化誘導肝細胞同士の間隙にある微細胆管構造に蓄積したと考えられる。我々が過去に報告 (K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.) したように、肝関連転写因子は肝分化に促進的に働くものが多い。そこで、3D ES-hepaにおける肝関連転写因子の発現を評価した (Figure 7)。肝分化に促進的に働くことが知られるHNF1 α 遺伝子などの発現量はmono ES-hepaよりも3D ES-hepaの方が高かった。3D ES-hepaにおけるほとんどの肝関連転写因子の発現はPHs-48hrに匹敵するレベルであることが分かった。以上の結果から、3D ES-hepa細胞はmono ES-hepa細胞よりも高い肝機能を有していることが示唆された。

ヒト ES/iPS 細胞は株によって、その分化能が大きく異なることが知られている。分化誘導肝細胞を毒性評価などに応用する場合、十分に高い肝機能を有した分化誘導肝細胞を作製できるヒト ES/iPS 細胞株を選択することが必要である。そこで、本研究では2株のヒト ES 細胞および6株のヒト iPS 細胞を Figure 5A にしたがって肝分化させたのち、培養35日目にALB遺伝子発現量および産生量を比較した。その結果、H1、H9、Dotcom、Tic、Toe 由来分化誘導

肝細胞は201B6、201B7、253G1 由来分化誘導肝細胞と比較して、高いALB発現量および産生量を示した。以上のことから、分化誘導肝細胞を毒性評価などの創薬に応用する場合、H1、H9、Dotcom、Tic、Toe などの肝分化指向性の高い株を選択する必要があることが示唆された。

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 α 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 (K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.)。しかしながら、FOXA2 およびHNF1 α 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 (Figure 1)・使用する培地 (Figure 2)・作用させる液性因子 (Figure 3) 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 2.5×10^5 cells/cm²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)、 1.25×10^5 cells/cm²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 5.0×10^5 cells/cm²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 μ 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（Figure 6A）。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（Figure 4A）、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（Figure 5A）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（Figure 6）。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（Figure 6D）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。Figure 6Iに示されるように、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。

E. 結論

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) 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 α 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) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 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.*, S-10-002 (2012).
- 6) 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
- 7) 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)
- 8) 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 α 、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、古江一楠田美保、水口裕之、SOX17、HEX、HNF4 α 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、古江一楠田美保、水口裕之、c/EBP α およびc/EBP β 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、古江一楠田美保、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、古江一楠田美保、水口裕之、FOXA2およびHNF1 α 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 α 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-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

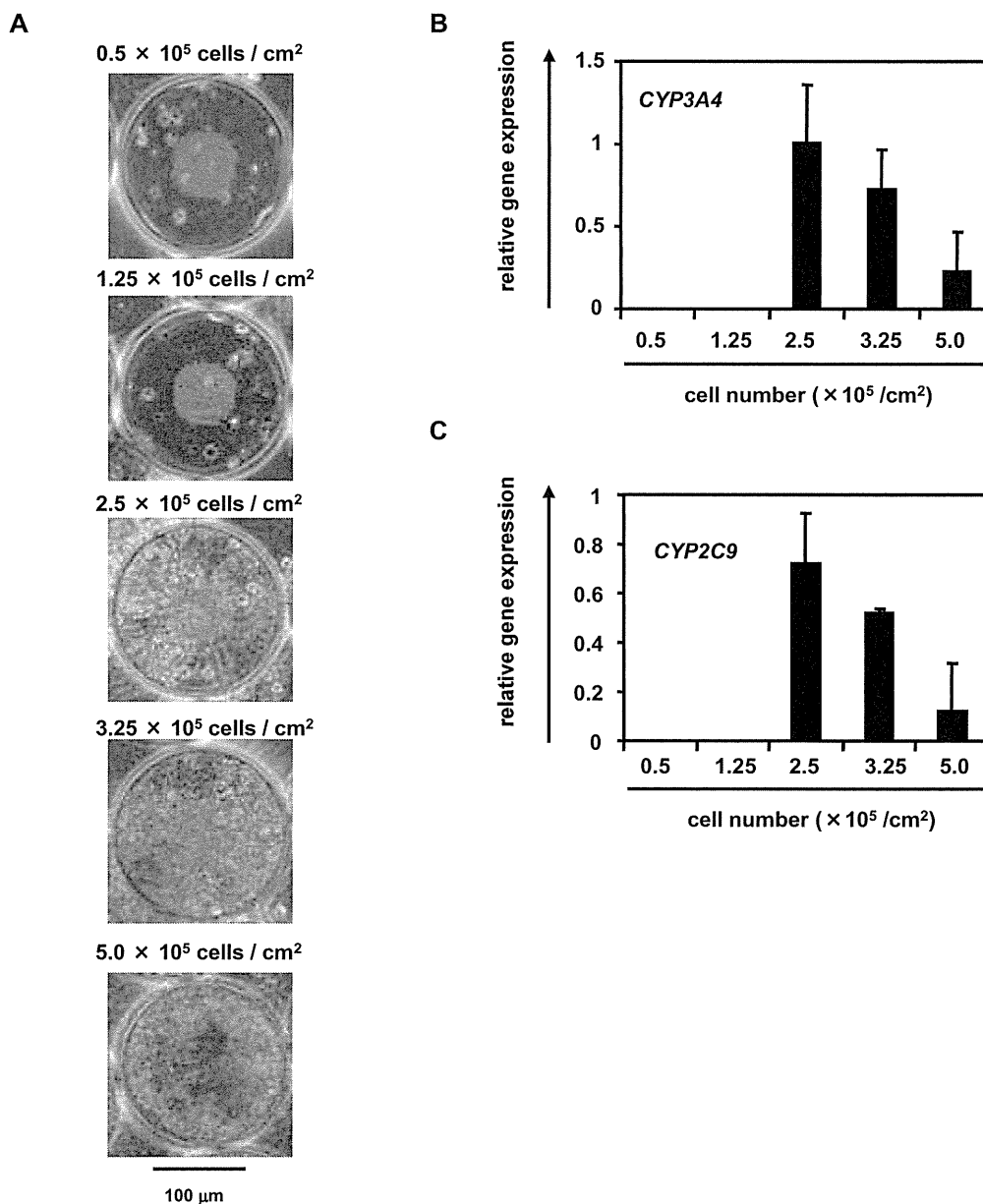


Figure 1 Optimal cell density for the formation of the hepatocyte-like cell spheroids

On day 11, the human ES cell (H9)-derived cells were plated onto the Nanopillar Plate at the indicated cell density. (A) Phase-contrast micrographs of the 3D ES-hepa on day 35 are shown. To form the 3D ES-hepa, the cell density should be more than 2.5×10^5 cells/cm². Scale bar represents 100 μm. (B, C) Gene expression levels of *CYP3A4* (B) and *CYP2C9* (C) in the 3D ES-hepa were measured by real-time RT-PCR on day 35. On the y axis, the gene expression levels in PHs-48hr were taken as 1.0. The gene expression levels of *CYP3A4* and *CYP2C9* were the highest when the cells were plated onto the Nanopillar Plate at 2.5×10^5 cells/cm².

Figure 2

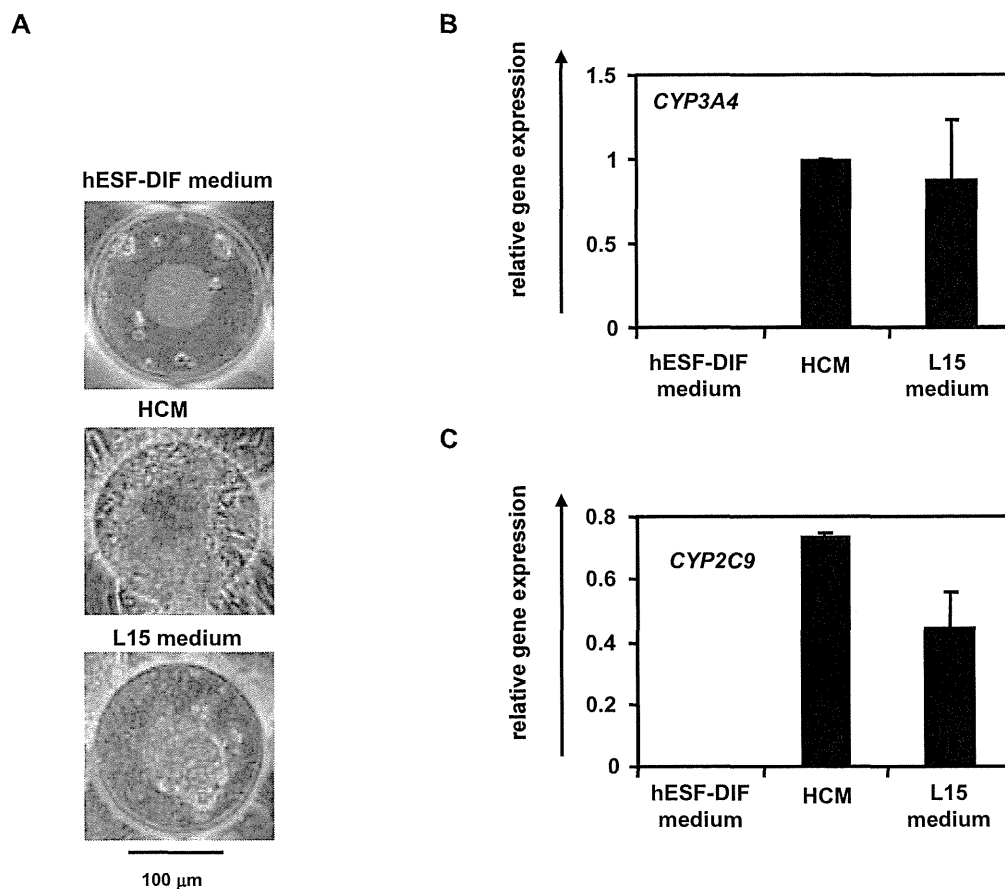


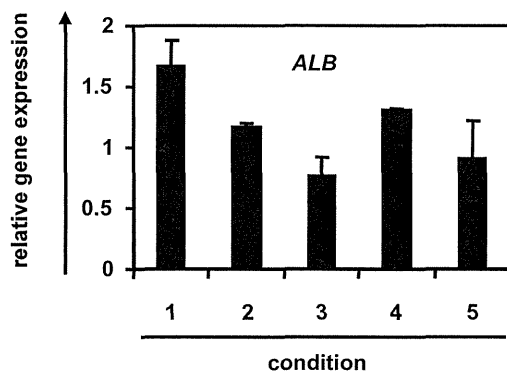
Figure 2 Optimal medium for the formation of the 3D ES-hepa

On day 11, the human ES cell (H9)-derived cells were plated onto the Nanopillar Plate, and then the cells were cultured in the differentiation hESF-DIF medium, HCM, or differentiation L15 medium until day 35. (A) Phase-contrast micrographs of the 3D ES-hepa on day 35 are shown. The 3D ES-hepa were formed by using HCM or differentiation L15 medium, although they did not form by using differentiation hESF-DIF medium. Scale bar represents 100 μm. (B, C) Gene expression levels of *CYP3A4* (B) and *CYP2C9* (C) in the 3D ES-hepa were measured by real-time RT-PCR on day 35. On the y axis, the gene expression levels in PHs-48hr were taken as 1.0. The gene expression levels of *CYP3A4* and *CYP2C9* were the highest when the cells were cultured in HCM.

Figure 3

A

	day 12 – day 25
condition 1	HGF, OsM, FGF4, DEX
condition 2	OsM, FGF4, DEX
condition 3	HGF, FGF4, DEX
condition 4	HGF, OsM, DEX
condition 5	HGF, OsM, FGF4



B

	day 12 – day 25	day 25 – day 35
condition 1	HGF, OsM, FGF4, DEX	HGF, OsM, FGF4, DEX
condition 2	HGF, OsM, FGF4, DEX	OsM, FGF4, DEX
condition 3	HGF, OsM, FGF4, DEX	HGF, FGF4, DEX
condition 4	HGF, OsM, FGF4, DEX	HGF, OsM, DEX
condition 5	HGF, OsM, FGF4, DEX	HGF, OsM, FGF4
condition 6	HGF, OsM, FGF4, DEX	OsM, DEX

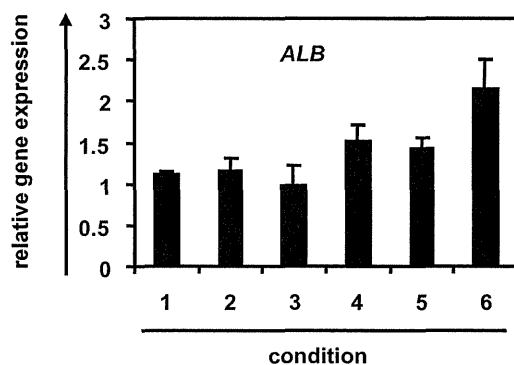


Figure 3 Optimal growth factors for the hepatic maturation of the 3D ES-hepa

On day 11, the human ES cell (H9)-derived cells were plated onto the Nanopillar Plate, and then the cells were cultured in HCM containing the indicated growth factors. **(A)** The optimal growth factors for the first stage of hepatic maturation were investigated. The gene expression levels of *ALB* in the 3D ES-hepa were measured by real-time RT-PCR on day 25. **(B)** The optimal growth factors for the second stage of hepatic maturation of the 3D ES-hepa were investigated. The gene expression levels of *ALB* in the 3D ES-hepa were measured by real-time RT-PCR on day 35. On the y axis, the gene expression levels in PHs-48hr were taken as 1.0.

Figure 4

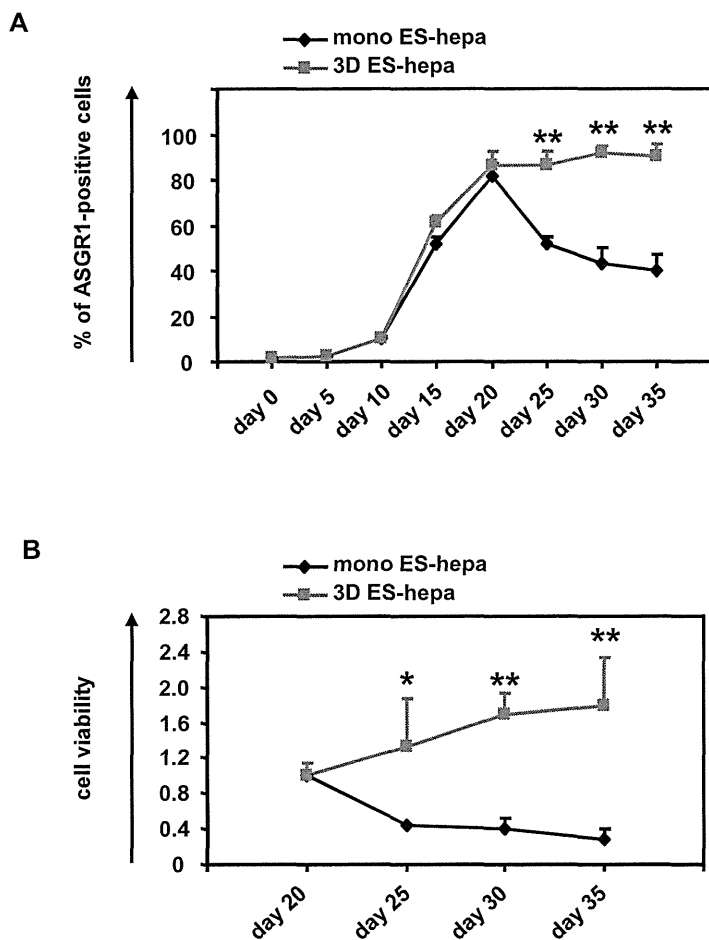


Figure 4 Temporal hepatocyte differentiation efficacy was investigated in the 3D ES-hepa.

On day 11, the human ES cell (H9)-derived cells were plated onto the Nanopillar Plate or the flat plate, and then the cells were cultured until day 35. **(A)** On day 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 35, the efficiency of hepatocyte differentiation was measured by estimating the percentage of ASGR1-positive cells using FACS analysis. **(B)** The cells were counted on day 20, 25, 30, and 35 of the differentiation. The number of cells on day 20 was taken as 1.0. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.