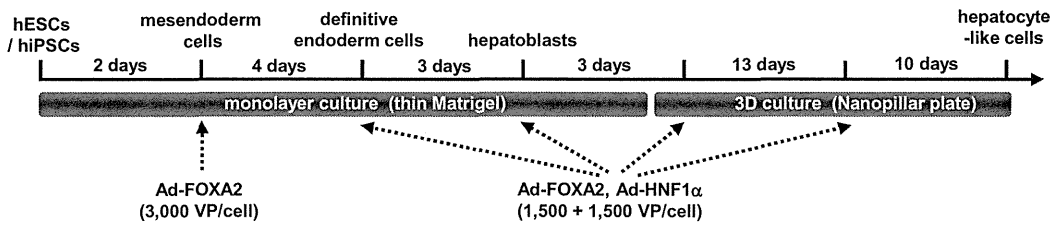
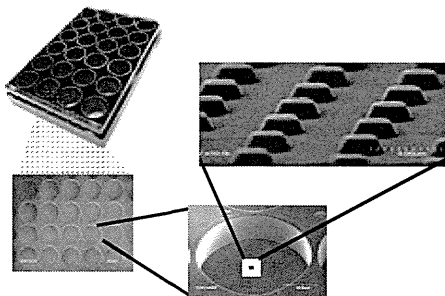


Figure 5

A



B



C

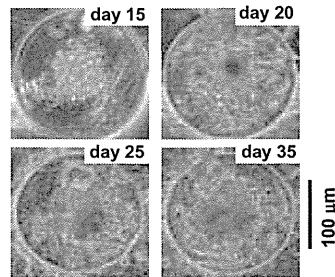
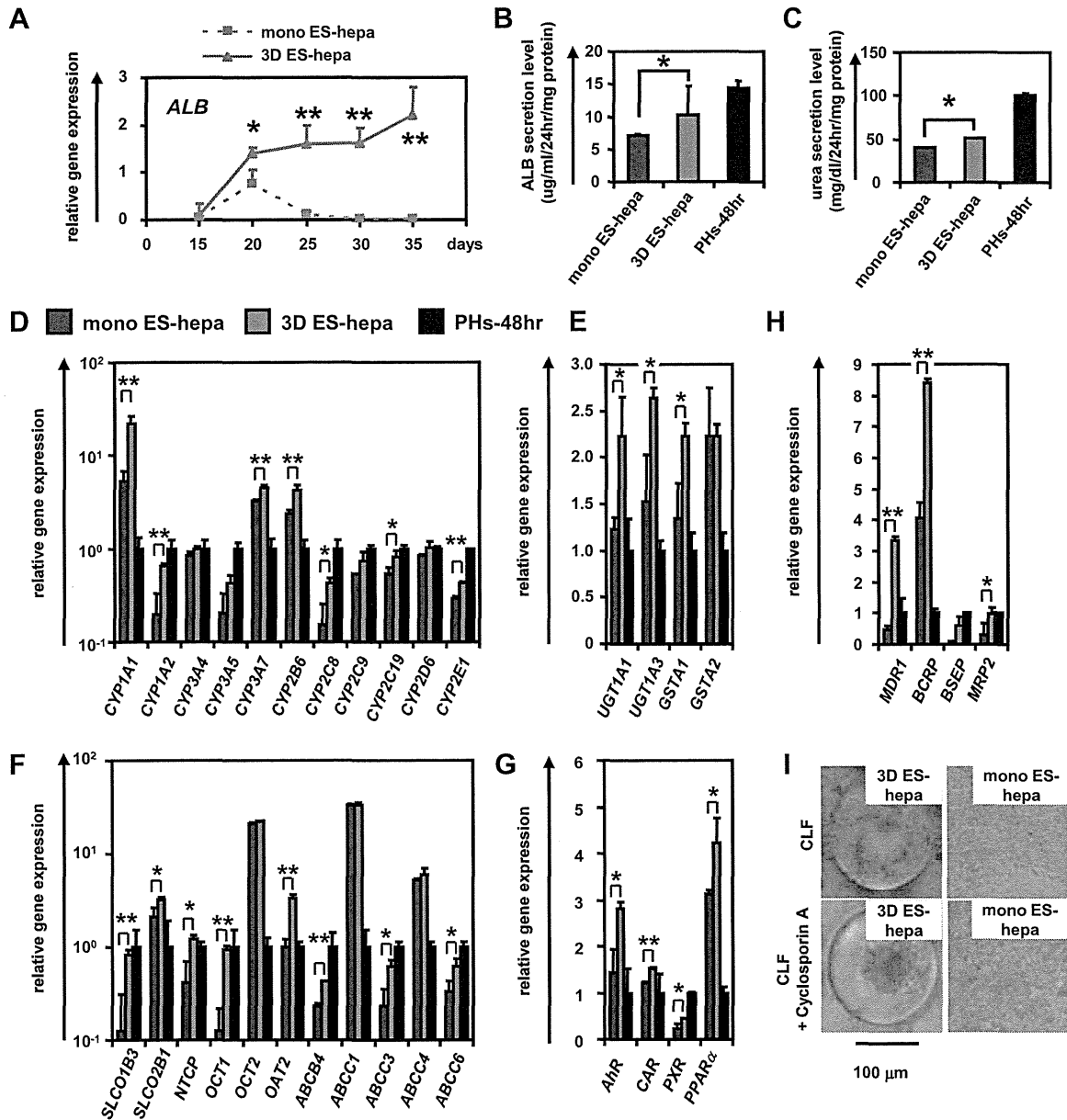


Figure 5 Hepatocyte-like cells were differentiated from hESCs/hiPSCs by using Nanopillar Plate.

(A) The procedure for differentiation of human ES/iPS cells into 3D ES/iPS-hepa via mesendoderm cells, definitive endoderm cells, and hepatoblasts is presented schematically. In the differentiation, not only the addition of growth factors but also stage-specific transient transduction of both FOXA2- and HNF1 $\alpha$ -expressing Ad vector (Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$ , respectively) was performed. The cellular differentiation procedure is described in detail in the Materials and Methods section. (B) Photograph display of a 24-well format Nanopillar Plate and its microstructural appearances of the hole and pillar structure. (C) Phase-contrast micrographs of the hESC-hepa spheroids on the Nanopillar Plate are shown. Scale bar represents 100  $\mu$ m.

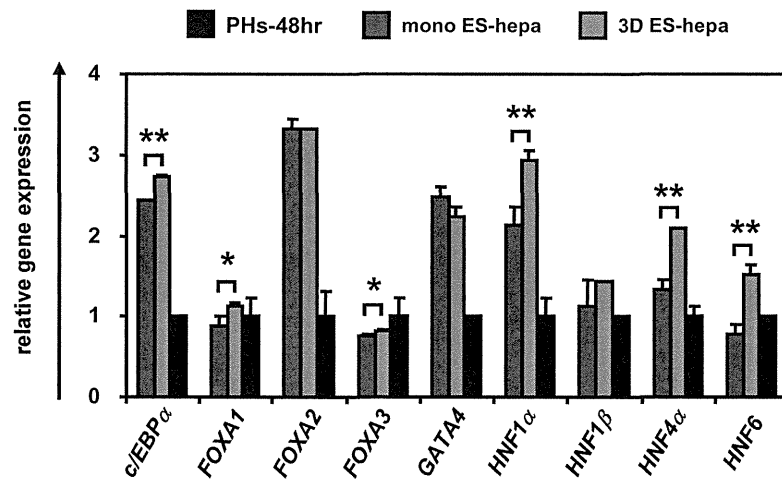
**Figure 6**



**Figure 6 Hepatocyte functions in hESC-derived hepatocyte-like cells were enhanced by using Nanopillar Plate.**

(A) The gene expression levels of *ALB* were measured by real-time RT-PCR on day 15, 20, 25, 30, and 35. On the y axis, the gene expression levels in PHs (three lots of PHs were used in all studies), which were cultured for 48 hours after plating (PHs-48hr), were taken as 1.0. (B, C) The amount of ALB (B) and urea (C) secretion were examined in the mono ES-hepa (day 20), the 3D ES-hepa (day 35), and PHs-48hr. (D-H) The gene expression levels of CYP enzymes (D), conjugating enzymes (E), hepatic transporters (F), hepatic nuclear receptors (G), and bile canalicular transporters (H) were examined by real-time RT-PCR in the mono ES-hepa, the 3D ES-hepa, and PHs-48hr. On the y axis, the expression levels in PHs-48hr were taken as 1.0. (I) The ability of bile acid uptake and efflux was examined in the mono ES-hepa and 3D ES-hepa. Choly-lysyl-fluorescein (CLF) (5  $\mu$ M) was used for the observation of bile canalicular uptake and efflux. To inhibit transportation by BSEP, the cells were pretreated with 1  $\mu$ M Cyclosporin A. \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01.

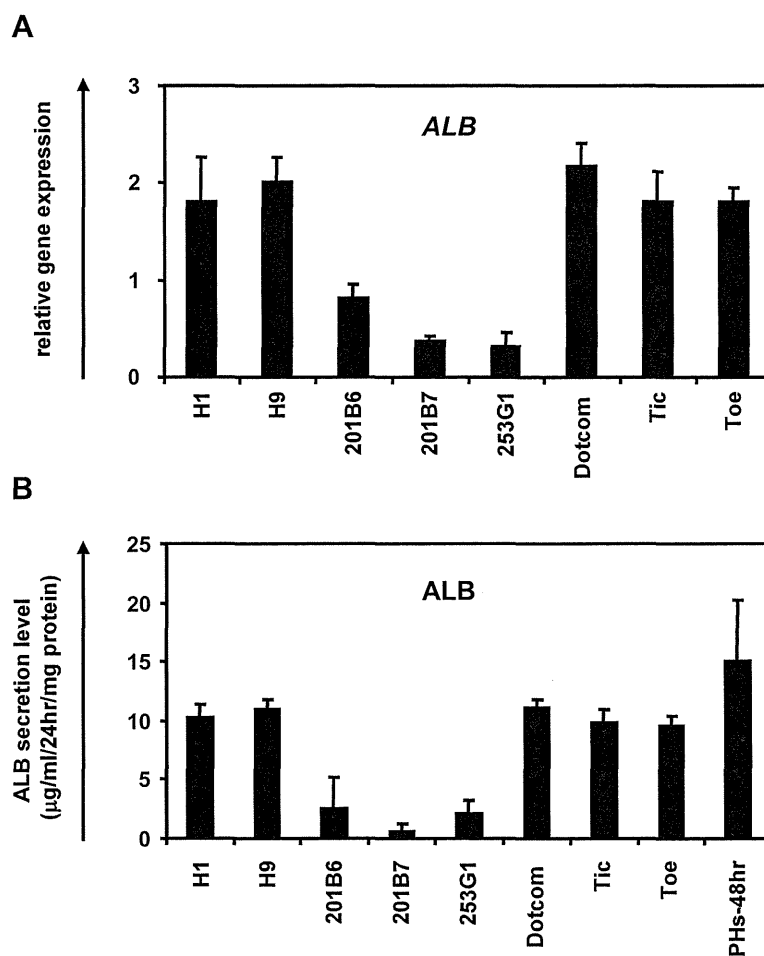
Figure 7



**Figure 7 Upregulation of the gene expression levels of hepatic transcription factors by culturing on the Nanopillar Plate.**

The gene expression levels of hepatic transcription factors of the 3D ES (H9)-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. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

Figure 8



**Figure 8 Comparison of the hepatic differentiation capacities of various hESC and hiPSC lines**

hESCs (H1 and H9) and hiPSCs (201B6, 201B7, 253G1, Dotcom, Tic, and Toe) were differentiated into the 3D ES/iPS-hepa as described in **Figure 1A**. (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-48hr was taken as 1.0. (B) On day 20, the amount of ALB secretion was examined by ELISA. The amount of ALB secretion was calculated according to each standard followed by normalization to the protein content per well.

## 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

研究分担者 梅澤 明弘 独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

研究要旨：細胞を用いた医薬品開発において、様々な安全性・有効性評価系の確立の重要性は ヒト iPS 細胞の登場に伴い期待が高まってきている。我々はこれまでに様々な組織由来のヒト間葉系幹細胞を樹立し、安定した幹細胞培養条件の開発を行ってきた。本研究ではこうした実績と経験を生かし、創薬研究への応用が期待されているヒト iPS 細胞に関して、肝細胞への分化誘導に適した細胞のスクリーニングを担当する。ヒト iPS 細胞等の幹細胞の再現性ある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発をおこない、特にヒト胎児肺組織由来細胞から樹立した 500 種類の iPS 細胞を用いて肝細胞への分化誘導に適した細胞株の選別を行った。本年度は、昨年度に引き続き、アレイ CGH や定量的 PCR により肝細胞分化指向性に資するデータ供出を行い、バイオインフォマティクス的手法を用いた包括的な解析を行い、再現性のあるスクリーニング手法の確立に務めた。

### 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。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

昨年度に引き続き以下の研究を実施する。

#### (1) ゲノム安定性評価法の確立

これまでに有していたヒト幹細胞の培養実績にもとづき、iPS 細胞を長期にわたって安定的に培養できる技術を用いる。その培養過程における継代、凍結等ゲノム安定性に与える影響について、核型解析ならびにアレイ CGH により検定する。

#### (2) データの統合及びバイオインフォマティクス的手法を用いた解析

昨年度に引き続き、エピゲノム解析を含めたアレイ CGH、マイクロアレイ等で得られた網羅的な発現データに付いて主成分解析、クラスタリング解析を行い、有用な評価指標を抽出する。

#### (倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の樹立と基礎研究応用に関し、既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91、平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238、平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 319、平成 20 年 12 月承認、承認番号 350、平成 22 年 1 月）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して

研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

#### C. 研究結果

##### (1) ゲノム安定性評価法

ヒト iPS 細胞の長期にわたる未分化性評価に加え、ゲノムレベルでの変異について検証した。その結果、染色体レベルおよびゲノムレベルで異常はほとんど検出されなかった。

##### (2) データの統合及びバイオインフォマティクスの手法を用いた解析

アレイ CGH、マイクロアレイ等で得られた網羅的な発現データに付いて主成分解析、クラスタリング解析を行い、有用な評価指標を抽出した。また、エピゲノムの発現様式も視野に入れた解析を行った結果、iPS 細胞の分化傾向はメチレーションによって明確に規定されている箇所があることを明らかにした。

#### D. 考察

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 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishii R, Kami D, Toyoda M, Makino H, Gojo S, Ishii T, **Umezawa A**. Placenta to cartilage: direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors. *Mol Biol Cell*. 23(18):3511-3521, 2012.

Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, **Umezawa A**. Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation. *Chem Rev*. 112(8):4507-4540, 2012.

Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, **Umezawa A**, Yuo A. Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cell Reprogram*. 14(2):171-185, 2012.

Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, **Umezawa A**, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell Metab*. 16(3):394-406, 2012.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高山和雄、川端健二、水口裕之	多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導	後藤満一、大橋一夫	再生医療業書	朝倉書店	日本	2012	110-116

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	4523-4534	2012
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
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
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
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.	S10-002		2012
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		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Ishii R, Kami D, Toyoda M, Makino H, Gojo S, Ishii T, Umezawa A.	Placenta to cartilage: direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors.	Mol Biol Cell	23(18)	3511-3521	2012
Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, Umezawa A.	Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation.	Chem Rev	112(8)	4507-4540	2012
Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A.	Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays.	Cell Reprogram	14(2)	171-185	2012
Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K.	Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer.	Cell Metab	16(3)	394-406	2012



- culture. *Nat Protoc* 2 : 1197-1205, 2007
- 29) Sasaki K, et al : Proliferation of hepatocyte progenitor cells isolated from adult human livers in serum-free medium. *Cell Transplant* 17, 1221-1230, 2008
  - 30) Ooe H, et al : Proliferation of rat small hepatocytes requires follistatin expression. *J Cell Physiol* 227 : 2363-2370, 2012
  - 31) Lemire JM, et al : Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 139 : 535-552, 1991
  - 32) Laconi E, et al : Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 153 : 319-329, 1998
  - 33) Ichinohe N, et al : Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant* 21 : 11-22, 2012
  - 34) Furuyama K, et al : Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43 : 34-41, 2011
  - 35) Zajicek G, et al : The streaming liver. *Liver* 5 : 293-300, 1985
  - 36) Carpentier R, et al : Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology* 141 : 1432-1438, 2011



### 5.3 多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導

肝臓移植は重篤な肝疾患患者に対する有効な治療法であるが、ドナー不足や拒絶反応などの問題が大きな障壁となっており、肝臓移植に代わる新しい治療法の開発が求められている。細胞移植は臓器移植とは異なり、凍結による大量の細胞ストックが可能であり、これまでに、凍結したヒト肝細胞を細胞移植に利用し、その治療効果（劇症肝炎や肝酵素疾患の治療など）が確認された例が報告されている<sup>1-3)</sup>。しかしながら、ヒト肝細胞は高品質なロットの細胞を大量に確保することが困難であり、培養下では増殖能を失っていることから、移植に必要な細胞を安定して供給できないという問題がある。そこで、安定した細胞移植を行うための新たな細胞源として多能性幹細胞が注目されている。肝臓における細胞移植（再生医療）に用いる細胞源としては、胚性幹細胞（embryonic stem cell : ESC）<sup>4)</sup>、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell : iPSC）<sup>5,6)</sup>、間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell : MSC）<sup>7)</sup>、骨髄由来の造血幹細胞（hematopoietic stem cell : HSC）<sup>8)</sup>、多能性体性前駆細胞（multipotent adult progenitor cell : MAPC）<sup>9)</sup>などが肝細胞への分化能を有するために注目されている（図 5.9）。ここでは、特に研究が盛んな ES 細胞、iPS 細胞、MS 細胞から肝細胞への分化について紹

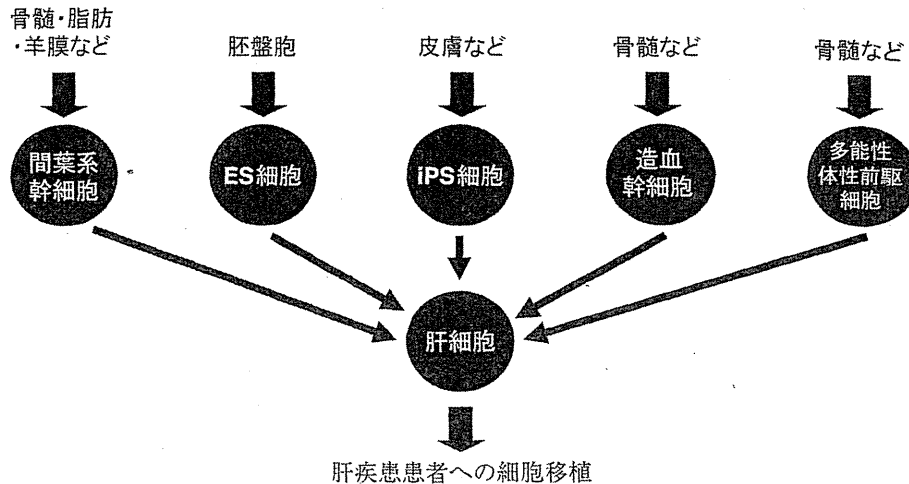


図 5.9 肝細胞への分化能を有する細胞

ES 細胞, iPS 細胞, MS 細胞, HS 細胞, MAP 細胞などが肝細胞への分化能を有するために, 肝疾患患者への肝細胞移植に用いる肝細胞源として期待されている。

介する。

ES 細胞, iPS 細胞, MS 細胞由来の肝細胞を再生医療に応用する場合, 高い肝細胞分化効率が求められる。胎児期における肝発生の解析から, さまざまな液性因子や転写因子が肝細胞分化を制御していることが明らかにされ, それらの液性因子や転写因子を利用して ES 細胞, iPS 細胞, MS 細胞から肝細胞への分化効率を上昇させる技術が開発されてきた。ここでは, 肝発生に関与する液性因子や転写因子を利用した肝細胞分化誘導法について解説し, 再生医療への応用と現在の課題について紹介する。

### 5.3.1 ヒト ES 細胞, iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞, iPS 細胞は中内胚葉, 内胚葉, 肝幹前駆細胞を介して成熟肝細胞へと分化する (図 5.10)。D'Amour らによって, アクチビン A が内胚葉を分化誘導できることが発見されて以降<sup>10)</sup>, ヒト ES 細胞, iPS 細胞から内胚葉への誘導過程においてアクチビン A が用いられているが, アクチビン A を用いた手法では,  $c\text{-Kit}^+/\text{CXCR4}^+$  の内胚葉への分化効率は 20% 程度と十分ではない。そこで, Seguin らや筆者らはアクチビン A を用いる内胚葉分化誘導過程において, 内胚葉形成の必須遺伝子である SOX17 遺伝子を導入することによって,  $c\text{-Kit}^+/\text{CXCR4}^+$  の内胚葉への分化効率が約 80% 程度に上昇することを明らかにした<sup>11,12)</sup>。

内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導では, 線維芽細胞増殖因子 (FGF) およ

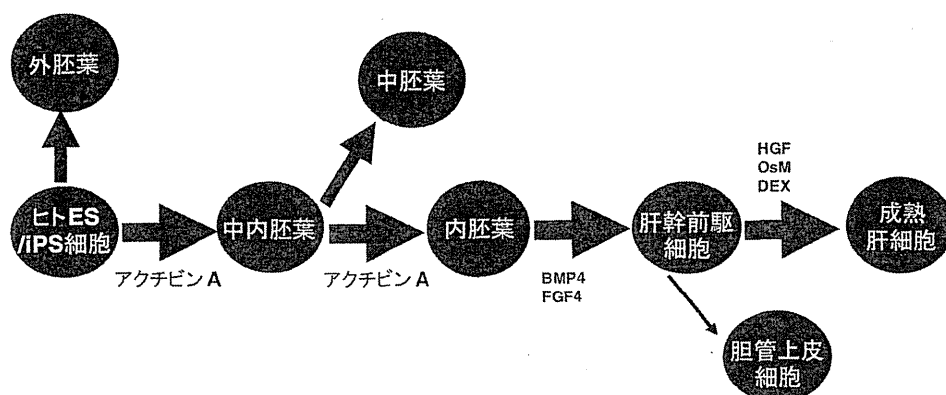


図 5.10 ヒト ES 細胞, iPS 細胞から肝細胞への分化誘導  
ヒト ES 細胞, iPS 細胞は中内胚葉, 内胚葉, 肝幹前駆細胞を介して肝細胞へと分化することができる。

び骨形成因子 (BMP) シグナルが重要であることが, 肝発生の研究から明らかになっている。Cai らはヒト ES 細胞由来内胚葉に対して FGF4 と BMP2 を同時に作用させることにより, 肝細胞分化マーカーであるアルブミン (ALB) の発現を上昇させることが可能であることを報告した<sup>4)</sup>。しかしながら, これらの液性因子を主に用いた分化誘導法では, 肝幹前駆細胞への分化誘導効率が十分ではないのが現状である。そこで最近, Kubo らはマウス ES 細胞を用いて, また, 筆者らはヒト ES 細胞, iPS 細胞を用いて, 肝細胞への方向づけに必須の遺伝子である HEX 遺伝子を一過的に内胚葉に導入することによって,  $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP)<sup>+</sup> の肝幹前駆細胞への分化が飛躍的に促進できることを報告した<sup>13,14)</sup>。

肝幹前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導では, 肝細胞増殖因子 (HGF) や オンコスタチン M (OsM) などの液性因子が重要なことが明らかになっている。HGF は胎児期の肝臓の周囲にある間充織から産生される液性因子であり, 肝臓の増殖や成熟化に参与する<sup>15,16)</sup>。一方, OsM は胎児期の肝臓に存在する造血幹細胞から産生され, デキサメタゾン (DEX) などのグルココルチコイドと協調的に働き, 肝成熟化を促進する<sup>17)</sup>。HGF, OsM, DEX などを用いることによるヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導は, これまでに多くの研究室で実施され, HNF4 $\alpha$  かつ c/EBP $\alpha$  などの肝特異的転写因子を強く発現した肝細胞が得られることが報告されている<sup>18,19)</sup>。

しかし本過程においても, 液性因子のみを用いた肝細胞分化誘導法では, ヒト初代培養肝細胞に匹敵する薬物代謝機能を有したヒト ES 細胞由来肝細胞の作製には成功しておらず, 薬物代謝に関連する遺伝子 (シトクロム P450 (CYP), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST), トランスポーター) や ALB の発現

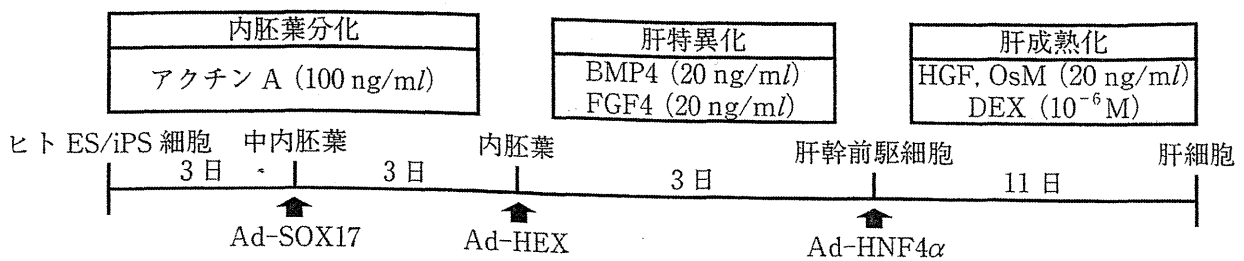


図 5.11 液性因子と転写因子の導入を組み合わせることによるヒト ES 細胞, iPS 細胞から肝細胞への分化誘導<sup>21)</sup>

ヒト ES 細胞, iPS 細胞をアクチビン A (100 ng/ml) で培養することによって得られた培養 3 日目の中内胚葉に対して SOX17 発現アデノウイルスベクター (Ad-SOX17) を作用させた。さらに, アクチビン A (100 ng/ml) で 3 日間培養したのち, 培養 6 日目の内胚葉に対して HEX 発現アデノウイルスベクター (Ad-HEX) を作用させた。BMP4 (20 ng/ml) と FGF4 (20 ng/ml) を用いて 3 日間培養したのち, 培養 9 日目の肝幹前駆細胞に対して HNF4 $\alpha$  発現アデノウイルスベクター (Ad-HNF4 $\alpha$ ) を作用させた。その後, 肝幹前駆細胞を HGF (20 ng/ml), OsM (20 ng/ml), DEX ( $10^{-6}$  M) を用いて 11 日間培養することによって, 高い薬剤代謝機能や ALB 産生能などを有した肝細胞へ分化させることができる。

が初代培養肝細胞よりも大きく劣ることが課題となっている<sup>20)</sup>。筆者らは最近, 図 5.11 に示すように中内胚葉に SOX17 遺伝子, 内胚葉に HEX 遺伝子を導入することによって得られた肝幹前駆細胞に対して, 肝成熟化の必須遺伝子である HNF4 $\alpha$  遺伝子を導入することで高い薬物代謝機能や ALB 産生能などを有した肝細胞を効率よく分化誘導することに成功した。このようにして作製した肝細胞はヒト初代培養肝細胞に近い CYP 遺伝子の発現を示した<sup>21)</sup>。

上述した肝細胞への分化誘導研究は, ヒト ES 細胞を用いて主に行われてきたが, 2007 年にヒト iPS 細胞が樹立されて以来, ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導研究も盛んに行われている。Si-Tayab ら, Song ら, Sullivan らはヒト ES 細胞から肝細胞を誘導する方法と同じように, ヒト iPS 細胞から肝細胞を作製できることを示した<sup>5,6,20)</sup>。また, Rashid らは  $\alpha$ -1-アンチトリプシン欠損症・家族性コレステロール血漿症・グリコーゲン貯蔵疾患症 1 $\alpha$  の患者の皮膚細胞から iPS 細胞を作製し, 肝細胞へ分化誘導させ, それぞれの病態を反映した肝細胞を作製できることを示した<sup>22)</sup>。

ヒト ES 細胞, iPS 細胞由来肝細胞を用いた細胞治療の基盤技術の構築を目的の一つとして, 肝障害を付与した免疫不全マウスに対してヒト ES 細胞, iPS 細胞由来肝細胞が移植されている。肝障害マウスとして uPA (urokinase-type plasminogen activator) 遺伝子を肝細胞特異的に発現させたマウスが汎用されている。Duan らはヒト ES 細胞から肝細胞を作製し, ルシフェラーゼ遺伝子を導入したのち NOD-SCID マウスに移植した<sup>23)</sup>。その結果, マウス肝臓内にヒト

ES細胞由来肝細胞の存在が確認され、移植後3週間まで血清中ヒトALBが確認された。また、ヒトiPS細胞由来肝細胞をマウスに移植した例も報告されており、ヒトiPS細胞由来肝細胞を移植することにより、血清中ヒトALBが検出され、マウス肝臓の約10%がヒトALB<sup>+</sup>細胞に置換された<sup>24)</sup>。

ヒトES細胞、iPS細胞由来の肝細胞を臨床応用するためには、何より安全性の確保が必須である。特に、ヒトES細胞、iPS細胞の場合は、分化させた細胞中に未分化細胞が残存すると生体内で自己複製および分化が無秩序に生じ、例外なく奇形腫（テラトーマ）が形成される。したがって、移植細胞調製段階で未分化な細胞の残存がないことを保障することが必須であり、分化細胞をソーティングなどで純化したり、未分化細胞を除去する方法論の確立も必要となるであろう。

### 5.3.2 MS細胞から肝細胞への分化誘導

MS細胞は中胚葉に由来する幹細胞であり、さまざまな組織中に広く存在する。最も研究が盛んな骨髄をはじめとして、羊膜、羊水、臍帯、脂肪などにもMS細胞は存在し、骨、軟骨、脂肪、筋肉などに分化するものと認識されていたが、胚葉を超えて肝細胞にも分化できることが報告された<sup>7)</sup>。MS細胞は比較的容易に入手可能であり、高い増殖能も有しているために、細胞治療のための新たな細胞供給源となりうる。MS細胞から肝細胞への分化誘導においては、ヒトES細胞、iPS細胞からの肝細胞分化と同様に、肝発生において重要と考えられている液性因子を用いることが多い。LeeらはHGF、FGF2、OsMを用いてヒトMS細胞を6週間培養することで、肝関連遺伝子の発現上昇、尿素産生、グリコーゲン貯蔵、低比重リポタンパク（LDL）の取込み、CYP活性を確認した<sup>25)</sup>。MS細胞から肝細胞への分化を促進するために、肝臓発生に関与する転写因子を導入する研究も行われている。Talens-visconiらは骨髄由来のヒトMS細胞に対して、c/EBP $\beta$ 遺伝子を導入することによって、肝細胞分化を促進できることを見いだしている<sup>26)</sup>。また、エピジェネティックな修飾を利用してヒトMS細胞から肝細胞への分化を制御する試みも実施されている。HGFなどの肝細胞分化を促進する液性因子を用いて、ヒトMS細胞を6~10日間培養したのち、1 $\mu$ Mのトリコスタチン（trichostatin）Aや0.1%のジメチルスルホキシド（dimethylsulfoxide）を作用させることによって、MS細胞から初代培養肝細胞と同程度の機能を有した肝細胞を作製できることも報告されている<sup>27, 28)</sup>。

MS細胞を細胞移植治療の新たな細胞供給源として利用する場合においても安全性を十分に検討する必要がある。MS細胞の場合は、移植した細胞のがん化の

可能性のほかに、ホストとなる（患者）肝臓にがん細胞が存在したときに MS 細胞の特徴である **trophic effect**（サイトカインなどを放出することにより周辺の細胞に栄養を供給する効果）が、がん細胞の転移および浸潤能を高める危険性についても詳細に検討する必要がある。

ヒト初代培養肝細胞と同程度の機能を有した多能性幹細胞由来の肝細胞への分化誘導法が確立されれば、多能性幹細胞由来の肝細胞は肝疾患患者への細胞移植治療の新しい細胞源として利用されることが期待される。ヒト ES 細胞, iPS 細胞, MS 細胞を含めた多能性幹細胞から分化誘導した肝細胞を利用する細胞移植治療の早期実現のためには、よりいっそうの基礎研究が必要であるとともに、基礎研究者・臨床医・政府（規制当局）が密接に連携して取り組むことが必要であろう。

〔高山和雄・川端健二・水口裕之〕

#### 文 献

- 1) Habibullah CM, et al: Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 58: 951-952, 1994
- 2) Strom SC, et al: Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 63: 559-569, 1997
- 3) Fox IJ, et al: Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338: 1422-1426, 1998
- 4) Cai J, et al: Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45: 1229-1239, 2007
- 5) Song Z, et al: Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 19: 1233-1242, 2009
- 6) Sullivan GJ, et al: Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51: 329-335, 2010
- 7) Pittenger MF, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999
- 8) Weissman IL: Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446, 2000
- 9) Jiang Y, et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002
- 10) D'Amour KA, et al: Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23: 1534-1541, 2005
- 11) Seguin CA, et al: Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3: 182-195, 2008
- 12) Takayama K, et al: Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One* 6: e21780, 2011

- 13) Kubo A, et al: The homeobox gene Hex regulates hepatocyte differentiation from embryonic stem cell-derived endoderm. *Hepatology* 51 : 633-641, 2010
- 14) Inamura M, et al: Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 19 : 400-407, 2011
- 15) Zaret KS: Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92 : 83-88, 2000
- 16) Kamiya A, et al: Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 492 : 90-94, 2001
- 17) Kinoshita T, et al: Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 7265-7270, 1999
- 18) Duan Y, et al: Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28 : 674-686, 2010
- 19) Baharvand H, et al: Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 76 : 465-477, 2008
- 20) Si-Tayeb K, et al: Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51 : 297-305, 2010
- 21) Takayama K, et al: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. *Mol Ther* 20 : 127-137, 2012
- 22) Rashid ST, et al: Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120 : 3127-3136, 2010
- 23) Duan Y, et al: Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 25 : 3058-3068, 2007
- 24) Liu H, et al: In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 3 : 82ra39, 2011
- 25) Lee KD, et al: In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40 : 1275-1284, 2004
- 26) Talens-Visconti R, et al: Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 12 : 5834-5845, 2006
- 27) Snykers S, et al: Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. *BMC Dev Biol* 7 : 24, 2007
- 28) Seo MJ, et al: Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328 : 258-264, 2005

## Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$ transduction

Kazuo Takayama<sup>1,2</sup>, Mitsuru Inamura<sup>1,2</sup>, Kenji Kawabata<sup>2,3</sup>, Michiko Sugawara<sup>4</sup>, Kiyomi Kikuchi<sup>4</sup>, Maiko Higuchi<sup>2</sup>, Yasuhito Nagamoto<sup>1,2</sup>, Hitoshi Watanabe<sup>1,2</sup>, Katsuhisa Tashiro<sup>2</sup>, Fuminori Sakurai<sup>1</sup>, Takao Hayakawa<sup>5,6</sup>, Miho Kusuda Furue<sup>7,8</sup>, Hiroyuki Mizuguchi<sup>1,2,9,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; <sup>2</sup>Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan; <sup>3</sup>Laboratory of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; <sup>4</sup>Tsukuba Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki 300-2635, Japan; <sup>5</sup>Pharmaceutics and Medical Devices Agency, Tokyo 100-0013, Japan; <sup>6</sup>Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan; <sup>7</sup>Laboratory of Cell Cultures, Department of Disease Bioresources Research, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan; <sup>8</sup>Laboratory of Cell Processing, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; <sup>9</sup>The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

**Background & Aims:** Hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (hiPSCs) can be utilized as a tool for screening for hepatotoxicity in the early phase of pharmaceutical development. We have recently reported that hepatic differentiation is promoted by sequential transduction of SOX17, HEX, and HNF4 $\alpha$  into hESC- or hiPSC-derived cells, but further maturation of hepatocyte-like cells is required for widespread use of drug screening.

**Methods:** To screen for hepatic differentiation-promoting factors, we tested the seven candidate genes related to liver development.

**Results:** The combination of two transcription factors, FOXA2 and HNF1 $\alpha$ , promoted efficient hepatic differentiation from hESCs and hiPSCs. The expression profile of hepatocyte-related genes (such as genes encoding cytochrome P450 enzymes, conjugating enzymes, hepatic transporters, and hepatic nuclear receptors) achieved with FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction was comparable to that obtained in primary human hepatocytes. The hepatocyte-like cells generated by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction exerted various hepatocyte functions including albumin and urea secretion, and the uptake of indocyanine green and low density lipoprotein. Moreover, these cells had the capacity to metabolize all nine tested drugs and were successfully employed to evaluate drug-induced cytotoxicity.

**Conclusions:** Our method employing the transduction of FOXA2 and HNF1 $\alpha$  represents a useful tool for the efficient generation of metabolically functional hepatocytes from hESCs and hiPSCs, and the screening of drug-induced cytotoxicity.

© 2012 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem cells (hESCs) [1] or human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) [2] have more advantages than primary human hepatocytes (PHs) for drug screening. While application of PHs in drug screening has been hindered by lack of cellular growth, loss of function, and de-differentiation *in vitro* [3], hESC- or hiPSC-derived hepatocyte-like cells (hESC-hepa or hiPSC-hepa, respectively) have potential to solve these problems.

Hepatic differentiation from hESCs and hiPSCs can be divided into four stages: definitive endoderm (DE) differentiation, hepatic commitment, hepatic expansion, and hepatic maturation. Various growth factors are required to mimic liver development [4] and to promote hepatic differentiation. Previously, we showed that transduction of transcription factors in addition to treatment with optimal growth factors was effective to enhance hepatic differentiation [5–7]. An almost homogeneous hepatocyte population was obtained by sequential transduction of SOX17, HEX, and HNF4 $\alpha$  into hESC- or hiPSCs-derived cells [7]. However, further maturation of the hESC-hepa and hiPSC-hepa is required for widespread use of drug screening because the drug metabolism capacity of these cells was not sufficient.

In some previous reports, hESC-hepa and hiPSC-hepa have been characterized for their hepatocyte functions in numerous ways, including functional assessment such as glycogen storage and low density lipoprotein (LDL) uptake [7]. To make a more precise judgment as to whether hESC-hepa and hiPSC-hepa can be applied to drug screening, it is more important to assess cytochrome P450 (CYP) induction potency and drug metabolism capacity rather than general hepatocyte function. Although Duan *et al.* have examined the drug metabolism capacity of hESC-hepa, drug metabolites were measured at 24 or 48 h [8]. To precisely

Keywords: FOXA2; HNF1 $\alpha$ ; Hepatocytes; Adenovirus; Drug screening; Drug metabolism; hESCs; hiPSCs.

Received 14 November 2011; received in revised form 31 March 2012; accepted 4 April 2012; available online 29 May 2012

\* Corresponding author. Address: Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Tel.: +81 6 6879 8185; fax: +81 6 6879 8186.

E-mail address: mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp (H. Mizuguchi).





estimate the drug metabolism capacity, the amount of metabolites must be measured during the time when production of metabolites is linearly detected (generally before 24 h). To the best of our knowledge, there have been few reports that have examined various drugs metabolism capacity of hESC-hepa and hiPSC-hepa in detail.

In the present study, seven candidate genes (*FOXA2*, *HEX*, *HNF1 $\alpha$* , *HNF1 $\beta$* , *HNF4 $\alpha$* , *HNF6*, and *SOX17*) were transduced into each stage of hepatic differentiation from hESCs by using an adenovirus (Ad) vector to screen for hepatic differentiation-promoting factors. Then, hepatocyte-related gene expression profiles and hepatocyte functions in hESC-hepa and hiPSC-hepa generated by the optimized protocol, were examined to investigate whether these cells have PHs characteristics. We used nine drugs, which are metabolized by various CYP enzymes and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), to determine whether the hESC-hepa and hiPSC-hepa have drug metabolism capacity. Furthermore, hESC-hepa and hiPSC-hepa were examined to determine whether these cells may be applied to evaluate drug-induced cytotoxicity.

## Materials and methods

### *In vitro* differentiation

Before the initiation of cellular differentiation, the medium of hESCs and hiPSCs was exchanged for a defined serum-free medium, hESF9, and cultured as previously reported [9]. The differentiation protocol for the induction of DE cells, hepatoblasts, and hepatocytes was based on our previous report with some modifications [5,6]. Briefly, in mesendoderm differentiation, hESCs and hiPSCs were dissociated into single cells by using Accutase (Millipore) and cultured for 2 days on Matrigel (BD biosciences) in differentiation hESF-DIF medium which contains 100 ng/ml Activin A (R&D Systems) and 10 ng/ml bFGF (hESF-DIF medium, Cell Science & Technology Institute; differentiation hESF-DIF medium was supplemented with 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, and 0.5 ng/ml bovine serum albumin, all from Sigma). To generate DE cells, mesendoderm cells were transduced with 3000 VP/cell of Ad-FOXA2 for 1.5 h on day 2 and cultured until day 6 on Matrigel in differentiation hESF-DIF medium supplemented with 100 ng/ml Activin A and 10 ng/ml bFGF. For induction of hepatoblasts, the DE cells were transduced with each 1500 VP/cell of Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$  for 1.5 h on day 6 and cultured for 3 days on Matrigel in hepatocyte culture medium (HCM, Lonza) supplemented with 30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4, R&D Systems) and 20 ng/ml FGF4 (R&D Systems). In hepatic expansion, the hepatoblasts were transduced with each 1500 VP/cell of Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$  for 1.5 h on day 9 and cultured for 3 days on Matrigel in HCM supplemented with 10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF), 10 ng/ml FGF1, 10 ng/ml FGF4, and 10 ng/ml FGF10 (all from R&D Systems). In hepatic maturation, cells were cultured for 8 days on Matrigel in L15 medium (Invitrogen) supplemented with 8.3% tryptose phosphate broth (BD biosciences), 10% FBS (Vita), 10  $\mu$ M hydrocortisone 21-hemisuccinate (Sigma), 1  $\mu$ M insulin, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (Wako), 20 ng/ml HGF, 20 ng/ml Oncostatin M (OsM, R&D systems), and 10<sup>-6</sup> M Dexamethasone (DEX, Sigma).

## Results

Recently, we showed that the sequential transduction of SOX17, HEX, and HNF4 $\alpha$  into hESC-derived mesendoderm, DE, and hepatoblasts, respectively, leads to efficient generation of the hESC-hepa [5–7]. In the present study, to further improve the differentiation efficiency towards hepatocytes, we screened for hepatic differentiation-promoting transcription factors. Seven candidate genes involved in liver development were selected. We then examined the function of the hESC-hepa and hiPSC-hepa

generated by the optimized protocol for pharmaceutical use in detail.

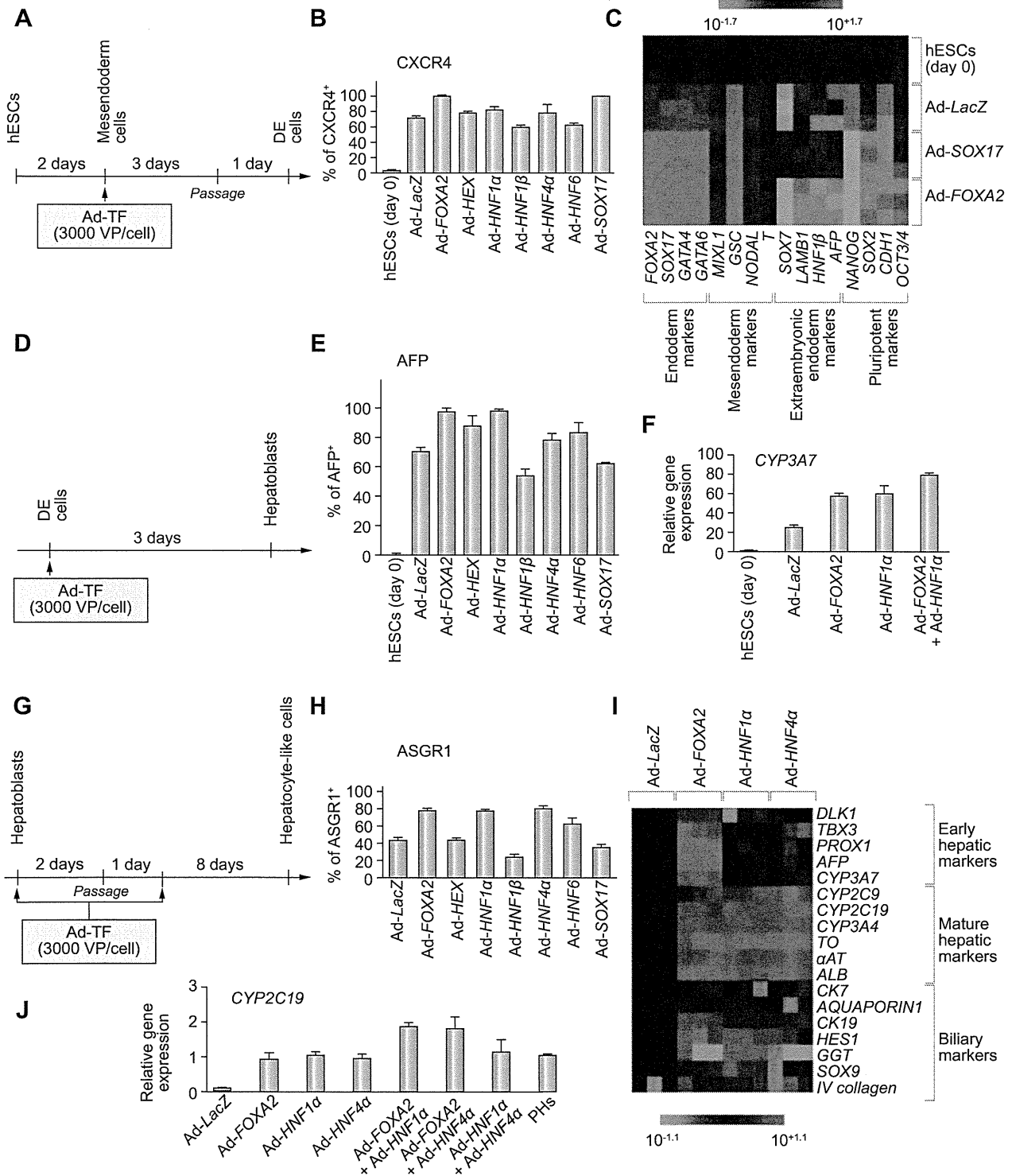
### *Efficient hepatic differentiation by Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$ transduction*

To perform efficient DE differentiation, T-positive hESC-derived mesendoderm cells (day 2) (Supplementary Fig. 1) were transduced with Ad vector expressing various transcription factors (Ad-FOXA2, Ad-HEX, Ad-HNF1 $\alpha$ , Ad-HNF1 $\beta$ , Ad-HNF4 $\alpha$ , Ad-HNF6, and Ad-SOX17 were used in this study). We ascertained the expression of *FOXA2*, *HEX*, *HNF1 $\alpha$* , *HNF1 $\beta$* , *HNF4 $\alpha$* , *HNF6*, or *SOX17* in Ad-FOXA2-, Ad-HEX-, Ad-HNF1 $\alpha$ -, Ad-HNF1 $\beta$ -, Ad-HNF4 $\alpha$ -, Ad-HNF6-, or Ad-SOX17-transduced cells, respectively (Supplementary Fig. 2). We also verified that there was no cytotoxicity of the cells transduced with Ad vector until the total amount of Ad vector reached 12,000 VP/cell (Supplementary Fig. 3). Each transcription factor was expressed in hESC-derived mesendoderm cells on day 2 by using Ad vector, and the efficiency of DE differentiation was examined (Fig. 1A). The DE differentiation efficiency based on CXCR4-positive cells was the highest when Ad-SOX17 or Ad-FOXA2 were transduced (Fig. 1B). To investigate the difference between Ad-FOXA2-transduced cells and Ad-SOX17-transduced cells, gene expression levels of markers of undifferentiated cells, mesendoderm cells, DE cells, and extraembryonic endoderm cells were examined (Fig. 1C). The expression levels of extraembryonic endoderm markers of Ad-SOX17-transduced cells were higher than those of Ad-FOXA2-transduced cells. Therefore, we concluded that FOXA2 transduction is suitable for use in selective DE differentiation.

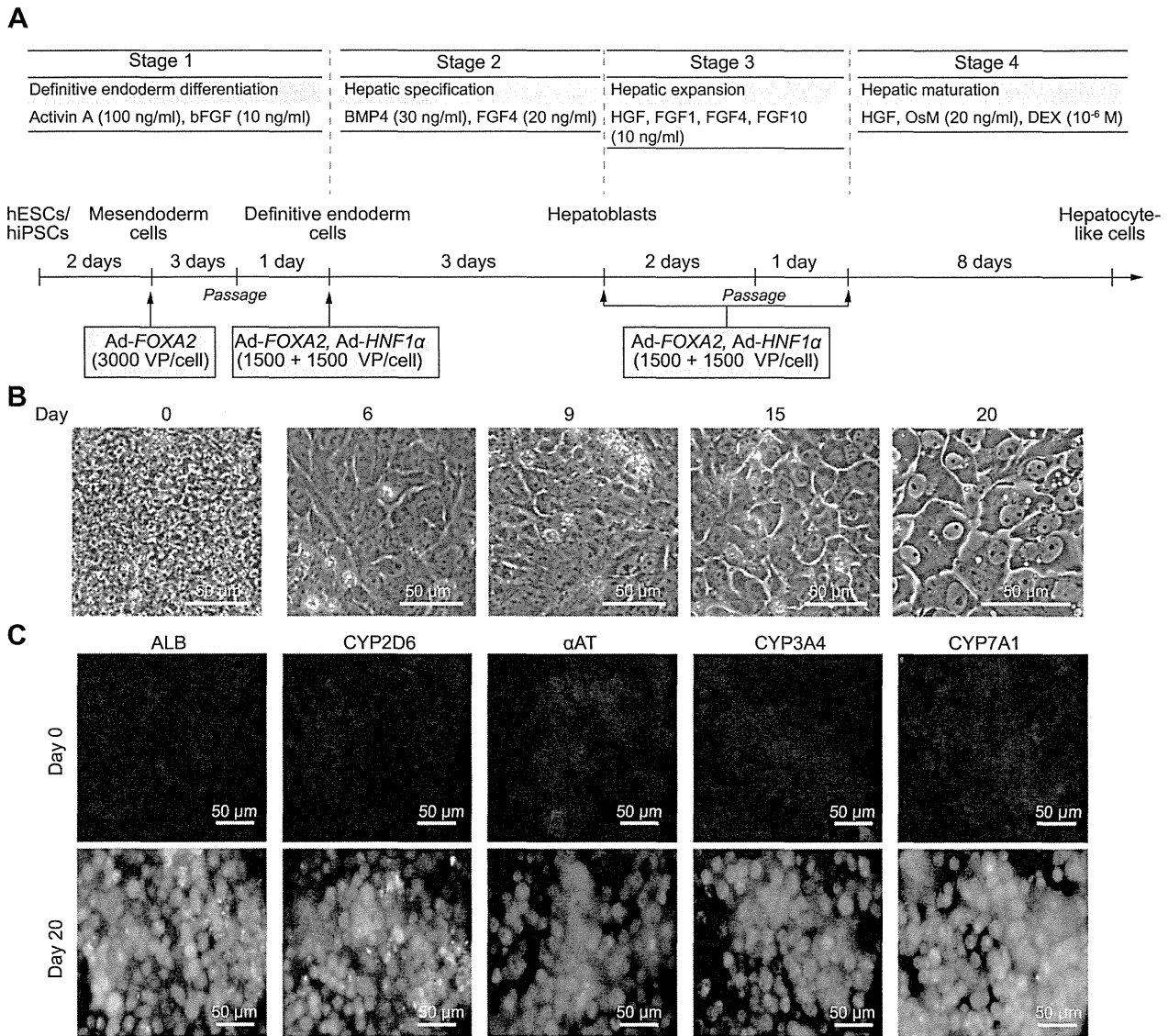
To promote hepatic commitment, various transcription factors were transduced into DE cells and the resulting phenotypes were examined on day 9 (Fig. 1D). Nearly 100% of the population of Ad-FOXA2-transduced cells and Ad-HNF1 $\alpha$ -transduced cells was  $\alpha$ -fetoprotein (AFP)-positive (Fig. 1E). We expected that hepatic commitment would be further accelerated by combining FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction. The DE cells were transduced with both Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$ , and then the gene expression levels of *CYP3A7* [10], which is a marker of fetal hepatocytes, were evaluated (Fig. 1F). When both Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$  were transduced into DE cells, the promotion of hepatic commitment was greater than in Ad-FOXA2-transduced cells or Ad-HNF1 $\alpha$ -transduced cells.

To promote hepatic expansion and maturation, we transduced various transcription factors into hepatoblasts on day 9 and 12 and the resulting phenotypes were examined on day 20 (Fig. 1G). We ascertained that the hepatoblast population was efficiently expanded by addition of HGF, FGF1, FGF4, and FGF10 (Supplementary Fig. 4). The hepatic differentiation efficiency based on asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)-positive cells was measured on day 20, demonstrating that FOXA2, HNF1 $\alpha$ , and HNF4 $\alpha$  transduction could promote efficient hepatic maturation (Fig. 1H). To investigate the phenotypic difference between Ad-FOXA2-, Ad-HNF1 $\alpha$ -, and Ad-HNF4 $\alpha$ -transduced cells, gene expression levels of early hepatic markers, mature hepatic markers, and biliary markers were examined (Fig. 1I). Gene expression levels of mature hepatic markers were up-regulated by FOXA2, HNF1 $\alpha$ , or HNF4 $\alpha$  transduction. FOXA2 transduction strongly upregulated gene expression levels of both early hepatic markers and mature hepatic markers, while HNF1 $\alpha$  or HNF4 $\alpha$  transduc-

# Research Article



**Fig. 1. Efficient hepatic differentiation from hESCs by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction.** (A) The schematic protocol describes the strategy for DE differentiation from hESCs (H9). Mesendoderm cells (day 2) were transduced with 3000 VP/cell of transcription factor (TF)-expressing Ad vector (Ad-TF) for 1.5 h and cultured as described in Fig. 2A. (B) On day 5, the efficiency of DE differentiation was measured by estimating the percentage of CXCR4<sup>+</sup> cells using FACS analysis. (C) The gene expression profiles were examined on day 5. (D) Schematic protocol describing the strategy for hepatoblast differentiation from DE. DE cells (day 6) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 h and cultured as described in Fig. 2A. (E) On day 9, the efficiency of hepatoblast differentiation was measured by estimating the percentage of AFP<sup>+</sup> cells.



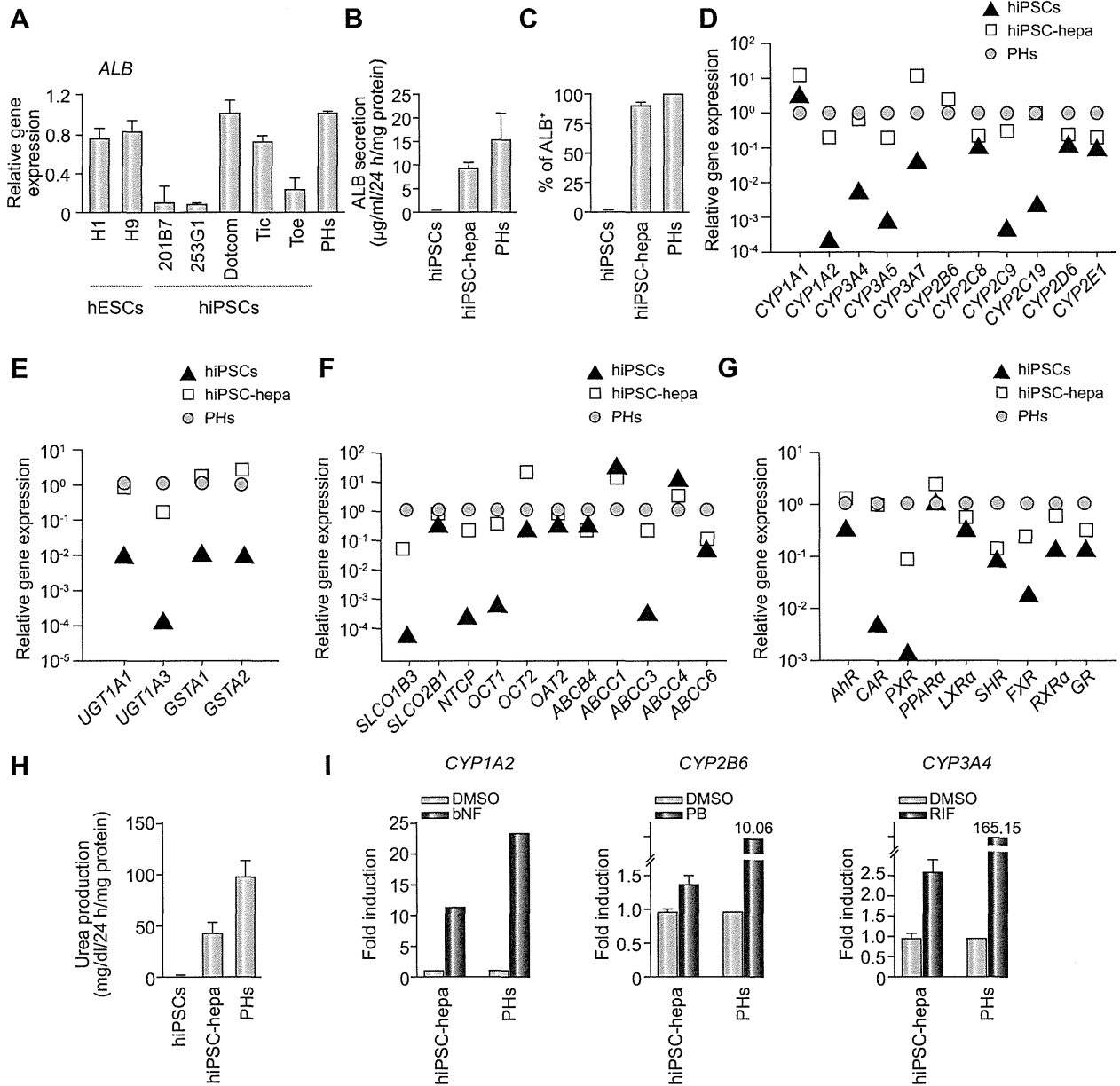
**Fig. 2. Hepatic differentiation of hESCs and hiPSCs by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction.** (A) The differentiation procedure of hESCs and hiPSCs into hepatocytes via DE cells and hepatoblasts is schematically shown. Details of the hepatic differentiation procedure are described in Materials and methods. (B) Sequential morphological changes (day 0–20) of hESCs (H9) differentiated into hepatocytes are shown. (C) The expression of the hepatocyte markers (ALB, CYP2D6,  $\alpha$ AT, CYP3A4, and CYP7A1, all green) was examined by immunohistochemistry on day 0 and 20. Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

tion did not up-regulate the gene expression levels of early hepatic markers. Next, multiple transduction of transcription factors was performed to promote further hepatic maturation. The combination of Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 $\alpha$  transduction and the com-

bination of Ad-FOXA2 and Ad-HNF4 $\alpha$  transduction result in the most efficient hepatic maturation, judged from the gene expression levels of CYP2C19 (Fig. 1J). This may happen because the mixture of immature hepatocytes and mature hepatocytes coor-

cells using FACS analysis. (F) The gene expression level of CYP3A7 was 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. (G) The schematic protocol describes the strategy for hepatic differentiation from hepatoblasts. Hepatoblasts (day 9) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 h and cultured as described in Fig. 2A. (H) On day 20, the efficiency of hepatic differentiation was measured by estimating the percentage of ASGR1-positive cells using FACS analysis. The detail results of FACS analysis are shown in Supplementary Table 1. (I) Gene expression profiles were examined on day 20. (J) Hepatoblasts (day 9) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-TFs (in the case of combination transduction of two types of Ad vector, 1500 VP/cell of each Ad-TF was transduced) for 1.5 h and cultured. 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 PHs, which were cultured for 48 h after the cells were plated, was taken as 1.0. All data are represented as mean  $\pm$  SD (n = 3).

# Research Article



**Fig. 3. 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 Fig. 2A. (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 h after cells were plated, was taken as 1.0. (B–I) hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 2A. (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 is indicated. (H) The amount of urea secretion was examined in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs. (I) Induction of *CYP1A2*, *2B6*, or *3A4* by DMSO or inducer (bNF, PB, or RIF) of hiPSC-hepa and PHs, cultured for 48 h after the cells were plated, was examined. On the y axis, the gene expression levels of *CYP1A2*, *2B6*, or *3A4* in DMSO-treated cells, which were cultured for 48 h, were taken as 1.0. All data are represented as mean ± SD (n = 3).

dinately works to induce hepatocyte functions. Taken together, efficient hepatic differentiation could be promoted by using the combination of *FOXA2* and *HNF1α* transduction at the optimal stage of differentiation (Fig. 2A). At the stage of hepatic expansion and maturation, Ad-*HNF4α* can be substituted for Ad-*HNF1α* (Fig. 1J). Interestingly, cell growth was delayed by *FOXA2* and

*HNF4α* transduction (Supplementary Fig. 5). This delay in cell proliferation might be due to promoted maturation by *FOXA2* and *HNF1α* transduction. As the hepatic differentiation proceeds, the morphology of hESCs gradually changed into a typical hepatocyte morphology, with distinct round nuclei and a polygonal shape (Fig. 2B), and the expression levels of hepatic markers