

付加がほぼ全てのプロトコルで用いられており、アクチビン A に加え FGF2 (fibroblast growth factor 2) や Wnt3a を付加して分化誘導する方法も知られている。

(2)の内胚葉から肝幹前駆細胞への分化ステップには、BMP (bone morphogenetic protein) シグナルと FGF (fibroblast growth factor) シグナルが必要なことが判明しており、BMP4 や FGF4 など付加する方法が汎用されている。また、肝細胞への方向付けにおいては DMSO (dimethyl sulfoxide) によるヒストンのアセチル化が有効であることも知られており、DMSO を用いた方法も報告されている¹⁾。

(3)の肝幹前駆細胞から肝細胞への分化には、HGF (hepatocyte growth factor) やオンコスタチン M (OsM)、デキサメタゾン (DEX) などを用いて分化誘導する方法が一般的である。更に各分化ステップで、培地や細胞外マトリックス (I 型コラーゲンやマトリゲルが汎用される) の種類、血清やフィーダー細胞の有無等が各プロトコルで工夫されている。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を再生医療に利用する場合には、血清やフィーダー細胞等の異種動物由来成分を排除し、かつ組成の明らかな培地 (chemically defined medium と呼ばれる) で分化誘導する必要があるが、同細胞を創薬研究に応用する場合にはそのような制限は必要ない。むしろ、創薬応用には可能な限り成熟度が高い肝細胞を分化誘導する必要があり、特に血清の付加は現時点では有用である (ただし、血清のロットチェックは必須である)。

以前は、胚様体 (embryoid body: EB) 形成法を用いて肝細胞への分化が試みられてきたが、最近では、EB 形成を介さず、上述のように直接分化させる方法が一般的である。しかしながら、これらの増殖因子やサイトカインの添加だけからなる分化誘導法は、肝細胞への分化効率もまだまだ不十分なのが現状であり、更なる分化効率の向上が必要となっている。

3.2 分化ステージに応じた最適な転写因子の過剰発現を組み合わせたヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導

著者らは、付加する増殖因子やサイトカインを単に最適化しただけの分化誘導法の改良では、劇的なヒト iPS 細胞から肝細胞への分化効率の向上が期待できないのではないかと考え、個々の分化ステップの細胞に (肝細胞への分化に) 適した転写因子を一過性に過剰発現させることで、効率よく肝細胞への分化を誘導する方法を開発した (Fig. 3)。すなわち、増殖因子やサイトカインを付加した従来の方法で細胞の外部環境を分化に適した状態にした上に、細胞内部から強制的に分化を生じさせるよ

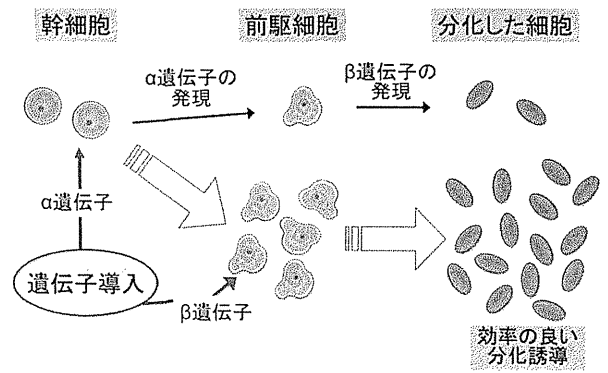


Fig. 3 機能遺伝子の導入による分化誘導効率の向上

適切な分化状態の細胞に効率よくかつ一過性に機能遺伝子を発現させることにより、目的の機能細胞を効率よく分化誘導することが期待できる。

うに適切な転写因子を発現させることで、分化効率を飛躍的に向上させる方法を考案した。

当初は、未分化 iPS 細胞からアクチビン A 処理で分化させた中内胚葉に SOX17 (Sry-related HMG box 17) 遺伝子を、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化ステップでは HEX (hematopoietically expressed homeobox) 遺伝子を、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化ステップでは HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) 遺伝子を導入することで、高いアルブミン産生能や薬物代謝機能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^{5,7)}。更に最近では、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への各分化ステップにおいて 7 種類の肝関連転写因子 (FOXA2, SOX17, HEX, HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , HNF6) を導入し、最も効率良く肝分化を促進できる転写因子を探索した結果、FOXA2 (forkhead box protein A2) 及び HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 α) 遺伝子を組み合わせることで発現させることにより、更に効率良く成熟肝細胞を分化誘導することに成功した (Fig. 4)⁸⁾。

このようにして作製した肝細胞は、80~90%以上の細胞がアルブミン、アシアロ糖タンパク質受容体、LDL (low density lipoprotein) 取り込み能、インドシアニングリーン取り込み能、薬物代謝酵素 (シトクロム P450 3A4, CYP7A1, CYP2D6 等) 陽性であり、ヒト初代培養肝細胞に匹敵する薬物代謝酵素の遺伝子発現レベルを示した。また、シトクロム P450 酵素などで代謝される 9 種類の薬物の代謝プロファイル調べたところ、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞より低いものの (シトクロム P450 酵素の種類により異なるが、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞の 1~40%程度の活性)、いずれの薬物に対しても代謝能を有していることが確認された。各

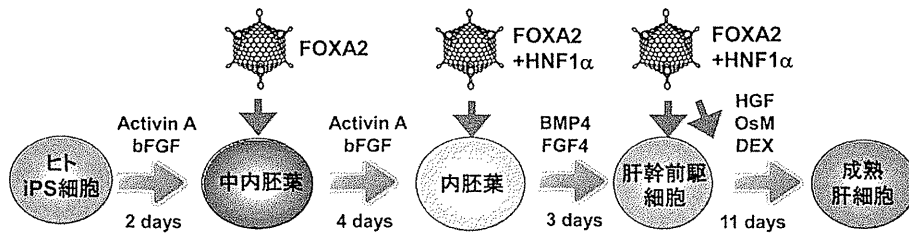


Fig. 4 液性因子と転写因子の導入を組み合わせることによるヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導

ヒト iPS 細胞をアクチビン A 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、FOXA2 発現アデノウイルスベクターを作用させた。更に、アクチビン A で 4 日間培養した後、培養 6 日目の内胚葉に対して FOXA2 及び HNF1 α 発現アデノウイルスベクターを作用させた。BMP4 と FGF4 を用いて 3 日間培養した後、培養 9 日目の肝幹前駆細胞に対して FOXA2 及び HNF1 α 発現アデノウイルスベクターを作用させた。その後、肝幹前駆細胞を HGF、オンコスタチン M (OsM)、デキサメタゾン (DEX) を用いて 11 日間培養することによって (培養 12 日目に FOXA2 及び HNF1 α 発現アデノウイルスベクターを更に作用)、高い薬剤代謝機能やアルブミン産生能等を有した肝細胞へ分化させることができる。

シトクロム P450 酵素の遺伝子発現と代謝能との間に、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞で乖離が認められたが、この原因としては、そもそもシトクロム P450 酵素の活性は個人差が大きいことが知られており (数十倍～千倍程度の個人差)、用いたヒト iPS 細胞が低いシトクロム P450 酵素活性の個人から樹立されていた可能性や、シトクロム P450 酵素の活性発現に必要な補酵素群の発現が未だ分化誘導肝細胞では十分でないこと等が考えられた。今後、異なった個人から樹立したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いて、同様の検討する必要があるであろう。

一方、作製したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いて、薬剤に対する毒性評価についても検討した (論文投稿中)。肝毒性を生じることが知られている多種類の薬剤について、本分化誘導肝細胞を用いて細胞毒性評価試験を行ったところ、株化細胞である HepG2 細胞を用いた場合に比べ、より感度良く毒性 (細胞傷害性) を示し、かつその毒性はシトクロム P450 酵素の阻害剤を加えると部分的に消失した。したがって、シトクロム P450 酵素で代謝された代謝物 (反応性代謝物) によって生じた細胞傷害性を、分化誘導肝細胞が検出できることが明らかとなった。反応性代謝物は薬物性肝障害の主な原因と考えられており、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞で反応性代謝物による細胞傷害性を検出できたことは、極めて大きな意義をもつと考えられる。以上のことから、FOXA2 及び HNF1 α 遺伝子を導入することにより、ヒト iPS 細胞から薬物代謝能を有する肝細胞を効率良く分化誘導できるだけでなく、同細胞が薬物の毒性スクリーニングに使用可能であることが示唆された。

なお、細胞分化の各ステップでの転写因子 (遺伝子)

の導入には、機能性に優れ、独自開発した改良型アデノウイルスベクターを用いた。iPS 細胞から肝細胞への分化のように、分化の各ステップが階層的に起こる場合には、各分化ステップでだけ導入遺伝子が機能するように (後の細胞分化に影響を与えないように)、遺伝子発現期間は一過性であること、そして効率よく細胞集団を分化させるためには、100%の遺伝子発現効率で遺伝子発現させることが必須となるが、改良型アデノウイルスベクターはこのような目的に唯一叶うベクターである。本研究で用いた改良型アデノウイルスベクターは、細胞への感染に関与するウイルス表面タンパク質のファイバータンパク質の C 末端領域にポリリジン配列 (KKKKKKK; リジン (K) が 7 つ続くので K7 と略称) を遺伝子工学的に付与しており、細胞表面のヘパラン硫酸を認識して多くの細胞種に効率よく遺伝子導入が可能となる (Fig. 5)。本 K7 型アデノウイルスベクターは、未分化ヒト iPS 細胞や、ヒト iPS 細胞から分化した細胞に対しても、100%の効率で遺伝子導入が可能であった²⁾。

著者らは、機能面で優れた様々なアデノウイルスベクターを開発しており、詳細は文献²⁾を参照されたい。

3.3 3次元培養によるヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の成熟化

ヒト初代培養肝細胞は、培養すると急速に肝細胞特異的な性質が失われていくことが知られている。例えば、アルブミンやシトクロム P450 酵素の遺伝子発現は、最適化された培養条件で培養しても、48 時間も培養すると、解凍 (凍結肝細胞の場合) 直後の遺伝子発現と比較すると 10～100 分の 1 程度にまで低下する。一方で、スフェロイド培養等の 3 次元培養や、繊維芽細胞や血管

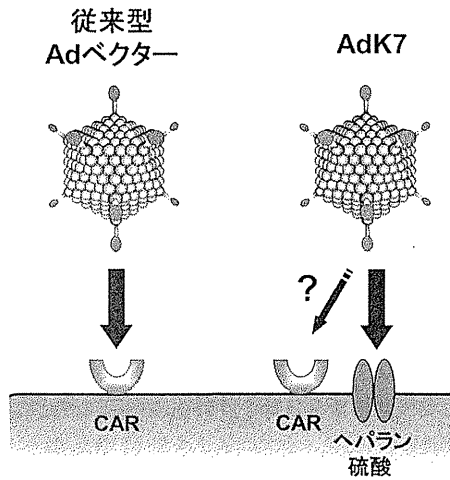


Fig.5 改良型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性

従来のアデノウイルス(Ad)ベクターはCAR(coxsackievirus adenovirus receptor)を認識して感染する。ポリリジン配列をファイバータンパク質のC末端領域に遺伝子工学的に付与したアデノウイルスベクター(AdK7)は、多くの細胞で発現しているヘパラン硫酸を認識して感染できるため、CAR陰性の細胞を含む多くの細胞への高効率な遺伝子導入が可能となる。

内皮細胞との共培養系でヒト初代培養肝細胞を培養すると、アルブミンやシトクロムP450酵素等の肝特異的な機能の減弱は、ある程度抑制されることが知られている。

そこで、細胞シート工学技術を用いることで、シート状に回収したSwiss3T3細胞とヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞とを積層3次元共培養し、肝機能の向上が可能か検討した(東京女子医大・先端生命医学研究所大橋一夫先生、岡野光夫先生との共同研究)¹⁰⁾。その結果、単層のヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞と比較し、肝細胞特異的な遺伝子発現量やアルブミン分泌量が有意に増加することが明らかとなった。また、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の成熟化には、肝細胞とSwiss3T3細胞との物理的な接触が重要であることを見出した。更に、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞へ、1型コラーゲンを重層することにより肝細胞成熟化が促進される一方で、コラーゲン合成阻害剤存在下においてはSwiss3T3細胞との積層3次元共培養時の成熟化が抑制されたことから、Swiss3T3細胞が産生する1型コラーゲンが肝細胞成熟化を担う主要な因子の1つであることが明らかとなった。最近では、簡便に3次元培養が可能な基材が各社から販売されており、培養法の改良によってもヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の成熟化亢進が期待でき

る。

3.4 Direct-reprogramming による肝細胞への直接分化

近年、繊維芽細胞等の分化した細胞から、iPS細胞を介さずに、直接他の細胞に分化を誘導するDirect-reprogrammingに関する研究がトピックスとなっている。

古くは、膵臓細胞を肝細胞に分化誘導した研究(2000年)や、B細胞をマクロファージに分化誘導した研究(2004年)があるが、2008年以降、膵β細胞や神経細胞、心筋細胞、肝細胞等を、通常複数の転写因子を発現する遺伝子を導入して、繊維芽細胞から直接分化誘導した研究が相次いでいる。肝細胞についても、マウスの系であるが、繊維芽細胞からのDirect-reprogrammingの報告がある^{11, 12)}(ヒト細胞を用いた肝細胞へのDirect-reprogrammingについてはまだ報告例はない)。iPS細胞から分化誘導した細胞同様に、Direct-reprogrammingによって得られた細胞(肝細胞を含む)も、創薬研究に有用なツールとなる可能性はあるが、重要なのは最終的に得られる分化細胞の“分化度”と、分化細胞を大量供給できるか?という観点であり、この2点が満たされれば、iPS細胞から分化させたのか、あるいはDirect-reprogrammingであるのかは問題ではない。

分化細胞の大量供給という観点では、Direct-reprogrammingによって終末分化した細胞に直接分化させた場合には、通常、細胞は増殖能を失うことから大量供給は難しく、その前駆細胞を分化誘導する方が有用かもしれない。その場合、前駆細胞を成熟細胞に分化させる技術が必要になり、iPS細胞から目的細胞への分化誘導研究は、この過程での技術開発にも役立つことが期待される。

4. おわりに

従来のヒトES/iPS細胞から分化誘導させた肝細胞は、機能面において初代培養肝細胞に比べて大きく劣っており、創薬研究への応用は困難であった。しかしながら、著者らが開発した分化誘導法により、創薬応用に向けて、ようやく最低限の解析が可能なレベルにまで分化した肝細胞を得ることが可能になった。

本稿では触れなかったが、著者らが分化誘導した肝細胞は、C型肝炎ウイルスに対する感染能も有しており¹³⁾、肝炎研究のための有力な培養モデル系にもなる(同様な報告が最近、海外のグループからも報告された^{14, 16)})。一方で、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を幅広く創薬研究に応用するためには、実験毎に3週間に及ぶ分化誘導を行うことは細胞供給の観点から効率が悪い。そこで現

在著者らは、分化途中の肝幹前駆細胞の段階で、分化細胞を大量に増幅できないかという課題にも取り組んでいる。今度、より一層高機能な（成熟度が高い）ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製法の開発（改良）を進めるとともに、本分化誘導肝細胞が創薬研究で広く活用されることを期待している。

なお、本稿で紹介した分化誘導法で作製されたヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、リプロセル社より Re-proHepato として市販されている。

文 献

- 1) D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazer S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E.: Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.*, 23, 1534-1541 (2005).
- 2) Snykers S., De Kock J., Rogiers V., Vanhaecke T.: In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*, 27, 577-605 (2009).
- 3) Baxter M.A., Rowe C., Alder J., Harrison S., Hanley K.P., Park B.K., Kitteringham N.R., Goldring C.E., Hanley N.A.: Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Rev.*, 5, 4-22 (2010).
- 4) Hay D.C., Zhao D., Fletcher J., Hewitt Z.A., McLean D., Urruticochea-Uriguen A., Black J.R., Elcombe C., Ross J.A., Wolf R., Cui W.: Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells*, 26, 894-902 (2008).
- 5) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.: Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19, 400-407 (2011).
- 6) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.: Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*, 6, e21780 (2011).
- 7) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012).
- 8) 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).
- 9) 水口裕之：次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学への応用, *Drug Delivery System*, 25, 493-503 (2010).
- 10) 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).
- 11) Huang P., He Z., Ji S., Sun H., Xiang D., Liu C., Hu Y., Wang X., Hui L.: Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 475, 386-389 (2011).
- 12) Sekiya S., Suzuki A.: Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 475, 390-399 (2011).
- 13) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K.: Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 416, 119-124 (2011).
- 14) Schwartz R.E., Trehan K., Andrus L., Sheahan T.P., Ploss A., Duncan S.A., Rice C.M., Bhatia S.N.: Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2544-2548 (2012).
- 15) Wu X., Robotham J.M., Lee E., Dalton S., Kneteman N.M., Gilbert D.M., Tang H.: Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation. *PLoS Pathog.*, 8, e1002617 (2012).
- 16) Roelandt P., Obeid S., Paeshuyse J., Vanhove J., Lommel A.V., Nahmias Y., Nevens F., Neyts J., Verfaillie C.M.: Human pluripotent stem cell derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *J. Hepatol.*, 57, 246-251 (2012).



特集 ■ iPS細胞と神経疾患

ヒト iPS 細胞の再生医療および創薬研究への応用の現状と展望

Perspectives Regarding the Potential Use of Human Induced Pluripotent Stem Cells for the Development of and Research on Medicinal Products

早川 堯夫¹⁾ 水口 裕之^{2,3)}

Takao Hayakawa¹⁾, Hiroyuki Mizuguchi^{2,3)}

Abstract

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are expected to be used in various life science areas, ranging from basic research to medical applications. This article describes perspectives regarding the potential use of hiPSCs, especially in Japan, for manufacturing products related to regenerative medicine as well as for establishing cell-based assay/screening systems that can be used for effective and efficient assessment of candidates for new drugs. The applications of hiPSCs include the following: hiPSC-derived retinal pigment epithelial cells for treating age-related macular degeneration; potential corneal reconstruction by using a combination of various relevant hiPSC-derived differentiated cells; potential treatment of Parkinson's disease by using dopaminergic neurons generated from hiPSCs; potential treatment of spinal cord injury by using neural stem/progenitor cells generated from hiPSCs; potential treatment of chronic heart failure by using hiPSC-derived functional cardiomyocytes; and development of cell-based drug toxicity screening and drug effect assay systems involving cells such as cardiomyocytes, hepatocytes, and neural cells that are differentiated from hiPSCs and can be used in the early phase of new drug development. The current situation regarding the development of guidelines for ensuring the quality and safety of hiPSC-derived medicinal products has also been described.

Key words : human induced pluripotent stem cells, regenerative medicine, cell-based medicinal products, cell-based drug assay/screening system, regulatory guidelines

はじめに

2007年にヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells : hiPSCs ; 以下, ヒト iPS 細胞) が山中らにより発明されて以来早5年が経過した。これは, 分化したヒト細胞をリプログラミング (初期化) できることを示したものであり, ヒト細胞の分化・脱分化が人為的に自在に操作できる可能性を示唆する金字塔で

ある。その活用により, 生命現象解明のための基礎研究, 病因や発症機構解明などの医学研究, 毒性・薬効評価系確立などを通じた創薬研究, さらに再生医療の実用化にも無限の可能性が拓かれた。

ヒト iPS 細胞は, 胚性幹 (embryonic stem : ES) 細胞と異なり倫理的問題が少なく, また自己 iPS 細胞由来の製品では, ドナーとレシピエントが同一人であり, 移植した場合の拒絶反応の回避が期待できるなど, 再生医療のための素材として大きな脚光を浴びている。ヒト

1) 近畿大学薬学総合研究所 Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

2) 大阪大学大学院薬学研究所 Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

3) 独立行政法人医薬基盤研究所 Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation

(連絡先) 早川堯夫 (〒154-0016 東京都世田谷区弦巻 5-1-8-435) 5-1-8-435 Tsurumaki, Setagaya-ku, Tokyo 154-0016, Japan

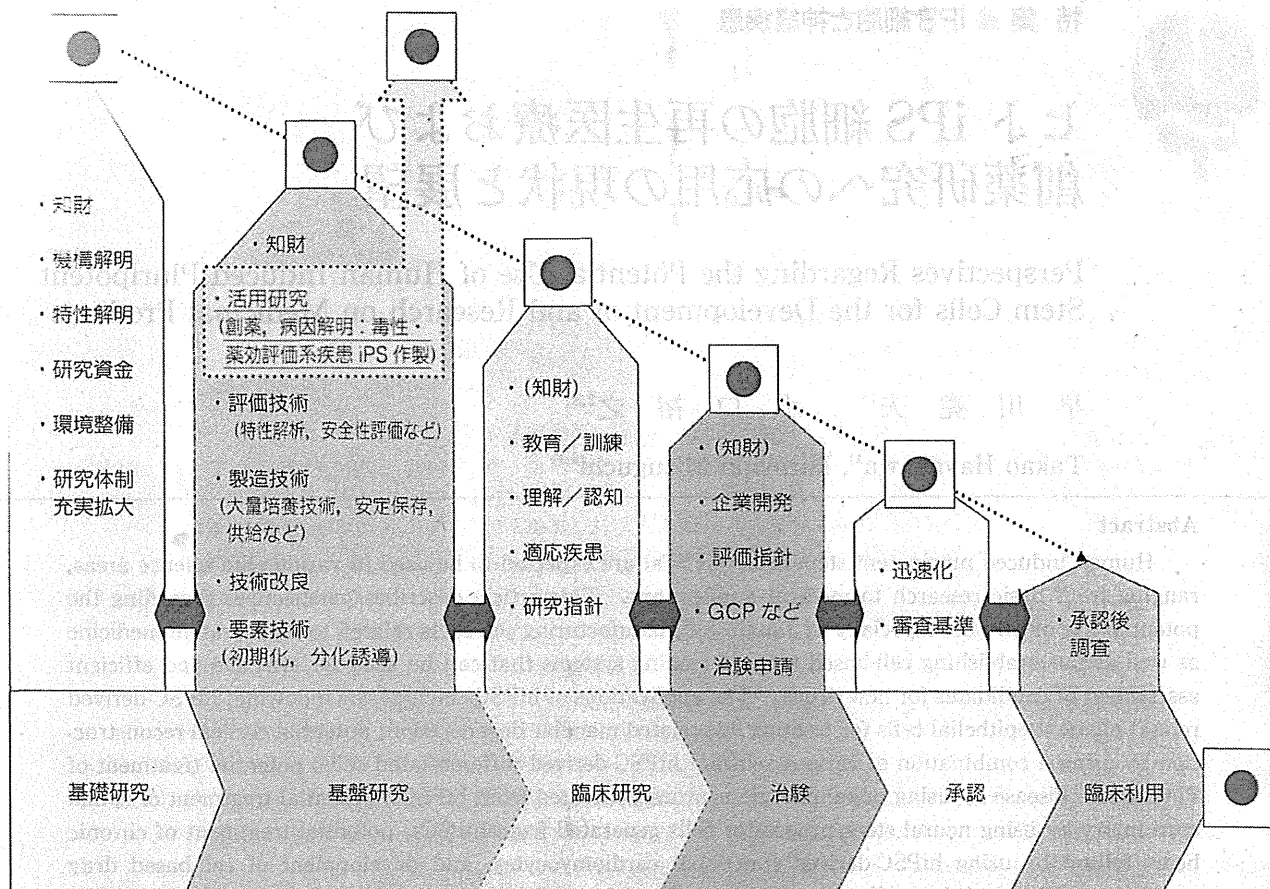


Fig. 1 ヒト iPS 細胞の再生医療、創薬研究への応用に必要な段階と要素

- ・各ベクトルにおいて世界をリードするためのオールジャパン体制の構築。
- ・各ベクトルの成果物を相互活用し、効率的、効果的、相乗的に各要素を進展させるためのオールジャパン体制の構築。
- ・臨床利用に各要素が最も有効に活用されるには、臨床目的や最終製品とそれに至る過程をイメージしながら個々の研究・開発を進めることが肝要。
- ・行政指針の役割は、最も効率的、効果的に所定の目標に達するための要素と方策の提示。当初は基本的留意事項の提示。各研究の進展や製品化に合わせ充実を図る。

iPS 細胞による再生医療の本格的な実用化には時間を要すると思われるが、一部では着実な進展もみられている。一方、創薬研究のため iPS 細胞に由来する細胞アッセイ系を活用しようとするアプローチは、再生医療用製品におけるような安全性の観点からの課題を多くの場合考慮に入れる必要はなく、より早期の実用化が期待されている。本稿では、主にわが国での再生医療および創薬研究（医薬品開発研究）へのヒト iPS 細胞の応用に関する現状と今後の展望について解説する。

I. ヒト iPS 細胞由来製品を用いた再生医療

ヒト iPS 細胞を用いた再生医療に関連して実用化の前提として研究面でヒト iPS 細胞から神経細胞を含め終末分化細胞を作製したという報告は多数ある。これら

がヒトに適用されるまでには、Fig. 1 および Fig. 2 に示したような多くのステップと検討が必要であり、ヒト iPS 細胞由来製品がヒトに適応された例はいまだない。ここでは、実用化に向けてわが国で進捗がみられる事例のいくつかについて現状と展望を以下に紹介する。

1. ヒト iPS 細胞から作製した網膜色素上皮細胞の加齢黄斑変性症への適応

ヒトへの臨床適用が最も早いと予測されるのが、理化学研究所の高橋政代博士のグループによるヒト iPS 細胞から網膜色素上皮 (retinal pigment epithelial: PRE) 細胞を作製し、加齢黄斑変性症に適応しようとする試みである。加齢黄斑変性症は、高齢者の視力低下の主要原因であるが、現存の治療法では疾患の沈静化や視力の回復が得られる症例は限定的であり、大多数の症例は線維性癍

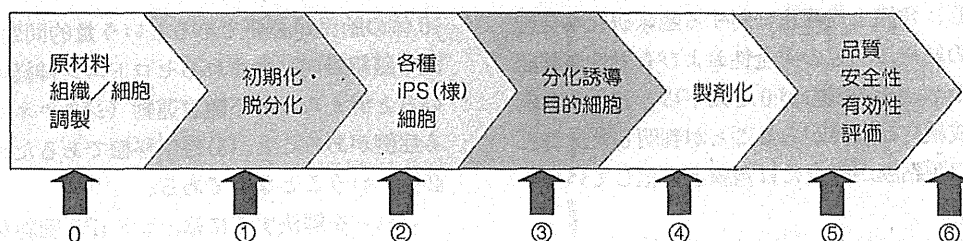


Fig. 2 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の製造、評価のポイント

- ①初期化/脱分化 (遺伝子導入もしくは今後開発されるかも知れない別の手法X)
- ①増殖因子などによる培養, 細胞大量培養
- ②細胞株樹立, 細胞のバンク化, 品質維持・管理, 安定供給, 細胞大量培養
- ②初期化/脱分化細胞 [iPS (様) 細胞] の特性解析 (identity, purity, potency), 安定性, 安全性など
- ③目的細胞への確実な分化誘導条件 (分化誘導剤, 培地, 培養条件など)
- ③分化した目的細胞の特性解析 (特異的細胞マーカー, 細胞の不均一性・純度, 造腫瘍性など)
- ④目的細胞の製剤化, 非細胞成分との組み合わせなど
- ⑤目的製品の安定性を含む品質特性解析, 非臨床/臨床試験による安全性・有効性評価 (臨床研究 v.s. 治験), 安全性上の関心事: 異所性の組織形成, 不適切な分化/造腫瘍性, 目的外の表現型発現, 免疫拒絶反応
- ⑥製造販売承認後の品質管理, 安全性モニターなど

痕の除去とともに網膜色素上皮の再生さらには視細胞の再生が必要とされている。

本アプローチの根拠となる実験結果 (proof of concept) は霊長類の ES 細胞を用いて疾患モデルの治療効果を世界で初めて確認したことに遡り、細胞移植に治療効果があることは、胎仔細胞の PRE 障害モデル動物への移植などから確認されている²⁾。しかし、他家移植である ES 細胞由来 PRE 細胞の場合、拒絶反応が起こることも含めて自己 iPS 細胞由来 PRE に比べてリスクが高いことから後者を利用する臨床応用を目指すこととなった。

その基盤となる研究として、最近、高橋らは、iPS 細胞から、生体内の細胞と同様の機能 (食食機能) を持つ RPE 細胞を分化誘導することに成功した。また、iPS 細胞から得られた RPE 細胞から、タイトジャンクションを持った細胞シートを作製することにも成功している^{3,4)}。そして、ヒト皮膚から誘導した iPS 細胞をもとに (1) 生体内で機能する成熟した細胞を、(2) 移植して機能回復に必要な量を通常の培養で、(3) 100% 純化した状態で得ることができるに至っているという。このように (1) 質 (成熟度)、(2) 量、(3) 純度の 3 点を満たす細胞種は他には存在しないため、PRE 細胞が最も臨床応用に近い細胞といえる。

詰めの作業として、(i) 宿主細胞のゲノムに組み込まれる恐れのないベクターを用いて iPS 細胞を樹立する技術の確認⁵⁾、(ii) 適度な強度と生体内と同じ組成の基底膜を有し、移植に適した柔軟性を持った RPE 細胞のシー

トを製造する技術の確認、(iii) 従来の分化誘導法の改良により高純度の PRE 細胞の集団を取得する技術の改良・開発、(iv) 非臨床安全性試験の実施、(v) 生物由来成分の適合性の確認を含む製造工程の確立などを進めつつあり、平成 24 年 (2012 年) 度中には臨床研究 (first-in-human) を開始する予定と聞く。シナリオどおりだと世界初のヒト iPS 細胞由来製品の臨床研究となる可能性が高い。

本細胞移植は、移植細胞が 1 度生着すれば生涯にわたり効果を発揮すると考えられ、また技術が確立されれば段階を経てより早期の患者に適応を広げることができ、より広範な患者が恩恵を受ける新たな医療が提供可能になると期待されている。

2. ヒト iPS 細胞を用いた角膜全層 (上皮、実質、内皮) の再生治療法

現在のところ角膜疾患のため重篤な視覚障害に至った患者に対しては献眼に依存した角膜移植が実施されている。しかし、ドナー角膜が圧倒的に不足している (全世界における待機患者約 1,000 万人に対して献眼数は約 10 万眼/年)。また、重篤な角膜疾患では免疫反応のため角膜移植が奏功しない。そこで細胞を用いた角膜再生治療法が期待されている。

角膜は上皮、実質、内皮の 3 層に分かれるが、国では、大阪大学の西田幸二教授や東京女子医科大学の大和雅之教授を中心とするグループが世界に先駆け、口腔粘膜の体性幹細胞を用いた自家培養上皮細胞シート

移植法を開発し、角膜上皮疾患に対する臨床研究を実施してきた。その結果、一定の安全性および有効性が確認された^{6,7)}。しかし、術後視力が0.1以下にとどまる症例が多く、長期成績には限界があることが判明した。これは、移植した口腔粘膜が完全には角膜上皮化していないことに起因する。

一方、この数年 iPS 細胞を用いた角膜再生治療法（角膜上皮および実質の自家再生治療法、角膜内皮の他家再生治療法）の開発研究が行われてきたが、有望な結果が得られつつある。すなわち、iPS 細胞から重層上皮前駆細胞、角膜上皮細胞への分化誘導⁸⁾、純化した iPS 由来上皮細胞シートの作製に成功したという。同様に、iPS 細胞から角膜内皮の発生起源である神経堤細胞へ高効率に誘導する新規培養系の創出と、独自に開発した角膜内皮分化誘導法を用いて、角膜内皮様細胞への分化誘導にも成功したという。角膜内皮再生については、既に培養角膜内皮細胞を動物眼に移植することに成功している。さらに、慶應義塾大学の榛村重人博士らは角膜実質に存在する体性幹細胞の単離⁹⁾と角膜内皮様細胞への分化誘導にも成功している。

このように、ヒト iPS 細胞から角膜細胞を創出するための基本技術が整備されてきたことから、開発研究をいっそう加速させ、臨床研究 (first-in-human) を7年以内に開始することを目指している。

3. ヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経前駆細胞の移植によるパーキンソン病治療

パーキンソン病は厚生労働省の特定疾患に指定された進行性神経変性疾患で、ドーパミン神経細胞の脱落により運動機能の低下を呈する神経難病である。わが国に約14万人の患者が存在する（2008年の統計）。

パーキンソン病に対しては主にL-ドパ（ドーパミン前駆物質）を治療薬とする薬物治療が基本であるが、病気の進行とともにドーパミンの合成にあたるドーパミン神経細胞が枯渇し、薬の効果が十分発揮できなくなる。根本治療は十分な量のドーパミン神経細胞の存在であるが、薬物療法においてもドーパミン神経細胞の補充があれば相補的な効果が期待できる。

既に欧米では1980年代末から400例もの胎児中脳細胞移植が行われており、L-ドパに反応しないような重症例を除けば二重盲験試験¹⁰⁾でもその有効性が示されている。すなわち、パーキンソン病に対する細胞移植治療という proof of concept が確立している。

一方で、胎児を利用する方法には多くの問題点も指摘されている。倫理的な問題以外に、(1) 1回の治療に5～

10体の胎児が必要であるという量的問題、(2) 術後に胎児中脳組織内に含まれるセロトニン神経細胞が関与していると考えられる不随意運動（ジスキネジア）がみられる症例があること、(3) 他家移植であるために免疫抑制が必要ということなどである。

これらを解決するには、ヒト iPS 細胞からドーパミン神経細胞に相当する細胞を作製・純化して治療に供するという方策が考えられる。まずは患者由来自己細胞から、将来的にはヒト白血球型抗原適合正常人由来 iPS 細胞を用いた移植治療への移行が考えられる。

京都大学の高橋 淳博士らは、世界に先駆けて、カニクイザル ES 細胞から誘導したドーパミン神経細胞移植によってカニクイザルパーキンソン病モデルの行動改善が得られることを報告した¹¹⁾。その後、ヒト ES 細胞からもドーパミン神経細胞の誘導に成功し、カニクイザルモデルへの移植を行い、分化程度が進んだ移植細胞では腫瘍性増殖をきたすことなくサルモデルの行動改善が得られることを明らかにした。さらに、ヒト iPS 細胞からもドーパミン神経細胞を誘導し、サルモデル脳にドーパミン神経細胞として生着していることを明らかにした。

術後の問題であったジスキネジアを回避するためには、目的細胞の純化が重要となるが、高橋らのグループは表面マーカーを用いたセルソーティングにより¹²⁾ 世界で初めてヒト ES、iPS 細胞由来のドーパミン神経前駆細胞を選別することに成功したとのことである。この選別されたドーパミン神経前駆細胞は以下の性質を持つ：(1) 高率にドーパミン神経細胞を産生する、(2) 増殖率ほぼゼロで、腫瘍性増殖の可能性が低い、(3) 胎児細胞移植に用いられるヒト胎児中脳腹側組織と比べてドーパミン神経マーカーの発現は同等であるが、セロトニン神経マーカーの発現も極めて低く、移植後のジスキネジアの発生を回避し得る。

以上のような研究基盤を背景に、わが国発の技術で世界のパーキンソン病治療に大きく貢献するための細胞移植治療が目指されている。その戦略を再度要約すると、(1) 孤発性パーキンソン病患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、(2) 浮遊培養系で神経誘導を行い、(3) ドーパミン神経前駆細胞を選別し、(4) 選別したドーパミン神経前駆細胞の有効性と安全性をカニクイザル、ラットの疾患モデル、ならびに免疫不全マウスへの移植で検証し、(5) 両側線条体に移植（局所麻酔下の定位的脳手術）するというもので、目的の達成を期待したい。本分野の詳細については本特集の森実飛鳥氏のレビューを参照されたい。

4. ヒト iPS 細胞を用いた脊髄再生医療

わが国の脊髄損傷患者の数は 50 万人に近いという。抗痙攣剤、人工呼吸器、脊椎固定術などの医療の向上に伴い生命予後は改善されたが、脊髄損傷による麻痺とそれに伴う深刻な合併症は依然として患者を苦しめている。中枢神経系の再生を可能とし、脊髄損傷に対する革新的な治療法の開発が望まれる所以である。

米国では 2010 年 10 月にヒト ES 細胞を分化させた「オリゴデンドロサイト前駆細胞」を患者の損傷部位に注入して神経再生を促す治療法を利用する臨床試験が FDA の許可を得て開始された。わが国では、慶應義塾大学の岡野栄之教授らのグループを中心に、世界に先駆けて損傷脊髄に対する胎児由来神経幹細胞、ES 細胞由来神経幹細胞移植の有効性が報告されている¹³⁻¹⁵⁾。しかし、わが国における倫理的問題のため臨床応用は現在まで困難な状況である。最近、サルおよびヒト iPS 細胞由来神経幹細胞についてマウスやサル脊髄損傷モデル動物を用いた安全性・有効性の検討が行われているが、ヒト臨床用に適切なヒト iPS 細胞や細胞バンクの樹立、製品としての神経幹細胞への分化誘導、安全性の検討も含め、確認には時間が必要であるとのことである。なお、本分野の詳細については本特集海苔 聡氏のレビューを参照されたい。

5. iPS 細胞を用いた再生心筋細胞移植による重症心不全治療法

従来の薬物療法やペースメーカー治療に不応性な難治性重症心不全は、補助人工心臓や心臓移植によらざるを得ない。しかし心臓移植は本邦はもとより世界中でドナー不足の状態にあり、ドナー心の恩恵を受けられる患者は極めて限られている。そこで、ヒト心筋細胞移植法の開発が待望されている。わが国では大阪大学の澤 芳樹教授らが重症心不全例への筋芽細胞シート移植による臨床研究を進めており一定の成果を収めている。

一方、慶應義塾大学の福田恵一教授らのグループは、(1)末梢血中の免疫細胞 [T 細胞¹⁶⁾ や樹状細胞] から iPS 細胞を樹立、(2) iPS 細胞を Xeno free で培養するため iPS 細胞自身を分化させ、フィーダー細胞とする方法の開発¹⁷⁾、(3) iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、成熟させる方法の開発¹⁸⁾、(4) 心筋細胞を未分化幹細胞から分離し、純化する方法の開発¹⁹⁾、(5) 移植細胞の効率的な生着法や移植法の開発²⁰⁾などを基盤に、究極的には患者由来の安全性の高い iPS 細胞を樹立し、これを大量培養した後に純化精製し、大量の心筋細胞 (1×10^7 個から 1×10^8 個) を心不全の患者の心臓に移植するべく研究を展開し

ようとしている。

II. ヒト iPS 由来細胞製品の臨床適用に関する規制環境の整備

わが国発の技術開発であるヒト iPS 細胞を素材とした製品の再生医療における実用化を図るためには製品の品質や安全性の確保などとともに患者を用いた臨床試験が実施される必要がある。現在のところ、ヒト iPS 細胞由来製品を用いた再生医療には 2 つのアプローチがある。

1 つは薬事法下における製品の製造販売承認を目指したものである。すなわち、企業による研究開発、治験に入る前にヒトに適用する (first-in-human) に際して支障がないという評価、そして「治験」、「製造販売承認」、「臨床利用」という段階を踏むアプローチである。2 つ目は、医師法下で行われる「ヒト幹細胞臨床研究」である。「ヒト幹細胞臨床研究」の実施の是非は、厚生労働省厚生科学審議会の議を経て、大臣から意見を聴くこととなっている。

ヒト幹細胞臨床研究を進めていく過程において、有効性および安全性の観点から公的保険制度における評価療養に該当すると評価された場合には「高度/先進医療」として公的医療給付の対象となる。このヒト幹細胞臨床研究が、さらにはシームレスに企業による製品開発につながることも期待されている。これに対し行政当局が開発早期から臨床使用に至るまでの必要な要件を示すことは、医学研究者や企業が研究・開発を合理的、効率的、効果的に進め、より迅速に実用化するために必須である。

また、規制側としても、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるために審査上の留意点に関する共通の理解を深め、対応できる準備を早期に行う必要がある。さらに、国際競争面でも研究・技術開発のみならずガイドライン策定において先行することは、国際的優位性を保持するうえでも不可欠な要素である。

これを踏まえ、薬事法下ではいち早く平成 12 年 (2000 年) 12 月 26 日医薬発第 1314 号「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」において基本的考え方 (別添 1) や基本的技術要件 (別添 2) が示された。第 1314 号別添 2 については、その後の学問・技術の進歩、国際動向を踏まえて、平成 18、19 年 (2006、2007 年) 度の厚生労働科学研究班 (研究代表者: 早川堯夫) により改訂作業が実施され、この成果をもとに、平成 20 年 (2008 年) 2 月に「ヒト (自己) 由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確

保に関する指針(薬食発第 0208003 号)および平成 20 年(2008 年)9 月に「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第 0912006 号)」がそれぞれ通知された。

その後さらに、平成 20~22 年(2008~2010 年)度の厚生労働科学研究班(研究代表者:早川堯夫)によりヒト体性幹細胞,ヒト ES 細胞,ヒト iPS 細胞にそれぞれ由来する製品に特化した研究が行われ,その成果が 5 つの指針案として提示された²¹⁾。そのうちの 2 つが「自己および同種由来のヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保」に関するものである。これらの指針が目指すのは,患者益,国民益に資し,実用化の水先案内,牽引力,推進力としての役割である²²⁾。

臨床研究に関しては平成 18 年(2006 年)7 月 3 日付け厚生労働省告示 第 425 号「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が臨床研究推進の一翼を担っていたが,最近その改訂版が平成 22 年(2010 年)11 月に出された(厚生労働省告示 第 380 号)。この科学的内容は,おおよそ薬食発第 1314 号および上記の薬事上の指針および指針(案)と同様のものとなっている。

III. ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた創薬研究

創薬のプロセスは,一般的に開発費に 1,000 億円超,期間に 10~15 年を要する。その過程で約 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 1 つが医薬品として承認を受ける。この過程を迅速化させるための新しい技術の 1 つとして,iPS 細胞技術が注目されている。

医薬品開発段階における創薬研究としては,上流からさかのぼると,(1)疾患のメカニズム解明や創薬ターゲット分子の検索,(2)スクリーニング系の構築と化合物スクリーニング,(3)化合物の最適化や薬効評価試験・安全性薬理試験・毒性試験・薬物動態試験,(4)製造法の最適化(確立)や品質管理試験などの CMC (chemistry, manufacturing and control)試験,(5)臨床試験,と続く。iPS 細胞を用いた創薬研究は,大きく分けて特定の疾患を反映した疾患由来の iPS 細胞(疾患 iPS 細胞)を用いた研究と,健常人由来の iPS 細胞を用いた研究に分けられるが,疾患 iPS 細胞は上記(1)(2)の研究段階に,健常人由来の iPS 細胞は(1)(2)(3)の研究段階に利用可能と期待されている。

なお,iPS 細胞自身がこれらの研究段階に利用されることは少なく,iPS 細胞から特定の細胞に分化させた細胞が創薬研究には利用される。したがって,iPS 細胞が創薬研究に利用できるか否か(あるいはどのような創薬研

究に利用できるか)は,iPS 細胞から分化させた細胞の“分化度”に大きく依存しており,未熟な分化細胞では実際のヒトにおける病態や状態を反映していないことが多く,利用できないことになる。

IV. 疾患 iPS 細胞を用いた創薬研究

患者生検組織から得た初代培養細胞を使用して作製された疾患 iPS 細胞は,疾患を引き起こす原因となる変異をゲノムに有しており,疾患標的組織細胞に分化させることで,疾患の表現型を再現できる可能性がある。この表現系や分化過程などを解析することで,その疾患の発症メカニズムの解明や,新たな創薬ターゲットを見出す研究への利用が期待されている。これまで,脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy:SMA)や家族性自律神経失調症, $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症をはじめとする多くの疾患 iPS 細胞が作製されている(詳細は文献 23 を参照)。

疾患 iPS 細胞は,これまで解析が困難であった難治性疾患に対する新しいアプローチからの創薬研究を可能にした点で期待が大きい。課題としては,疾患 iPS 細胞を標的細胞に分化させても,必ずしも培養系では疾患(表現系)を再現できない場合があることが挙げられる。また,そもそも,iPS 細胞の性質はクローンごとと比較的大きく異なっており,iPS 細胞のクローンによる性質の違いや,クローンによる細胞の分化度の違いと,疾患による iPS 細胞(由来分化細胞)の表現系(疾患を反映した機能不全など)の違いを,区別して見極めることが必要である。

V. 健常人由来の iPS 細胞を用いた創薬研究

健常ヒト iPS 細胞から分化させた細胞(特に,心筋,肝臓,神経細胞など)は医薬品開発研究の最上流の疾患のメカニズム解明や創薬ターゲット分子の検索研究だけでなく,化合物スクリーニングや薬効評価試験・安全性薬理試験・毒性試験・薬物動態試験などの前臨床試験においても活用が期待されている。細胞を用いた *in vitro* アッセイ系は,薬理作用(有効性)の評価や毒性評価のためにこれまでも活用されてきたが,多くは株化細胞や初代培養(ヒト)細胞を用いたものである。株化細胞はスループット性に優れているが,生体の状態(病態)をどの程度反映しているかに関して課題があり,一方で初代培養ヒト細胞は単一ロットの細胞を大量に得ることが困難であるという課題がある(神経細胞では,そもそも

初代培養ヒト細胞を得ることさえ困難である)。また、動物由来の初代培養細胞や動物実験では、「種差の壁」のために、ヒト固有の薬理・毒性作用を見落とす可能性がある。健常ヒト iPS 細胞由来分化誘導細胞は、これらの問題点を克服できることが期待されることから、大きな注目を集めている。

以下、心筋、肝臓、神経細胞を例に、健常ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた創薬研究や技術開発研究の現状について解説する。また、これらの分化細胞を用いた研究は、各分化細胞への細胞の“分化度”が試験系の精度に大きく影響することから、効率のよい分化誘導法の開発が最も重要であり、分化誘導技術開発の現状についても述べる。なお、健常人由来の iPS 細胞を用いた創薬研究は、ヒト ES 細胞を用いた同様の研究が先行しており、以下ではヒト ES 細胞と iPS 細胞の両者を用いた研究について紹介する。

1. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた創薬研究

ヒト ES 細胞や iPS 細胞から分化させた細胞の応用としては、研究・開発が最も進んでおり、特に薬物誘発性 QT 延長アッセイ系はリプロセル社 (<http://www.reprocell.com/>), ChanTest 社 (<http://www.chantest.com/>), Cellular Dynamics International 社 (<http://www.cellulardynamics.com/>) により既に実用化されている。

薬物誘発性 QT 延長とは、心室筋の活動電位持続時間に相当する心電図の QT 間隔が延長することを特徴とし、重篤な副作用を起こす原因となる。QT 延長の主な原因としては、薬剤が K⁺チャネルの形成サブユニットである hERG (human *ether-a-go-go* related gene) チャネルの機能を阻害することであることが明らかとなっている。日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation: ICH) において制定された安全性薬理試験ガイドラインにおいては、医薬品候補化合物の催不整脈作用、特に QT 間隔延長作用の有無を検討することが求められており、hERG 遺伝子を導入し hERG K⁺チャネルを発現させた HEK293 細胞や CHO 細胞などを用いて、化合物の hERG K⁺チャネルに対する機能抑制作用を調べる試験が安全性薬理試験として推奨されている。

リプロセル社が開発した QT 延長試験 (QTempo) は、ヒト iPS 細胞由来の拍動心筋細胞を用いて心電図の QT 間隔に相当する波形を無侵襲の電気生理学的な手法を用いて測定する cell-based QT 延長試験法であり、QT 延長だけでなく、拍動数の変化、K⁺イオン以外の複数イオ

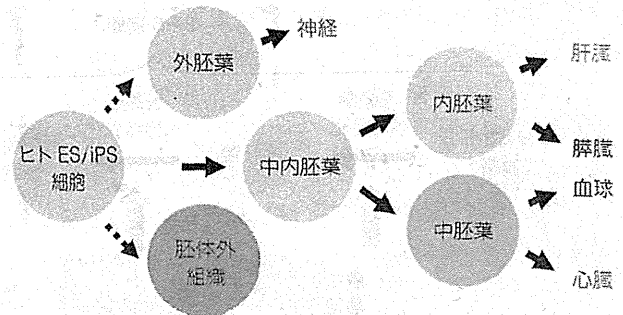


Fig. 3 ヒト ES/iPS 細胞から心臓、肝臓、神経細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞から心臓 (心筋細胞)、肝臓 (肝細胞)、神経細胞への分化は、それぞれ中胚葉、内胚葉、外胚葉を通して起こる。

ンチャネルへの影響も観察できることを特徴としている。hERG 遺伝子を導入した細胞株を用いた試験と比較し、拍動心筋細胞を用いていることから、多種多様なイオンチャネルを発現していることなど、より正確な薬物誘発性 QT 延長試験が期待できる。

心筋細胞は、ヒト ES/iPS 細胞から中胚葉を経由して分化誘導される (Fig. 3)。ヒト ES/iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導技術開発は、神経細胞と並んで比較的進んでいるが、ヒト ES/iPS 細胞を Noggin と G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) を添加して培養すると心筋細胞へ効率よく分化することが知られている¹⁵⁾。ヒト ES 細胞由来心筋細胞は Cellartis 社 (<http://www.cellartis.com/>) から、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は iPS アカデミアジャパン社 (<http://www.ips-cell.net>) から発売されており (Cellular Dynamics International 社が製品化した細胞を販売)、リプロセル社もヒト iPS 細胞由来心筋細胞を発売している。

2. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた創薬研究

肝臓 (肝細胞) は生体内外の物質の代謝、解毒、排泄などに関与する主要な臓器 (細胞) であり、医薬品は主に肝細胞で薬物代謝酵素により代謝され、抱合系酵素により解毒を受け、トランスポーターにより排出される。肝毒性は医薬品候補化合物の開発中止原因の主要なものであり、正常肝細胞を用いて将来起こり得る高い濃度の毒性発現を研究開発の初期段階に予測できれば、安全性の高い医薬品を効率よく開発することにつながると思われる。

現在は、主に初代培養ヒト肝細胞や肝臓由来の細胞を用いて、薬剤あるいは反応性代謝物 (薬物の代謝物) により代謝された代謝物による肝毒性を調べる試験が

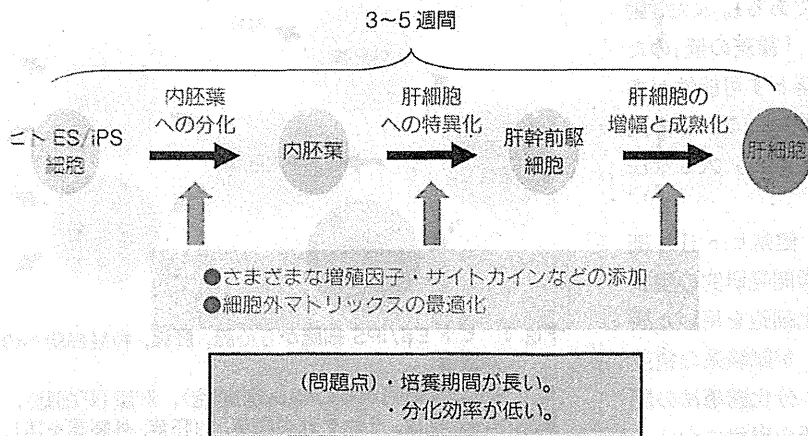


Fig. 4 ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への代表的な分化誘導法。ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は、内胚葉、肝幹前駆細胞を通して起こる。これらの各段階で、さまざまな増殖因子やサイトカインなどの添加、および細胞外マトリックスの最適化がなされる。しかしながら、培養期間が長いこと、分化効率が低いことが課題となっている。

験する毒性試験や、薬物代謝酵素の誘導や阻害などの薬物動態評価試験が施行されている。しかしながら、コストや高機能なヒト肝細胞ロットの安定供給の問題などから、ヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた毒性・薬物動態評価系の開発が期待されている。

また、将来的には、ヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた場合、個人差を反映した評価系が開発できる可能性もある。さらに、ヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は肝炎ウイルス (B型肝炎やC型肝炎ウイルス) 研究にも有用であり、疾患のメカニズム解明や創薬ターゲット分子の検索研究にも応用できる。

肝細胞は、ヒト ES/iPS 細胞から中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞などを經由して分化誘導される (Fig. 3, 4)。ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法としては、さまざまな方法が開発されているが、ヒト ES/iPS 細胞から中内胚葉や内胚葉への分化にはアクチビン A などを、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化には BMP4 (bone morphogenetic protein 4) や FGF4 (fibroblast growth factor 4) などを、肝細胞の成熟化には HGF (hepatocyte growth factor) やオンコスタチン M (OSM) などを用いて分化誘導する方法が一般的である。しかしながら、これらの方法を用いて分化誘導された肝細胞の薬物代謝酵素活性は、初代培養ヒト肝細胞に比べると一般的には 2~3 オーダー以上低いことが多く、よりいっそうの分化誘導効率の改善が必要である。

筆者らは最近、細胞の外部環境 (さまざまな液性因子の付加) を、発生段階を模倣したように変化させ分化誘導する上記の方法では限界があると考え、適切な外部環境の処方に加え、細胞内部からの分化指令が働くように細胞分化の適切な時期に適切な転写因子を発現させることで肝細胞への分化効率が飛躍的に亢進することを報告した²⁴⁻²⁶⁾。

具体的には、中内胚葉から内胚葉への分化段階には Sox17 (SRY-box containing gene 17) 遺伝子を、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化段階には HEX (hematopoietically expressed homeobox) 遺伝子を、肝幹前駆細胞から肝細胞へに成熟 (分化) 段階には HNF4a (hepatocyte nuclear factor 4, alpha) 遺伝子を発現させることで、80%以上の細胞がアルブミン陽性となり、各種薬物代謝酵素の遺伝子発現レベルも初代培養ヒト肝細胞に近いレベルにまで亢進した。なお、遺伝子導入にはウイルス表面蛋白質のファイバー領域を独自に改変し、未分化ヒト ES/iPS 細胞およびヒト ES/iPS 細胞から分化させた細胞へ 100%の効率で一過性の遺伝子発現が可能な改良型アデノウイルスベクターを用いた。

今後、どのような創薬研究で本分化誘導肝細胞が使用できるのか、あるいは創薬研究に使用するためには、まだどのような改善が必要か、などを詳細に解析することで、さらなる分化効率の向上に必要な技術開発や応用研究へと進めていきたい。

本分化誘導系を用いた事業化に関しては、リプロセル社が進めていく予定である。ヒト ES 細胞由来分化誘導肝細胞に関しては、Cellartis 社 (<http://www.cellartis.com/>) が販売しているが、現状では高価であり、薬物代謝酵素活性のレベルも低いようである。

3. ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた創薬研究

これまで正常ヒト神経細胞の入手は困難であったため、初代培養ヒト神経細胞を用いて神経細胞に対する薬効や毒性を試験することは不可能であった。ヒト iPS 細胞由来分化誘導神経細胞を用いることで、新たな細胞評価系の構築が可能になる。例えば、ドパミン神経を誘導し、神経突起などの微細な神経細胞構造を指標として毒

三評価を行うことや、分化誘導ドパミン神経で構成された神経回路のカルシウムレスポンスに対する各種化合物の影響を評価することなどへの利用が考えられる。また、神経細胞だけでなく、グリア細胞を含む中枢神経系の構成細胞に対する細胞毒性などを評価することも可能となる。

ES/iPS細胞から神経細胞への分化誘導は、これまでさまざまな方法が開発されており、胚様体を形成させる方法、ストローマ細胞など(例:PA6細胞)のフィーダー細胞上で分化させる方法(SDIA法:stromal cell derived inducing activity)²⁷⁾、あるいはレチノイン酸などの誘導因子を用いて直接分化させる方法などが開発されている。

胚様体やフィーダー細胞を用いる方法はその後、ニューロスフェア(neurosphere:FGF2などの増殖因子を含む無血清培地で浮遊培養した球状の神経幹/前駆細胞塊)を形成させて神経幹/前駆細胞を選択的に増幅させ、そこからニューロンやグリア細胞に分化させる方法と²⁸⁾、ニューロスフェアを介さず、直接ニューロンやグリア細胞に分化させる方法に分けられる。ヒトES/iPS細胞から胚様体を経てニューロスフェアが形成される効率は必ずしも高くなく、通常約1カ月程度の長時間を要するが、ニューロスフェアを形成した神経幹/前駆細胞は*in vitro*で増幅が可能であり、凍結保存も可能という長所も有する。

一方、ES/iPS細胞を血清や増殖因子を除いた培養液で浮遊培養すると、胚様体様浮遊凝集塊を形成し、神経前駆細胞や神経細胞へ比較的効率よく分化することが知られている(SFEB法:serum-free floating culture of embryoid bodies-like aggregates)²⁹⁾。最近の研究から、マウスでの検討ではあるが、血清や増殖因子を除いた培養液で浮遊培養されたES細胞は、Zfp521という核内蛋白質を発現させ、この蛋白質の働きで神経前駆細胞への分化が誘導されることが明らかになった³⁰⁾。

いずれの方法を用いても、今後は、個々の中枢神経系の構成細胞(ドパミン神経細胞、アストロサイトなど)への分化効率の上昇や、特定の構成細胞を純化する技術開発が必要となると考えられる。なお、リプロセル社はヒトiPS細胞から分化誘導したドパミン神経細胞を発売している。

VI. Direct-reprogramming

近年、線維芽細胞などの末梢の分化した細胞から、iPS細胞を介さずに、直接他の細胞に分化を誘導する direct-

Table Direct-reprogramming による各種細胞の分化誘導例

雑誌名	年	号/頁	筆頭著者(責任著者)	種	元の細胞	誘導細胞	遺伝子
Nat Cell Biol	2000	2/879-887	Shen CN (Tosh D)	mouse	pancreas	liver	(液性因子) glucocorticoid, dexamethasone
Cell	2004	117/663-676	Xie H (Graf T)	mouse	B cell	macrophage	C/EBP γ , η
Nature	2008	455/627-632	Shou Q (Melton DA)	mouse	pancreas	γ -cell	Ngn3, Pdx1, Mafk
PNAS	2008	105/6057-6062	Funf R (Graf T)	mouse	fibroblast	macrophage	PU.1, C/EBP α
Nature	2010	463/1035-1041	Vierbuchen T (Wernig M)	mouse	fibroblast	neuron	Ascl1, Brn2, Myt1l
Cell	2010	142/375-386	Ieda M (Srivastava D)	mouse	fibroblast	cardiomyocyte	Gata4, Mef2c, Tbx5
Nature	2010	468/521-526	Szabo E (Bhatia M)	mouse	fibroblast	blood progenitor	Oct-4
J Clin Inv	2011	121/640-657	Hiramatsu K (Tsumaki N)	mouse	fibroblast	hyaline cartilaginous	c-Myc, Klf4, Sox9
Nat Cell Biol	2011	13/215-222	Efe JA (Ding S)	mouse	fibroblast	cardiomyocyte	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, + small molecule
PNAS	2011	108/10343-10348	Pfisterer U (Parmar M)	human	fibroblast	dopaminergic neuron	LMx1a, Foxa2, Ascl1, Brn2, Myt1l
PNAS	2011	108/7838-7843	Kim J (Ding S)	mouse	fibroblast	neuron progenitor	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
Nature	2011	476/220-223	Pang ZP (Wernig M)	mouse	fibroblast	neuron	NeuroD1, Brn2, Ascl1, Myt1l
Nature	2011	476/224-227	Cattazzo M (Dell'Anno MT)	mouse/human	fibroblast	neuron progenitor	Ascl1, Nrnr1, Lmx1a
Nature	2011	475/386-389	Huang P (Hui L)	mouse	fibroblast	hepatocyte	Gata4, Hnf1a, Foxa3, inactivation of p19
Nature	2011	475/390-393	Sekiya S (Suzuki A)	mouse	fibroblast	hepatocyte	HNF4a, Foxa1 or 2 or 3
Nature	2011	476/228-231	Yoo AS (Cabrera GR)	human	fibroblast	neuron	miR-9/9*, miR-124 (a process facilitated by NEUROD2)
Nature	2011	6/621-621	Lee ST (Koh JK)	human	fibroblast	Neurosphere	Neural stem cell line-derived cellular extract
Cell Stem Cell	2011	9/113-118	Ambasudhan R (Ding S)	human	fibroblast	neuron	miR-124, Brn2, Myt1l
Cell Stem Cell	2011	9/206-211	Bao KY (Guan K)	mouse/human	fibroblast	neuron	Hb9, Isl1, Lhx3, Ascl1, Brn2, Myt1l
Cell Stem Cell	2011	9/1-9	Miyata S (Wernig M)	mouse	hepatocyte	neuron	Brn2, Ascl1, Myt1l

reprogramming に関する研究がトピックスとなっている。古くは、膵臓細胞を肝細胞に分化誘導した研究(2000年)や、B細胞をマクロファージに分化誘導した研究(2004年)があるが、2008年以降、膵 β 細胞や神経細胞、心筋細胞、肝細胞などを、通常複数の転写因子を発現する遺伝子を導入して、線維芽細胞から直接分化誘導した研究が相次いでいる (Table)。

ES/iPS細胞から分化誘導した細胞同様に、direct-reprogramming によって得られた細胞も、創薬研究に有用なツールとなる可能性はあるが、重要なのは最終的に得られる分化細胞の“分化度”と、分化細胞を大量供給できるか?という観点であり、この2点が満たされれば、iPS細胞から分化させたのか、あるいはdirect-reprogramming であるのかは問題ではない。分化細胞の大量供給という観点では、direct-reprogramming によって終末分化した細胞に直接分化させた場合には、通常、細胞は増殖能を失うことから大量供給は難しく、その前駆細胞を分化誘導するほうが有用かもしれない。その場合、前駆細胞を成熟細胞に分化させる技術が必要になり、ES/iPS細胞から目的細胞の分化誘導研究は、この過程での技術開発にも役立つことが期待される。

おわりに

本稿では、ヒト iPS 細胞を素材として分化誘導して得られた細胞製品を重篤な疾病に適応しようとするいくつかの事例について触れたが、これ以外にも例えば本特集の別稿で述べられているように筋ジストロフィー患者から iPS 細胞を作製し、それにジストロフィン遺伝子を導入することで、疾病の原因遺伝子を修復し、骨格筋前駆細胞に分化誘導した後、移植して体内での筋芽細胞への分化と骨格筋との融合によりジストロフィンの供給を期待するといったものから、血小板の作製、さらには臓器再生などさまざまな試みがある。また、ES/iPS細胞を用いた創薬研究としては、心筋細胞、肝細胞、神経細胞についての現状を述べたが、これらの細胞以外にも、例えば膵 β 細胞や免疫系細胞は、特に薬効評価系のための重要なターゲット細胞である。また、現在のところ、ほとんど分化誘導が困難な腎臓や小腸由来細胞も創薬研究には重要なターゲット細胞となり、今後のよりいっそうの基礎研究の需要が期待される。

創薬のための iPS 細胞技術が、再生医療をはじめ、創薬研究の加速、標準化にもつながり、有効性や安全性に優れたよりよい創薬薬品が1日も早く患者のもとに届くことを期待している。

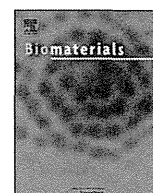
謝辞

本稿をまとめるにあたり、貴重なご助言をいただきました金村米博博士(独立行政法人国立病院機構大阪医療センター臨床研究センター再生医療研究室)、樋口麻衣子博士(独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト)および森山博由博士(近畿大学薬学総合研究所准教授)に深謝いたします。

文献

- 1) Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Honda Y, Takahashi M, et al: *in vitro* and *in vivo* characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1020-1025, 2004
- 2) Lund RD, Kwan AS, Keegan DJ, Coffey PJ, Lawrence JM, et al: Cell transplantation as a treatment for retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 20: 415-449, 2001
- 3) Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc* 4: 811-824, 2009
- 4) Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, Yoshimura N, Takahashi M, et al: Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* 458: 126-131, 2009
- 5) Okita K, Matsumura Y, Takahashi M, Takahashi J, Yamanaka S, et al: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8: 409-412, 2011
- 6) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Okano T, Tano Y, et al: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351: 1187-1196, 2004
- 7) Sumide T, Nishida K, Yamato M, Okano T, Tano Y, et al: Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* 20: 392-394, 2005
- 8) Sakurai M, Hayashi R, Kageyama T, Yamato M, Nishida K: Induction of putative stratified epithelial progenitor cells *in vitro* from mouse-induced pluripotent stem cells. *J Artif Organs* 14: 58-66, 2011
- 9) Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Okano H, Tsubota K, et al: Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24: 2714-2722, 2006
- 10) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Eidelberg D, Fahs S, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719, 2001
- 11) Takagi Y, Takahashi J, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N, et al: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* 115: 102-109,

- 2005
- 12) Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, Takahashi J, Imai T, et al: Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134: 3213-3225, 2007
 - 13) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Toyama Y, Okano H, et al: Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 69: 925-933, 2002
 - 14) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, et al: Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *Neurosci Res* 80: 182-190, 2005
 - 15) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nakamura M, Okano H, et al: Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 4: e7706, 2009
 - 16) Seki T, Yuasa Y, Egashira T, Hasegawa M, Fukuda K, et al: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7: 11-14, 2010
 - 17) Li W, Yamashita H, Hattori F, Sano M, Fukuda K, et al: Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 6: 83-89, 2011
 - 18) Shimoji K, Yuasa Y, Hattori F, Ogawa S, Fukuda K: G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes *in vivo* and in derivation from ES and iPS cells. *Cell Stem Cell* 6: 227-237, 2010
 - 19) Hattori F, Chen H, Yamashita H, Makino S, Fukuda K, et al: Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature Methods* 7: 61-66, 2010
 - 20) Kimura T, Miyoshi S, Takatsuki S, Soejima K, Fukuda K, et al: Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart *in vivo*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142: 181-190, 2011
 - 21) 早川堯夫, 梅澤明弘, 澤 芳樹, 大和雅之, 山中伸弥, 他: ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究(その1)-(その8). . 再生医療 10: 86-152, 2011
 - 22) 早川堯夫: ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する 2 つの指針案. 医学のあゆみ 239. 2011(in press)
 - 23) Wu SM, Hochedlinger K: Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol* 13: 497-505, 2011
 - 24) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H, 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
 - 25) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H, et al: Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One* 6: e21780
 - 26) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H, et al: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol Ther*, 2011 [Epub ahead of print] doi: 10.1038/mt2011.234
 - 27) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sasai Y, et al: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31-40, 2000
 - 28) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Sobue G, Okano H, et al: Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26: 3086-3098, 2008
 - 29) Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Mizuseki K, Sasai Y, et al: Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8: 288-296, 2005
 - 30) Kamiya D, Banno S, Sasai N, Nishikawa S, Sasai Y, et al: Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. *Nature* 470: 503-509, 2011



3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing

Kazuo Takayama^{a,b}, Kenji Kawabata^{b,c}, Yasuhito Nagamoto^{a,b}, Keisuke Kishimoto^{a,b}, Katsuhisa Tashiro^b, Fuminori Sakurai^a, Masashi Tachibana^a, Katsuhiko Kanda^d, Takao Hayakawa^e, Miho Kusuda Furue^{f,g}, Hiroyuki Mizuguchi^{a,b,h,*}

^a Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

^b Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

^c Laboratory of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

^d Pharma Business Project, Corporate Projects Center, Corporate Strategy Division, Hitachi High-Technologies Corporation, Ibaraki 312-8504, Japan

^e Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan

^f Laboratory of Embryonic Stem Cell Cultures, Department of Disease Bioresources Research, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

^g Department of Embryonic Stem Cell Research, Field of Stem Cell Research, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

^h The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2012

Accepted 20 November 2012

Available online 8 December 2012

Keywords:

Hepatocyte-like cell
Human ES cell
Human iPSC cell
Nanopillar plate
Drug screening

ABSTRACT

Although it is expected that hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem (ES) cells or induced pluripotent stem (iPS) cells will be utilized in drug toxicity testing, the actual applicability of hepatocyte-like cells in this context has not been well examined so far. To generate mature hepatocyte-like cells that would be applicable for drug toxicity testing, we established a hepatocyte differentiation method that employs not only stage-specific transient overexpression of hepatocyte-related transcription factors but also a three-dimensional spheroid culture system using a Nanopillar Plate. We succeeded in establishing protocol that could generate more matured hepatocyte-like cells than our previous protocol. In addition, our hepatocyte-like cells could sensitively predict drug-induced hepatotoxicity, including reactive metabolite-mediated toxicity. In conclusion, our hepatocyte-like cells differentiated from human ES cells or iPS cells have potential to be applied in drug toxicity testing.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatocyte-like cells that are generated from human embryonic stem cells (hESCs) [1] or human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) [2] are expected to be used in drug screening instead of primary (or cryopreserved) human hepatocytes (PHs). We recently demonstrated that stage-specific transient transduction of transcription factors, in addition to treatment with optimal growth factors and cytokines, is useful for promoting hepatic differentiation [3–6]. The hepatocyte-like cells, which have many hepatocyte characteristics (the abilities to uptake low-density lipoprotein and Indocyanine green, store glycogen, and synthesize urea) and drug metabolism capacity, were generated from hESCs/hiPSCs by

combinational transduction of FOXA2 and HNF1 α [6]. However, further maturation of the hepatocyte-like cells is required because their hepatic characteristics, such as drug metabolism capacity, are lower than those of PHs [6].

To promote further maturation of the hepatocyte-like cells, we subjected them to three-dimensional (3D) spheroid cultures. It is known that various 3D culture conditions (such as Alginate scaffolds [7], cell sheet technology [8], galactose-carrying substrata [9], and basement membrane substratum [10]) are useful for the maturation of the hepatocyte-like cells. Nanopillar Plate technology [11] used in the present study makes it easy to control the configuration of the spheroids. The Nanopillar Plate has an arrayed μ m-scale hole structure at the bottom of each well, and nanopillars were aligned further at the bottom of the respective holes. The seeded cells evenly drop into the holes, then migrate and aggregate on top surface of the nanopillars, thus likely to form the uniform spheroids in each hole. Not only 3D spheroid cultures [12] but also Matrigel overlay cultures [13] are useful for maintaining the hepatocyte characteristics of PHs. Therefore, we employed both 3D

* Corresponding author. 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).

spheroid culture and Matrigel overlay culture systems to promote hepatocyte maturation of the hepatocyte-like cells.

The hepatocyte-like cells generated from hESCs/hiPSCs are expected to be used in drug development. To the best of our knowledge, however, few studies have tried to predict widespread drug-induced cytotoxicity *in vitro* using the hepatocyte-like cells. To precisely determine the applicability of the hepatocyte-like cells to drug screening, it is necessary to investigate the responses of these hepatocyte-like cells to many kinds of hepatotoxic drugs.

In this study, 3D spheroid and Matrigel overlay cultures of the hepatocyte-like cells were performed to promote hepatocyte maturation. The gene expression analysis of cytochrome P450 (CYP) enzymes, conjugating enzymes, hepatic transporters, and hepatic nuclear receptors in the 3D spheroid-cultured hESC- or hiPSC-derived hepatocyte-like cells (3D ES-hepa or 3D iPSC-hepa), were analyzed. In addition, CYP induction potency and drug metabolism capacity were estimated in the 3D ES/iPSC-hepa. To determine the suitability of these cells for drug screening, we examined whether the drug-induced cytotoxicity is induced by treatment of various kinds of hepatotoxic drugs in 3D ES/iPSC-hepa.

2. Materials and methods

2.1. hESCs and hiPSCs culture

A hESC line, H1 and H9 (WiCell Research Institute), was maintained on a feeder layer of mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts (Millipore) with Repro Stem medium (Repro CELL) supplemented with 5 ng/ml fibroblast growth factor 2 (FGF2) (Sigma). Both H1 and H9 were used following the Guidelines for Derivation and Utilization of Human Embryonic Stem Cells of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and furthermore, and the study was approved by Independent Ethics Committee.

Three human iPSC lines were provided from the JCRB Cell Bank (Tic, JCRB Number: JCRB1331; Dotcom, JCRB Number: JCRB1327; Toe, JCRB Number: JCRB1338) [14,15]. These human iPSC lines were maintained on a feeder layer of mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts with iPSCellon (Cardio) supplemented with 10 ng/ml FGF2. Other three human iPSC lines, 201B6, 201B7 and 253G1 were kindly provided by Dr. S. Yamanaka (Kyoto University) [2]. These human iPSC lines were maintained on a feeder layer of mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts with Repro Stem supplemented with 5 ng/ml FGF2.

2.2. *In vitro* differentiation

Before the initiation of cellular differentiation, the medium of hESCs was exchanged into a defined serum-free medium, hESF9, and cultured as previously reported [16]. The differentiation protocol for the induction of definitive endoderm cells, hepatoblasts, and hepatocytes was based on our previous reports with some modifications [3–5,17]. Briefly, in mesendoderm differentiation, hESCs 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 was purchased from Cell Science & Technology Institute; differentiation hESF-DIF medium was supplemented with 10 µg/ml human recombinant insulin, 5 µg/ml human apotransferrin, 10 µM 2-mercaptoethanol, 10 µM ethanolamine, 10 µM sodium selenite, and 0.5 mg/ml bovine fatty acid free serum albumin [all from sigma]). To generate definitive endoderm cells, the mesendoderm cells were transduced with 3000 vector particle (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-HNF1α 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-HNF1α 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). To perform hepatocyte maturation on Nanopillar Plate (a prototype multi-well culturing plate for spheroid culture developed and prepared by Hitachi High-Technologies Corporation) shown in Fig. 1B, the cells were seeded at 2.5×10^5 cells/cm² (Fig. S1) in hepatocyte culture medium (Fig. S2) supplemented with 10 ng/ml HGF, 10 ng/ml FGF1, 10 ng/ml FGF4, and 10 ng/ml FGF10 on day 11. In the first stage of hepatocyte maturation (from day 12 to day 25), the cells were cultured for 13 days on Matrigel in HCM supplemented with 20 ng/ml HGF,

20 ng/ml oncostatin M (OsM), 10 ng/ml FGF4, and 10^{-6} M dexamethasone (DEX). In the second stage of hepatocyte maturation (from day 25 to day 35), Matrigel was overlaid on the hepatocyte-like cells. Matrigel were diluted to a final concentration of 0.25 mg/ml with William's E medium (Invitrogen) containing 4 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamycin sulfate, 1×10^{-6} M ITS (BD Biosciences), 20 ng/ml OsM, and 10^{-6} M DEX. The culture medium was aspirated, and then the Matrigel solution (described above) was overlaid on the hepatocyte-like cells. The cells were incubated overnight, and the medium was replaced with HCM supplemented with 20 ng/ml OsM and 10^{-6} M DEX.

2.3. Adenovirus (Ad) vectors

Ad vectors were constructed by an improved *in vitro* ligation method [18,19]. The human EF-1α promoter-driven LacZ-, FOXA2-, or HNF1α-expressing Ad vectors (Ad-LacZ, Ad-FOXA2, or Ad-HNF1α, respectively) were constructed previously [3,4,20]. All of Ad vectors contain a stretch of lysine residue (K7) peptides in the C-terminal region of the fiber knob for more efficient transduction of hESCs, hiPSCs, and DE cells, in which transfection efficiency was almost 100%, and purified as described previously [3–5]. The vector particle (VP) titer was determined by using a spectrophotometric method [21].

2.4. Flow cytometry

Single-cell suspensions of hESC/hiPSC-derived cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) at 4°C for 20 min, and then incubated with the primary antibody (described in Table S1), followed by the secondary antibody (described in Table S1). Flow cytometry analysis was performed using a FACS LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences).

2.5. RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from hESCs or hiPSCs and their derivatives using ISO-GENE (Nippon Gene). cDNA was synthesized using 500 ng of total RNA with a Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen). Real-time RT-PCR was performed with Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) or SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) using an ABI PRISM 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems). Relative quantification was performed against a standard curve and the values were normalized against the input determined for the housekeeping gene, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The primer sequences used in this study are described in Table S2.

2.6. Immunohistochemistry

The cells were fixed with 4% PFA. After incubation with 1% Triton X-100, blocking with Blocking One (Nakalai tesque), the cells were incubated with primary antibody (described in Table S1) at 4°C for overnight, followed by incubation with a secondary antibody (described in Table S1) at room temperature for 1 h.

2.7. ELISA

The hESCs or hiPSCs were differentiated into hepatocytes as described in Fig. 1A. The culture supernatants, which were incubated for 24 h after fresh medium was added, were collected and analyzed for the amount of ALB secretion by ELISA. ELISA kits for ALB were purchased from Bethyl. ELISA was performed according to the manufacturer's instructions. The amount of ALB secretion was calculated according to each standard followed by normalization to the protein content per well.

2.8. Urea secretion

The hESCs or hiPSCs were differentiated into hepatocytes as described in Fig. 1A. The culture supernatants, which were incubated for 24 h after fresh medium was added, were collected and analyzed for the amount of urea secretion. Urea measurement kits were purchased from BioAssay Systems. The experiment was performed according to the manufacturer's instructions. The amount of urea secretion was calculated according to each standard followed by normalization to the protein content per well.

2.9. Canalicular secretory assay

At cellular differentiation, the hepatocyte-like cell spheroids were treated with 5 mM choly-lysyl-fluorescein (CLF) (BD Biosciences) for 30 min. The cells were washed with culture medium, and then observed by fluorescence microscope. To inhibit the function of BSEP, the cells were pretreated with Cyclosporin A 24 h before of the CLF treatment.

2.10. Assay for CYP activity and CYP induction

To measure the cytochrome P450 2C9 and 3A4 activity of the cells, we performed lytic assays by using a P450-GloTM CYP2C9 (catalog number; V8791) and

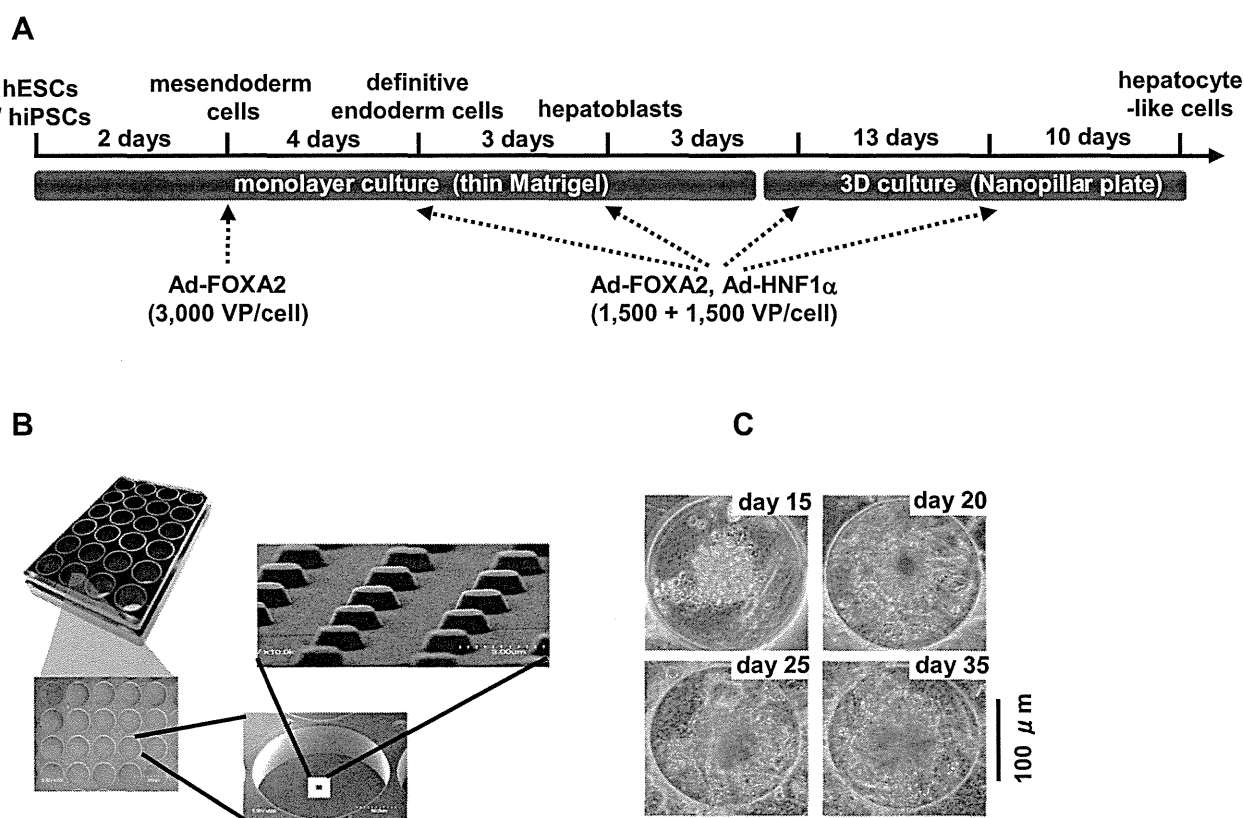


Fig. 1. Hepatocyte-like cells were differentiated from hESCs/hiPSCs by using Nanopillar Plate. (A) The procedure for differentiation of hESCs into 3D ES/iPS-hepa via mesendoderm cells, definitive endoderm cells, and hepatoblasts is presented schematically. In the differentiation, not only the addition of growth factors but also stage-specific transient transduction of both FOXA2- and HNF1 α -expressing Ad vector (Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α , 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 μ m.

3A4 (catalog number; V9001) Assay Kit (Promega), respectively. We measured the fluorescence activity with a luminometer (Lumat LB 9507; Berthold) according to the manufacturer's instructions. The CYP activity was normalized with the protein content per well.

To measure CYP2C9 and 3A4 induction potency, the CYP activity was measured by using a P450-GloTM CYP2C9 and 3A4 Assay Kit, respectively. The cells were treated with rifampicin, which is known to induce both CYP2C9 and 3A4, at a final concentration of 10 μ M for 48 h. The cells were also treated with Ketoconazole (Sigma) or Sulfaphenazole (Sigma), which are inhibitors for CYP3A4 or 2C9, at a final concentration of 1 μ M or 2 μ M, respectively, for 48 h. Controls were treated with DMSO (final concentration 0.1%). Inducer compounds were replaced daily.

2.11. Cell viability tests

Cell viability was assessed by the WST-8 assay kit (Dojindo) in Fig. 2D. After treatment with test compounds, such as Acetaminophen (Wako), Allopurinol (Wako), Amiodaron (Sigma), Benzbromarone (Sigma), Clozapine (Wako), Cyclizine (MP bio), Dantrolene (Wako), Desipramine (Wako), Disulfiram (Wako), Erythromycin (Wako), Felbamate (Sigma), Flutamide (Wako), Isoniazid (Sigma), Labetalol (Sigma), Lefunomide (Sigma), Maprotiline (Sigma), Nefazodone (Sigma), Nitrofurantoin (Sigma), Sulindac (Wako), Tacrine (Sigma), Tebinafine (Wako), Tolcapone (TRC), Troglitazone (Wako), and Zafirlukast (Cayman) for 24 h, the cell viability was measured. The cell viability of the 3D iPS-hepa were assessed by WST-8 assay after 24 h exposure to different concentrations of Aflatoxin B1 (Sigma) and Benzbromarone in the presence or absence of the CYP3A4 or 2C9 inhibitor, Ketoconazole (1 μ M) or Sulfaphenazole (10 μ M), respectively. The control refers to incubations in the absence of test compounds and was considered as 100% viability value. Controls were treated with DMSO (final concentration 0.1%). ATP assay (BioAssay Systems), Alamar Blue assay (Invitrogen), and Crystal Violet (Wako) staining assay were performed according to the manufacturer's instructions.

2.12. Primary human hepatocytes

Three lots of cryopreserved human hepatocytes (lot Hu8072 [CellzDirect], HC2-14, and HC10-101 [Xenotech]) were used. These three lots of cryopreserved human hepatocytes were cultured according to our previous report [5].

2.13. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$).

3. Results

The 3D ES/iPS-hepa were generated from hESCs/hiPSCs as shown in Fig. 1A. Hepatocyte differentiation of hESCs/hiPSCs was efficiently promoted by stage-specific transient transduction of FOXA2 and HNF1 α in addition to the treatment with appropriate soluble factors (growth factors and cytokines) [6]. On day 11, the hESC-derived cells were seeded at 2.5×10^5 cells/cm² (Fig. S1) on Nanopillar Plate (Fig. 1B), in hepatocyte culture medium (Fig. S2) to promote hepatocyte maturation. In addition, Matrigel was overlaid on the 3D ES-hepa to promote further hepatocyte maturation. The 3D ES-hepa with compact morphology that were adhesive to the substratum and had an optimal size (approximately 100 μ m in diameter) were formed by using the Nanopillar Plate (Fig. 1C). The spheroids seem to be stable because they could be cultured for more than 20 days. We have confirmed that more than 90% of the cells that constitute the spheroids were alive, indicating that the necrotic centers are absent.

To investigate whether or not a 3D spheroid culture could promote hepatocyte maturation of the hepatocyte-like cells, various hepatocyte characteristics of the 3D ES/iPS-hepa were compared with those of the monolayer-cultured hESC- or hiPSC-derived hepatocyte-like cells (mono ES-hepa or mono iPS-hepa). The gene expression level of *ALB* peaked on day 20 in the mono ES-hepa, and then it was dramatically decreased after day 25 (Fig. 2A). In contrast, the gene expression level of *ALB* was

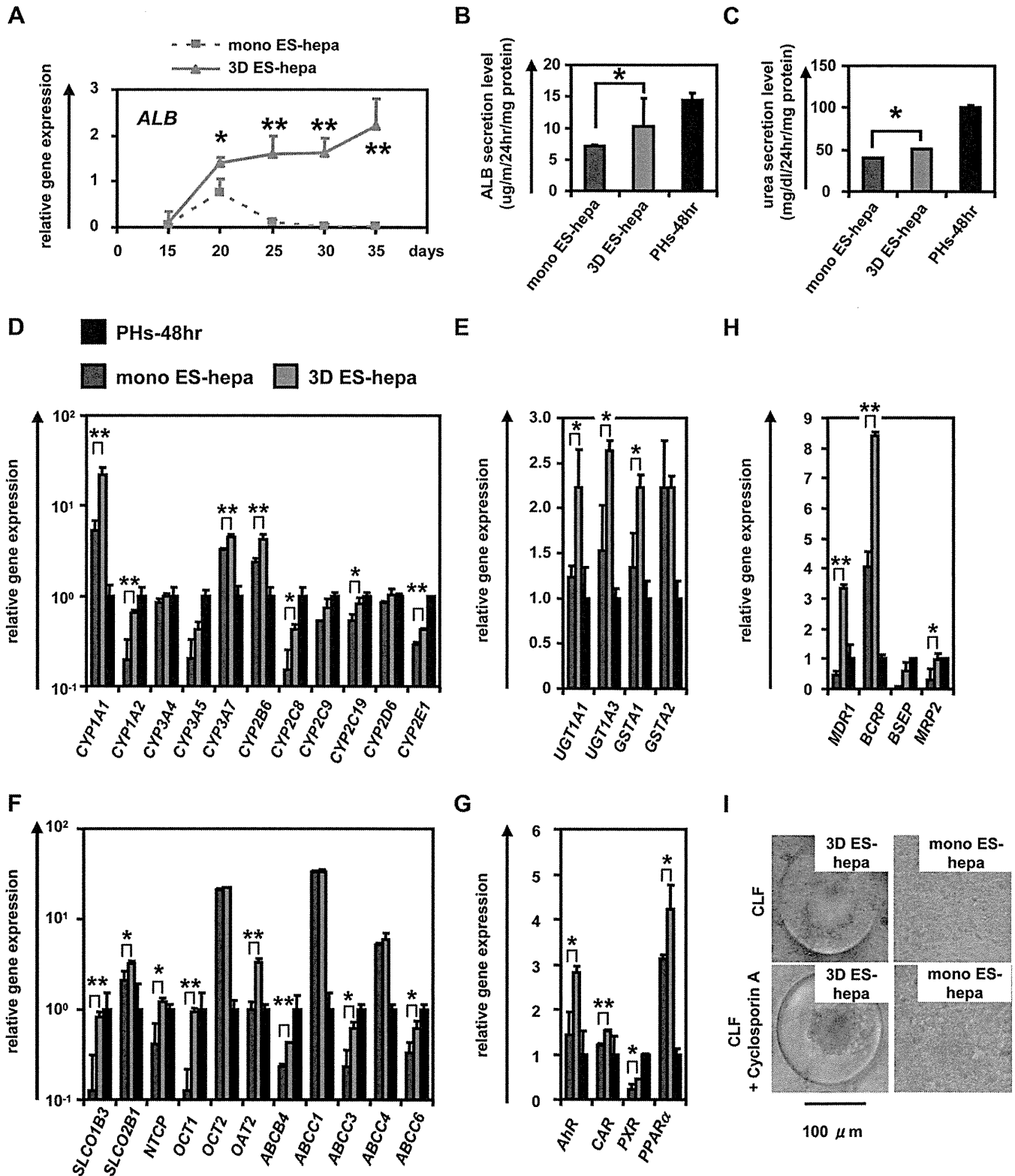


Fig. 2. Hepatocyte functions in hESC-derived hepatocyte-like cells were enhanced by using Nanopillar Plate. (A) The gene expression levels of *ALB* were measured by real-time RT-PCR on day 15, 20, 25, 30, and 35. On the y axis, the gene expression levels in PHs (three lots of PHs were used in all studies), which were cultured for 48 h 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 canalculi 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-l-tyl-syl-fluorescein (CLF) (5 μ m) was used for the observation of bile canalculi uptake and efflux. To inhibit transportation by BSEP, the cells were pretreated with 1 μ m Cyclosporin A. * P < 0.05; ** P < 0.01.

moderately increased in the 3D ES-hepa until day 35 (Fig. 2A). These results suggest that the hepatocyte functions of the 3D ES-hepa are sustained for more than 2 weeks on the Nanopillar Plate, although those of the mono ES-hepa are rapidly devitalized (Fig. 2A and Fig. S4). Other hepatocyte characteristics, such as ability of ALB and urea secretion and gene expression levels of hepatocyte-related markers in the 3D ES-hepa were compared with those of the mono ES-hepa (Fig. 2B–H). Because the gene expression level of *ALB* in the 3D ES-hepa was the highest on day 35 and that in mono ES-hepa was the highest on day 20, various hepatocyte characteristics were compared on day 35 or day 20, respectively. The amount of ALB (Fig. 2B) and urea (Fig. 2C) secretion in the 3D ES-hepa was higher than those of the mono ES-hepa. The gene expression levels of *CYP* enzymes (Fig. 2D), conjugating enzymes (Fig. 2E), hepatic transporters (Fig. 2F), hepatic nuclear receptors (Fig. 2G), and hepatic transcription factors (Fig. S5) in the 3D ES-hepa were higher than those in the mono ES-hepa. The expression levels of most of the genes in the 3D ES-hepa were higher than those in the mono ES-hepa. Because the previous study [11] showed that hepatocyte spheroids expressed hepatocyte transporters similar to those of the bile canaliculi in native liver tissue, the gene expression levels of bile canaliculi transporters (Fig. 2H), as well as the ability of bile acid uptake and efflux, (Fig. 2I) were examined in the 3D ES-hepa. The gene expression levels of bile canaliculi transporters were increased in the 3D ES-hepa compared with those of mono ES-hepa and PHs (Fig. 2H). The bile canaliculi formation was visualized by BSEP fluorescent substrate: Cholyl-L-lysyl-fluorescein (CLF), which is inhibited by BSEP

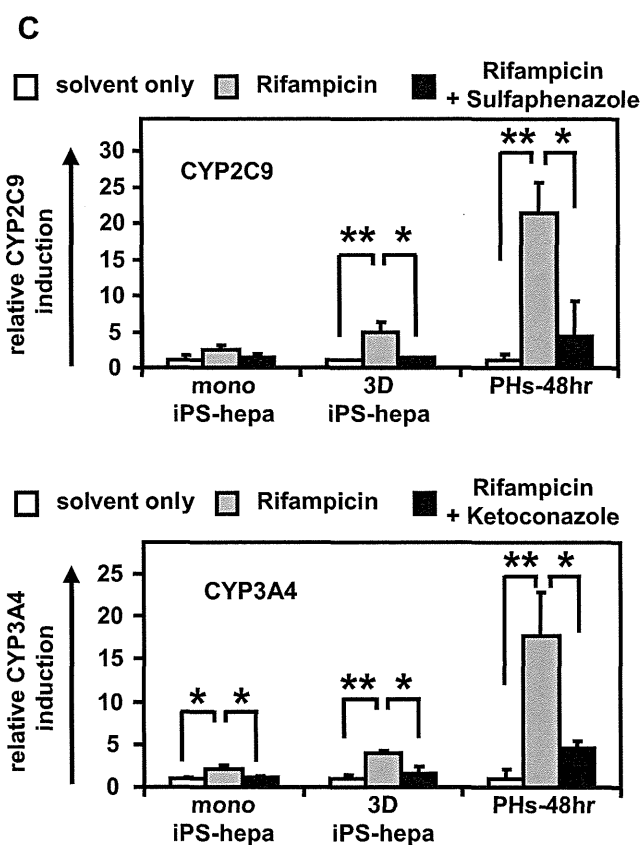
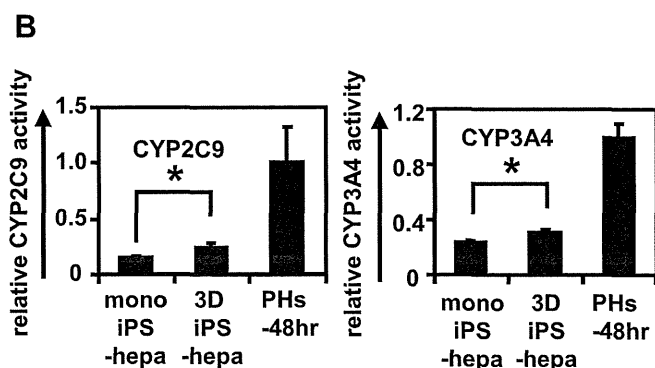
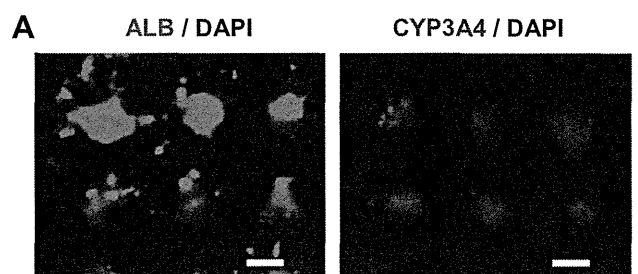


Fig. 4. Drug metabolism capacity and CYP induction potency were examined in the 3D iPS-hepa. (A) The 3D iPS-hepa (day 35) were subjected to immunostaining with anti-ALB (green) or CYP3A4 (red) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar represents 100 μ m. (B) The CYP activity 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. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

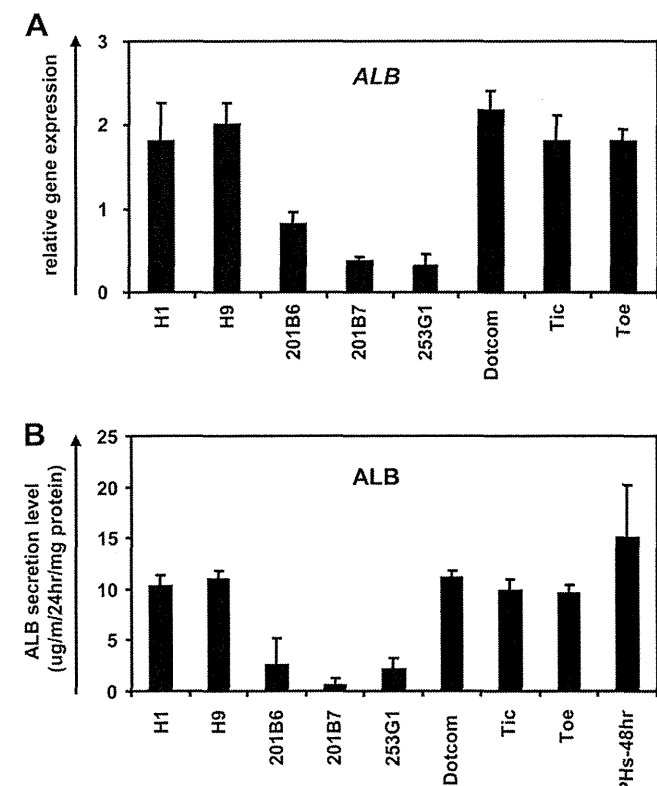


Fig. 3. Comparison of the hepatic differentiation capacities of various hESC and hiPSC lines hESCs (H1 and H9) and hiPSCs (201B6, 201B7, 253G1, Dotcom, Tic, and Toe) were differentiated into the 3D ES/iPS-hepa as described in Fig. 1A. (A) On day 20, the gene expression level of *ALB* was examined by 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.