

201208024B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した
新規毒性評価系の開発

平成23年度－平成24年度

総合研究報告書

研究代表者 水口裕之

平成25（2013）年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した
新規毒性評価系の開発

平成23年度－平成24年度

総合研究報告書

研究代表者 水口裕之

平成25（2013）年4月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を利用した新規毒性評価系の開発	-----	1
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)		

II. 分担研究報告

ヒトiPS細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発	-----	7
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)		

ヒトiPS細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発	-----	37
川端 健二 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)		

肝細胞への分化誘導に適したヒトiPS細胞のスクリーニング	-----	65
梅澤 明弘 (独立行政法人国立成育医療センター 生殖・細胞医療研究部)		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	68
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総合・総括研究報告書

ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した新規毒性評価系の開発

研究代表者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

ヒト iPS 細胞は再生医療だけではなく、創薬への応用も強く期待されている。なかでも、iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、薬物の毒性評価や動態評価への応用が期待でき、産業界からの需要が最も高いものの一つである。医薬品の開発プロセスの早期に肝毒性を精度高く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらし、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。しかしながら、肝細胞は効率の良い分化誘導が困難であり、創薬応用の障害となっている。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発、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、および肝細胞に分化しやすい iPS 細胞株のスクリーニング法の開発、を行った。その結果、

- ① 肝分化に重要な転写因子である FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を導入して作製された分化誘導肝細胞は、ヒト初代培養肝細胞と同程度の肝関連遺伝子の発現が確認された。
- ② ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、ナノピラープレートを用いた三次元培養を行うことで、促進できることを明らかにした。
- ③ 分化誘導肝細胞について、シトクロム P450 酵素などで代謝される薬物の代謝プロファイルを調べたところ、その薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞より低いものの、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。さらに、分化誘導肝細胞は肝毒性を示す薬剤に対してヒト初代培養肝細胞と同様に細胞毒性を呈した。
- ④ ナノピラープレートを用いた三次元培養法と肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。
- ⑤ ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、肝細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。さらにゲノムレベル、エピゲノムでの安定性に関しての解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。

分担研究者

川端健二 (独)医薬基盤研究所

梅澤明弘 国立成育医療センター研究所

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し、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ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を利用した肝毒性評価系の確立、②ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発、および③肝細胞に分化しやすい iPS 細胞株のスクリーニング法の開発を行う。

B. 研究方法

本研究は、研究代表者水口、分担研究者2名（川端、梅澤）の計3名が遂行した。本研究においては、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発、ヒト iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発、および肝細胞への分化誘導に適したヒト iPS 細胞のスクリーニング、に分けて遂行された。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発

ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞における第一相反応酵素（CYP 遺伝子）、第二相反応酵素（UGT、GST 遺伝子）、第三相反応酵素（肝関連トランスポーター）の発現を調べたところ、多くの遺伝子はヒト初代培養肝細胞と同程度であった。しかしながら、9種類の薬剤の代謝プロファイルを調べたところ、分化誘導肝細胞の薬物代謝能は確認されたものの、ヒト初代培養肝細胞よりも劣るものであった。また、ナノピラープレートを用いた三次元培養法と肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。今後、新たな三次元培養法・共培養法の開発ならびに新規肝成熟化因子の同定とその過剰発現などを行うことにより、分化誘導肝細胞さらなる肝成熟化の促進が期待される。

2. ヒト iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法の開発

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入することによって促進できることを明らかにした。また、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化が、ナノピラープレートを用いた三次元培養を行うことで、促進できることを明らかにした。これらの結果は、薬物毒性スクリーニングに応用可能な細胞を作製するための基盤技術となることが期待される。

3. 肝細胞への分化誘導に適したヒト iPS 細胞のスクリーニング

ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、肝細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。さらにゲノムレベル、エピゲノムでの安定性に関しての解析を加え品質

評価技術の基盤整備が整った。今後はフィーダフリー、血清フリー培養条件下での細胞についてこの評価系を応用して、創薬開発に資する安定した肝細胞スクリーニング技術の開発を行っていく。

D. 考察

我々はこれまでに SOX17、HEX、HNF4α 遺伝子を導入することによるヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への効率良い分化誘導方法を開発したが、分化誘導肝細胞を毒性スクリーニングに応用するためには、さらなる成熟化が必要であった。そこで、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化の各過程において、7 種類の遺伝子 (FOXA2、HEX、HNF1α、HNF1B、HNF4α、HNF6、SOX17 遺伝子) をそれぞれ導入し、分化を促進できる遺伝子のスクリーニングを実施することによって、最も効率良く肝成熟化を行うことが可能である遺伝子の組み合わせを探索した。中内胚葉から内胚葉への分化過程においては FOXA2 遺伝子、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程においては FOXA2 と HNF1α 遺伝子、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においては FOXA2 と HNF1α 遺伝子 (あるいは FOXA2 と HNF4α 遺伝子) を組み合わせて導入することによって、効率良く肝細胞を誘導できることを明らかにした。肝細胞への分化過程に HNF1α もしくは HNF4α 遺伝子を導入した場合、肝幹前駆細胞マーカーの発現上昇は確認されなかったが、FOXA2 遺伝子を導入した場合は肝幹前駆細胞マーカーの発現上昇が確認された。成熟化を促進するためには、肝成熟化マーカーのみ選択的に発現上昇させることができる HNF4α、HNF1α 遺伝子を組み合わせることが好ま

しいと予想されたが、FOXA2、HNF1α 遺伝子あるいは FOXA2、HNF4α 遺伝子を組み合わせて導入ことによって最も肝成熟化が促進された。これは、肝成熟化には肝幹前駆細胞と肝細胞が共存することが必要であることを示唆している。また、FOXA2 遺伝子は *in vivo* の発生においても、中内胚葉から発現が確認され、FOXA2 および HNF1α 遺伝子は肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においていずれも発現が上昇することが知られている。これらの知見から、*in vivo* の胚発生を模倣した遺伝子発現の制御が重要であることが示唆される。

我々は過去の報告において、培養 9 日目に導入した Ad 由来遺伝子は 14 日目まで発現が確認され、培養 18 日目には完全に消失することを確認している。本プロトコールにしたがって、分化誘導肝細胞を作製した場合においても、培養 20 日目には Ad 由来の遺伝子の発現はほぼ消失していると考えられる。そのため、各種遺伝子の発現は Ad 由来の遺伝子の発現の直接の制御を受けていないことが示唆される。

過去の我々の知見では、分化誘導肝細胞における肝関連遺伝子の発現の評価したところ、ヒト初代培養肝細胞と同程度であったが、分化誘導肝細胞の薬剤代謝能はヒト初代培養肝細胞よりも劣ることが確認された。遺伝子発現と薬剤代謝能の差がみとめられた原因のひとつとして、分化誘導肝細胞の肝関連核内受容体の遺伝子発現がヒト初代培養肝細胞と比較して低い可能性が考えられる。肝関連核内受容体は CYP3A4 遺伝子などの主要な CYP 遺伝子が正しく機能するために必須の遺伝子であることが知られているため、肝関連核内受容体を分化誘導肝細胞に導入することによってさらな

る肝成熟化が期待される。

分化誘導肝細胞を薬剤スクリーニングに応用可能か検討するために、本研究ではベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じるか調べた。分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様にベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じることが確認された。今後は、これらの肝毒性を示す薬剤を作用させたときに細胞毒性が CYP 酵素を介したものであるかどうか詳細に検討する必要がある。また、他の肝毒性を有する薬剤に対する応用についても網羅的に検討する必要があると考えられる。

さらに我々は、ナノピラープレートを用いた三次元培養法を用いて、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化および薬物代謝能の向上を目指した。ナノピラープレート上で、分化誘導肝細胞の肝成熟化を促進させるために、細胞播種密度・使用する培地・作用させる液性因子などの様々な条件を検討した。ナノピラープレート上で、スフェロイド形成させるためには 2.5×10^5 cells/cm²以上の細胞密度が必要であった。我々の過去の検討から、ヒトES/iPS細胞由来肝幹前駆細胞をmatrigelコートされた細胞に播種する場合（平面培養時）、 1.25×10^5 cells/cm²の細胞密度で十分であることから、スフェロイド形成させるためには、平面培養時よりの2倍量程度の細胞を必要とする。また、スフェロイド形成させるために、肝幹前駆細胞を 5.0×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種したところ、スフェロイドの形成は確認されたが、*CYP3A4*および*2C9*の遺伝子発現量は低かった。細胞播種密度が高い場合は100 μm以上のスフェロイドが形成され、すべての細胞に栄養成分や酸素が行き届かないために、*CYP*遺伝子発現などの肝機能が

低下したものだと考えられる。ナノピラープレート上で分化誘導肝細胞の成熟化させる培地はHCMが最適であった。平面培養時においてもHCMを使用しており、スフェロイド形成に特化した培地を使用する必要はない。ナノピラープレート上で肝成熟化させる過程（計23日間培養；培養12~35日目）において、前半の13日間はHGF、OsM、DEX、FGF4を作用させ、後半の10日間はOsM、DEXを作用させることによって、最も肝マーカーである*ALB*の遺伝子発現量が高かった。肝成熟化前半の13日間では、成熟化を促進する液性因子など（HGF、OsM、DEX）に加えて、細胞増殖シグナルを活性化する液性因子であるFGF4が必要であった。これはスフェロイドが効率良く形成されるには高い細胞増殖活性が必要であるためだと推察される。

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

きる可能性がある。

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

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

見られないことが分かった。

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

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

また、3D iPS-hepa 細胞に肝毒性化合物を作用させることによる細胞毒性は CYP による代謝を介したものである。したがって、本研究における肝毒性化合物による細

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

さらに、ヒト iPS 細胞の肝分化マーカーによるスクリーニング系について検証し、その培養技術について検討した。また最もシビアな問題として考えられているゲノム変異について、染色体レベルおよびゲノムレベルでの検証法を確立した。本年度は特にエピゲノムまで解析範囲を広げた手法を確立した。この評価系で染色体異常を認める iPS 細胞の細胞形質を詳細に解析し、正常な iPS 細胞と比較検証する基盤ができ、創薬開発に必要な良質な iPS 細胞由来肝細胞とは何かということの規定することが可能となる。また肝分化指向性評価とゲノム安定性評価による結果は、現在の培養システムがヒト iPS 細胞を長期にわたって安定的に培養できていることを示している。今後、フィーダフリー、血清フリー培養条件下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

FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することによって作製した分化誘導肝細胞における第一相反応酵素 (CYP 遺伝子)、第二相反応酵素 (UGT、GST 遺伝子)、第三相反応

酵素 (肝関連トランスポーター) の発現を調べたところ、多くの遺伝子はヒト初代培養肝細胞と同程度であった。しかしながら、9 種類の薬剤の代謝プロファイル調べたところ、分化誘導肝細胞の薬物代謝能は確認されたものの、ヒト初代培養肝細胞よりも劣るものであった。また、ナノピラプレートを用いた三次元培養法と FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出できる分化誘導肝細胞の作製に成功した。今後、新たな三次元培養法・共培養法の開発ならびに新規肝成熟化因子の同定とその過剰発現などを行うことにより、分化誘導肝細胞さらなる肝成熟化の促進が期待される。

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化過程の適切な時期に、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入することによって、肝分化が促進できることを明らかにした。また、肝成熟化をナノピラプレートを用いた三次元培養系で行うことで、さらに肝成熟化を促進できることを明らかにした。これらの結果は、*in vitro* 薬物毒性評価系に応用可能な細胞を作製するための基盤技術となることが期待される。

ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、肝細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。さらにゲノムレベル、エピゲノムでの安定性に関しての解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。今後はフィーダフリー、血清フリー培養条件下での細胞についてこの評価系を応用して、創薬開発に資する安定した肝細胞スクリーニング技術の開発を行っていく。

総合・分担研究報告書

ヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能解析と薬物毒性評価系の開発

分担研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

本研究では、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞の機能解析と薬物の毒性評価系への応用のための基盤技術の開発を行う。

我々はこれまでに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化における適切な時期に FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することによって成熟肝細胞への分化を促進する技術を開発した。そこで平成 23 年度は、分化誘導肝細胞の薬剤代謝能をヒト初代培養肝細胞と比較した。また、分化誘導肝細胞の薬剤の毒性評価系へ応用できる可能性について検討するため、肝臓で毒性を生じる薬物を分化誘導肝細胞に作用させた後の細胞毒性についても調べた。シトクロム P450 (CYP) などで代謝される 9 種類の薬物の代謝プロファイルを調べたところ、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、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。さらに、分化誘導肝細胞は肝毒性を示す薬剤に対してヒト初代培養肝細胞と同様に細胞毒性を呈した。

平成 24 年度は、肝成熟化 (肝幹前駆細胞から肝細胞への分化) をナノピラープレート (株式会社 日立ハイテクノロジーより供与) を用いた三次元培養条件下で行うことにより、分化誘導肝細胞をさらに成熟化させ、分化誘導肝細胞のより広範な毒性評価系への応用を目指した。その結果、三次元培養で作製された分化誘導肝細胞 (3D iPS-hepa 細胞) は単層培養で作製されたヒト iPS 細胞由来肝細胞 (mono iPS-hepa 細胞) に比べて、高い CYP 活性を示した。ヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物毒性評価系へ応用できる可能性を検討するために、肝毒性化合物を mono iPS-hepa 細胞および 3D iPS-hepa 細胞に作用させたところ、3D iPS-hepa 細胞の方がより強い細胞毒性が観察された。3D iPS-hep 細胞および HepG2 細胞の肝毒性化合物 (合計 22 種類) に対する感受性を比較したところ、ほとんどの化合物について 3D iPS-hep 細胞の方がより強い細胞毒性を示した。

以上のことから、ナノピラープレートを用いた三次元培養法と肝関連遺伝子を適切な分化段階で導入する技術を併用することで、HepG2 細胞よりも感度良く肝毒性化合物の毒性を検出可能な分化誘導肝細胞の作製に成功した。

研究協力者

川端健二 (独)医薬基盤研究所
櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科
高山和雄 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

薬物によって誘発される肝障害は、医薬品候補化合物の開発中止や医薬品の市場撤退の主な原因の1つである。現在は、ヒト初代培養肝細胞（ヒト凍結肝細胞を含めてヒト初代培養肝細胞と表記する）を用いた *in vitro* 毒性評価系で肝毒性を起こす医薬品候補化合物を創薬研究の早期段階において同定し、医薬品開発の効率および安全性を高めることが行われている。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞は高価であり、培養後急速に薬物代謝酵素をはじめとする肝機能が減弱すること、ロット差も大きい（高機能な肝細胞ロットの）安定供給が困難であるといった問題点を有する。そこで、ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem (iPS)) 細胞から分化誘導した肝細胞（分化誘導肝細胞）が、ヒト初代培養肝細胞の代替ソースとして期待されている。そこで、我々は分化誘導肝細胞が薬剤の毒性評価系に応用可能かどうか正確に評価するため、分化誘導肝細胞における薬剤代謝能をヒト初代培養肝細胞と比較した（平成23年度）。また、肝成熟化（肝幹前駆細胞から肝細胞への分化）をナノピラープレートを用いた三次元培養条件下で行うことにより、分化誘導肝細胞をさらに成熟化させ、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のより広範な毒性評価系へ応用できるか検討した（平成24年度）。

B. 研究方法

B-1. アデノウイルス (Ad) ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミドは pHMEF5 を使用した。そのマルチクロニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMEF5-LacZ を作製した。さらに、EF プロモーター制御下でヒト forkhead box protein A2 (FOXA2)、hematopoietically expressed homeobox transcription factor (HEX)、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 α)、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B (HNF1 β)、hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)、hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6)、SRY-box containing gene 17 (SOX17)、を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-FOXA2、pHMEF5-HEX、pHMEF5-HNF1 α 、pHMEF5-HNF1 β 、pHMEF5-HNF4 α 、pHMEF5-HNF6、pHMEF5-SOX17 を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-CeuI と PI-SceI で消化し、同酵素で消化した K7 型ベクタープラスミドに挿入することにより、pAdHM41K7-EF-FOXA2、pAdHM41K7-K7-EF-HEX、pAdHM41K7-EF-HNF1 α 、pAdHM41K7-EF-HNF1 β 、pAdHM41K7-EF-HNF4 α 、pAdHM41K7-EF-HNF6、pAdHM41K7-EF-SOX17 を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを PacI で消化

し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社)を用いてヒト胎児腎細胞由来細胞である HEK293 細胞にトランスフェクションすることにより、AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HEX、AdK7-EF-HNF1 α 、AdK7-EF-HNF1B、AdK7-EF-HNF4 α 、AdK7-EF-HNF6、AdK7-EF-SOX17 を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。各 Ad ベクターの物理学的(particle)タイターは Maizel らの方法により測定した。

B-2. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 Dotcom (国立生育医療センター梅澤明弘教授から供与)は 10 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学工業社)を含む iPS 細胞用培地である iPSELLON (カルディオ社)を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞(MEF、ミリポア社)上で培養した。4-6 日ごとに 0.1 mg/mL デイスペーゼ (Roche 社)を用いてヒト iPS 細胞のコロニーを回収した後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

B-3. ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 hESF9 (MK. Furue et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase cell detachment solution (日本ベクトン・ディッキンソン社)を用いてヒト iPS 細胞で細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin A (R&D systems 社)および 10 ng/ml bFGF を含む

Differentiation hESF-DIF 培地(6 因子 (10 μ g/mL human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin (すべて Sigma 社より購入))を含む 霊長類 ES 細胞用分化誘導基礎培養液である hESF-DIF (株式会社細胞科学研究所))に懸濁後、50 μ g/cm² Matrigel (日本ベクトン・ディッキンソン社)でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 ウェルプレート) (住友ベークライト社)の各ウェルに 6.25 \times 10⁴ cells/cm² の細胞密度で播種したのち、2 日間培養した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞由来中内胚葉 (培養 2 日目) から内胚葉への分化誘導を行う場合は、ヒト iPS 細胞を上記の方法で中内胚葉まで培養し、各 Ad ベクター(AdK7-EF-FOXA2)を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で 90 分間作用させた。培地は 100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いた。その後、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いて毎日培地交換を行い、5 日目まで培養した。

B-4 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3. に記載された方法に準じて分化誘導した内胚葉 (培養 5 日目) を、0.05% trypsin-0.053 mM EDTA で細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、50 μ g/cm² Matrigel でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 ウェルプレート) の各ウェルに 1.25 \times 10⁵

cells/cm²の細胞密度で播種した。継代した翌日にAdベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1α) をそれぞれ 1,500 VP/cellの濃度で 90 分間作用させたのち、20 ng/ml FGF4 (R&D systems社)、30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D systems社) を含むHCM Hepatocyte Culture Medium (Lonza社) に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、9 日目まで培養した。

B-5. 平面培養系での肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導

ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3. およびB-4. に記載された方法に準じて 9 日間培養して分化誘導した肝幹前駆細胞に各Adベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1α) をそれぞれ 1,500 VP/cellの濃度で作用させた後、10 ng/ml FGF1 (R&D systems社)、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10 (R&D systems社)、10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (R&D systems社) を含むHCMに交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin-0.053 mM EDTAで回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF (すべて 10 ng/mlの濃度で使用) を含むHCMに懸濁後、Matrigelでコーティングした細胞培養用 12 プレーットの各ウェルに 1.25×10⁵ cells/cm²の細胞密度で播種した。1 日後にAdベクター (AdK7-EF-FOXA2 およびAdK7-EF-HNF1α) をそれぞれ 1,500 VP/cellの濃度で作用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems社)、10⁻⁶ M Dexamethazone

(DEX) を含む Differentiation CL15 medium (8.3% tryptose phosphate broth [BD Biosciences社]、10% FBS [Vita社]、10 μM hydrocortisone 21-hemisuccinate [Sigma社]、1 μM insulin、25 mM NaHCO₃ [Wako 社] を添加した L15 medium [Invitrogen社])を用いて培養した。8 日後に肝細胞への分化効率の測定および肝機能の評価を行った。

B-6. ナノピラープレートを用いた三次元培養系での肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導

ヒトES/iPS細胞由来肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3. およびB-4. に記載された方法に準じて 9 日間培養して分化誘導した肝幹前駆細胞に各Adベクター(AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1α) をそれぞれ 1,500 VP/cellの濃度で 90 分間作用させた後、10 ng/ml FGF1、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10、10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (すべてR&D systems社) を含むHCMに交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin-0.053 mM EDTAを用いて細胞を剥離したのち回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF (すべて 10 ng/mlの濃度で使用) を含むHCMに懸濁後、20 μg/cm² Matrigelでコーティングした日立ナノピラー細胞培養 12 ウェルプレート(日立ハイテクノロジー社) の各ウェルに 2.5×10⁵ cells/cm²の細胞密度で播種した。1 日後にAdベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1α) をそれぞれ 1,500 VP/cellの濃度で 90 分間作

用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M (OsM, R&D systems社)、10 ng/mL FGF4、 10^{-6} M Dexamethazone (DEX, Sigma社)を含むHCMを用いて1日おきに培地交換を行い、13日間(培養12日目から培養25日目まで)培養した。分化誘導肝細胞をさらに成熟化させるため、Matrigelを分化誘導肝細胞の上に重層化させた。0.25 mg/mL Matrigel、4 mM L-Glutamine、50 µg/mL gentamycin sulfate、 1×10^5 ITS (BD Biosciences社)、20 ng/mL OsM、 10^{-6} M DEXを含むWilliam's E Medium (Invitrogen社) (以下、Matrigel Working Solutionとする)を4□で作製した。培養25日目の各wellに対して、1 mLのMatrigel Working Solutionを添加し、24時間培養した。培養26日目に余分なWorking Solutionを除去したのち、20 ng/mL Oncostatin M (OsM, R&D systems社)、 10^{-6} M Dexamethazone (DEX, Sigma社)を含むHCMを用いて1日おきに培地交換を行い、9日間(培養26日目から培養35日目まで)培養した。

B-7. Indocyanine Green (ICG)の取り込み能と排泄能の評価

B-5.の方法により分化誘導されたヒトES/iPS細胞由来肝細胞を1 mg/ml ICGを含むconditioned L15培地を用いて37°Cで1時間培養した後、ICGを取り込んだ細胞を観察した。ICGを含まないconditioned L15 mediumに培地交換したのち、37°Cで6時間培養することにより、ICGを取り込んだ細胞からICGを排泄させた。

B-8. Low density lipoprotein (LDL)の取り込み能の評価

B-5.の方法により分化誘導されたヒトES/iPS細胞由来肝細胞を20 µg/mlを含むconditioned L15培地を用いて37°Cで1時間培養した後、2% paraformaldehydeにて固定した。DAPI (Invitrogen社)を用いて核染色を行った後、蛍光顕微鏡(BIOREVO、キーエンス社)にて観察した。

B-9. 薬物に対する細胞毒性の評価

Figure 7では、ヒトiPS細胞、B-5.の方法により作製された分化誘導肝細胞およびヒト初代培養肝細胞をBenzbromarone (Wako社)をそれぞれ含む培地を用いて37°Cで48時間培養した。0.5 mg/ml Aramar Blue (Invitrogen社)を用いて37°Cで3時間培養した後、プレートリーダー(Sunrise社)を使用して570 nmおよび600 nmの吸光度を測定することによって細胞生存率を評価した。

B-10. 分化誘導肝細胞の薬物代謝能の評価

ヒトiPS細胞、分化誘導肝細胞、ヒト初代培養肝細胞はPhenacetin (PHE)、Bupropion (BP)、Paclitaxel (PCT)、Tolbutamide (TB)、*S*-mephenytoin (MP)、Bufuralol (BF)、Midazolam (MDZ)、Testosterone (TS)、Hydroxyl coumarin (OHC)を以下の濃度で作用させられた。10 µM PHE、150 µM BP、20 µM PCT、500 µM TB、200 µM MP、50 µM BF、10 µM MDZ、100 µM TS、10 µM OHC。各基質は(PHE、BP、PCT、TB、MP、BF、MDZ、TS、OHC)代謝されることにより、下記の代謝物になることが知られている

Acetaminophen	[AAP]	,
Hydroxybupropion	[OHBP]	,
6 α -hydroxypaclitaxel	[OHPCT]	,
Hydroxytolbutamide	[OHTB]	,
4'-hydroxymephenytoin	[OHMP]	,

1'-hydroxybufuralol [OHBF] 、
1'-hydroxymidazolam [OHMDZ] 、
6β-hydroxytestosterone [OHTS] 、
7-Hydroxycoumarin glucuronide
[G-OHC])。各基質を作用させた後、上清を
1、2、4、24 時間後に回収し、LC-MS/MS
(Shimadzu Corporation 社)を用いて、代謝
物量を測定した。代謝物量は総タンパク量
で補正した。

B-11. 定量的リアルタイム PCR

各細胞集団からISOGEN (Nippon gene
社)を用いてTotal RNAを抽出した。ヒト初
代培養肝細胞 (CellzDirect社 (ロット：
Hu8072)) もしくはXenotech社 (ロット：
HC2-14 およびHC10-101))は 15 µg/cm²
type I-A collagen (新田ゼラチン社) をコ
ートした細胞培養用 12 ウェルプレートの
各ウェルに 1.2×10⁵ cells/cm²の細胞密度で
10% FCS (GIBCO-BRL社) を含むHCMで
播種したのち、6 時間後に一度上記培地で
培地交換し、合計 48 時間培養した。各Total
RNAをRNase-free DNase Iで処理した後、
Superscript VILO cDNA synthesis kit
(Invitrogen社)を用いて逆転写反応を行い、
complementary DNA (cDNA)を合成した。
定量的リアルタイムPCRによる解析は
Taqman gene expression assays (Applied
Biosystems社)を使用し、ABI PRISM 7700
Sequence Detector (Applied Biosystems
社)により定量した。

B-12. 免疫抗体染色法

12 (あるいは 24) ウェルプレートにて培
養した各細胞を PBS にて 2 回洗浄し、メタ
ノール (Wako 社) もしくは 4%
paraformaldehyde (Wako 社) を用いて室

温で 10 分処理したのち、2% BSA (Sigma
社)、0.2% Triton X-100 (Sigma 社) を含
む PBS で 45 分間ブロッキングを行った。
各 1 次抗体を 4°Cで一晩反応させ、続いて
Alexa Fluor 488またはAlexa Fluor 594で
標識した 2 次抗体 (Molecular Probe 社)
を室温で 1 時間反応させた。その後、
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
(Invitrogen 社) を用いて核染色を行った後
2% paraformaldehyde にて固定し、蛍光顕
微鏡 (BIOREVO BZ-9000、キーエンス社)
にて観察した。

B-13. アルブミン・尿素産生能の評価

HepG2 細胞、分化誘導肝細胞、48 時間
培養したヒト初代培養肝細胞について、培
地交換したのち 24 時間後に培地を回収し、
産生されたアルブミン量を Human
Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories
社)、産生された尿素量を QuantiChrom
Urea Assay Kit (BioAssay Systems 社)
を用いて測定した。アルブミンおよび尿素
産生量は総タンパク量で補正した。なお、
総タンパク量の測定には Thermo
Scientific Pierce BCA Protein Assay
(Thermo Scientific 社) を用いた。

B-14. CYP 活性測定法

B-3~B-6 に示す方法により分化誘導さ
れたヒト iPS 細胞由来肝細胞に 10 µM
Rifampicin (Wako 社)、または DMSO (終
濃度 0.1%となるように使用 ; Wako 社) を
作用させ、48 時間後に P450-Glo™
CYP2C9 (型番 : V8791) 、CYP3A4 (型
番 : V9001) Assay Kit (Promega 社) を
用いて CYP2C9、CYP3A4 の活性を測定し
た。活性はルミノメーター (Lumat LB
9507、Berthold 社)を用いて定量した。CYP
活性は総タンパク量で補正した。なお、総

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

B-15. 肝毒性化合物を作用させることによる細胞毒性の評価

B-3~B-6 の方法により分化誘導された分化誘導肝細胞 (mono iPS-hepa 細胞および 3D iPS-hepa 細胞) および HepG2 細胞を Acetaminophen (Wako)、Allopurinol (Wako)、Amiodaron (Sigma)、Benzbromarone (Sigma)、Clozapine (Wako 社)、Cyclizine (MP bio 社)、Dantrolene (Wako 社)、Desipramine (Wako 社)、Disulfiram (Wako 社)、Erythromycin (Wako 社)、Felbamate (Sigma 社)、Flutamide (Wako 社)、Isoniazid (Sigma 社)、Labetalol (Sigma 社)、Lefunomide (Sigma 社)、Maprotiline (Sigma 社)、Nefazodone (Sigma 社)、Nitrofurantoin (Sigma 社)、Sulindac (Wako 社)、Tacrine (Sigma 社)、Tebinafine (Wako 社)、Tolcapone (TRC 社)、Troglitazone (Wako 社)、Zafirlukast (Cayman 社) をそれぞれ含む培地を用いて 37°C で 24 時間培養した。また、肝毒性化合物による細胞毒性が CYP を介したものであるか調べる際は、B-3~B-6 の方法により分化誘導されたヒト iPS 細胞由来肝細胞を Aflatoxin B1 (Sigma 社)、Benzbromarone をそれぞれ CYP 阻害剤含有 (CYP2C9 を阻害する場合は 2 μ M

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

C. 研究結果

我々はこれまでに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化過程の適切な時期において FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入することによって、効率良く肝分化を促進できることを見出している。そこで、本研究では、Figure 1 のプロトコールにしたがって分化誘導した肝細胞における肝機能を評価した。成熟した肝細胞は尿素を産生することが知られているため、分化誘導肝細胞における尿素産生量を調べた。その結果、分化誘導肝細胞の尿素産生能はヒト初代培養肝細胞の半分程度であった (Figure 2A)。肝細胞は特定の薬剤を作用させることによって、シトクロム P450 (CYP) が誘導されることが知られており、なかでも CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 は市販の多くの薬剤によって誘導されることが知られている。分化誘導肝細胞の CYP 誘導能を評価するため、培養 20 日目の分化誘導肝細胞に対して、CYP1A2 の誘導剤である β -naphthoflavone (bNF)、CYP2B6 の誘導剤である phenobarbital (PB)、CYP3A4 の誘導剤である rifampicin (RIF) をそれぞれ作用させた (Figure 2B) (用いた誘導剤の使用濃度は Figure 3 に記載した)。未分化なヒト iPS 細胞においてはこれらの薬剤に対する CYP 誘導が

観察されなかったが (data not shown)、分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞においては、CYP 誘導がみとめられた (Figure 2B)。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞の CYP 誘導能と比較して、分化誘導肝細胞の CYP 誘導能は非常に低かった。

薬物の大半は肝臓において代謝されており、CYP、UGT 酵素が特に重要な役割を担うことが知られている。肝臓で機能する様々な薬剤代謝酵素のうち CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT 遺伝子の代謝能を Figure 1 のプロトコールにしたがって作製した分化誘導肝細胞において評価した。9 つの薬剤、Phenacetin (PHE)、Bupropion (BP)、Paclitazell (PCT)、Tolbutamide (TB)、S-mephenytoin (MP)、Bufuralol (BF)、Midazolam (MDZ)、Testosterone (TS)、Hydroxyl coumarin (OHC) はそれぞれ CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4、3A4、UGT の基質であり、これらをヒト iPS 細胞、分化誘導肝細胞、ヒト初代培養肝細胞に作用させ、その代謝生成物の量を 1、2、4、24 時間後測定した (Figure 4) (使用した基質とその代謝物の名称は Figure 5 に記載した)。それぞれの CYP および UGT 酵素による代謝能は代謝物の産生に線形性が確認される時間において評価した (Figure 6)。その結果、分化誘導肝細胞の薬剤代謝能はヒト初代培養肝細胞よりも劣っていたものの、全ての薬剤の代謝生成物が検出可能であった。

肝臓における薬物代謝には第一相反応に関与する CYP 酵素、第二相反応に関与する UGT や GST 酵素のほかに第三相反応に関与する肝関連トランスポーターも重要であることが知られている。そこで、分化誘導肝細胞の肝関連トランスポーターの機能を評価するために、インドシアニングリーン (ICG) の取り込み能を調べた (Figure

7A)。その結果、未分化なヒト iPS 細胞は ICG を取り込まなかったのに対して、分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞は ICG を取り込む能力を有していた。また、ICG を除去した培地で分化誘導肝細胞を 6 時間培養することによって、取り込んだ ICG を排泄することができることが確認された (Figure 7A)。以上の結果から、分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様に機能するトランスポーターを有していることが明らかとなった。また、肝臓は低濃度リポタンパク (LDL) を取り込むことができることも知られている。そこで、Alexa-Flour 488 をラベルした LDL を分化誘導肝細胞が取り込むことができるかどうか調べた (Figure 7B)。その結果、未分化なヒト iPS 細胞は LDL を取り込まなかったのに対して、分化誘導肝細胞では 80% 以上の細胞が LDL を取り込む能力を有していた。以上の結果から、分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様に LDL を取り込む能力を有していることが明らかとなった。

分化誘導肝細胞を薬剤スクリーニングに応用できるかどうか検討するために、培養 20 日目の分化誘導肝細胞に対して肝毒性を示すことが知られるベンゾブロマロンを作用させ、48 時間後に細胞生存率を測定した (Figure 8)。分化誘導肝細胞の細胞生存率はベンゾブロマロンの濃度に依存して低下した。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞と比較して、分化誘導肝細胞の細胞毒性が弱いことが確認された。肝毒性を示す薬剤に対する分化誘導肝細胞の感度を向上させるために、細胞内のグルタチオンを枯渇させることができる Buthionine-SR-sulfoximine (BSO) を分化誘導肝細胞に作用させたのち、先ほどと同様にベンゾブロマロンを用いた評価を実施した。その結果、BSO を処理した分化誘導肝細胞は、よりヒト初代培養肝細胞に近

い感度でベンゾブロマロンに対する細胞毒性を検出できることが確認された。以上の結果から、グルタチオンを枯渇させた分化誘導肝細胞は薬剤スクリーニングに応用できる可能性が示唆された。

そこで次に、肝分化誘導において上述の遺伝子導入技術と三次元培養法を組み合わせることで、分化誘導肝細胞をさらなる成熟化を試みた。B-3~B-6に記載されたプロトコールにしたがって、三次元培養条件下で分化誘導肝細胞を作製した。3D iPS-hepa 細胞において、肝マーカーであるアルブミン (ALB) や CYP3A4 が発現しているか確認するために、免疫抗体染色を実施した (Figure 9A)。その結果、3D iPS-hepa 細胞において、ALB および CYP3A4 タンパクの発現が確認された。分化誘導肝細胞を薬物毒性評価系に応用するためには、高い CYP 活性を有している必要があるため、mono iPS-hepa 細胞と 3D iPS-hepa 細胞における CYP 活性を比較した (Figure 9B)。その結果、3D iPS-hepa 細胞の方が有意に高い CYP2C9 および CYP3A4 活性を示した。肝細胞は Rifampicin などの化合物を作用させることによって CYP mRNA および活性が上昇することが知られる。そこで、mono iPS-hep 細胞および 3D iPS-hepa 細胞における CYP 誘導能を評価したところ、3D iPS-hepa 細胞における CYP 誘導能の方が高かった (Figure 9C)。また、3D iPS-hepa 細胞における CYP2C9 および CYP3A4 の誘導は、それぞれの CYP に対する阻害剤 (CYP2C9 を阻害する場合は Sulfaphenazole、CYP3A4 を阻害する場合は Ketoconazole を用いた) を作用させることによって減弱した。以上の結果から、ナノピラープレートを用いた三次元培養系で作製した分化誘導肝細胞は、これまで使用していた平面培養系で作製した分化誘導肝

細胞と比較し、高い CYP 活性および誘導能を有していることが明らかとなった。

ナノピラープレートを用いて作製した 3D iPS-hepa 細胞が薬物毒性評価系に応用できる可能性を検討するため、3D iPS-hepa 細胞を肝毒性化合物を含む培地で培養したのち、細胞生存率を評価した。細胞生存率を評価するにあたり、WST-8 法、ATP 量測定法、Alamar Blue アッセイ、Crystal Violet 染色のうちどの方法が最も感度良く肝毒性化合物による細胞毒性を検出できるか調べた (Figure 10A)。また、各評価方法において、3D iPS-hepa 細胞に $40 \mu\text{M}$ Benzbromarone を作用させたときの、細胞生存率 (あるいは ATP 活性) を Figure 10B にまとめた。その結果、肝毒性化合物である Benzbromarone を作用させた場合、有意な差はなかったものの WST-8 法を用いることによって、高感度に細胞毒性を検出することができた。以上の結果から、以後の肝毒性化合物に対する感受性を評価する実験では WST-8 法を用いた。

Mono iPS-hepa 細胞と 3D iPS-hepa 細胞の肝毒性化合物に対する感受性を比較するため、各細胞に対して 8 つの化合物 (Acetaminophen、Benzbromarone、Desipramine、Maprotiline、Nefazodone、Nitrofurantoin、Imipramine、Cyclosporin A) を様々な濃度で作用させた (Figure 11)。その結果、6 つの化合物 (Acetaminophen、Benzbromarone、Desipramine、Maprotiline、Nitrofurantoin、Cyclosporin A) について、3D iPS-hepa 細胞の方が有意に強い細胞毒性が生じた。以上の結果から、3D iPS-hepa 細胞は mono iPS-hepa 細胞に比べてより広範の薬物毒性評価系に応用できる可能性が示唆された。

薬物が肝細胞の薬剤代謝酵素に代謝されることによって生成される反応性代謝物は、肝細胞の毒性を引き起こす場合があること

が知られる。薬物の反応性代謝物による肝細胞毒性を予測するために、ヒト初代培養肝細胞を用いた high content analysis などの各種解析が実施されているが、ヒト肝がん由来細胞である HepG2 細胞を用いた解析も汎用されている。HepG2 細胞はヒト初代培養肝細胞と比較し、多くの CYP 活性が劣っているものの、非常に安価であり、ほぼ無限に増殖でき、均質であるため、現在も創薬過程における薬物毒性評価系への適用が試みられている。そこで、本研究で作製した 3D iPS-hepa 細胞は HepG2 細胞と比較して薬物毒性評価への応用に適しているかどうか調べるため、肝毒性化合物 22 種類を各細胞に作用させたのち、細胞毒性を評価した (Figure 12)。その結果、22 化合物中 18 化合物について、3D iPS-hepa 細胞の方が HepG2 細胞より強い細胞毒性を生じた。なお、本研究では HepG2 細胞はナノピラープレート上でスフェロイド形成させたものを使用している。スフェロイド形成させた HepG2 細胞 (3D HepG2) は平面培養時よりも各種肝機能が高いことを確認している (Figure 13)。

最後に、肝毒性化合物を 3D iPS-hepa 細胞に作用させることで生じる細胞毒性が、CYP を介したものであることを確認するために、以下に示す実験を行った。CYP3A4 によって代謝されることで肝毒性を生じることが知られる Aflatoxin B1 を CYP3A4 阻害剤である Ketoconazole を併用した条件で、3D iPS-hepa 細胞に作用させたのち、細胞毒性を評価した (Figure 14A)。また、CYP2C9 によって代謝されることで肝毒性を生じることが知られる Benzbromarone を CYP2C9 阻害剤である Sulfaphenazole を併用した条件で、3D iPS-hepa 細胞に作用させたのち、細胞毒性を評価した (Figure 14B)。その結果、Aflatoxin B1、Benzbromarone のいずれを作用させた場

合においても、CYP 阻害剤を併用することで、3D iPS-hepa 細胞における細胞毒性が軽減した。以上のことから、3D iPS-hepa 細胞における肝毒性化合物により細胞毒性は CYP を介することが示された。

D. 考察

Figure 4 および Figure 6 において分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞の薬物代謝能を比較した。過去の我々の知見では、分化誘導肝細胞における肝関連遺伝子の発現の評価したところ、ヒト初代培養肝細胞は同程度であったが、Figure 6 で示されたように分化誘導肝細胞の薬剤代謝能はヒト初代培養肝細胞よりも劣ることが確認された。遺伝子発現と薬剤代謝能の差がみとめられた原因のひとつとして、分化誘導肝細胞の肝関連核内受容体の遺伝子発現がヒト初代培養肝細胞と比較して低い可能性が考えられる。肝関連核内受容体は CYP3A4 遺伝子などの主要な CYP 遺伝子が正しく機能するために必須の遺伝子であることが知られているため、肝関連核内受容体を分化誘導肝細胞に導入することによってさらなる肝成熟化が期待される。

分化誘導肝細胞を薬剤スクリーニングに応用可能か検討するために、本研究ではベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じるか調べた。分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様にベンゾブロマロンに対する細胞毒性が生じることが確認された (Figure 8)。今後は、これらの肝毒性を示す薬剤を作用させたときに細胞毒性が CYP 酵素を介したものかどうか詳細に検討する必要がある。また、他の肝毒性を有する薬剤に対する応用についても網羅的に検討する必要があると考えられる。

ヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化が、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入することによって促

進できることを明らかにした。本研究において作製した分化誘導肝細胞は薬剤代謝能を有することが示された。今後は、肝毒性を有する化合物に対する応答能を網羅的に調べるとともに、肝毒性マーカーをヒト初代培養肝細胞と比較することによって、どの程度正確な毒性評価が可能であるか調べる必要がある。

肝成熟化（肝幹前駆細胞から肝細胞への分化）をナノピラープレートを用いた三次元培養条件下で行うことにより、分化誘導肝細胞をさらに成熟化させること、ならびに、より広範な毒性評価系へ応用することを目指して更なる検討を行った。3D iPS-hepa 細胞の CYP 活性および誘導能は、いずれも mono iPS-hepa 細胞よりも高かった (Figure 9)。3D iPS-hepa 細胞は mono iPS-hepa 細胞と比較して、約 2 倍以上の期間培養しているため、CYP タンパクがより多く蓄積することで、CYP 活性が上昇したと考えられる。しかしながら、3D iPS-hepa 細胞の CYP 活性および誘導能はいずれもヒト初代培養肝細胞よりも低かった。以上のことから、三次元培養法を用いることによって、分化誘導肝細胞の CYP 活性および誘導能を有意に高めることができるものの、大幅な改善は見られないことが分かった。

3D iPS-hepa 細胞の CYP 活性は mono iPS-hepa 細胞よりも高かったため、肝毒性を示す化合物に対する感受性も高いのではないかと考え、Figure 11 に示す 8 種類の化合物をそれぞれの細胞に作用させた。その結果、3D iPS-hepa 細胞の方が肝毒性化合物を作用させることで、より強い細胞毒性を生じた。Desipramine や Nefazodone などについては、mono iPS-hepa 細胞ではほとんど細胞毒性が観察されなかったが、3D iPS-hepa 細胞では非常に強い細胞毒性がみられた。三次元培養することによって、

分化誘導肝細胞の CYP 活性は約 2 倍程度の上昇しか見られなかったのに対して、一部の肝毒性化合物に対する感受性が大幅に高まった理由として、その薬物の反応性代謝物の抱合・排泄に関与する第二相抱合酵素・トランスポーターの発現が低下したことが一因として考えられる。

本研究にて作製した 3D iPS-hepa 細胞は HepG2 細胞よりも肝毒性化合物に対する感受性が高かった (Figure 12)。3D iPS-hepa 細胞を用いてさらに感度良く肝毒性化合物による細胞毒性を検出するためには、CYP の活性を上昇させる必要がある。これまでに HepG2 細胞において、細胞保護作用のある第二相抱合酵素の発現をブチオニンスルホキシミン (BSO) を用いて低下させることで、肝毒性化合物への感受性が高まることが報告されている。また、3D iPS-hepa 細胞の電子伝達系が正常であるならば、3D iPS-hepa 細胞において発現が不足している CYP 群を過剰発現させることによって、より肝毒性化合物による細胞毒性を高感度に検出できる可能性がある。

Figure 14 に示されるように、3D iPS-hepa 細胞に肝毒性化合物を作用させることによる細胞毒性は CYP による代謝を介したものである。したがって、本研究における肝毒性化合物による細胞毒性は、非特異的な細胞毒性でなく、CYP を発現する細胞に特異的な現象であるといえる。本研究では、肝毒性化合物に対する応答能の評価として細胞毒性を調べたが、今後はミトコンドリアにおける毒性、脂質代謝の異常、尿素サイクルの異常などについても検討する予定である。

E. 結論

FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することによって作製した分化誘導肝細胞における