

A. 研究目的

創薬過程において、新薬の開発費として多額の予算と長期に及ぶ非臨床・臨床試験を要する。この過程を迅速化させ、低コスト化させるための新たな技術のひとつとして、ヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells ; ヒト iPS 細胞) を用いた技術が注目されている。ヒト iPS 細胞は、ヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cells ; ヒト ES 細胞) と同様に、自己複製能と分化多能性を有する細胞であり、ヒト ES/iPS 細胞から分化させた細胞は創薬過程における薬効評価試験・毒性試験などの非臨床試験への応用が期待されている。肝臓は薬物の代謝に関与する主要な臓器であるため、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞は新薬候補化合物の代謝や肝毒性の予測などに活用できると考えられる。しかしながら、現在のヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術では、ヒト初代培養肝細胞に類似した機能を有した肝細胞を効率良く分化誘導することが困難であった。そのため、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導技術の開発が急務となっている。そこで、我々はヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化効率を上昇させるため、肝分化に必須の 7 種類の転写因子 (FOXA2、HEX、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、HNF6、SOX17) を肝細胞への分化過程の適切な時期の細胞に遺伝子導入した (平成 23 年度)。また、三次元培養法を用いて、ヒト ES/iPS 細胞から高い肝機能を有した肝細胞への効率良い分化誘導法の開発を試みた (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。そのマルチクローニング部位に 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-LacZ、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-HNF1 β 、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 ES/iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 H1(WA01)、H9(WA09) (WISC Bank, WiCell Research Institute)やヒト iPS 細胞株 201B6、201B7、253G1(京都大学、山中伸弥教授から供与)は 5 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学工業社)を含む霊長類 ES 細胞用培地である ReproStem (リプロセル社)を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞(MEF、ミリポア社)上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Dotcom、Tic、Toe は 10 ng/mL の bFGF を含む iPS 細胞用培地である iPSELLON (カルディオ社)を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。5-7 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼ (Roche 社)を用いてヒト ES/iPS 細胞のコロニーを回収した後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

B-3. ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 hESF9 (MK. Furue et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,

105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase cell detachment solution (日本ベクトン・ディッキンソン社)を用いてヒト ES/iPS 細胞で細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin A (R&D systems 社)および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地(6 因子 (10 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 ES/iPS 細胞由来中内胚葉(培養 2 日目)から内胚葉への分化誘導を行う場合は、ヒト ES/iPS 細胞を上記の方法で中内胚葉まで培養し、各 Ad ベクター(AdK7-EF-FOXA2)を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で 90 分間作用させた。培地は 100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いた。その後、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いて毎日培地交換を行い、5 日目まで培養した。

B-4 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3.に記載された方法に準じて分化誘導し

た内胚葉（培養 5 日目）を、0.05% trypsin-0.053 mM EDTAで細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin Aおよび 10 ng/ml bFGFを含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigelでコーティングした細胞培養用マルチプレート（12 ウェルプレート）の各ウェルに 1.25×10^5 cells/ cm^2 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-HNF1 α ）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-HNF1 α ）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 プレーートの各ウェルに 1.25×10^5 cells/ cm^2 の細胞密度で播種した。1 日後にAdベクター（AdK7-EF-FOXA2 およびAdK7-EF-HNF1 α ）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 NaHCO_3 [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-HNF1 α ）をそれぞれ 1,500 VP/cellの濃度で 90 分間作用させた後、10 ng/ml FGF1、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10、10 ng/ml hepatocyte growth factor（HGF）（すべてR&D systems社）を含むHCMに交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin-0.053 mM EDTAを用いて細胞を剥離したのち回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF（すべて 10 ng/mlの濃度で使用）を含

むHCMに懸濁後、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigelでコーティングした日立ナノピラー細胞培養12 ウェルプレート(日立ハイテクノロジー社)の各ウェルに 2.5×10^5 cells/ cm^2 の細胞密度で播種した。1日後にAdベクター(AdK7-EF-FOXA2, AdK7-EF-HNF1 α)をそれぞれ1,500 VP/cellの濃度で90分間作用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M (OsM, R&D systems社)、10 ng/mL FGF4、 10^{-6} M Dexamethazone (DEX, Sigma社)を含むHCMを用いて1日おきに培地交換を行い、13日間(培養12日目から培養25日目まで)培養した。分化誘導肝細胞をさらに成熟化させるため、Matrigelを分化誘導肝細胞の上に重層化させた。0.25 mg/mL Matrigel、4 mM L-Glutamine、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate、 $1 \times \text{ITS}$ (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 \square 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. 定量的リアルタイムPCR

各細胞集団からISOGEN (Nippon gene社)を用いてTotal RNAを抽出した。ヒト初代培養肝細胞(CellzDirect社(ロット: Hu8072))もしくはXenotech社(ロット:

HC2-14 およびHC10-101)は15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ type I-A collagen (新田ゼラチン社)をコートした細胞培養用12ウェルプレートの各ウェルに 1.2×10^5 cells/ cm^2 の細胞密度で10% FCS (GIBCO-BRL社)を含むHCMで播種したのち、6時間後に一度上記培地で培地交換し、合計48時間培養した。各Total RNAをRNase-free DNase Iで処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen社)を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA)を合成した。定量的リアルタイムPCRによる解析はTaqman gene expression assays (Applied Biosystems社)を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems社)により定量した。

B-8. フローサイトメトリー

B-3~6の方法により作製した分化誘導肝細胞を1 mM EDTA/PBSで剥離したのち回収した。得られた細胞に各1次抗体を4 $^{\circ}\text{C}$ で30分反応させ、続いてAlexa Fluor 488で標識した2次抗体(Molecular Probe社)を4 $^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させた。抗原陽性細胞の割合はBD LSRFortessa (BD Biosciences社)フローサイトメーターを用いて解析した。

B-9. アルブミン・尿素産生能の評価

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

パク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific 社) を用いた。

B-10. CLF 取り込み能の評価

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

B-11. 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。

C. 研究結果

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化を促進するために、分化誘導された中内胚葉 (培養 2 日目) に対して、7 種類の転写因子をそれぞれ搭載した Ad ベクター (Ad-SOX17、Ad-FOXA2、Ad-HEX、

Ad-HNF1 α 、Ad-HNF1 β 、Ad-HNF4 α 、Ad-HNF6) を作用させた (Figure 1A)。培養 5 日目に CXCR4 (内胚葉マーカー) 陽性細胞率を FACS で計測することによって内胚葉への分化誘導効果を評価した。FOXA2 もしくは SOX17 遺伝子を導入することによって、CXCR4 陽性細胞率が最も増加した (Figure 1B)。FOXA2 もしくは SOX17 遺伝子を導入することによって分化誘導した内胚葉の性質の相違を調べるために、FOXA2 もしくは SOX17 遺伝子導入細胞における内胚葉マーカー、中胚葉マーカー、胚体外内胚葉マーカー、未分化マーカーの遺伝子発現を培養 5 日目に調べた。内胚葉マーカーは FOXA2 遺伝子導入細胞と SOX17 遺伝子導入細胞の間で同程度の発現量を示したが、胚体外内胚葉マーカーの発現量は SOX17 遺伝子導入細胞の方が高発現であった (Figure 1C)。したがって、FOXA2 遺伝子導入によって内胚葉へ分化を選択的に促進できることが示された。

内胚葉から肝幹前駆細胞への分化を促進するため、培養 6 日目の内胚葉に対して、7 種類の転写因子をそれぞれ搭載した Ad ベクター (Ad-SOX17、Ad-FOXA2、Ad-HEX、Ad-HNF1 α 、Ad-HNF1 β 、Ad-HNF4 α 、Ad-HNF6) を作用させた (Figure 1D)。肝幹前駆細胞への分化誘導効果は AFP (肝幹前駆細胞マーカー) 陽性細胞率を培養 9 日目に FACS で計測することによって評価した。FOXA2 あるいは HNF1 α 遺伝子を導入することによって、AFP 陽性細胞率は最も増加した (Figure 1E)。FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を組み合わせて導入することによって、肝幹前駆細胞への分化をさらに促進できることを期待し、培養 9 日目に肝幹前駆細胞のマーカーである *CYP3A7* 遺伝子の発現量を調べることによって肝幹前駆細胞への分化誘導効果を評価した。FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を組み合わせることによ

て、FOXA2 あるいは HNF1 α を単独で導入した場合と比較して、*CYP3A7* の遺伝子発現量が上昇したことから、FOXA2 と HNF1 α 遺伝子を組み合わせることで導入することによって、肝幹前駆細胞への分化をさらに促進できることが確認された (Figure 1F)。

肝幹前駆細胞から成熟した肝細胞への分化を促進するために、培養 9 日目の肝幹前駆細胞に対して 7 種類の転写因子をそれぞれ搭載した Ad ベクター (Ad-SOX17、Ad-FOXA2、Ad-HEX、Ad-HNF1 α 、Ad-HNF1 β 、Ad-HNF4 α 、Ad-HNF6) を作用させた (Figure 2A)。成熟した肝細胞への分化誘導効果はアジアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1、成熟した肝細胞のマーカー) 陽性細胞率を培養 20 日目に FACS で計測することによって評価した。FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子を導入することによって、ASGR1 陽性細胞は最も増加した (Figure 2B)。FOXA2、HNF1 α 、あるいは HNF4 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の性質の相違を調べるために、FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子導入細胞における肝幹前駆細胞マーカー、肝細胞マーカー、胆管上皮細胞マーカーの遺伝子発現を培養 20 日目に調べた。成熟肝細胞マーカー (mature hepatic markers) は FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子導入細胞の間で同程度の発現を示したが、肝幹前駆細胞マーカー (early hepatic markers) は FOXA2 遺伝子導入細胞で最も高発現であった (Figure 2C)。FOXA2、HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子を組み合わせることで導入することによってさらなる肝成熟化が促進されることを期待し、培養 20 日目に成熟肝細胞のマーカーである *CYP2C19* 遺伝子の発現量を調べた。FOXA2、HNF1 α 遺伝子もしくは HNF1 α 、HNF4 α 遺伝子を組み合わせることによって、単独導入時と比較

して、*CYP2C19* 遺伝子の発現量が上昇したことから、FOXA2、HNF1 α 遺伝子もしくは FOXA2、HNF4 α 遺伝子を組み合わせることによって、さらなる肝成熟化を促進できることが確認された (Figure 2D)。以上の結果から、Figure 3A に示すプロトコールを用いてヒト ES/iPS 細胞から成熟した肝細胞への分化誘導を行うことによって、効率良く肝細胞を分化誘導できることが明らかとなった。また、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を組み合わせることによって作製した分化誘導肝細胞は、明確な輪郭や複数の核を有することが確認された (Figure 3B)。さらに分化誘導肝細胞は Albumin (ALB)、Cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*)、alpha-1-antitrypsin (α AT)、*CYP3A4*、*CYP7A1* などの肝関連タンパクを強く発現していることも示された (Figure 3C)。

分化誘導肝細胞を薬剤の毒性評価系などに応用する場合、その肝機能がヒト初代培養肝細胞に近いことが求められるため、肝分化能の高いヒト ES/iPS 細胞を探索した。2 種類のヒト ES 細胞株、5 種類のヒト iPS 細胞株を Figure 3A のプロトコールにしたがって肝分化させ、培養 20 日目に ALB 遺伝子発現量を比較した結果、ヒト iPS 細胞株である Dotcom が最も高い ALB 遺伝子発現を示した。したがって、ヒト iPS 細胞株 Dotcom が最も肝分化能が高いことが示唆された (Figure 4A)。分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能を比較するため、ALB 産生量や ALB 陽性細胞率をそれぞれの細胞において測定した (Figures 4B and C)。その結果、分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞に近い ALB 産生能を有しており (Figure 4B)、約 80% 以上の細胞が ALB 陽性細胞であること (Figure 4C) が確認された。さらに、詳細に分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能を比較す

るため、肝細胞において発現することが知られる薬物代謝の第1相反応に關与するCYP遺伝子 (Figure 4D)、薬物代謝の第2相反応に關与するUGT遺伝子やGST遺伝子 (Figure 4E)、薬物代謝の第3相反応に關与する各種トランスポーター (Figure 4F)、CYP誘導に關与する肝關連核内受容体 (Figure 4G) の発現を調べた。その結果、分化誘導肝細胞における各種遺伝子の発現はヒト初代培養肝細胞と同程度のものが多かった。しかしながら、分化誘導肝細胞における胎児型のCYPである *CYP3A7* の発現がヒト初代培養肝細胞と比較して高いことから、分化誘導肝細胞はさらなる成熟化の余地があると考えられる。また、Figure 4において用いたヒト初代培養肝細胞は48時間培養したものであり、より生体内の肝細胞に近い細胞をヒトiPS細胞から分化誘導するためにはさらなる肝分化誘導技術の改良が必要である。

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

する条件が最適であることが示された。

次に、ナノピラープレートを用いた肝成熟化に適した培地を検討した。Differentiation hESF-DIF培地、HCM、L15培地の3種類の培地を用いて、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化を行った。Differentiation hESF-DIF培地ではスフェロイドが形成されなかったのに対して、HCMあるいはL15培地を用いることでスフェロイドの形成が観察された (Figure 6A)。また、各培地で培養したときの、各細胞の *CYP3A4* (Figure 6B) および *CYP2C9* (Figure 6C) の遺伝子発現量を定量的RT-PCR法を用いて調べた。HCMで培養した細胞において、最も高い *CYP3A4* および *CYP2C9* 遺伝子発現量が確認された。したがって、ナノピラープレートを用いて肝成熟化を行うためには、HCMが最適な培地であることが明らかになった。

ナノピラープレートを用いた三次元培養系では、どの液性因子が成熟化に促進的に働くか調べた。培養12~25日目において、Figure 7Aのcondition 1~5に示す液性因子を肝幹前駆細胞に作用させ、各細胞における *ALB* の遺伝子発現量を調べた。その結果、この過程においてはHGF、OsM、FGF4、DEXを作用させることで、最も高い *ALB* 遺伝子発現量を示した。次に、培養25~35日目においてはどの液性因子が肝成熟化に促進的に働くか調べた。培養25~35日目において、Figure 7Bのcondition 1~6に示す液性因子を分化誘導肝細胞に作用させ、各細胞における *ALB* 遺伝子発現量を調べた。この過程では、OsMとDEXを作用させることで、最も高い *ALB* 遺伝子発現量が確認された。以上の結果から、ナノピラープレートを用いた肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程前半ではHGF、OsM、FGF4、DEXを、後半ではOsMとDEXを作用させることで、最も肝成熟化を促進できるこ

とが明らかになった。

本研究で作製した分化誘導肝細胞を毒性評価などに応用する場合、スフェロイドに肝細胞が高純度で含まれている必要があるため、作製したスフェロイドにおける肝細胞集団の割合を肝細胞マーカーであるASGR1を指標にFACSを用いて調べた(Figure 8A)。その結果、培養20日目のスフェロイドでは80%程度の細胞がASGR1陽性細胞であり、培養30~35日目のスフェロイドでは90%程度の細胞がASGR1陽性細胞であった。また、平面培養時にはASGR1陽性細胞は培養20日目をピーク(約80%)とし、それ以降はASGR1陽性細胞は減少した。以上の結果から、平面培養系では分化誘導肝細胞を長期間維持することはできないが、ナノピラープレートを用いた三次元培養系では、非常に高い純度の肝細胞集団を作製できることが示された。スフェロイドが形成され、細胞が増殖するにつれて直径が大きくなることで、その中心部が壊死することが過去の報告で指摘されている。本研究で作製したスフェロイド型の分化誘導肝細胞(3D ES-hepa細胞)は90%以上の細胞生存率を示していた(data not shown)。また、平面培養で作製した分化誘導肝細胞(mono ES-hepa細胞)は培養20日目以降減少するのに対して、3D ES-hepa細胞は培養35日目においても増加傾向を示した(Figure 8B)。以上の結果から、ナノピラープレートを用いることで、ヒトES/iPS細胞由来肝幹前駆細胞から高純度の肝細胞からなるスフェロイドを作製でき、それを長期間維持できることが示された。

ここまでの結果から、確立された肝分化誘導プロトコルをFigure 9Aに示す。ナノピラープレート(Figure 9B)に肝幹前駆細胞を播種することでスフェロイドが形成され、培養35日目には直径100 μm 程度のス

フェロイドになる(Figure 9C)。従来の平面培養系で作製したmono ES-hepa細胞と本研究の三次元培養系で作製した3D ES-hepa細胞の肝機能を比較するために、以下に示す実験を行った。3D ES-hepa細胞のALB遺伝子発現を継時的に調べたところ、培養20日目には48時間培養したヒト初代培養肝細胞(PHs-48hr)に匹敵する発現量となり、培養35日目までその発現量は増加し続けた(Figure 10A)。また、培養20、25、30、35日目のいずれにおいても、3D ES-hepa細胞はmono ES-hepa細胞よりも有意に高いALB遺伝子発現量を示した。Mono ES-hepa細胞は培養20日目、3D ES-hepa細胞は培養35日目にALB遺伝子発現が最高値を示したため、以後の実験ではmono ES-hepa細胞は培養20日目、3D ES-hepa細胞は培養35日目の細胞を解析に用いた。Mono ES-hepa細胞および3D ES-hepa細胞におけるALB産生能(Figure 10B)および尿素産生能(Figure 10C)を調べたところ、3D ES-hepa細胞の方が有意に高い産生能を有していた。続いて、Mono ES-hepa細胞および3D ES-hepa細胞において、薬剤代謝酵素であるCYP(Figure 10D)、抱合酵素であるUDP-glucuronosyltransferase(UGT)やglutathione S transferase(GST)(Figure 10E)、肝臓に薬物の輸送などに関与するトランスポーター(Figure 10F)、肝関連核内受容体(Figure 10G)、微細胆管構造側に発現することが知られるトランスポーター(Figure 10H)の遺伝子発現を調べた。その結果、ほとんどの遺伝子について、3D ES-hepa細胞の方がmono ES-hepa細胞よりも高発現であった。また、微細胆管構造が形成されていることを確認するために、肝細胞からBSEPなどのトランスポーターを介して微細胆管構造に蓄積されるCLFを培地に添加し、その蓄積能を調べた(Figure

10I) 。Mono ES-hepa細胞では、CLFの取り込みはほとんどなかったが、3D ES-hepa細胞ではCLFの蓄積が観察された。また、3D ES-hepa細胞におけるCLFの取り込みはBSEP阻害剤であるcyclosporin Aを事前作用させることで、観察されなくなった。したがって、BSEPなどの微細胆管側のトランスポーターを介して、CLFが分化誘導肝細胞同士の間隙にある微細胆管構造に蓄積したと考えられる。我々が過去に報告(K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.) したように、肝関連転写因子は肝分化に促進的に働くものが多い。そこで、3D ES-hepaにおける肝関連転写因子の発現を評価した (Figure 11) 。肝分化に促進的に働くことが知られるHNF1 α 遺伝子などの発現量はmono ES-hepaよりも3D ES-hepaの方が高かった。3D ES-hepaにおけるほとんどの肝関連転写因子の発現はPHs-48hrに匹敵するレベルであることが分かった。以上の結果から、3D ES-hepa細胞はmono ES-hepa細胞よりも高い肝機能を有していることが示唆された。

ヒト ES/iPS 細胞は株によって、その分化能が大きく異なることが知られている。分化誘導肝細胞を毒性評価などに応用する場合、十分に高い肝機能を有した分化誘導肝細胞を作製できるヒト ES/iPS 細胞株を選択することが必要である。そこで、本研究では2株のヒト ES細胞および6株のヒト iPS細胞を Figure 9A にしたがって肝分化させたのち、培養35日目にALB遺伝子発現量および産生量を比較した (Figure 12) 。その結果、H1、H9、Dotcom、Tic、Toe由来分化誘導肝細胞は201B6、201B7、253G1由来分化誘導肝細胞と比較して、高いALB発現量および産生量を示した。以上のことから、分化誘導肝細胞を毒性評価などの創薬に応用する場合、H1、H9、Dotcom、Tic、Toeなどの肝分化指向性の高い株を選

択する必要であることが示唆された。

D. 考察

我々はこれまでにSOX17、HEX、HNF4 α 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、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、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(Figures 1A-C)、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程においてはFOXA2とHNF1 α 遺伝子(Figures 1D-F)、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においてはFOXA2とHNF1 α 遺伝子(あるいはFOXA2とHNF4 α 遺伝子)(Figure 2)を組み合わせることで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HNF1 α もしくはHNF4 α 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(Figure 2)。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HNF4 α 、HNF1 α 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、HNF1 α 遺伝子あるいはFOXA2、HNF4 α

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 HNF1 α 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。Figure 3A の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、Figure 4 における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。

我々は平成 23 年度までに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入することによって、薬物代謝能を有する分化誘導肝細胞を作製した (K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.)。しかしながら、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入して作製した分化誘導肝細胞の薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞と比較して、数%から 40%程度であり、より薬物代謝能の高い分化誘導肝細胞の作製技術の開発が必要であった。本年度は、ナノピラープレートを用いた三次元培養法を用いて、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化および薬物代

謝能の向上を目指した。

ナノピラープレート上で、分化誘導肝細胞の肝成熟化を促進させるために、細胞播種密度 (Figure 5) ・使用する培地 (Figure 6) ・作用させる液性因子 (Figure 7) などの様々な条件を検討した。ナノピラープレート上で、スフェロイド形成させるためには 2.5×10^5 cells/cm²以上の細胞密度が必要であった。我々の過去の検討から、ヒト ES/iPS細胞由来肝幹前駆細胞をmatrigelコートされた細胞に播種する場合 (平面培養時)、 1.25×10^5 cells/cm²の細胞密度で十分であることから、スフェロイド形成させるためには、平面培養時よりの 2 倍量程度の細胞を必要とする。また、スフェロイド形成させるために、肝幹前駆細胞を 5.0×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種したところ、スフェロイドの形成は確認されたが、CYP3A4および2C9の遺伝子発現量は低かった。細胞播種密度が高い場合は 100 μ m以上のスフェロイドが形成され、すべての細胞に栄養成分や酸素が行き届かないために、CYP遺伝子発現などの肝機能が低下したものだと考えられる。ナノピラープレート上で分化誘導肝細胞の成熟化させる培地はHCMが最適であった。平面培養時においてもHCMを使用しており、スフェロイド形成に特化した培地を使用する必要はない。ナノピラープレート上で肝成熟化させる過程 (計 23 日間培養 ; 培養 12~35 日目) において、前半の 13 日間はHGF、OsM、DEX、FGF4 を作用させ、後半の 10 日間はOsM、DEXを作用させることによって、最も肝マーカーであるALBの遺伝子発現量が高かった。肝成熟化前半の 13 日間では、成熟化を促進する液性因子など (HGF、OsM、DEX)

に加えて、細胞増殖シグナルを活性化する液性因子であるFGF4が必要であった。これはスフェロイドが効率良く形成されるには高い細胞増殖活性が必要であるためだと推察される。

平面培養あるいは三次元培養で作製された分化誘導肝細胞の肝マーカー遺伝子の発現を継時的に調べた結果、平面培養時は培養20日目をピークとして、急速に減少したが、三次元培養時は培養35日目まで肝マーカー遺伝子（アルブミン）の発現量は上昇し続けた（Figure 10A）。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（Figure 8A）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（Figure 9A）で作製した分化誘導肝細胞の各種肝機能を比較した結果、本研究の分化誘導法の方がより肝機能の高い分化誘導肝細胞を作製できることが示された（Figure 10）。三次元培養することによって、薬物代謝において重要な役割を担うCYP1A2やCYP2C19などの遺伝子発現量は上昇したが、胎児肝マーカーであるCYP3A7の遺伝子発現量も上昇した（Figure 10D）ことから、本研究において

作製した分化誘導肝細胞はいまだ胎児型肝細胞であることが示唆される。Figure 10Iに示されるように、三次元培養で作製された分化誘導肝細胞は微細胆管構造を有している可能性が確認された。したがって、今後はBSEP、FIC1、MDR3欠損などの原因によって、微細胆管構造が形成されにくい進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者からiPS細胞を作製し、肝細胞へ誘導することで、新たな疾患モデル細胞を構築できるとともに、新規治療薬の開発に繋がると期待される。

E. 結論

ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化過程の適切な時期に、FOXA2およびHNF1α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ー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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1α

- transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- 2) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
- 3) 水口裕之、高山和雄、長基康人、川端健二：ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用、*医薬品レギュラトリーサイエンス*、43、982-987(2012)
- 4) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawae T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 5) Kawabata K., Takayama K., Nagamoto Y., Saldon M.S., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *J. Stem Cell Res. Ther.*, S-10-002 (2012).
- 6) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用、*組織培養研究*、印刷中
- 7) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒトES/iPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその創薬応用、*最新医学*、68、141-144 (2013)
- 8) 川端健二、高山和雄、水口裕之：ヒト iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発、*BIO INDUSTRY*、30、19-24 (2013)
- 9) 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.*, 20:127-37 (2012).
- 10) 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).

- 11) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient Hepatic Differentiation of Human iPS Cells by Gene Transfer. *Methods Mol Biol.*, 826: 115-124 (2012)

2. 学会発表

- 1) 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、Nanopillarプレートを用いたヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用、第12回日本再生医療学会総会、神奈川、2013年3月
- 2) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、ヒトES/iPS細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子HEXの機能解明、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日
- 3) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction、第27回日本薬物動態学会年会、千葉、2012年11月
- 4) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒトES/iPS細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子HEXの機能解明、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、兵庫、2012年10月
- 5) 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、FOXA2およびHNF1 α 遺伝子導入によるヒトES/iPS細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導、第39回日本毒性学会学術年会、宮城、2012年7月
- 6) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞のSwiss 3T3細胞との積層3次元共培養下における成熟化・促進機構の解析、第19回肝細胞研究会、北海道、2012年6月
- 7) 高山和雄、川端健二、稲村 充、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、c/EBP α およびc/EBP β 遺伝子によるTGFBR2遺

伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定、第 19 回大会肝細胞研究会、北海道、2012 年 6 月

8) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之、Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析、第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月

9) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導、第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月

10) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Tachibana M., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H.、Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012 年 6 月

11) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi

M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H.、Generation of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by transduction of FOXA2 and HNF1 α 、International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012 年 6 月

12) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、転写因子 HEX によるヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化機構の解明、第 12 回日本再生医療学会総会、神奈川、2013 年 3 月 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：FOXA2・HNF1 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

13) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之：3 次元共培養法によるヒト ES・iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

14) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: EFFICIENT GENERATION OF MATURE HEPATOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 α TRANSDUCTION, 第 26 回 日本薬物動態学会年会, 広島, 2011 年 11 月 16-18 日

15) 高山和雄、稲村 充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導, 第 18 回肝細胞研究会, 東京, 2011 年 6 月 24-25 日

16) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: HNF4 α promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts., The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011

17) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura,

Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: EFFICIENT GENERATION OF FUNCTIONAL HEPATOCYTES FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 α TRANSDUCTION., International Society for Stem Cell Research, Tronto, June, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

3. その他

Figure 1

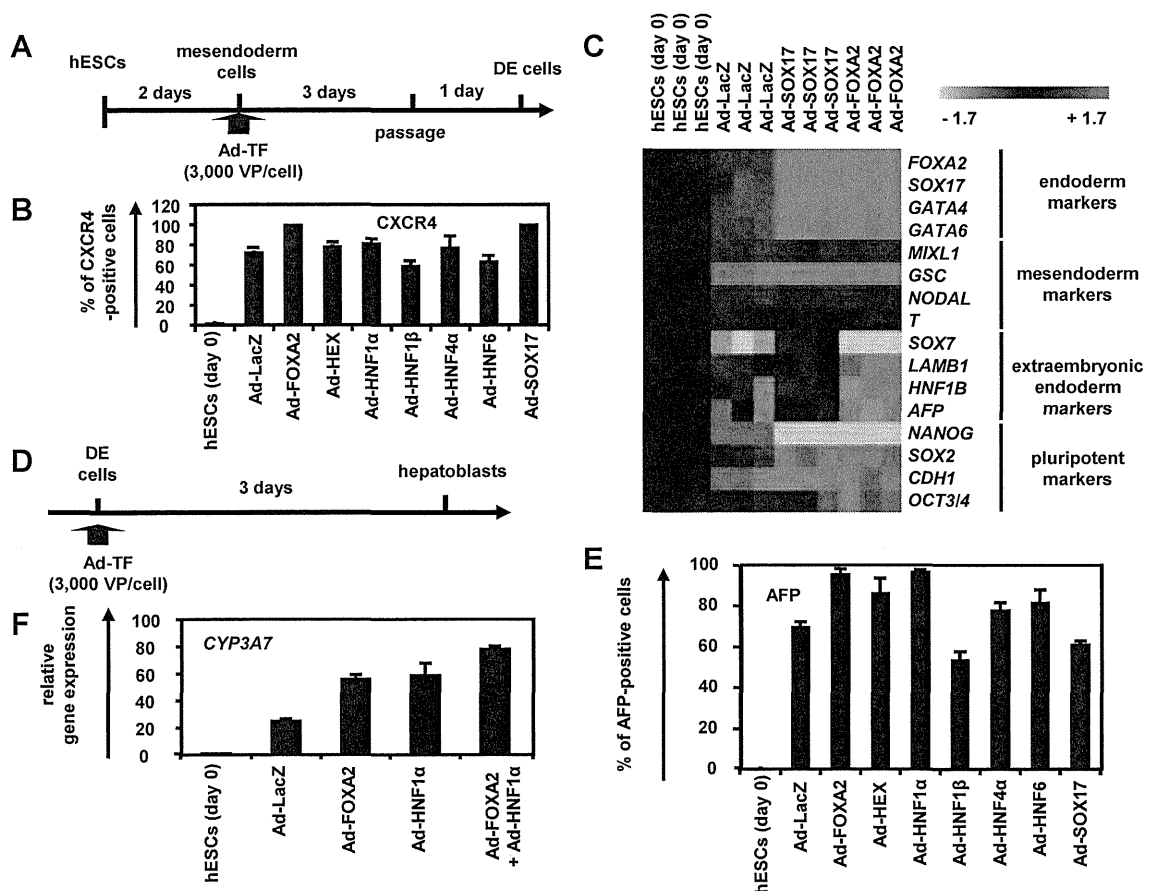


Figure 1 Efficient hepatic specification from hESCs by FOXA2 and HNF1 α transduction

(A) The schematic protocol describes the strategy for definitive endoderm (DE) differentiation from hESCs (H9). The hESC-derived mesendoderm cells (day 2) were transduced with 3,000 VP/cell of transcription factor (TF)-expressing Ad vector (Ad-TF) for 1.5 hr and cultured as described in Figure 3A. (B) On day 5, the efficiency of DE differentiation was measured by estimating the percentage of CXCR4⁺ cells using FACS analysis. (C) The gene expression profiles were examined on day 5. (D) The schematic protocol describes the strategy for hepatoblast differentiation from DE. The hESC-derived DE cells (day 6) were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 hr and cultured as described in Figure 3A. (E) On day 9, the efficiency of hepatoblast differentiation was measured by estimating the percentage of AFP⁺ cells using FACS analysis. (F) The gene expression levels of CYP3A7 were 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. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

Figure 2

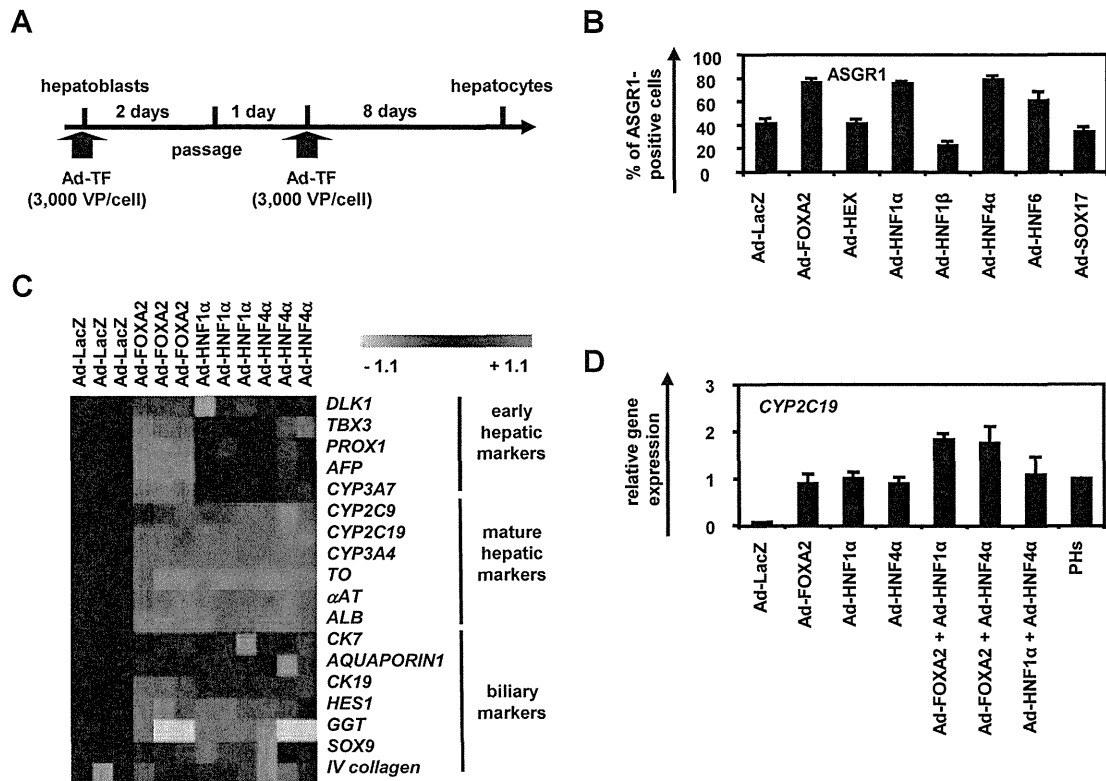


Figure 2 Efficient hepatic maturation from hESC-derived hepatoblasts by FOXA2 and HNF1 α transduction

(A) The schematic protocol describes the strategy for hepatic differentiation from hepatoblasts. The hESC-derived hepatoblasts (day 9) were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 hr and cultured as described in Figure 3A. (B) On day 20, the efficiency of hepatic differentiation was measured by estimating the percentage of ASGR1+ cells using FACS analysis. (C) The gene expression profiles were examined on day 20. (D) The hESC-derived hepatoblasts (day 9) were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-TFs (in the case of combination transduction of two types of Ad vector, 1,500 VP/cell of each Ad-TF was transduced.) for 1.5 hr and cultured. The 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 primary human hepatocytes (PHs), which were cultured for 48 hr after the cells were plated, was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

Figure 3

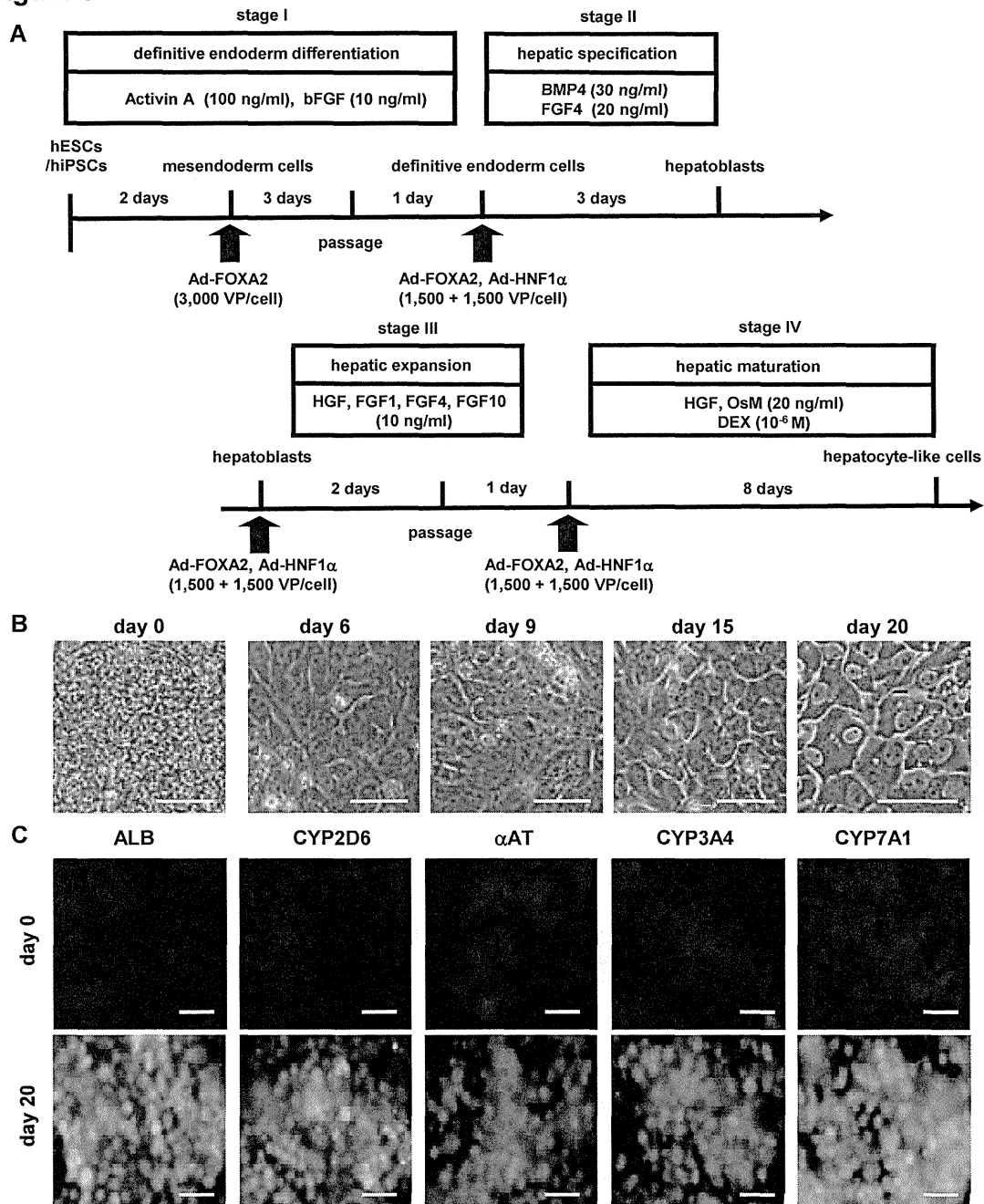


Figure 3 Hepatic differentiation of hESCs and hiPSCs by FOXA2 and HNF1 α transduction

(A) The procedure for differentiation of hESCs and hiPSCs into hepatocyte-like cells via definitive endoderm cells and hepatoblasts is presented schematically. Details of the hepatic differentiation procedure are described in the Materials and Methods section. (B) Sequential morphological changes (day 0-20) of hESCs (H9) differentiated into hepatocytes are shown. (C) The expression of the hepatocyte markers (ALB, CYP2D6, α AT, CYP3A4, and CYP7A1 [all green]) was examined by immunohistochemistry on day 0 and 20. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bars represent 50 μ m.

Figure 4

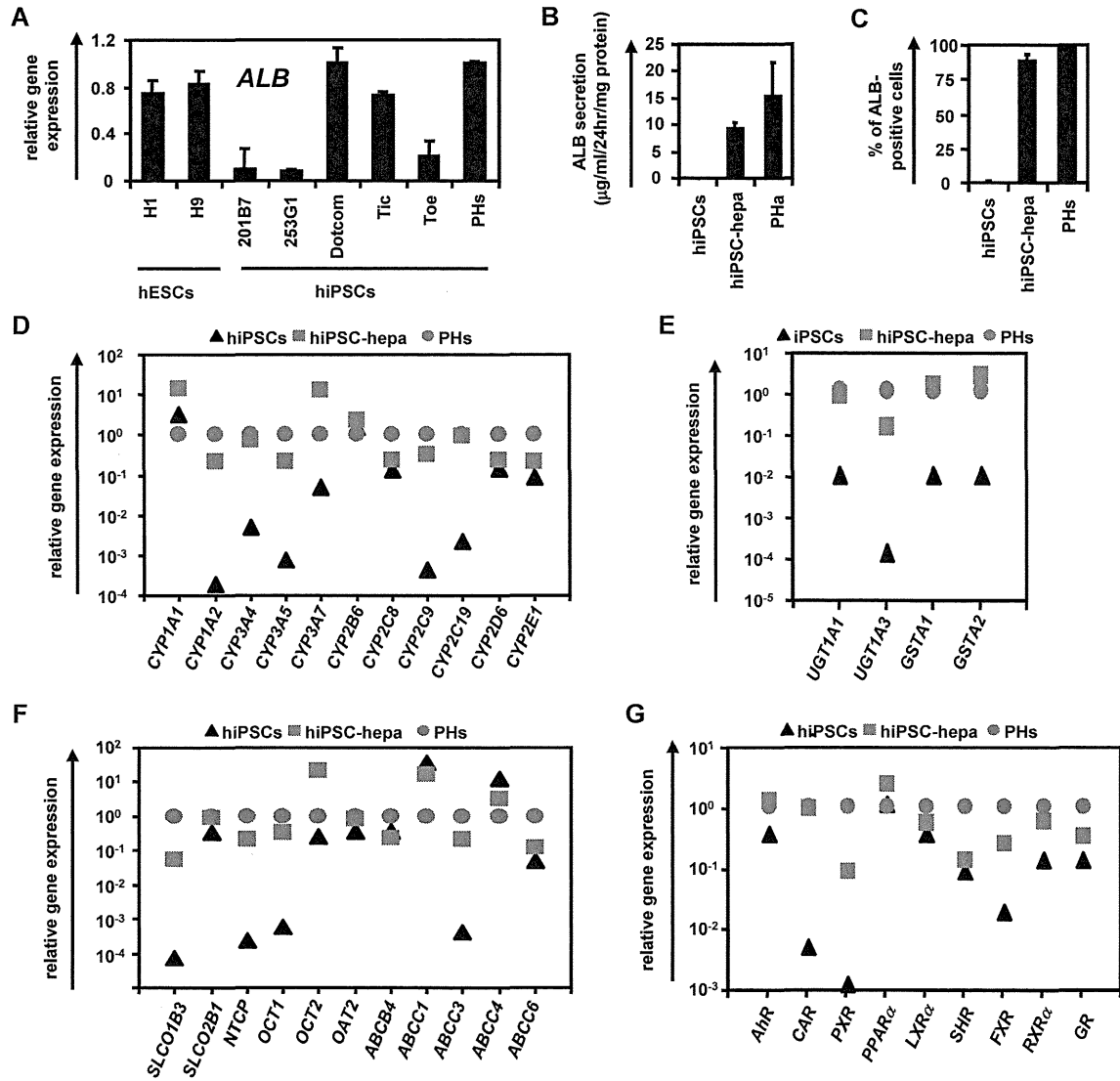


Figure 4 The hepatic characterization of hiPSC-hepa

hESCs (H1 and H9) and hiPSCs (201B7, 253G1, Dotcom, Tic, and Toe) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Figure 3A. **(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 hr after the cells were plated, was taken as 1.0. **(B-I)** hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Figure 3A. **(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. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

Figure 5

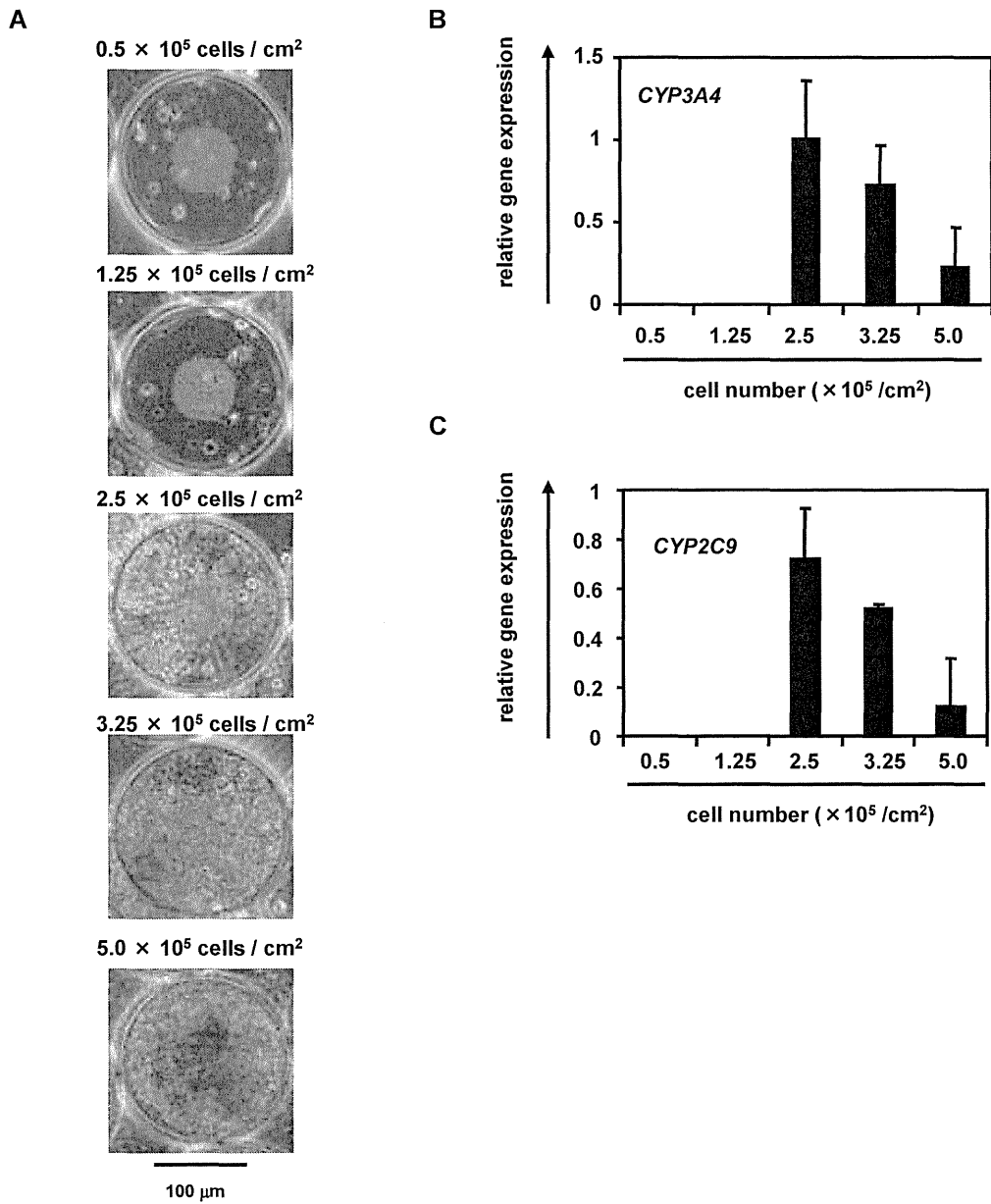


Figure 5 Optimal cell density for the formation of the hepatocyte-like cell spheroids

On day 11, the human ES cell (H9)-derived cells were plated onto the Nanopillar Plate at the indicated cell density. (A) Phase-contrast micrographs of the 3D ES-hepa on day 35 are shown. To form the 3D ES-hepa, the cell density should be more than 2.5 × 10⁵ cells/cm². Scale bar represents 100 μm. (B, C) Gene expression levels of *CYP3A4* (B) and *CYP2C9* (C) in the 3D ES-hepa were measured by real-time RT-PCR on day 35. On the y axis, the gene expression levels in PHs-48hr were taken as 1.0. The gene expression levels of *CYP3A4* and *CYP2C9* were the highest when the cells were plated onto the Nanopillar Plate at 2.5 × 10⁵ cells/cm².