

Fig. 3. Stratification of Swiss 3T3 cell sheet on hiPHs promotes hepatic maturation. Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) (Tic and 201B7) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 1A. (A–F): On day 25, the gene expression levels of *ALB* (A), *CYP2C9* (B), *CYP3A5*(C), *CYP1A2* (D), *GSTA1* (E), and *CK7* (F) were examined in monolayer hiPSC-derived hepatocyte-like cells (hiPHs-mono) and hiPSC-derived hepatocyte-like cells stratified with Swiss 3T3 cell sheet (hiPHs-Swiss) by real-time RT-PCR. The values were graphed as the fold-changes relative to hiPHs-mono differentiated from Tic. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

attempted to employ a cell sheet engineering technology to further induce maturation of the hEHs and hiPHs.

We observed a significant increase in the expression of hepatocyte-related genes in the hEHs- and hiPHs-Swiss as compared with those in the hEHs- and hiPHs-mono, respectively (Figs. 2 and 3), indicating that 3D co-culture with the Swiss 3T3 cell sheet was effective to promote hepatic maturation of the hEHs and hiPHs. On the other hand, Han et al. have recently shown that hESC-derived DE cells cannot be promoted to differentiate into hepatoblasts by co-culture of mouse fibroblast 3T3 cells [38]. Considering that primary rat hepatocytes are also able to grow and retain their functions for a long period of time in the presence of Swiss 3T3 cells [19,20], Swiss 3T3 cells would probably have the capacity to support the functions of freshly isolated mature hepatocytes and hESC- or hiPSC-derived hepatocyte-like cells, but not DE cells. Besides Swiss 3T3 cells, we attempted to maturate the hEHs using

3D co-culture with the bovine carotid artery endothelial cell sheet, because Kim et al. recently succeeded in creating a functional hepatocyte culture system by stacking bovine carotid artery endothelial cell sheets on primary rat hepatocytes [25]. However, our preliminary data showed that Swiss 3T3 cell sheets were superior to the bovine carotid artery endothelial cell sheets in terms of hepatic maturation of hEHs (data not shown). Thus, we conducted the present experiments to facilitate hepatic differentiation of human pluripotent stem cells using Swiss 3T3 cell sheets.

Interestingly, we found a difference in hepatic differentiation efficiency among hiPSC lines (Fig. 3). This might have been due to epigenetic memory of the hiPSC line, because several studies showed that the epigenetic memory of iPSCs affected the differentiation capacity [39,40]. Kleger et al. showed that iPSCs generated from mouse liver progenitor cells, could be more effectively differentiated into hepatocyte-like cells in comparison with iPSCs

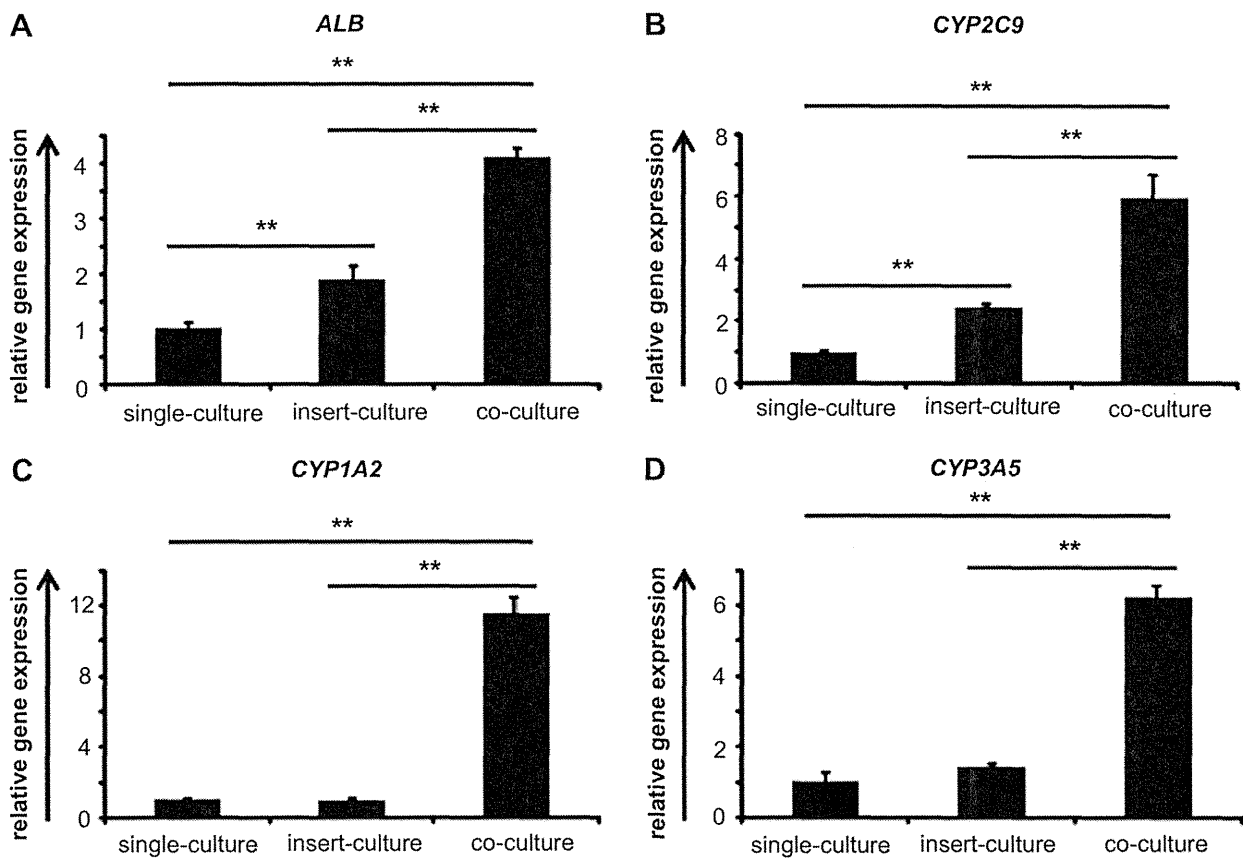


Fig. 4. Physical contacts between hESC-derived hepatocyte-like cells and Swiss 3T3 cells promote hepatic maturation. hESCs (H9) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 1A until day 14, and then the cells were differentiated into hepatocyte-like cells by single-culture, insert-culture, or co-culture with Swiss 3T3 cells. (A–D): On day 25, the gene expression levels of ALB (A), CYP2C9 (B), CYP1A2 (C) and CYP3A5 (D) were examined in hESC-derived hepatocyte-like cells (hEHs) differentiated by single-culture, insert-culture, or co-culture with Swiss 3T3 cells by real-time RT-PCR. The values were graphed as the fold-changes relative to hEHs by single-culture. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$). ** $P < 0.01$.

generated from mouse embryo fibroblasts [41]. Thus, to more efficiently differentiate into hepatocyte-like cells from hiPSCs, it might be valuable to employ hiPSCs generated from freshly isolated human hepatocytes. Moreover, by using our 3D co-culture system, such hiPSCs would be differentiated into more mature hepatocyte-like cells.

We investigated the Swiss 3T3 cell-derived hepatic maturation factors by using cell culture inserts, and found that the physical contacts between Swiss 3T3 cells and the hEHs were the major factors contributing to the hepatic maturation of hEHs (Fig. 4). Because Swiss 3T3 cell-derived soluble factors partially induce maturation of hEHs (Fig. 4A and B), it would also be interesting to search for hepatic maturation factors secreted from Swiss 3T3 cells.

To further investigate the maturation factors, we examined whether type I collagen, which is abundantly synthesized by Swiss 3T3 cells, could promote hepatic maturation. Stratification of type I collagen gel could lead to a promotion of hepatic maturation of hEHs-mono as well as hEHs-Swiss (Fig. 5A). We also found that hepatic maturation by 3D co-culture with the Swiss 3T3 cell sheet was suppressed by inhibition of collagen synthesis (Fig. 5D). Taken together, these results show that type I collagen is one of the key molecules in promotion of hepatic maturation by stratification of Swiss 3T3 cells. It is known that the space of Disse, which faces hepatocytes directly, contains various kinds of ECM proteins, including type I collagen [42]. Because the conditions in 3D co-culture, which contains type I collagen synthesized from Swiss 3T3 cells, can mimic the *in vivo* liver microstructure, including the space of Disse, the hepatic maturation from hEHs and hiPHs might

be efficiently promoted. Furthermore, it was also reported that, by the stratification of type I collagen gel in primary rat hepatocyte culture, the cytoskeletal organizations, such as actin localization, in primary rat hepatocytes were changed and stress fibers were obliterated just as in the *in vivo* state [43]. They also showed that the stratification of type I collagen gel in primary rat hepatocyte culture maintained ALB secretion in primary rat hepatocyte. Thus, the alteration of the cytoskeletal organization might also be changed in the hEHs and hiPHs by 3D co-culture with the Swiss 3T3 cell sheet. For these reasons, it could be speculated that stratification of Swiss 3T3 cell sheets positively affects the maturation process of hEHs and hiPHs mediated by cell-to-cell and cell-type I collagen–cell interactions. The expression level of the CK7 gene in the hEHs was down-regulated by stratification of the Swiss 3T3 cell sheet or type I collagen gel (Figs. 2C and 5B). Although Matrigel, which contains large amount of type IV collagen, is widely used to differentiate hESCs and hiPSCs into hepatocyte-like cells, it is reported that type IV collagen promotes cholangiocyte differentiation [44]. Therefore, it would be important to note that stratification of Swiss 3T3 cell sheet inhibits the cholangiocyte differentiation and thereby allows the cells to drive the way to hepatic differentiation. Although we showed that a Swiss 3T3 cell-derived type I collagen plays an important role in hepatic maturation, it was likely that the other soluble factors would also be involved in the promotion of hepatic maturation.

We employed Swiss 3T3 cells for 3D co-culture with the hEHs and hiPHs. However, it would be an attractive study to employ other kinds of cells such as liver sinusoidal endothelial cells, stellate

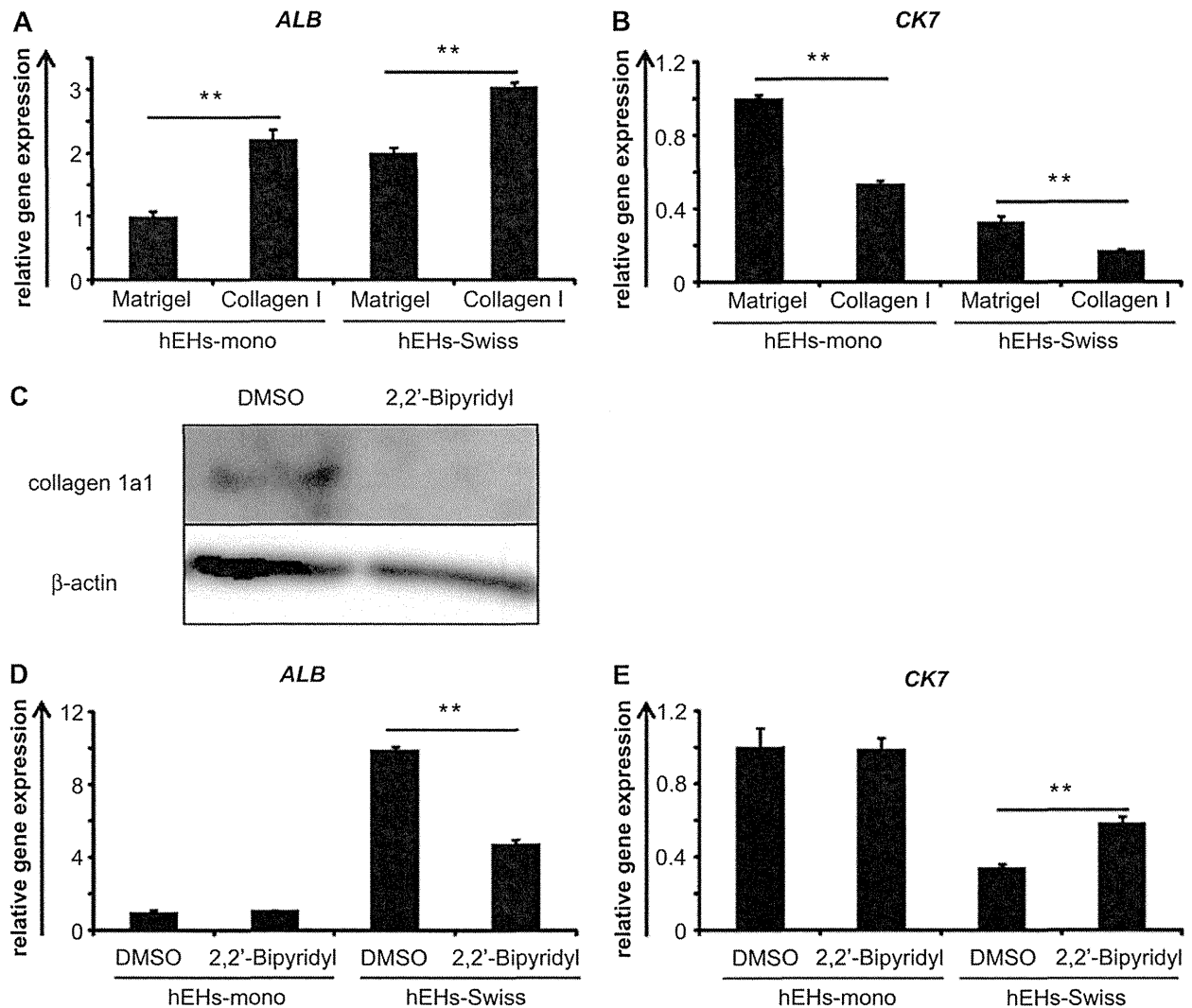


Fig. 5. Stratification of type I collagen gel promotes hepatic maturation. (A and B) hESCs (H9) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 1A until day 14, and then type I collagen gel (collagen I) or Matrigel are stratified on monolayer hESC-derived hepatocyte-like cells (hEHs-mono) and hESC-derived hepatocyte-like cells stratified with Swiss 3T3 cell sheet (hEHs-Swiss). On day 25, the gene expression levels of *ALB* (A) and *CK7* (B) were examined in hEHs-mono and hEHs-Swiss cultured with Matrigel or type I collagen gel by real-time RT-PCR. (C) Swiss 3T3 cells were cultured with 2,2'-Bipyridyl or solvent (0.1% DMSO) for 3 days, and then the expression of type I collagen precursor, *col1a1*, in these cells were detected by Western blot analysis. (D and E) hESCs (H9) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 1A. After stratification of Swiss 3T3 cells on day 14, these cells were treated with 2,2'-Bipyridyl or solvent (0.1% DMSO). On day 25, the gene expression levels of *ALB* (D) and *CK7* (E) were examined in hEHs-mono and hEHs-Swiss treated with 2,2'-Bipyridyl or solvent (0.1% DMSO) by real-time RT-PCR. The values were graphed as the fold-changes relative to hEHs-mono cultured with Matrigel. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$). $**P < 0.01$.

cells, and Kupffer cells, to mimic the *in vivo* liver microstructure. By mimicking the *in vivo* liver microstructure, basic molecular mechanisms, including cell–cell interactions, in liver development would be clarified. Moreover, because our cell sheet technology allows us to stratify the multiple cell sheets and create layered 3D tissue constructs, combinations with multiple layers consisting of various types of cells might be able to develop an efficient method for hepatic maturation of the hEHs and hiPHs. In addition, by using new biomaterials with cell patterning techniques, more mature hepatocyte-like cells would be probably generated from human pluripotent stem cells, and thereby accelerate the research into tissue generation.

5. Conclusions

We succeeded in promoting the hepatic maturation of both the hEHs and hiPHs by stratification of the Swiss 3T3 cell sheet using

a cell sheet engineering technology. We also determined that type I collagen, which is synthesized in Swiss 3T3 cells, plays an important role in hepatic maturation. Since our cell sheet engineering technology enables us to stratify multiple cell sheets, this technology would have the potential to mimic the *in vivo* liver microstructure and to generate hepatocyte-like cells, which have functions similar to primary hepatocytes. Our methods would be powerful tools for *in vitro* applications, such as drug toxicity screening in the early phase of pharmaceutical development.

Acknowledgements

We thank Misae Nishijima, Miki Yoshioka, Nobue Hirata, and Hiroko Matsumura for their excellent technical support. We also thank Tetsutaro Kikuchi (Cell Seed Inc) for providing a cell sheet stamp manipulator system. HM, KK, MKF, and TH were supported by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan

(MEXT). HM was also supported by Japan Research foundation For Clinical Pharmacology and The Uehara Memorial Foundation. KO was supported by Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology from MEXT. FS was supported by Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.011.

References

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–72.
- Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 2007;25:3058–68.
- Touboul T, Hannan NR, Corbinau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology* 2010;51:1754–65.
- Brolen G, Sivertsson L, Bjorquist P, Eriksson G, Ek M, Semb H, et al. Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 2010;145:284–94.
- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007;45:1229–39.
- 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* 2009;27:577–605.
- Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001;492:90–4.
- Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 2010;18:175–89.
- Duan Y, Ma X, Zou W, Wang C, Bahbah IS, Ahuja TP, et al. Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010;28:674–86.
- Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, et al. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 2011;19:400–7.
- Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, et al. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. *Mol Ther* 2012;20:127–37.
- Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, et al. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One* 2011;6:e21780.
- Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:83–8.
- Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001;294:559–63.
- Kinoshita T, Sekiguchi T, Xu MJ, Ito Y, Kamiya A, Tsuji K, et al. Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7265–70.
- Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 2007;13:880–5.
- Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, Ohnishi C, Katayama S, Kohashi T, et al. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. *J Hepatol* 2006;44:749–57.
- Sato H, Funahashi M, Kristensen DB, Tateno C, Yoshizato K. Pleiotrophin as a Swiss 3T3 cell-derived potent mitogen for adult rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1999;246:152–64.
- Hui EE, Bhatia SN. Micromechanical control of cell-cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5722–6.
- Khetani SR, Szulgit G, Del Rio JA, Barlow C, Bhatia SN. Exploring interactions between rat hepatocytes and nonparenchymal cells using gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40:545–54.
- Abu-Absi SF, Hansen LK, Hu WS. Three-dimensional co-culture of hepatocytes and stellate cells. *Cytotechnology* 2004;45:125–40.
- Gu J, Shi X, Zhang Y, Chu X, Hang H, Ding Y. Establishment of a three-dimensional co-culture system by porcine hepatocytes and bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Hepato Res* 2009;39:398–407.
- Thomas RJ, Bhandari R, Barrett DA, Bennett AJ, Fry JR, Powe D, et al. The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs* 2005;181:67–79.
- Kim K, Ohashi K, Utoh R, Kano K, Okano T. Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials* 2012;33:1406–13.
- Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A, et al. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 2002;62:464–70.
- Yu YD, Kim KH, Lee SG, Choi SY, Kim YC, Byun KS, et al. Hepatic differentiation from human embryonic stem cells using stromal cells. *J Surg Res* 2011;170:e253–61.
- Tuleuova N, Lee JY, Lee J, Ramanculov E, Zern MA, Revzin A. Using growth factor arrays and micropatterned co-cultures to induce hepatic differentiation of embryonic stem cells. *Biomaterials* 2010;31:9221–31.
- Miki T, Ring A, Gerlach J. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:557–68.
- Kawabata K, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther* 2005;12:547–54.
- Maizel Jr JV, White DO, Scharff MD. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 1968;36:115–25.
- Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, et al. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13409–14.
- Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, Haraguchi Y, Yamato M, Sawa Y, et al. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials* 2010;31:1646–54.
- Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:582–90.
- Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology* 2005;41:956–67.
- Suzuki A. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003;130:2513–24.
- Goldberg B. Collagen synthesis as a marker for cell type in mouse 3T3 lines. *Cell* 1977;11:169–72.
- Han S, Dziedzic N, Gadue P, Keller GM, Gouon-Evans V. An endothelial cell niche induces hepatic specification through Dual Repression of Wnt and Notch signaling. *Stem Cells* 2011;29:217–28.
- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010;467:285–90.
- Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010;28:848–55.
- Kleger A, Mahaddalkar P, Katz SF, Lechel A, Ju JY, Loya K, et al. Increased Reprogramming capacity of mouse liver progenitor cells, compared with differentiated liver cells, Requires BAF Complex. *Gastroenterology*, in press.
- Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 1984;51:57–74.
- Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 1991;7:237–45.
- Tanimizu N, Saito H, Mostov K, Miyajima A. Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk+ hepatoblasts. *J Cell Sci* 2004;117:6425–34.

総 説

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用

水口 裕之^{*1, 2, 3}, 高山 和雄^{*1}, 長基 康人^{*1}, 川端 健二^{*3}

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス

Vol. 43, No. 11 別刷 (2012 年)

一般財団法人 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用

水口 裕之^{*1, 2, 3}, 高山 和雄^{*1}, 長基 康人^{*1}, 川端 健二^{*3}

Current Status of Hepatic Differentiation from Human iPS cells and Application for Drug Development

Hiroyuki MIZUGUCHI^{*1, 2, 3}, Kazuo TAKAYAMA^{*1}, Yasuhito NAGAMOTO^{*1}, Kenji KAWABATA^{*3}

1. はじめに

創薬のプロセスは、一般的に開発費に 1000 億円超、1 つの医薬品が製品化されるまでに 10~15 年を要する。その過程で数万~100 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、開発成功率を向上させるための新しい技術のひとつとして、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) 技術に注目が集まっている。

ヒト iPS 細胞から分化させた細胞 (特に、肝臓、心筋、神経細胞等) 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・薬物動態試験等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 (ヒト) 初代培養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) を必ずしも反映しておらず、一方で、ヒト初代培養細胞は入手が

限られ、ロット差も大きいこと、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。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。ヒト iPS 細胞由来分化誘導細胞は、これらの問題点の克服が期待できることから、大きな注目を集めている。

本稿では、産業界からのニーズが特に高い肝細胞に焦点をあて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用 (特に毒性評価) への可能性について、著者らの最新の知見を中心に概説する。

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、排出等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える高い潜在的毒

*¹大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 大阪府吹田市山田丘 1-6 (〒565-0871)

Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan.

*²大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 大阪府吹田市山田丘 2-2 (〒565-0871)

The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan.

*³独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8 (〒567-0085)

Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8, Asagi, Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan.

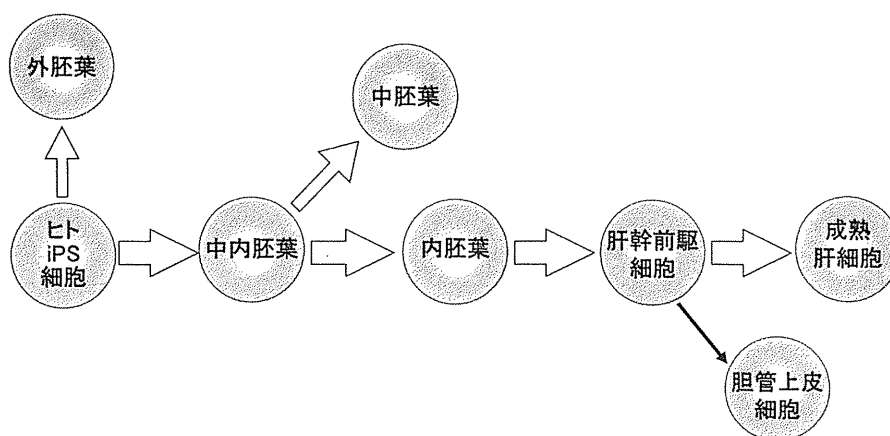


Fig.1 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞は中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞を経由して成熟した肝細胞へと分化する。

性発現を研究開発の初期段階に予測できれば、より安全性の高い医薬品を効率良く開発することにつながると考えられる。現在は、主にヒト初代培養（凍結）肝細胞（本稿では、ヒト凍結肝細胞も含めてヒト初代培養肝細胞と記載する）や肝ミクロソームを用いて、薬剤あるいは薬剤の代謝過程で生成する反応性代謝物による細胞傷害性等を試験する毒性試験や、薬物代謝酵素の誘導や阻害等の薬物動態評価試験が施行されている。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞は高価であり、高機能なヒト肝細胞ロットの安定供給が難しいといった問題等から、ヒト 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、薬物代謝酵素の活性は個人差が大きいたことが知られているが（薬物代謝酵素の種類によるが、数十倍～千倍程度）、将来的には、様々な個人由来のヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いることで、個人差を反映した評価系が開発できる可能性もある。

3. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

3.1 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は、先行して進められてきたヒト ES 細胞 (embryonic stem cells) から肝細胞への分化誘導を応用して進められてきており、両者は共通の方法を用いて分化誘導できる。そこで本稿では、両者を区別することなく、紹介する。

ヒト iPS 細胞は中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞を経由して成熟した肝細胞へと分化する (Fig. 1)。一般に、外胚葉由来の神経細胞や、中胚葉由来の心筋細胞への分化誘導に比べ、内胚葉に属する肝細胞や膵臓細胞への分化誘導は研究が遅れていた (Fig. 2)。しかしながら、

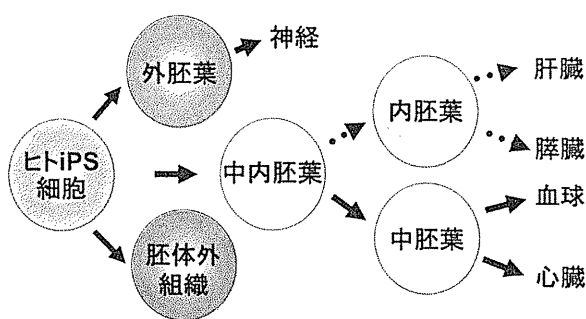


Fig.2 ヒト iPS 細胞から各胚葉への分化

神経細胞は外胚葉を、心筋細胞は中胚葉を、肝細胞や膵臓細胞は内胚葉を経由して分化する。

2005年にD'Amourらによって、アクチビンAが内胚葉を分化誘導できることが発見されて以来¹⁾、急速に研究が進展している。これまでに、ヒト iPS 細胞から肝細胞への様々な分化誘導法が開発されているが（前述のように、ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導法も含める）、未分化ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程を、以下の3ステップあるいは4ステップに分けて分化誘導する方法が一般的である。即ち、(1)未分化 iPS 細胞から内胚葉への分化ステップ（内胚葉分化）、(2)内胚葉から肝幹前駆細胞への分化ステップ（肝特異化）、(3)肝幹前駆細胞から肝細胞への分化ステップ（肝成熟化）〔あるいは肝幹前駆細胞から肝細胞への分化ステップを、(3)肝（幹前駆）細胞の増幅と(4)肝細胞の成熟化のステップに分ける〕に分け、個々の分化ステージで、発生段階を模倣したように、分化に必要な増殖因子やサイトカイン等を付加して分化させることが試みられている（詳細は代表的な総説^{2,3)}を参照）。

(1)の内胚葉への分化ステップでは、アクチビンAの

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 などを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⁴⁾。

(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る。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

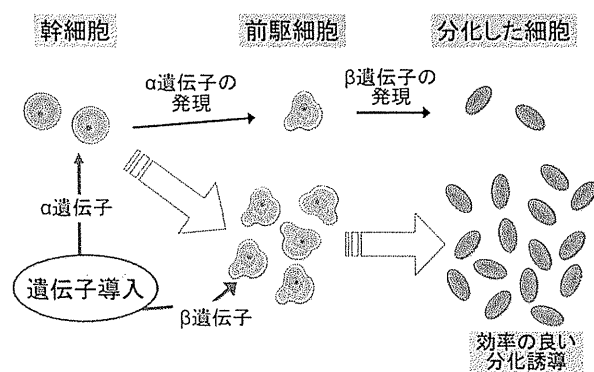


Fig. 3 機能遺伝子の導入による分化誘導効率の向上

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と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、アジ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を調べたところ、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

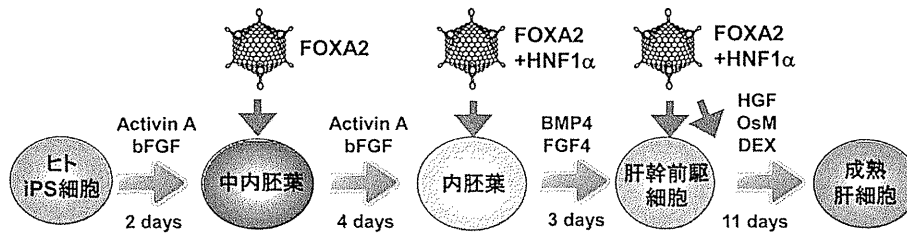


Fig. 4 液性因子と転写因子の導入を組み合わせることによるヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導

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³⁾。

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³⁾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

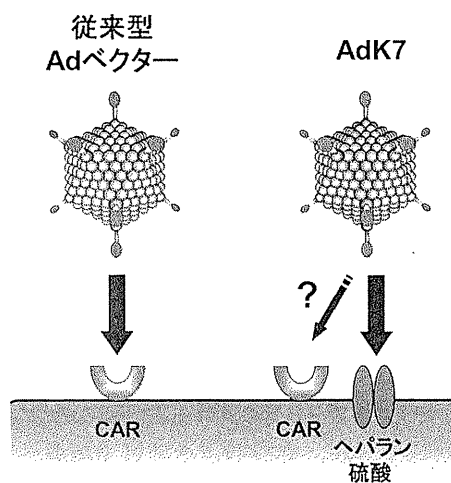


Fig.5 改良型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性
従来のアデノウイルス(Ad)ベクターはCAR(coxsackievirus adenovirus receptor)を認識して感染する。ポリリジン配列をファイバータンパク質のC末端領域に遺伝子工学的に付与したアデノウイルスベクター(AdK7)は、多くの細胞で発現しているヘパラン硫酸を認識して感染できるため、CAR陰性の細胞を含む多くの細胞への高効率な遺伝子導入が可能となる。

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・先端生命医科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, 15)}。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 週間にも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., Eliazar 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., Urruticoechea-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 M.K., 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 M.K., 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 M.K., 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 M.K., 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 M.K., 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, 390-339 (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).



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な問題が少なく, 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科 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

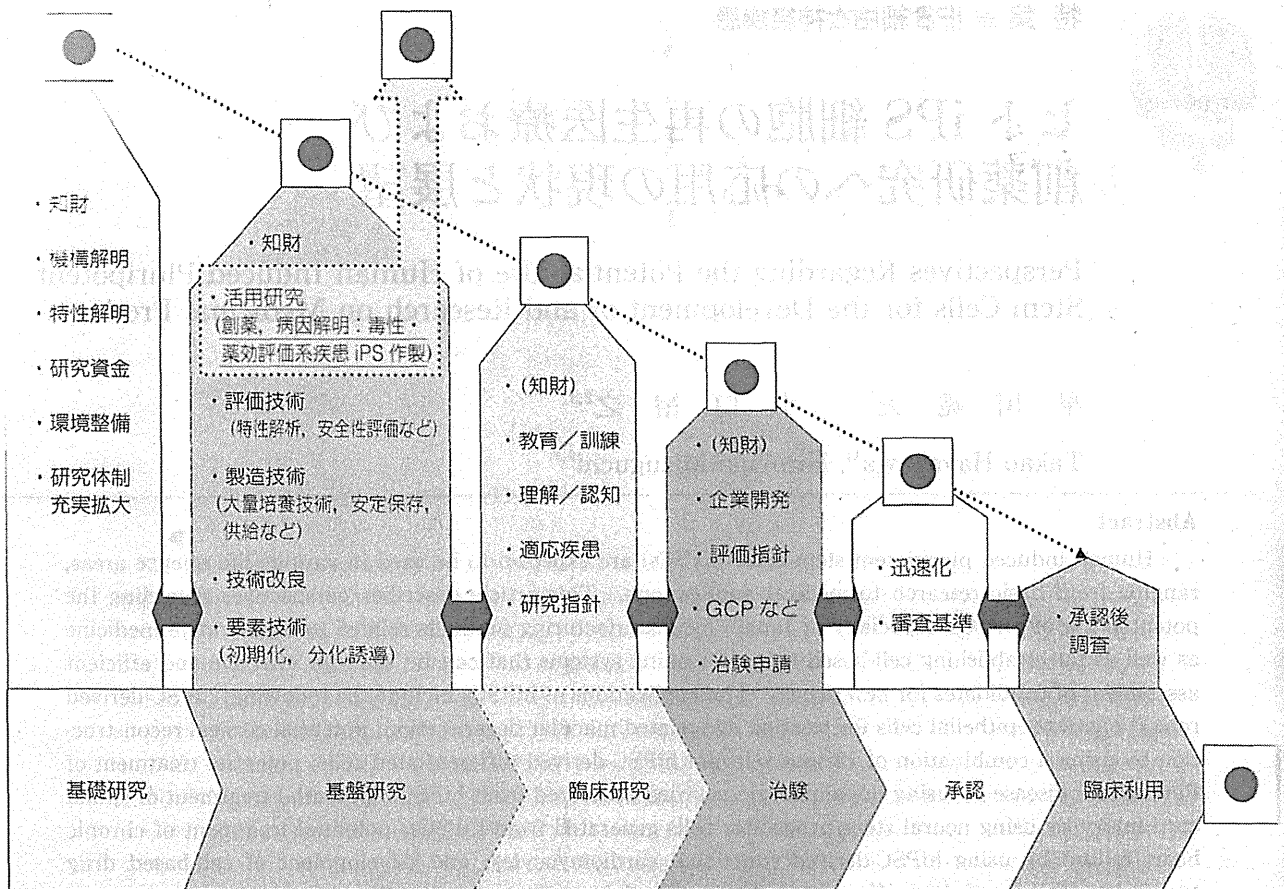


Fig. 1 ヒト iPS 細胞の再生医療, 創薬研究への応用に必要な段階と要素

- 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

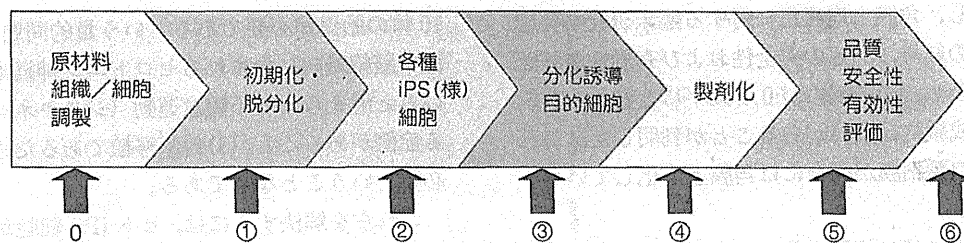


Fig. 2 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の製造, 評価のポイント

- 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
- ④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よる。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 (貪食機能) 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-

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約 10 万眼/年)。また, 重篤な角膜疾患では拒絶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パミンの合成にあたるド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パミン神経細胞の存在であるが、薬物療法においてもド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 細胞からもドパミン神経細胞を誘導し、サルモデル脳にド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。この選別されたドパミン神経前駆細胞は以下の性質を持つ：(1) 高率にド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) ドパミン神経前駆細胞を選別し、(4) 選別したド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、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,おおよそ医薬発第 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,健康人由来の 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,健康人由来の 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. 健康人由来の iPS 細胞を用いた創薬研究

健康ヒト 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口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

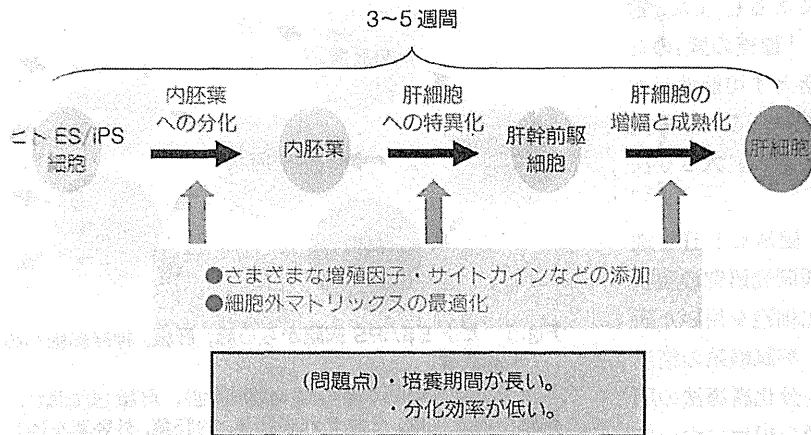


Fig. 4 ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への代表的な分化誘導法
ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は、内胚葉、肝幹前駆細胞を通して起こる。これらの各段階で、さまざまな増殖因子やサイトカインなどの添加、および細胞外マトリックスの最適化がなされる。しかしながら、培養期間が長いこと、分化効率が低いことが課題となっている。

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経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

を評価を行うことや、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、これまでに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ヵ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 (液性因子)
Nat Cell Biol	2000	2/879-887	Shen CN (Tosh D)	mouse	pancreas	liver	glucocorticoid, dexamethasone
Cell	2004	117/663-676	Xie H (Graf T)	mouse	B cell	macrophage	C/EBP γ , γ
Nature	2008	455/627-632	Shou Q (Melton DA)	mouse	pancreas	<i>7</i> -cell	Ngn3, Pdx1, Maf
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 (Bhatta 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 (Parmer M)	human	fibroblast	dopamin 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	476/324-327	Caiazzo M (Dell'Anno MT)	mouse/human	fibroblast	neuron progenitor	Ascl1, Nurrl, Lmx1a
Nature	2011	475/386-389	Huang P (Hui L)	mouse	fibroblast	hepatocyte	Gata4, Hnf1a, Foxa3, inactivation of p19
Nature	2011	475/396-399	Sekiya S (Suzuki A)	mouse	fibroblast	hepatocyte	HNF4a, Foxa1 or 2 or 3
Nature	2011	476/228-231	Yeo AS (Crabtree GR)	human	fibroblast	neuron	miR-9/9*, miR-124 (a process facilitated by NEUROD2)
PNAS	2011	6/421-424	Lee ST (Koh JK)	human	fibroblast	Neuroshere	Neural stem cell line-derived cellular extract
Cell Stem Cell	2011	9/113-118	Ambrogini R (Ding S)	human	fibroblast	neuron	miR-124, Brn2, Myt1l
Cell Stem Cell	2011	9/206-211	Lee JY (Hwang K)	mouse/human	fibroblast	neuron	Hb9, Isl1, Lhx3, Ascl1, Brn2, Myt1l
Cell Stem Cell	2011	9/1-9	Marino S (Wernig M)	mouse	hepatocyte	neuron	Brn2, Ascl1, Myt1l