

3. Aspirate the supernatant, resuspend the cells in 10 ml of cold HCM and centrifuge them at $267 \times g$ for 3 min at 4°C .
4. Aspirate the supernatant, and replace with warm fresh HCM supplemented with SingleQuots, 10 ng/ml FGF-4, 10 ng/ml HGF, 10 ng/ml, and 10^{-7} M dexamethasone.
5. Transfer into two wells of a type I collagen-coated tissue culture 12-well plate and incubate the cells in a humidified atmosphere of 10% CO_2 and 90% air at 37°C . The final volume of medium should be 1.0 ml per well (see Note 5).
6. Change the medium every 2 days.
7. After 9 days of culture in HCM, analyze the cells by RT-PCR and measure the cytochrome P450 activity (see Notes 9 and 11) (Fig. 3).

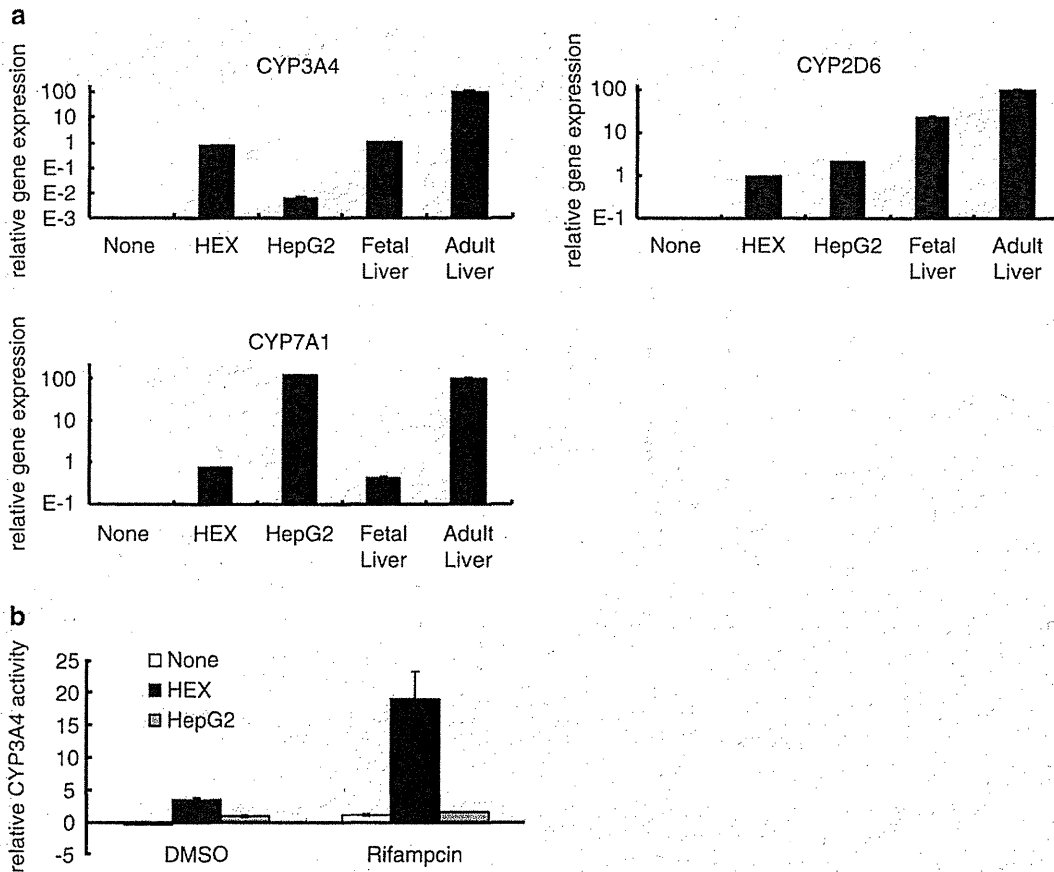


Fig. 3. Cytochrome P450 isozymes in human iPS cell-derived hepatocytes. (a) Real-time RT-PCR analysis of CYP3A4, CYP7A1, and CYP2D6 expression in human iPS cell-derived nontransduced cells (day 18), Ad-HEX-transduced cells (day 18), and fetal and adult liver tissues. (b) Induction of CYP3A4 by rifampicin in human iPS cell-derived nontransduced cells, Ad-HEX-transduced cells, and the HepG2 cell line. Data are presented as the mean \pm SD from triplicate experiments. The graphs represent the relative gene expression level when the level in the adult liver is taken as 100. Abbreviations: *NONE* nontransduced cells, *LacZ* Ad-LacZ-transduced cells, *HEX* Ad-HEX-transduced cells, *DMSO* dimethyl sulfoxide.

4. Notes

1. Culture human iPS cells to maintain the undifferentiated states according to the original protocol (16, 17). Basically, human ES cells can be cultured, handled, and differentiated using the same protocol as human iPS cells described here.
2. Proceed to step 3 within 48 h. Attachment efficiency will be reduced if passage is performed after more than 48 h of culture in hESF9 medium.
3. By this operation, the feeder cells are removed and only the human iPS cells remain in the flask.
4. Determine the number of cells using a hemocytometer and adjust the concentration precisely. An excessive number of cells per well results in the presence of undifferentiated cells after 5 days of culture with differentiation medium. Also, strain the cell suspension with a cell strainer to obtain a uniform single cell suspension, since cell clusters will result in the appearance of undifferentiated cells after 5 days of culture with differentiation medium.
5. Be sure to gently shake the plate left to right and back to front to obtain evenly distributed cells.
6. A low concentration of trypsin-EDTA can reduce cell damage by passage and promote cell survival. Detach the cells by brushing the medium on the cells.
7. Vortex the 1.5-ml tube supplemented with Ad-HEX.
8. Proceed to Subheading 3.4. for induction of hepatocytes after 3 days of culture in differentiation medium B.
9. Total RNA was isolated from human iPS cells, their derivatives, and HepG2 cells using an RNeasy Plus Mini kit. cDNA was synthesized using 500 ng of total RNA with a Superscript VILO cDNA synthesis kit. Real-time PCR was performed with Taqman gene expression assays using an ABI PRISM 7700 Sequence Detector. Relative quantification was performed against a standard curve, and the values were normalized against the input determined for the housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The primer sequences used in these methods are described in Table 1.
10. Do not dissociate the cell clusters into single cells. Passage the cells as the cell clumps.
11. To measure cytochrome P450 3A4 activity, lytic assays was performed by using a P450-Glo™ CYP3A4 Assay Kit. For the cytochrome P450 3A4 activity assay, Ad-HEX-transduced cells and nontransduced cells as well as HepG2 cells were

treated with rifampicin, which is the substrate for CYP3A4, at a final concentration of 25 μM or DMSO for 72 h. The fluorescence was measured with a luminometer according to the manufacturer's instructions. HepG2 cells were cultured as per the instructions.

Acknowledgment

This study was supported by grants from the Ministry of Education, Sports, Science and Technology of Japan and by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

1. Lavon, N. and Benvenisty, N. (2005) Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 96, 1193–1202.
2. McLin, V.A. and Zorn, A.M. (2006) Molecular control of liver development. *Clin Liver Dis* 10, 1–25.
3. Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2009) In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: State of the art. *Stem Cells* 27, 577–605.
4. Kyrmizi, I., Hatzis, P., Ktrakili, N., Tronche, F., Gonzalez, F.J., and Talianidis, I. (2006) Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 20, 2293–2305.
5. Hunter, M.P., Wilson, C.M., Jiang, X., Cong, R., Vasavada, H., Kaestner, K.H., and Bogue, C.W. (2007) The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis. *Dev Biol* 308, 355–367.
6. Bogue, C.W., Ganea, G.R., Sturm, E., Ianucci, R., and Jacobs, H.C. (2000) Hex expression suggests a role in the development and function of organs derived from foregut endoderm. *Dev Dyn* 219, 84–89.
7. Martinez Barbera, J.P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., and Beddington, R.S. (2000) The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 127, 2433–2445.
8. Keng, V.W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T., Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M., Sato, M., and Noguchi, T. (2000) Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 1155–1161.
9. Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera, J.P., and Zaret, K.S. (2006) Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 290, 44–56.
10. 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., Kusuda-Furue, M., and Mizuguchi, H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. in press.
11. Kawabata, K., Sakurai, F., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., and Mizuguchi, H. (2005) Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther* 12, 547–554.
12. Koizumi, N., Mizuguchi, H., Utoguchi, N., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. (2003) Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 5, 267–276.
13. Mizuguchi, H. and Kay, M.A. (1998) Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* 9, 2577–2583.
14. Mizuguchi, H. and Kay, M.A. (1999) A simple method for constructing E1- and E1/

- E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 10, 2013–2017.
15. Maizel JV, Jr., White DO, and Scharff M.D. (1968) The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36, 115–125.
 16. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
 17. Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, and Tada T. (2009) Efficient Reprogramming of Human and Mouse Primary Extra-Embryonic Cells to Pluripotent Stem Cells. *Genes Cells* 14, 1395–404.

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所分子生物学分野 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.

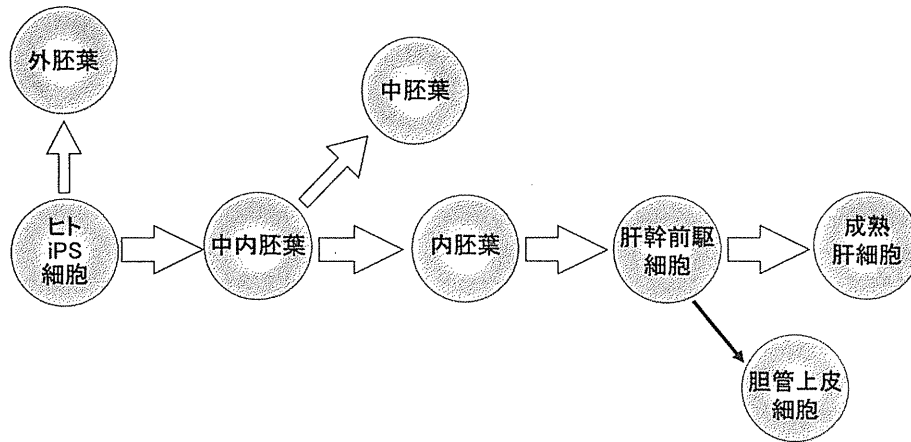


Fig.1 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

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、

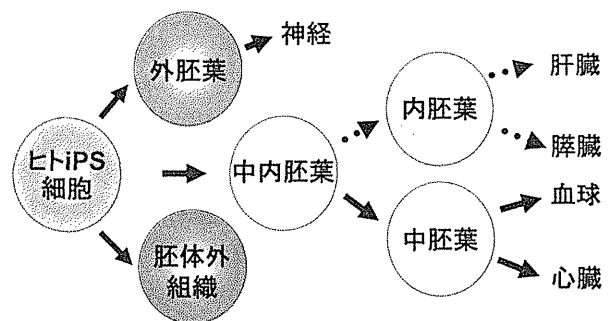


Fig.2 ヒト iPS 細胞から各胚葉への分化

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) シグナルが必要なが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り、特に血清の付加は現時点では有用である (ただし、血清のロットチェックは必須である)。

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

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

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

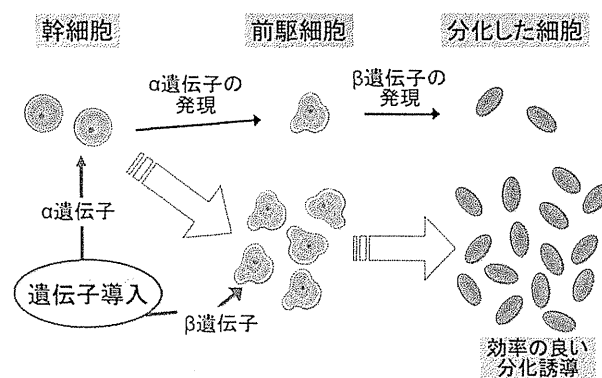


Fig. 3 機能遺伝子の導入による分化誘導効率の向上

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

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

当初は、未分化 iPS 細胞からアクチビン A 処理で分化させた中内胚葉に SOX17 (Sry-related HMG box 17) 遺伝子を、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化ステップでは HEX (hematopoietically expressed homeobox) 遺伝子を、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化ステップでは HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) 遺伝子を導入することで、高いアルブミン産生能や薬物代謝機能を有した肝細胞を効率よく分化誘導することに成功した^{5,7)}。更に最近では、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への各分化ステップにおいて 7 種類の肝関連転写因子 (FOXA2, SOX17, HEX, HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , HNF6) を導入し、最も効率良く肝分化を促進できる転写因子を探索した結果、FOXA2 (forkhead box protein A2) 及び HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 α) 遺伝子を組み合わせる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、アシアロ糖タンパク質受容体、LDL (low density lipoprotein) 取り込み能、インドシアニングリーン取り込み能、薬物代謝酵素 (シトクロム P450 3A4, CYP7A1, CYP2D6 等) 陽性であり、ヒト初代培養肝細胞に匹敵する薬物代謝酵素の遺伝子発現レベルを示した。また、シトクロム P450 酵素などで代謝される 9 種類の薬物の代謝プロファイル調べたところ、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の薬物代謝能はヒト初代培養肝細胞より低いものの (シトクロム P450 酵素の種類により異なるが、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞の 1 ~ 40%程度の活性)、いずれの薬物に対しても代謝能を有していることが確認された。各

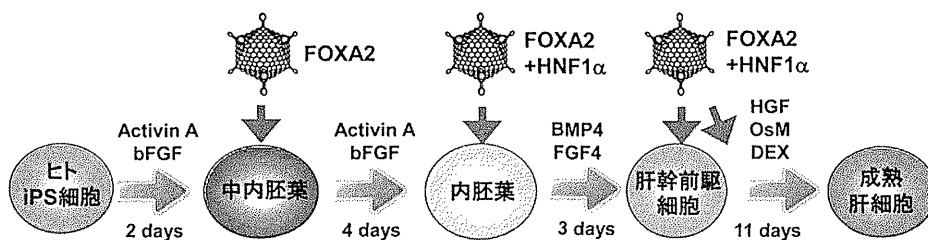


Fig.4 液性因子と転写因子の導入を組み合わせることによるヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導

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

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

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

なお、細胞分化の各ステップでの転写因子 (遺伝子)

の導入には、機能性に優れ、独自開発した改良型アデノウイルスベクターを用いた。iPS 細胞から肝細胞への分化のように、分化の各ステップが階層的に起こる場合には、各分化ステップでだけ導入遺伝子が機能するように (後の細胞分化に影響を与えないように)、遺伝子発現期間は一過性であること、そして効率よく細胞集団を分化させるためには、100%の遺伝子発現効率で遺伝子発現させることが必須となるが、改良型アデノウイルスベクターはこのような目的に唯一のベクターである。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⁵⁾。

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⁹⁾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

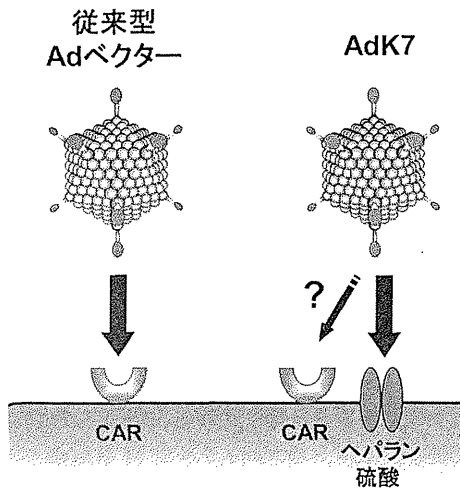


Fig.5 改良型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性

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タンパク質のC末端領域に遺伝子工学的に付与したアデノウイルスベクター(AdK7)は、多くの細胞で発現しているヘパラン硫酸を認識して感染できるため、CAR陰性の細胞を含む多くの細胞への高効率な遺伝子導入が可能となる。

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

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

る。

3.4 Direct-reprogramming による肝細胞への直接分化

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

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

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

4. おわりに

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

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

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

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

文 献

- 1) D'Amour K.A., Agulnick A.D., 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研究への応用, *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, 390-399 (2011).
- 13) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K.: Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 416, 119-124 (2011).
- 14) Schwartz R.E., Trehan K., Andrus L., Sheahan T.P., Ploss A., Duncan S.A., Rice C.M., Bhatia S.N.: Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2544-2548 (2012).
- 15) Wu X., Robotham J.M., Lee E., Dalton S., Kneteman N.M., Gilbert D.M., Tang H.: Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation. *PLoS Pathog.*, 8, e1002617 (2012).
- 16) Roelandt P., Obeid S., Paeshuyse J., Vanhove J., Lommel A.V., Nahmias Y., Nevens F., Neyts J., Verfaillie C.M.: Human pluripotent stem cell derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *J. Hepatol.*, 57, 246-251 (2012).

トピックス

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高山和雄^{*1*2} 川端健二^{**2} 水口裕之^{***2*3}

要旨

薬物誘発性肝障害は、医薬品候補化合物の開発中止や医薬品の市場撤退の主要な原因であり、医薬品開発研究の初期に肝毒性を精度高く予測することができれば、医薬品開発の効率化やコスト削減に繋がる。ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からヒト初代培養肝細胞に類似した機能を有した肝細胞を作製できれば、*in vitro* での毒性評価において、ヒト初代培養肝細胞の代替ソースとなりうる。本稿では、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術と、毒性評価系への応用に関する現状と課題について概説する。

はじめに

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（本稿では、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、スクリーニングすることが試みられている。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 ES/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。本稿では、これまでに検討されてきたヒト ES/iPS 細胞からの肝細胞分化誘導法とその課題について紹介するとともに、分化誘導肝細胞を薬物の毒性評価に応用する試みについても紹介する。

ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

1. 液性因子の作用による従来の肝分化誘導法

ヒト ES 細胞から肝細胞への最初の分化誘導の報告では、胚様体 (embryoid body: EB) を形成させた後、各種液性因子を作用させることで肝分化が試みられた¹⁾。しかしながら EB 形成法では細胞集団が不均一であり、分化がランダムに進行し、肝細胞への選択的な分化が制御できない。そこで効率よく肝細胞へ分化させるために、均一な分化誘導ができる平面培養で、生体内での肝発生・分化の環境を模倣してサイトカインや増殖因子などの各種液性因子を作用させることによって、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞へと段階的に分化させる肝分化誘導法が開発された (図1)²⁾。

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

*1 大阪大学大学院薬学研究所 分子生物学分野

**1 同 教授

**2 独立行政法人医薬基盤研究所
幹細胞制御プロジェクト

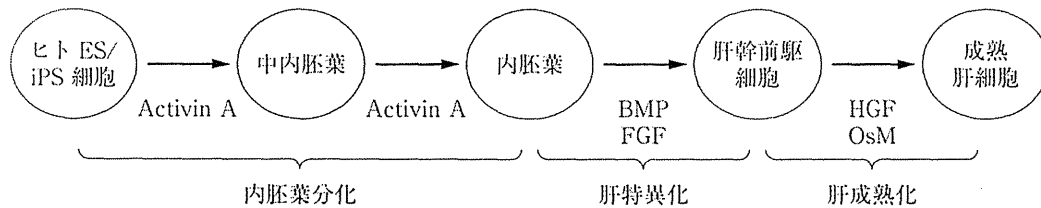
***2 同 プロジェクトリーダー

***2 同 チーフプロジェクトリーダー

*3 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 教授

キーワード: ヒト ES 細胞, ヒト iPS 細胞, 肝細胞,
毒性評価, 遺伝子導入

図1 ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化



ヒト ES/iPS 細胞は、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞を介して肝細胞へと分化する。ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化には Activin A が使用される。内胚葉から肝幹前駆細胞への分化には BMP および FGF が併用される。肝幹前駆細胞から肝細胞への分化には HGF および OsM などを使用される。

略語：巻末の「今月の略語」参照

トップでは、Activin A がほぼすべてのプロトコールで使われている³⁾。また、Wnt シグナルが内胚葉分化を促進するという報告もあるため、Activin A と Wnt を併用する内胚葉分化誘導法も報告されている⁴⁾。肝特異化の分化誘導ステップ（内胚葉から肝幹前駆細胞への分化：図1）では、肝発生を模倣するように、FGF と BMP を組み合わせる方法が広く用いられている⁵⁾。肝成熟化の分化誘導ステップ（肝幹前駆細胞から肝細胞への分化：図1）では、胎児肝細胞の増殖を支持する HGF⁶⁾ や、胎児肝細胞の肝成熟化を促進する Oncostatin M (OsM)⁷⁾ などを使用されている。しかしながら、これらの液性因子の作用のみからなる分化誘導法では肝細胞への分化効率は不十分であり、さらなる肝分化効率の向上が要求されている。

2. 肝分化関連遺伝子を導入する肝分化誘導法

山中 4 因子と呼ばれる転写因子を体細胞に遺伝子導入すると細胞が初期化され iPS 細胞が樹立されるように、肝細胞への分化を含むあらゆる細胞の運命決定において遺伝子発現の制御は極めて重要なツールとなりうる。そこで筆者らは、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の各ステップにおいても、各種液性因子の作用に加えて外来的に遺伝子発現を制御することによって肝分化の促進を試みた。ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導された中内胚葉に、内胚葉形

成に必須である SOX17 (sry-related HMG box 17) 遺伝子を導入した結果、約 80% の効率で内胚葉が分化誘導された⁸⁾。また、分化誘導された内胚葉に、肝特異化に必須である HEX (hematopoietically expressed homeobox) 遺伝子を導入することによって、肝幹前駆細胞への分化が促進された⁹⁾。さらに、分化誘導された肝幹前駆細胞に HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) 遺伝子を導入した結果、より高い肝機能を有した肝細胞を高効率に作製できた¹⁰⁾。さらに筆者らは最近、FOXA2 (forkhead box A2) と HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 alpha) 遺伝子を組み合わせることで各分化ステップの細胞に導入することによって、SOX17・HEX・HNF4 α 遺伝子の導入を組み合わせる方法よりも高い cytochrome P450 (CYP) 代謝機能を有する分化誘導肝細胞を作製することに成功した¹¹⁾。

3. 分化誘導肝細胞と異種細胞との共培養法

胎発生過程では、肝幹前駆細胞は心臓中胚葉や横中隔間充織に接触しており、肝発生には隣接する中胚葉からのシグナルが重要である。そこで、ES 細胞からの肝分化過程において、胎発生を模倣するように中胚葉系の細胞との共培養が試みられた。ES 細胞を胎生中胚葉¹²⁾ や中胚葉由来の細胞株 (M15)¹³⁾ と共培養することによって、肝分化が促進されることが報告され

ている。

4. 肝分化させた細胞集団からの分化誘導肝細胞の抽出

上述したような肝分化誘導技術の改良によって、肝細胞への分化効率は飛躍的に向上したが、依然として最終的に分化させた細胞集団は分化度が不均一であり、分化が不十分な細胞が混在している状態である。そこで Basma らは、未分化な細胞や内胚葉では発現せず、肝細胞に特異的に発現する表面抗原として asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1) に着目した¹⁰⁾。肝分化させた細胞集団から ASGR1 陽性細胞をソートすることで、分化誘導肝細胞のみを抽出することに成功した。また Woo らは、indocyanine green (成熟した肝細胞が特異的に取り込むことが知られている色素) を取り込んだ細胞のみをソートすることによって、分化誘導肝細胞を選択的に抽出できることを報告した¹¹⁾。肝分化させた細胞集団から分化誘導肝細胞を高純度に抽出できる技術を活用することによって、均一な機能を有し、より成熟した肝細胞集団を供給できると期待される。

分化誘導肝細胞の毒性評価系への応用

薬物が引き起こす肝毒性の多くは、薬物が薬物代謝酵素で代謝されて生じる反応性代謝物が原因であるため、反応性代謝物による毒性を検出できる評価系の開発が必要である。筆者らは、トログリタゾン、アセトアミノフェンといった肝毒性を起こす薬物を、上述の遺伝子導入を組み合わせた分化誘導法で作製した分化誘導肝細胞に作用させたところ、細胞毒性が生じることを確認した¹⁰⁾。また、肝毒性を生じる 20 種類以上の薬物を分化誘導肝細胞に作用させたところ、ほぼすべての薬物について、*in vitro* 肝毒性評価系として汎用される HepG2 細胞 (肝がん細胞由来細胞株) よりも高感度に細胞毒性を検出することが可能であった¹⁰⁾。さらに、薬物代謝酵素の阻害剤を併用して細胞毒性を評価し

たところ、薬物による細胞傷害性が一部減弱し、反応性代謝物による毒性も筆者らの分化誘導肝細胞で検出できることが明らかになった¹⁰⁾。分化誘導肝細胞を用いた薬物の毒性評価はいまだ研究開発段階の技術ではあるが、本細胞を毒性評価系へ応用できる可能性が示唆された。

まとめ

肝発生の基礎研究で得られた知見をもとに、ヒト ES/iPS 細胞から薬物代謝能を有した肝細胞を分化誘導する研究が活発に行われ、肝分化誘導技術は確実に進歩してきた。しかしながら現在の肝分化誘導技術では、ヒト初代培養肝細胞の完全なる代替品を作出するまでには至っていない。今後、分化誘導肝細胞の創薬応用の実現を目指して、さらなる研究の進歩が期待される。

文 献

- 1) Hamazaki T, et al: Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett* 497 (1): 15-19, 2001.
- 2) Duan Y, et al: Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells* 25 (12): 3058-3068, 2007.
- 3) D'Amour K A, et al: Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23 (12): 1534-1541, 2005.
- 4) Hay D C, et al: Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (34): 12301-12306, 2008.
- 5) Cai J, et al: Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45 (5): 1229-1239, 2007.
- 6) Kamiya A, et al: Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 492 (1-2): 90-94, 2001.
- 7) Kinoshita T, et al: Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver

- hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (13): 7265-7270, 1999.
- 8) Takayama K, et al: Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One* 6 (7): e21780, 2011.
- 9) Inamura M, et al: Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPSC cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 19 (2): 400-407, 2011.
- 10) Takayama K, et al: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. *Mol Ther* 20 (1): 127-137, 2012.
- 11) Takayama K, et al: Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1alpha transduction. *J Hepatol* 57 (3): 628-636, 2012.
- 12) Fair JH, et al: Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery* 134 (2): 189-196, 2003.
- 13) Shiraki N, et al: Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13 (7): 731-746, 2008.
- 14) Basma H, et al: Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 136 (3): 990-999, 2009.
- 15) Woo DH, et al: Direct and indirect contribution of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells to liver repair in mice. *Gastroenterology* 142 (3): 602-611, 2012.
- 16) Takayama K, et al: 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*: 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.029>

Efficient Generation of Hepatocyte-like Cells from Human ES/iPSC Cells for Drug Toxicity Screening

Kazuo Takayama^{1,2}, Kenji Kawabata², Hiroyuki Mizuguchi^{1,2,3}

¹ Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

² Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation

³ The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University

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

Evaluation of Drug Toxicity by Using Hepatocytes Derived from Human iPS Cells

川端健二^{*1} 高山和雄^{*2} 水口裕之^{*3}

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。特に肝細胞を iPS 細胞から効率良く分化誘導できれば、ハイスループットな薬物毒性評価系や薬物代謝評価系を新規に構築できると考えられる。本稿では、筆者らが考案したヒト iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導法とその薬物毒性評価への応用について紹介したい。

1. はじめに

現在の創薬プロセスにおいては、一つの医薬品が製品化されるまでに 10~15 年程度の期間および 1,000 億円を超える開発費が必要であるといわれており、研究開発費のうちの 7 割強は臨床試験以前の探索研究から前臨床研究までに投入されている。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一つが医薬品として承認を受ける。ここでしばしば問題となるのが薬物誘発性肝障害（肝毒性）であるが、医薬品の開発プロセスの早期に肝毒性を確度良く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらす、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。ヒト初代培養肝細胞の利用により肝毒性評価技術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、安定供給や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。近年、ヒト体細胞から分化多能性を有した iPS (induced pluripotent stem) 細胞の樹立が報告され、iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は上記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、近年目覚ましい進歩を遂げているヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法に関する知見を概説するとともに、それを利用した薬物毒性評価系への応用の可能性について筆者らの最新の結果を含めて紹介する。

2. 肝細胞の培養

肝臓は、炭水化物や脂質の代謝、グリコーゲンの貯蔵とグルコースの合成、尿素の生合成等、多くの機能を有する内胚葉由来の臓器である。肝臓を構成する細胞のうち、肝実質細胞（肝細胞）がこれらの主要な機能を担っており、*in vitro* で培養された肝細胞は、生物医学的研究だけでなく再生医療や薬物毒性評価系への応用も強く期待され

^{*1}Kenji Kawabata 独医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

^{*2}Kazuo Takayama 大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野

^{*3}Hiroyuki Mizuguchi 大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野 教授

ている。これまで肝組織の *in vitro* モデルとして初代培養肝細胞がしばしば用いられてきた。初代培養肝細胞は薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを高発現していることから、現在でも *in vitro* での標準細胞として薬物毒性試験等で用いられている¹⁾。しかしながら、初代培養肝細胞は、高価であること、ドナーが制限されること、増殖しないために安定供給が難しいこと、培養後速やかにシトクロム P450 薬物代謝酵素の活性低下がみとめられること、等の問題点が指摘されている²⁻⁴⁾。したがって、無限増殖能を有するヒト iPS 細胞から効率良く肝細胞が分化誘導できればこれらの問題点が解決できると期待されている。

3. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞はヒト ES (embryonic stem) 細胞と同様に分化多能性を有し、神経や皮膚、肝臓、血液、心筋等の三胚葉へ分化することができる^{5,6)}。ヒト iPS 細胞の分化誘導はヒト ES 細胞の分化誘導と基本的に同等であり、いずれも共通の手法を用いて分化誘導できる。したがって、以下にヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法について紹介するが、ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導法の方がより多く報告されているため、ヒト ES 細胞に関する報告も混在していることに留意されたい。

3.1 ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト iPS 細胞の分化誘導研究において、肝細胞等の内胚葉分化に関する研究は、神経細胞等の外胚葉分化に関する研究や心筋細胞・血液細胞等の中胚葉分化に関する研究よりも遅れてきた(図1)。内胚葉分化誘導の研究が遅れてきた理由の一つとして、分化過程が複数の段階を経ることによるものと考えられる。肝細胞分化の場合、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肝細胞へと分化し(図2)、この過程で種々の液性因子が必要とされる。このうち、内胚葉への分化誘導において最も頻繁に用いられている液性因子はアクチビン A である^{7,8)}。アクチビン A は TGF (transforming growth factor)- β ファミリーに属する増殖因子であり、受容体に結合した後、細胞内で Smad とよばれるアダプター分子群を活性化する⁹⁾。アクチビン A 以外では、FGF (fibroblast growth factor) 2 や Wnt3a も内胚葉分化誘導に用いられる。特に FGF2 については、アクチビン A と同時に作用させることにより、アクチビン A 単独作用時と比較し有意に内胚葉分化誘導効率が向上することが報告されている¹⁰⁾。

3.2 内胚葉から肝細胞への特異化

内胚葉から肝細胞への分化は肝細胞特異化 (specification) と肝細胞成熟化 (maturation) の

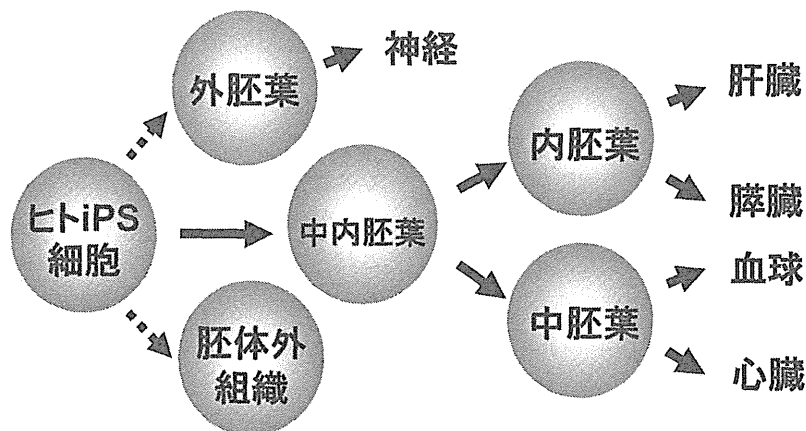


図1 ヒト iPS 細胞から三胚葉への分化誘導
ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞とおなじく三胚葉に分化することができる。

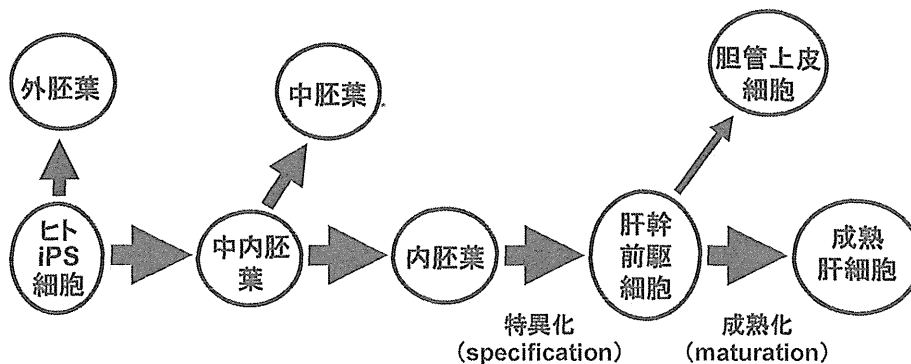


図2 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化
ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞への分化は複数の過程に分けることができる。

2つのステップに分かれる (図2)。このうち、肝細胞特異化の過程では肝幹前駆細胞が分化誘導され、 α -フェトプロテインやトランスサイレチンを発現するようになる^{11,12)}。この過程では FGF シグナルと BMP (bone morphogenetic protein) シグナルが重要であることが知られており、FGF4 と BMP2 を作用させることにより肝特異化が著明に亢進することが報告されている¹³⁾。またその他にも、FGF1/2/4 と BMP2/4 の組み合わせによって、内胚葉から肝細胞が分化誘導できるという報告もある¹⁰⁾。

3.3 肝幹前駆細胞から肝細胞への成熟化

肝幹前駆細胞は肝実質細胞と胆管上皮細胞という2種類の系列に分化することが可能である (図2)。肝幹前駆細胞から肝実質細胞へ分化するにつれて α -フェトプロテインの発現量が低下し、代わってアルブミンの発現量が上昇してくる。この過程において重要な液性因子は HGF (hepatocyte growth factor) とオンコスタチン M である^{14,15)}。HGF は肝前駆細胞の増殖を促進させるとともに胆管への分化を阻害する。また、オンコスタチン M は肝前駆細胞の成熟化を促進する。

さら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ー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) で分化誘導する必要がある。一方、iPS 細胞由来分化誘導肝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ではなく、むしろ創薬応用において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ため、特に血清の使用は現時点では有用である。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。

3.4 遺伝子導入による肝細胞分化誘導

先述したように、iPS 細胞から肝細胞への分化誘導効率は未だ十分ではなく、薬物毒性評価系に応用するにはさらなる技術開発が必要である。筆者らや他のグループは、Sox17 とよばれる内胚葉分化に重要な転写因子の遺伝子をヒト ES 細胞や iPS 細胞に導入することにより、内胚葉への分化誘導効率が著明に向上することを明らかにした^{16,17)}。また、FoxA2 とよばれる内胚葉で強く

発現している転写因子の遺伝子を導入することでも内胚葉分化は促進される¹⁸⁾。肝特異化のステップでは、肝発生に重要な転写因子である Hex 遺伝子を、iPS 細胞由来内胚葉に導入することにより肝細胞分化が強く促進されることが筆者らと他のグループにより報告されている^{19~21)}。

また、筆者らは複数の遺伝子を分化の適切な時期に順次導入することにより、ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞までの分化誘導効率を向上させることを検討した。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 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 遺伝子を、さらに肝幹前駆細胞から肝細胞への分化ステップでは HNF4 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^{17, 20, 22)}。さらに最近では、ヒト 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 および HNF1 α 遺伝子を組み合わせで発現させることにより、さらに効率良く成熟肝細胞を分化誘導することに成功した (図 3)²³⁾。なお、本分化誘導では、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に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、細胞への感染に参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 (図 4)。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²⁰⁾。

3.5 三次元培養技術による肝細胞の成熟化

肝細胞をハンギングドロップ法や浮遊培養法を用いてスフェロイド培養することにより成熟化することはよく知られている。筆者らは、細胞シート工学技術を用い、シート状に回収したマウス Swiss 3T3 線維芽細胞とヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞とを積層三次元共培養し肝細胞の成熟化を検討した²⁴⁾。その結果、ヒト iPS 細胞より分化誘導した単層の肝細胞と比較し、Swiss 3T3 細胞と積層三次元共培養することによりアルブミンや HNF4 α , CYP1A2 などの肝細胞特異的な遺伝子発現量が上昇することが確認された。また、分化誘導した肝細胞の成熟化には Swiss 3T3 細胞の分泌する液性因子よりも、肝細胞と Swiss 3T3

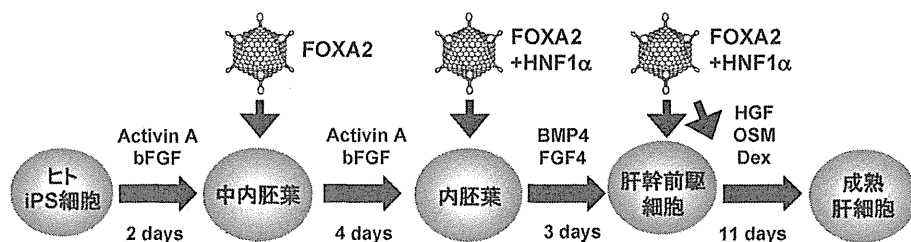


図 3 遺伝子導入を用いたヒト iPS 細胞から成熟肝細胞への分化誘導
分化の適切な時期に適切な遺伝子を一過性に発現させることにより、効率良く肝細胞を分化誘導できる。

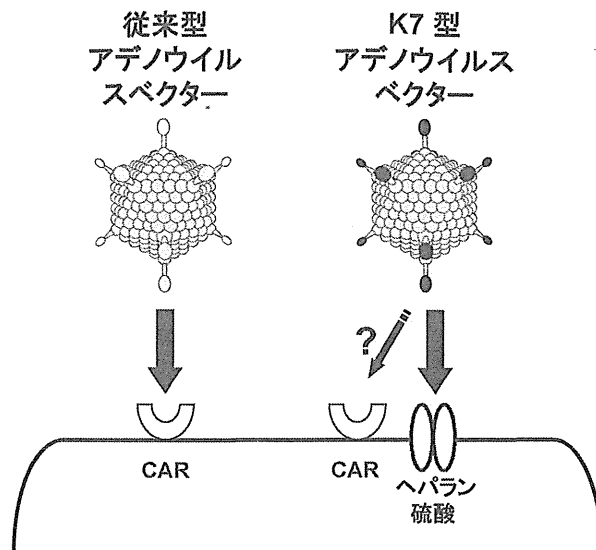


図4 改良型アデノウイルスベクター

改良型 (K7型) アデノウイルスベクターはアデノウイルス受容体 (CAR) だけでなく、ヘパラン硫酸も認識することにより、多くの細胞種に効率よく遺伝子導入が可能となる。

細胞との直接的な接触が重要であることを見だし、Swiss 3T3 細胞との積層三次元共培養により分化誘導した肝細胞は、成熟化がより促進されていることが明らかとなった。

4. iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発

このようにしてヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、形態学的には二核を有した成熟肝細胞の形状をしており、80~90%以上の細胞がアルブミン、アシアロ糖タンパク質受容体、LDL (low density lipoprotein) 取り込み能、インドシアニングリーン取り込み能、薬物代謝酵素 (CYP3A4, 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、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、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²³⁾。各シトクロム P450 酵素の遺伝子発現と代謝能との間に、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)、低いシトクロム P450 酵素活性の個人から iPS 細胞が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。また、Rashid らは $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠損症・家族性コレステロール血漿症・グリコーゲン貯蔵疾患症 1 α の患者の皮膚細胞から iPS 細胞を作製し、肝細胞へ分化誘導させ、それぞれの病態を反映した肝細胞を作製できることを示した²⁵⁾。したがって、将来的には病態を反映した iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価や代謝評価も可能となるであろう。