

III 血液感染するウイルス肝炎

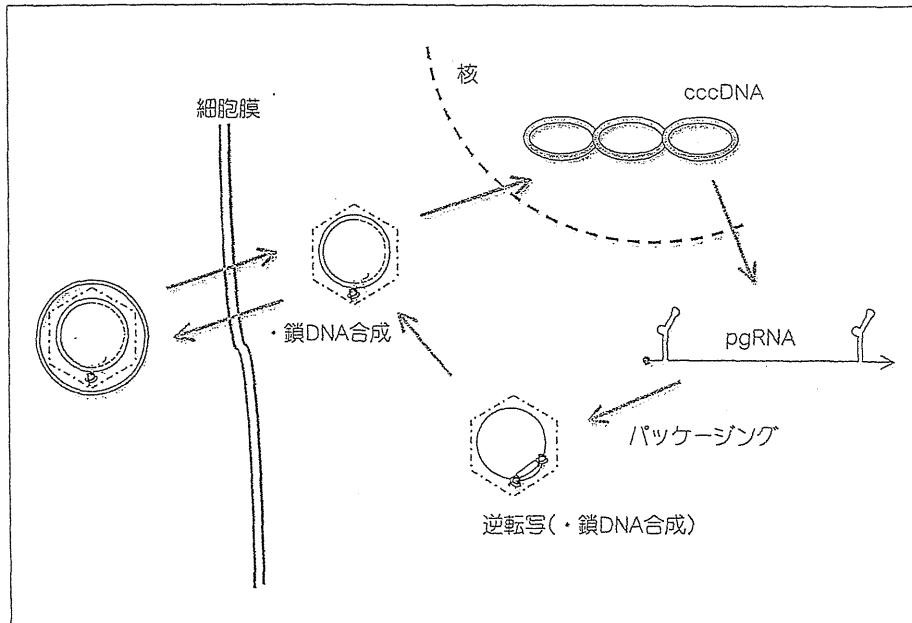


図3 HBVの生活環

HBVの生活環の概略を示した。HBV感染粒子は想定される受容体に結合後、細胞膜上もしくはエンドゾームで膜融合を起こし、コア粒子が細胞質へ取り込まれる。コア粒子は核へ移送されると仮定されているが、このプロセスでゲノムDNAのギャップは埋められ、末端タンパクは取り外されて、核内ではプラスミド型の閉環状cccDNAとなる。このエピゾームは被転写競合型であり、HBV関連転写物が発現される。ゲノム合成に供与されるRNAはpgRNAであり、コア粒子のアセンブリーと共役して、パッケージング、逆転写反応が進行する。分泌された感染性HBV粒子のゲノムは完全なHBVゲノム構造をとっており、⊕鎖DNA合成は膜粒子に取り込まれるまでに完了していると考えられている。

HBV：B型肝炎ウイルス

(文献9より改変)

C遺伝子の後半からpreSにかけてスプライスされた2.3kb前後のmRNA(機能不明)も産生される¹⁵⁾。これらのmRNAはすべて⊕鎖極性をもつもので、⊖鎖極性をもつ転写産物は基本的には知られていない。プレゲノムRNAはゲノムサイズより長く、5'と3'が重複配列になっていることが特徴であり、また、逆転写複製に不可欠である。

プレゲノムRNAから翻訳されたpolはプレゲノムRNAのパッケージングシグナルεに結合し、タンパクプライミングによって⊖鎖DNAの合成を開始する(HBVの場合は63番目のチロシンからチミンが合成開始の発端になる)(図4A)。εからDR1、5'の配列はプレゲノムRNAの3'にも存在するため、こ

こまで合成された⊕鎖DNAはプレゲノムRNA3'と同様の相補的な配列に転座して、さらに、5'までの両端の重複した完全長の⊖鎖DNAを完成する。プレゲノムRNA自体は⊖鎖DNA合成が進むに連れてpol自身のRNaseH活性により分解されるが、5'のDR1を含む短い配列部分が最終的に⊖鎖DNAのDR2に相補的に結合することが⊕鎖DNAのプライミングになる。⊖鎖DNAの5'のDR1辺りまで合成された⊕鎖DNAは3'のDR1に転座して、さらに⊕鎖DNA合成を進める。この⊕鎖DNA合成はS遺伝子ORFとX遺伝子のORF辺りで停止している。粒子内での基質が枯渇してくることが理由のひとつかもしれない⁹⁾(図4B)。

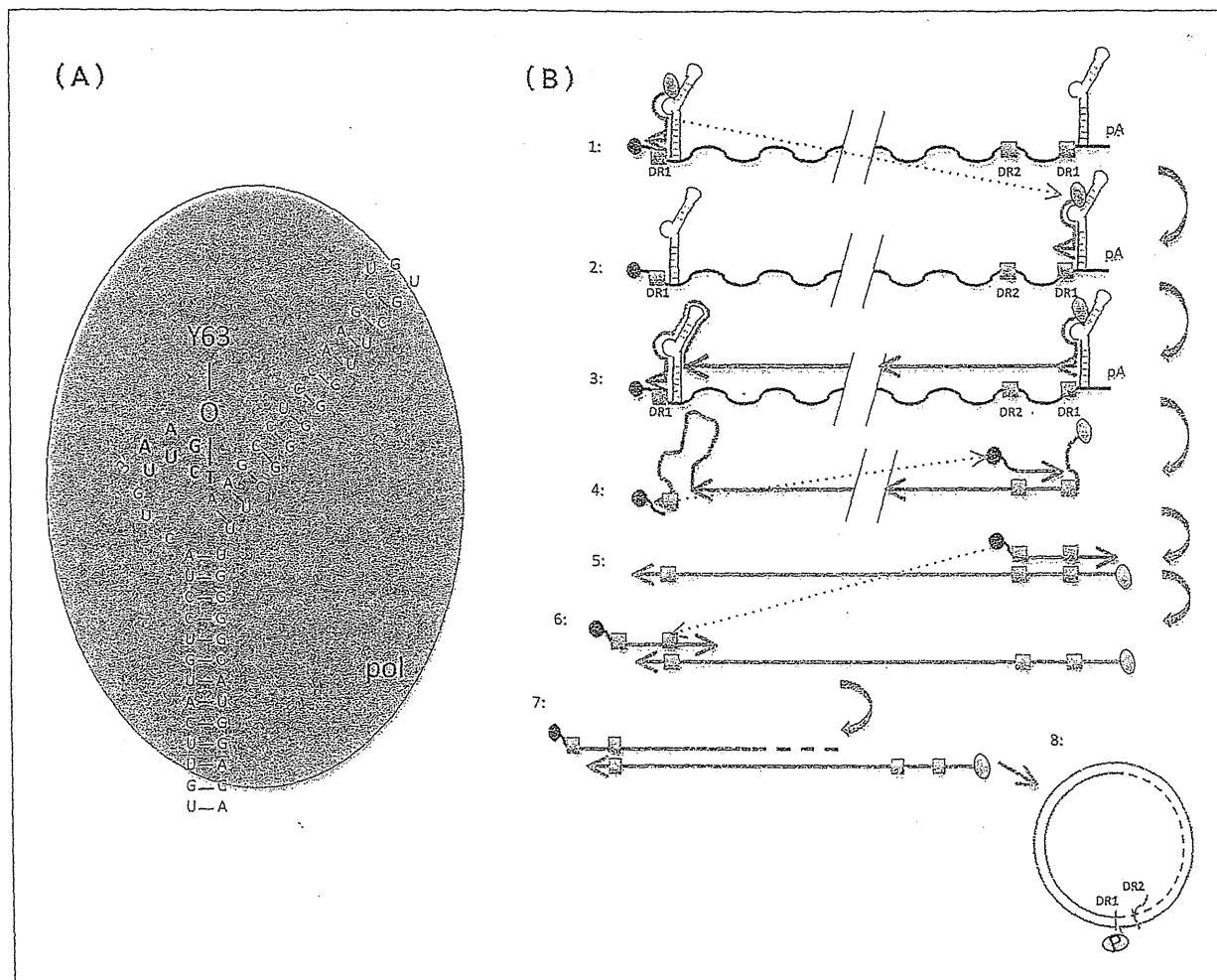


図4 HBV パッケージングシグナル(ε)と逆転写複製メカニズム

(A) HBV HBVパッケージングシグナル(ε)。RNAによくみられる pseudo-not 構造をとると考えられている。HBV pol 末端タンパク領域で認識されると考えられていて、部分的に1本鎖となる膨らみ (bulge) の根元のアデニンと相補的に HBV pol の 63 番目のチロシンからプライミングされる。(B) HBV 複製メカニズム。① ε から開始した逆転写産物は 5' DR1 まで合成されると、② 3' DR1 に転座することで全長⊖鎖 DNA 合成が可能となる。③ 5' DR1 まで⊖鎖 DNA 合成が進行するにともない、④ 鋳型 pgRNA は HBV pol の RNaseH 活性により順次分解される。キャップ構造～ DR1 をもつ 5' の短い pgRNA 部分は完全な DNA-RNA ハイブリッドにならないため分解を免れ、この部分の RNA が 3' に近い DR2 領域に相補的に転座することで⊖鎖 DNA 合成のプライマーとして機能する(レトロウイルスの⊖鎖 DNA 合成のプライマーとなる polypurine tract (ppt) に相当する)。⑤ ⊖鎖 DNA 合成は⊖鎖 DNA 5' まで進み、⑥ その後、3' DR1 に転座することで、⑦ さらに⊖鎖 DNA 合成が進む。この反応過程で、⑧ DR 領域の相補的な配列をもとに環状化構造をとる。⊖鎖 DNA 合成は確固とした理由は定かではないが、50～80% くらいのところで合成が停止している。本図では末端タンパクを独立した因子として描いているが、HBV pol は機能構造に分解されないため、末端タンパク～合成酵素活性はひとつのタンパクとして機能している。

HBV : B型肝炎ウイルス

(文献9より)

HBV の逆転写 (⊖鎖 DNA 合成) から⊕鎖 DNA 合成といった一連の HBV ゲノム複製がコア粒子内で行われると考えられており、ゲ

ノムを含むコア粒子は ER に分子集合している膜タンパクに内包されて ER を経由して細胞外に分泌されると考えられる。コア粒子の

III 血液感染するウイルス肝炎

ERでの内包から分泌の過程にどのような宿主因子がかかわり、ウイルス因子がどのように機能しているのか、受動的なものなのか、能動的な移送・分子集合なのか、いまだ謎だらけである。

VIII HBV 研究の将来

HBV 感染者は世界に2~3億人、わが国でもいまだ150万人存在すると考えられている。このような巨大感染症はワクチン回避変異体を生み、慢性化率の高いゲノタイプが蔓延しつつある。HBV 慢性肝炎の治療はインターフェロンによる seroconversion を目指した治療が最良であるが、効果は限定的である。したがって、HBV 増殖を抑えることに主眼がおかれるが、抗 HBV 剤は抗 HIV 剤のたらい回しの利用で変異株とのいたちごっこである。

HBV の研究は分子生物学的手法を主体になされ、各遺伝子の機能が明らかにされて来た。しかし、これまでの報告が HBV の本質的なウイルス学をどこまで正確に記述しているのかを検討する必要がある。すなわち、少なくとも培養細胞を利用した *in vitro* 感染系で、可能であればマウス等を利用した個体感染モデルでの実証が必要である。これらの感染系の樹立は HBV のウイルス学を発展させるに留まらず、病態発症機構の解明や、その事実に基づく治療法の開発へと発展することを約束する。

そこで、今後の HBV 研究を進める上でもっとも大きな問題点を2つあげておきたい。① HBV 感染受容体を分離・同定し、その性質を明らかにしつつ、有用かつ簡便な *in vitro*, *in vivo* 感染系を樹立すること、② HBV pol の簡便なアッセイ系による high-throughput 抗 HBV 剤スクリーニングシステムを確立することの2点である。これらの問題はウイルス学に託された最難問である。

IX HBV 感染受容体の分離・同定と感染系の確立

ウイルスの発見からすでに半世紀足らず、HBV の感染受容体はそのかけらもわかっていないに等しい。本来の感染宿主実質肝細胞に感染増殖するが、肝実質細胞由来の培養肝がん細胞にはほとんど感染しない。もちろん、培養肝がん細胞が元々の正常の肝実質細胞の性質を維持していないことは想定される。初代培養ヒト肝実質細胞の系では確かに HBV 感染が確認されるが、倫理的な側面、調達の煩雑さを考えると、研究室での使用にはまったく耐えない。

C型肝炎ウイルスに起因すると思われる肝がんから樹立された HepaRG という培養肝がん細胞が HBV にも感染感受性を示すことが示された¹⁶⁾。しかし、感受性を得るために2~3週間程度の分化誘導が必要なこと、感染効率率は最大で30%程度で、しかもディッシュ1枚当たり10万円以上する高価な細胞株であることなどから汎用性に耐えない(増殖維持は特許の関連で制限されている)。iPS から分化させた肝細胞の利用もひとつのアイデアではあるかもしれないが、その誘導から維持の手間を考えると、HBV 研究者が低コストで簡便・自由に使用できる状況にはない。

そこでやはり、HBV 感染受容体の分離・同定とその応用としての感染系の樹立が必要不可欠と考えている。とは言っても、半世紀近い研究でまったく成果が出なかった対象である。ウイルス感染機構の概念を根本から変える非常識的なアイデアが必要となると、かえってかなり厄介であるが、斬新なスクリーニング方法を考案しつつ、ウイルス感染の基本に立って地道な同定作業を続けている。

X HBV pol アッセイシステム

タンパクプライミング逆転写が、パッケージングシグナル ϵ 、コア粒子のアセンブリー

と共役して活性化するなどの特殊性や、発現タンパクの可溶化が困難であるなど、試験管内反応系を拒む問題点が立ちほだかる。High-throughput/mass screening システムの構築、立体構造から *in silico* 解析を行うにしても純度の高い評品が大量に必要である。いかに活性を維持した状態でこういった評品を得るか、種々のアイデアをもとに試行錯誤を続けている。

❖ おわりに

抗 HBV ワクチンが開発されて、わが国では特段 HBV 感染症に対する意識が下がったのか、わが国における HBV の基礎研究者はほとんど影を潜めてしまった。わが国の 150 万人強の患者、世界に数億人の感染者をもってして、容易に減少していく感染症ではないと考える。HBV ウイルス学も HBV 肝炎、肝がんもよくわからないことだらけである。一見きわめて単純なウイルスのように見えるが、逆に抗ウイルス標的材料が少なく、種々の側面からの治療薬の開発も難しい。本ウイルスの基本的な問題を解決することが、いろいろな意味で新たな展開を生むかもしれない。



- 1) Blumberg BS, et al : A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191 : 541-546, 1965.
- 2) Blumberg BS, et al : A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann Intern Med 66 : 924-931, 1967.
- 3) Okochi K., Murakami S : Observation on Australia antigen in Japanese. Vox Sang 15 : 374-385, 1968.
- 4) Schaefer S : Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotype. World J Gastroenterol 13 : 14-21, 2007.

1. B 型肝炎 (1) B 型肝炎のウイルス学

- 5) Seeger C, et al : Hepadnaviruses. "Fields Virology" Knipe DM and Howley PM ed. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. p2977-3029, 2007.
- 6) Liang TK : Hepatitis B : The Virus and Disease. Hepatol 49 : S13-S21, 2009.
- 7) Wynne SA, et al : The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol Cell 3 : 771-780, 1999.
- 8) Watts NR, et al : The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. EMBO J 21 : 876-884, 2002.
- 9) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. World J Gastroenterol 13 : 48-64, 2007.
- 10) Yang W, Summers J : Integration of Hepadnavirus DNA in infected liver : evidence for a linear precursor. J Virol 73 : 9710-9717, 1999.
- 11) Bruss V, Ganem D : The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 1069-1063, 1991.
- 12) Ueda K, et al : Three envelope proteins of hepatitis B virus : large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. J Virol 65 : 3521-3529, 1991.
- 13) Kim CM, et al : HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature 351 : 317-320, 1991.
- 14) Wei Y, et al : Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathologie Biologie 58 : 267-272, 2010.
- 15) Suzuki T, et al : Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 8422-8426, 1989.
- 16) Gripon P, et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002.

遺伝子挿入HBVを用いた感染レセプターの探索

上田 啓 次*

索引用語：HBVベクター，HBV psuedotype，HBVレセプター，HBV感染系

要旨：B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus, HBV)が同定されてから、約半世紀が過ぎようとしている。日本には今なお130万人前後、世界的には3.6億人の感染患者が存在するが、本感染症の抜本的な克服手段は今もって存在しないといっても過言ではない。その根本的な理由のひとつが、本ウイルスには簡便な*in vitro*あるいは*in vivo*感染系が存在しないことによると思われる。このことは逆にHBV感染レセプターの同定を阻んでいると思われるが、世界中で展開されている多くのデータの積み重ねにも関わらず謎は深まるばかりである。ウイルス学的にもまたその感染による病態発症機構の解明、治療法やその評価系の考案には、*in vitro*あるいは*in vivo*感染系の構築が必須であると考えられる。しかしながら、このような経緯を克服し、HBV感染レセプターを同定、感染系を樹立するにはかなりの創意工夫が必要と思われる。本稿では、これまで進展してきたHBV *in vitro* 感染系、HBV感染レセプターに関する研究を総括し、今後のHBV感染レセプター同定と感染系樹立へ向けた遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を概説する。

1 はじめに

1964年にBlumbergがオーストラリア抗原として、世界で初めてHBVの存在を示してから¹⁾、約半世紀が迫ろうとしている。HBVは肝炎、肝硬変、肝癌の発症に関わる社会的にも重要視されるウイルスであり、その克服のため、さまざまな観点からウイルス学的、臨床医学的研究が展開されてきた。

HBVは、複製に逆転写過程をもち、3.2 kb

の部分二重鎖DNAにコードされたたった4つの遺伝子で、ほぼ特異的に肝実質細胞において生活環を全うするウイルス学的にも特異的なウイルスである²⁾。分子生物学的手法の開眼と相まって、ゲノムクローニング、塩基配列解析、HBV関連遺伝子解析、組込みと病態解析などが展開され、ワクチンの開発やインターフェロン、抗HIV剤の流用による治療法の進展もあったことも事実である。こういった経緯を背景にし、基礎ウイルス学的に

Keiji UEDA: Separation and identification of the hepatitis B virus receptors with recombinant HBV technology

*大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]

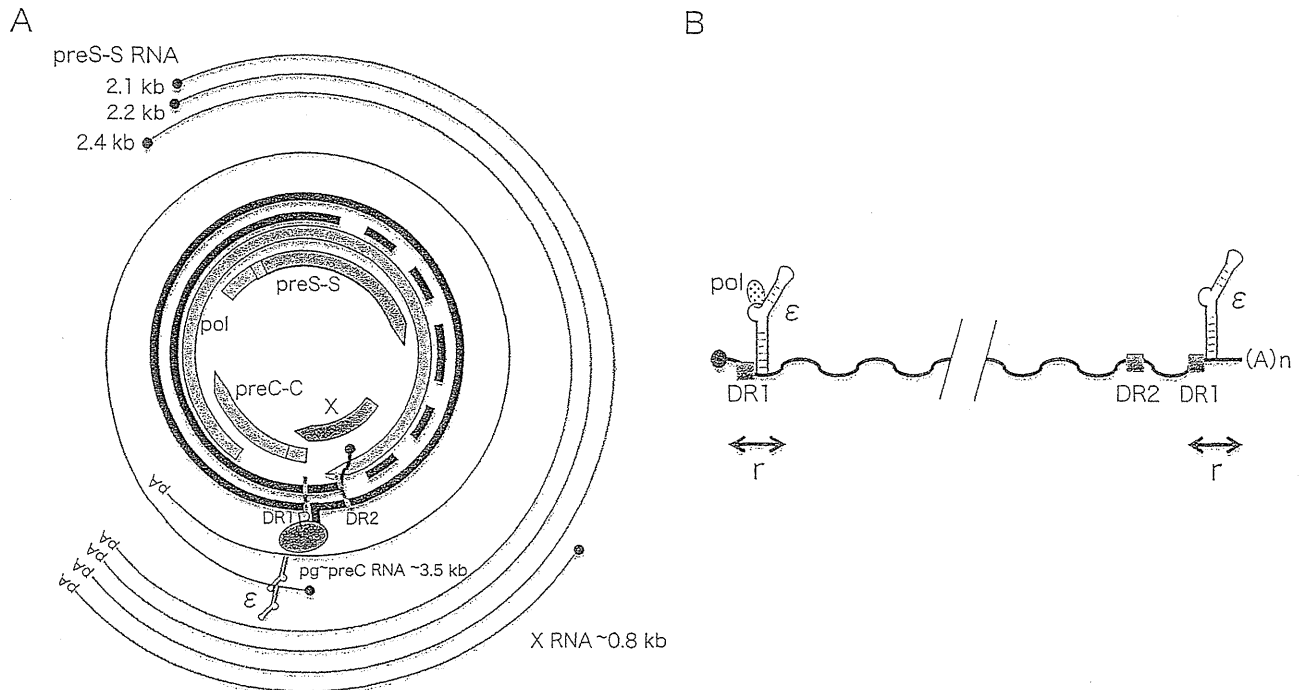


図1 HBVゲノム構造と遺伝子転写産物

- A: HBVのゲノム構造を太線, 太破線で示す。⊖鎖DNA末端にpolが付着する。DR1およびDR2の位置を示した。その内側にHBV関連遺伝子産物の読取り枠を示している。遺伝子は基本的にpreCore-Core (preC-C), preS-S, pol, Xの4つである。3.5 kb mRNAがpreCのATGを含む場合, preCore-Coreとして翻訳され, 分泌過程でN末の分泌シグナルおよびC末が切断されてHBe抗原(p17)となる。preCのATGを含まない場合がpregenome RNA (pgRNA)である。pgRNAは逆転写の鋳型となる重要な機能をもつと同時にcore蛋白, polの翻訳に利用される。preS-S遺伝子はmRNAの開始部位の違いにより, 2.4 kb mRNAからlarge S (preS1-preS2-small S [SS]) (LS), 2.2 kb mRNAからmiddle S (preS2-SS) (MS), 2.1 kb mRNAからSSが翻訳される。この内最も産生量として多いのはSSである。X遺伝子は固有のmRNA (0.8 kb)から翻訳される。●はキャップ構造を示す。
- B: pgRNAの構造。両端は重複した配列(r)となる。DR配列, パッケージングシグナル(ε), polのプライミングする位置を示す。

はもはややり尽された感があったのか, ここ10年間, 日本のHBVの基礎研究は暗黒の時代であった。しかし, 現在なお日本国内に約130万人, 世界的には3.6億人の巨大感染症を形成する人類史上最も危惧すべき感染症のひとつであり, その克服にはHBVの本質を詳細に解析できる *in vitro* あるいは *in vivo* 感染系が何としても必要であり, 感染系を土台とした病態発症機構の解明とそれらに基づくウイルス排除へ向けた抜本的な治療法の開発が重要であると考えている。

HBVは本来の宿主であるヒト若しくはチンパンジーなどのヒト近縁類人猿にしか感染

しない。これらの初代培養肝細胞はHBV感染系としての効率は高いが, その調達は倫理的にも不可能に近く, できたとしてもその手間を考えると, とても日々の実験に容易に用いられる感染系とはいえない。

類人猿に感染するHBVを除いた animal hepadnaviruses (アヒルB型肝炎ウイルス [duck hepatitis B virus = DHBV]³⁾, ウッドチャック肝炎ウイルス [woodchuck hepatitis virus = WHV]⁴⁾, 地リス肝炎ウイルス [ground squirrel hepatitis virus = GSHV])を用いた分子ウイルス学的アプローチは, 確かに多くの事実を明らかにしてきたと思うが, それに

しても、感染レセプター、感染系、cccDNA (covalently closed circular DNA) 生合成とその維持機構、動態、病態との関連、HBV ポリメラーゼのアッセイ系、詳細な複製メカニズムなど、多くの謎が残されたままである。

HBV感染レセプターの分離・同定は、初代培養アヒル肝細胞(primary duck hepatocyte = PDH)を用いたDHBVを中心に進められた。HBV吸着因子を含め、候補にあげられた因子は、重合アルブミンレセプター⁵⁾から始まって、gp120⁶⁾、gp180⁷⁾などいくつかあるが、繰り返し述べたように感染系の構築には至っていない。これ程までに困難なHBV感染レセプターの分離・同定に向けてどのようなアプローチが必要なのか、遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を考案した。

2 *In vitro* HBV感染系

前述のごとく、簡便な特に*in vitro*感染系が存在しないことが、HBV感染レセプターの分離・同定にとって決定的な障壁となっていることはいうまでもないが、*in vitro* HBV感染系(初代培養肝細胞を除く)構築の努力は続けられている。当然のことながら、HBVは正常肝実質細胞へ高親和性を示し、増殖能を発揮することから、肝実質細胞由来と考えられるHepG2、HuH7などのヒト肝癌培養細胞株が感染系として試されてきた。これらの細胞はHBVの複製サイクルと考慮して構築したHBV発現ベクターをトランスフェクションすることにより、感染性粒子を産生することがわかっている^{8,9)}。生体においてどのような形質をもつ肝実質細胞に感染するのか全く検討もつかないが、一般的に正常肝細胞は高分化状態にあると考えられるため、これらの細胞をステロイド、インスリ

ン、dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて分化誘導し、感染実験を試みたという報告がある¹⁰⁾。またこれらの細胞を用いて、肝臓という臓器状態をできるだけ再現する目的で高密度三次元培養によるHBV感染系の構築の試みもあるが、感染効率、コストパフォーマンスを考えるとHBV感染系としての価値は評価するレベルにないといわざるを得ない。

一般培養細胞系感染系としては、最近(といっても、すでに10年も経過する)樹立されたHCV感染肝癌から樹立されたHepaRGを用いたHBV感染系が唯一であると思われる¹¹⁾。この細胞を2~4% DMSOで数週間分化誘導すると20%程度のHBV感染効率が得られるとされる。しかしながら、一般的な培養肝癌細胞ながら商業用で直径約10 cmのディッシュで10万円強もする高価な細胞であり、とても日常的に使用できる細胞ではない。cccDNA形成など、本来の感染サイクルが進行していると思われるが、Dane様粒子の存在が示されている一方、感染性粒子を排出できないなどの問題点もある¹²⁾。

HBV感染レセプターの分離・同定から、感染系の構築を目指す場合にこのHepaRGの有用性が議論されている¹³⁾。最近の報告¹⁴⁾では、小管構造の形成に関わる肝細胞の側底側細胞膜(basolateral membrane)側からHBVは感染する。初代培養ヒト肝細胞(primary human hepatocyte = PHH)では接着細胞の表面側一面に小管構造マーカーであるmultidrug resistance protein 2 (MRP2)の発現がみられ、8000 multiplicity of genome equivalent (mge)以上でほぼ100%のHBV感染性がみられるのに対し、DMSO分化誘導HepaRGでは、限られた集属する領域にMRP2の発現がみられ、同じmgeを用いた感染実験でその集団の周辺部にHBV感染が観

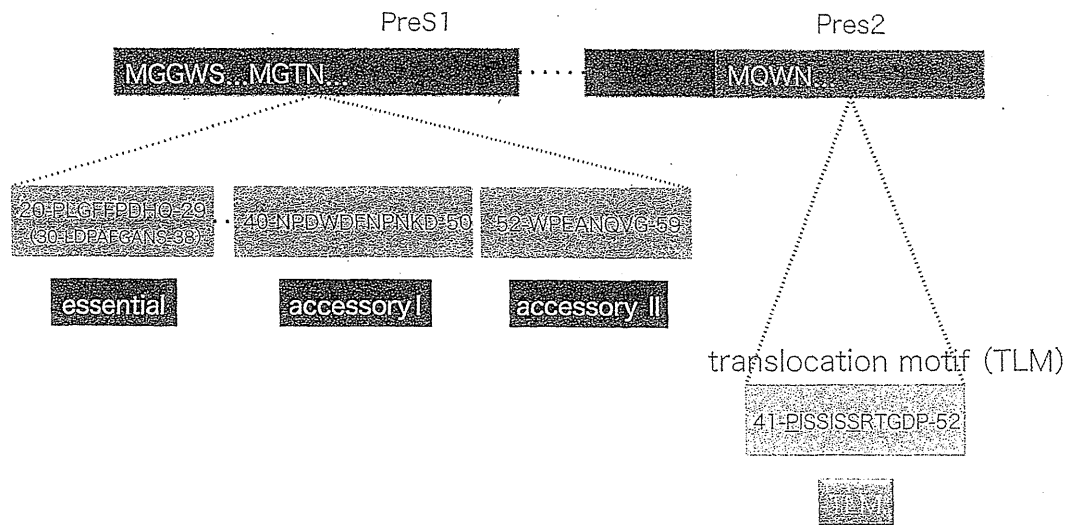


図2 preSの機能配列

preS1内の付着・侵入に必須な機能配列(20～29aa), 付随的機能配列(accessory IおよびII)とpreS2内の侵入過程で重要なTLMを示す。

察されることや、この現象がEGTAで促進される、集団の内部へも感染が確認できるようになる、ことから導き出された。本知見は生体における肝実質細胞の形質は、培養肝癌細胞株に比べ著しい高分化状態にあり、培養肝癌細胞では容易には達成し難い形質を有することを想像させる。この高分化状態がHBV感染レセプターの発現に関わるのか、活性に関わるのか定かではないにせよ、興味深い問題である。

3 付着・融合・侵入に関わるHBV因子

培養肝癌細胞のひとつ、HepG2細胞のHBV感染効率はないに等しいと考える研究者は多いと思われるが、当初はこの細胞を用いたHBV感染粒子の付着機構に関する研究は多々報告された^{15,16)}。最近ではD型肝炎ウイルス(HDV)なども利用してHepaRG細胞を用いた研究が多い¹⁷⁾。HBVの感染性粒子の形成には所謂small S (SS若しくは単にHBs)膜蛋白とmiddle S (MS)膜蛋白に加え、large S (LS)膜蛋白が必須の因子となるが、感染性HBV粒子の細胞への付着に関し

て、特にpreS1領域の機能が重要視されている¹⁸⁾。preS1領域は部分的にアミノ酸配列の相同性の低いところがあるが、おおむね高い相同性があると考えて良く、付着・膜融合に関わる必須な領域、2つの付随的な領域が存在すると考えられている。preS2領域も相同性は高く、細胞内侵入に関わると思われる領域(translocation motif = TLM)が想定されている。またSS膜蛋白N末にも膜融合に関わる領域が予測されている。

以上のような情報をもとにして、preS1内の必須領域を介して、肝細胞膜表面因子に結合(付着)し、レセプター分子集合・構造変化、SS膜蛋白N末を加えたHBV粒子膜-細胞膜融合が起こり、TLMを介した細胞内侵入といったHBVの付着・膜融合・侵入機構が想像される。

6 HBV感染レセプターの分離・同定

さて、HBV感染レセプターの分離・同定は倫理的な制約も絡んで、PDH-DHBV系を中心に行われてきた。DHBVにはHBVのMSに相当する膜蛋白はなく、すなわちpreS2に

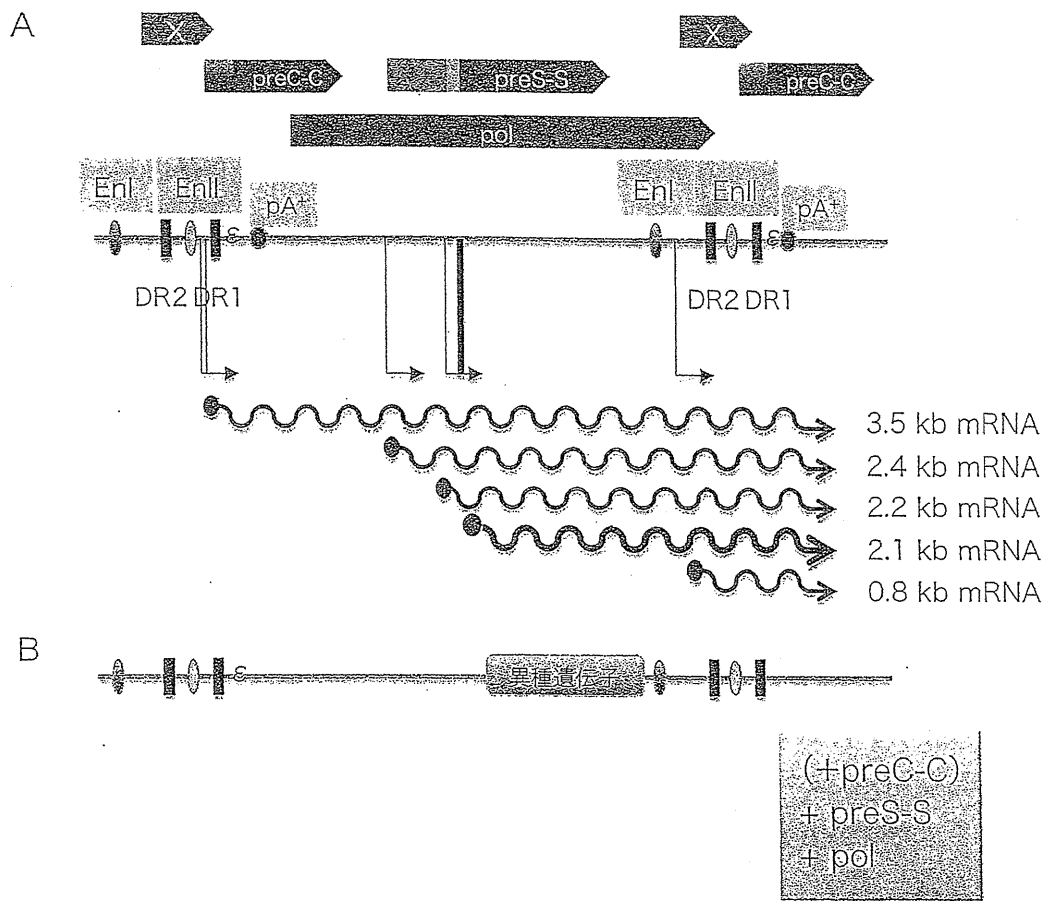


図3 HBVベクター型遺伝子挿入HBVデザイン

- A: HBVゲノムを直鎖状に描いている。上段のボックス矢印はORFを示す。pgRNAを発現するための必須基本ユニットを示した。En: エンハンサー。pA: ポリA付加シグナル。鍵矢印は各転写産物の開始部位、波線は転写産物を示す。
- B: SSの位置に異種遺伝子を挿入したデザインを示した。この場合、挿入により、preC-C遺伝子、X遺伝子を除くそのほかのHBV関連遺伝子はすべて破壊されるため、トランスに供給する必要がある。挿入部位によってはpreC-Cの供給も必要となる

該当する領域は存在しない。LS内のpreS領域に付着・膜融合に関わる必須な領域、2つのTLMに相当する領域が同定されている。

DHBVで同定された最も有力なDHBV付着因子はgp180 (carboxypeptidase D)であった¹⁹⁾。本因子は膜表面をビオチン化したPDHをDHBVと付着させた後、抗DHBV膜蛋白抗体を用いて免疫沈降することによって分離・同定されたものである。本因子の同定は、HBVの付着・膜融合・侵入に関わるHBV感染レセプターの本体にも迫る因子として期待されたが、LMH細胞(chicken由来

の培養肝癌細胞株でDHBV感染を許容しない)をDHBV感染許容細胞へ変化させることはできなかったし、またgp180に対する抗体もアヒル初代培養肝細胞へのDHBV感染を阻止するに至らなかった。

付着因子の存在が報告されているHepG2細胞からもHBV感染が許容される分化誘導したHepaRG細胞からも、依然としてHBV感染レセプターの本体に迫る因子の分離・同定はされていない。現時点における生化学、分子生物学などの技術を駆使しても、確固としたHBV膜蛋白結合因子すらこれらの細胞

から同定されないのはなぜであろうか？—ますますHBV感染レセプターの謎は深まり、逆に興味深くもあるが、HBV感染レセプターの分離・同定には相当の工夫と努力とを余儀なくされると思われる。

7 遺伝子挿入HBVの作製

これまでの経緯から、HBV感染レセプターの分離・同定へ向けた新たな局面を拓くために遺伝子挿入HBV—いわば、組換え型HBV或はpseudotype HBV作製を試みている。この2つの遺伝子挿入HBVは、前者のごとくHBVの複製機構を理解したHBVベクター型か、膜粒子のみをHBV型に変えたpseudotype HBV型に分けられる。本アプローチはこれまでに試みられなかったHBV感染性粒子を基盤にした感染性を指標にするアッセイ系の構築を可能にする。

1. HBVベクター型

本ベクターの構築には、HBVの複製過程を正確に理解する必要がある。HBVは、部分二重鎖DNAという独特のゲノム構造をもつことは勿論、さらに蛋白プライミングによって逆転写複製を行うという極めて特徴的な複製サイクルをもつ²⁰⁾。

HBVは感染成立後、部分二重鎖DNAを修復し、いわゆるcccDNAというエピゲノムを形成する。本ゲノムは肝実質細胞核内にあって、転写許容構造体として逆転写の鋳型となる3.5 kbプレゲノムRNAをはじめ、いくつかのHBV関連転写産物産生の鋳型として機能する。3.5 kbプレゲノムRNAはpreC翻訳領域内でDR1 (direct repeat 1)を含む形で転写され、3'側にDR2、さらに5'のDR1を含んだやや下流でpolyA付加シグナルが認識されて、すなわち5'と3'が重複される形で集結する。

本稿ではHBV複製サイクルの詳細については省略するが、このベクター構築上最低限必要なエレメントとして、プレゲノムRNA転写開始部位を含めた転写開始装置、5' DR1, ϵ , DR2, 3' DR1配列の基本情報を残しておく必要がある、またどの転写unitを使うか考慮する必要がある(図3A, B)。ウイルス蛋白因子として、実際の逆転写過程から部分二重鎖DNA合成に関わるHBVポリメラーゼ(HBVpol)、コア粒子を供給するHBVコア蛋白(HBV-C)、膜粒子を構成するpreS-S蛋白(HBV preS-S)を適宜トランスに供給する必要がある(図3B)。またゲノムサイズも厳密に影響すると思われるし、プレゲノムRNAの転写効率を上げるために適宜異種遺伝子エンハンサーを考慮する必要があるかもしれない。

このタイプの遺伝子挿入型HBVはHBVの生活環を踏襲するので、理論上は感染後速やかにcccDNAが形成され遺伝子発現が可能となると予測される。蛍光蛋白遺伝子などで感染をモニターすることにより、HBV感染レセプターの遺伝子の分離・同定に役立てることが可能である。ただし、HBVcccDNAには γ ヘルペスウイルスにみられる潜伏感染複製オリジン(ori-P)は存在せず、細胞分裂の際に複製・分配・維持されることなくしだいに希釈されていくと想定される。

私どもは肝実質細胞を標的とした遺伝子治療を達成する目論見で、約20年前に本タイプの遺伝子挿入HBVベクターの開発に挑んだ経緯がある。その後Schallらを中心として本タイプの遺伝子挿入HBVベクターが作製可能であることが示されている²¹⁾。

2. HBV pseudotype particles (HBVpp)型

このタイプの遺伝子挿入型HBVは、VSV-Gを使った pantropic retrovirus、あるいは lenti-

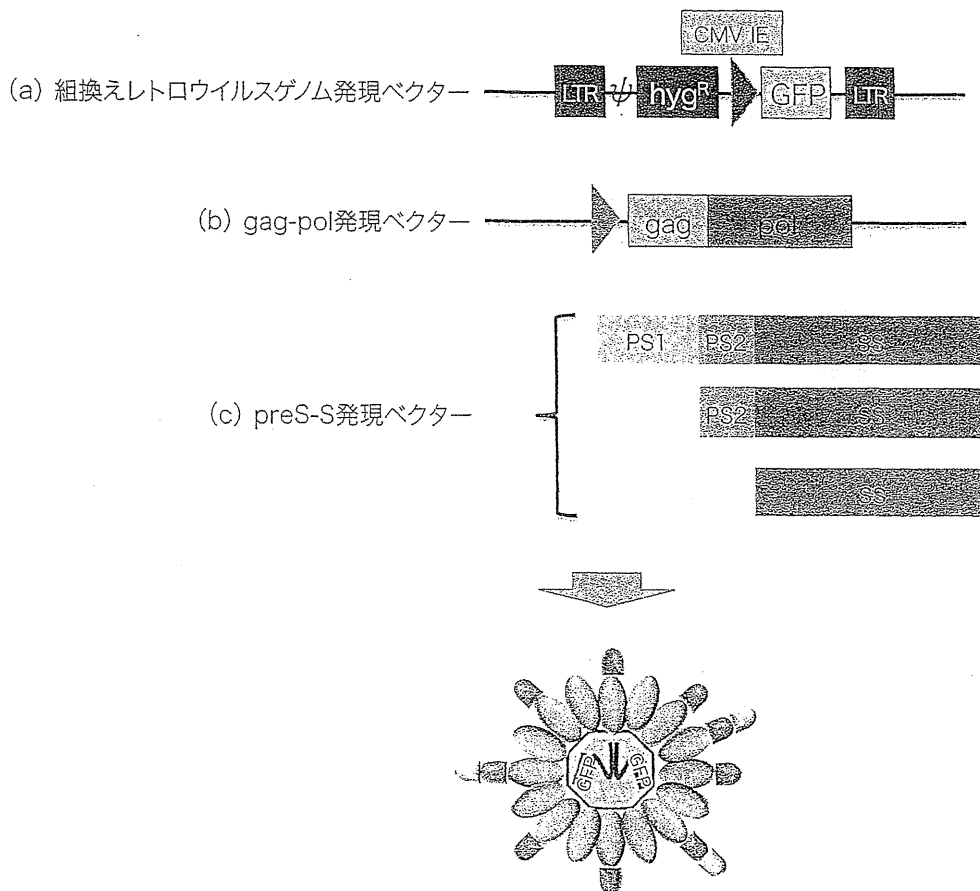


図4 HBVpp型のデザイン

このタイプではレトロウイルスのRNAゲノムを供給する発現ベクター (a), コア粒子と逆転写過程からプロウイルス合成に必要な pol を供給する gag-pol 発現ベクター, HBV 膜粒子を供給する HBV の 3 つの膜蛋白を供給する発現ベクターが必要となる. (b) に HIV 型を用い, (a) に HIV (レンチウイルス) 型のゲノムを供する rev responsive element (RRE) などの必要なエレメントを携えておけば, レンチウイルス型のレトロウイルスベクターとなる. (a) あるいは (b) をあらかじめ安定型培養細胞株として樹立してパッケージング細胞として使用することも可能である. LTR: long terminal repeat. hyg^R : hygromycin resistance gene. CMV IE: cytomegalovirus immediate early enhancer-promoter. GFP: green fluorescent protein. ψ : レトロウイルスパッケージングシグナル. \triangleright : エンハンサー-プロモーター.

virus において VSV-G を HBV 膜蛋白に変えた pseudo-HBV である. HCV でも pseudotype particles (HCVpp) として試みられている²²⁾. HBVpp は付着・侵入は HBV の過程を辿り, それ以降の過程はレトロウイルスの生活環に従う. 最終的には逆転写過程を経て, プロウイルスとして安定的に感染宿主細胞ゲノムに組み込まれるので, 培養細胞など, 継代が基本的に可能な細胞を用いた場合, ウイルス遺伝子として蛍光蛋白遺伝子や薬剤耐性遺伝子

を挿入しておけば, 感染細胞はクローン化できることになる.

問題となるのは, 通常のレトロウイルスベクターを用いた場合, 感染後, プロウイルスを形成し, 安定的な挿入遺伝子の発現まで数日から1週間程度の時間を要する点である. この意味で lentivirus 型のレトロウイルスをベースにした HBVpp が望ましいかもしれない.

私どもの研究室では, 肝実質細胞の cDNA

ライブラリーを培養肝癌細胞へ導入後、HBVppの感染性を指標にしたHBV感染レセプターの分離・同定を試みる戦略で通レトロウイルス型HBVppの構築を独自に試みた。まずレトロウイルスのgag-pol遺伝子を発現する細胞にEGFP (EGFP)とハイグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を挿入したレトロウイルスベクターゲノムを組込んだパッケージング細胞を作製し、この細胞に3つのHBV膜蛋白を発現させることで培養上清中にHBV膜蛋白を被ったウイルス粒子が産生されるかどうかを検討した。抗HBs抗体による免疫沈降、ウイルスゲノム抽出、RT-PCRで免疫沈降したサンプルに挿入したEGFP遺伝子が確認された。セシウム密度勾配超遠心法でもHBV粒子密度に近い1.22 g/ml近傍に粒子が集積することや、電顕によっても粒子形成されていることが確認された²³⁾。なお、本HBVppの感染能についていくつかの知見を得ているが本稿では差し控えたい。

8 おわりに

以上、遺伝子挿入HBVベクターについて概説した。HBVベクタータイプもHBVppタイプも作製可能であり、それぞれの利点を活かしたHBV感染レセプターの分離・同定における利用価値は高いと思われる。またこれら2つの遺伝子挿入HBVベクターは感染性を指標にしたアッセイ系を組み立てることにより、HBV感染レセプター分離・同定後の*in vitro*、および*in vivo*におけるHBV生活環や病態解析解明、治療法の開発とその評価系の構築に有用性は極めて高いものと思われる。

文 献

1) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S : A "New" Antigen in Leukemia Sera. JAMA 191 : 541-546,

1965
 2) Seeger C, Zoulim F, MASON WS : Hepadnaviruses. In "Fields Virology". 5th ed , 2007, pp2977-3029
 3) Funk A, Mhamdi M, Will H et al : Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. World J Gastroenterol 13 : 91-103, 2007
 4) Menne S, Cote PJ : The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 13 : 104-124, 2007
 5) Hellström U, Sylvan S : Human serum albumin and the enigma of chronic hepatitis type B. Scand J Immunol 23 : 523-527, 1986
 6) Li JS, Tong SP, Wands JR : Characterization of a 120-Kilodalton pre-S-binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor. J Virol 70 : 6029-6035, 1996
 7) Kuroki K, Cheung R, Marion PL et al : A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. J Virol 68 : 2091-2096, 1994
 8) Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K : Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 444-448, 1987
 9) Sells MA, Chen ML, Acs G : Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 1005-1009, 1987
 10) Bchini R, Capel F, Dauguet C et al : In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. J Virol 64 : 3025-3032, 1990
 11) Gripon P, Rumin S, Urban S et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002
 12) Hantz O, Parent R, Durantel D et al : Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. J Gen Virol 90 : 127-135, 2009
 13) Marion MJ, Hantz O, Durantel D : The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. Methods Mol Biol 640 : 261-272, 2010
 14) Schulze A, Mills K, Weiss TS et al : Hepatocyte

- polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* 55 : 373-383, 2012
- 15) Neurath AR, Kent SB, Strick N et al : Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46 : 429-436, 1986
 - 16) Petit MA, Dubanchet S, Capel F et al : HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1 (21-47) . *Virology* 180 : 483-491, 1991
 - 17) Blanchet M, Sureau C : Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 80 : 11935-11945, 2006
 - 18) Glebe D, Urban S : Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13 : 22-38, 2007
 - 19) Kuroki K, Eng F, Ishikawa T et al : gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem* 270 : 15022-15028, 1995
 - 20) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13 : 48-64, 2007
 - 21) Protzer U, Nassal M, Chiang PW et al : Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10818-10823, 1999
 - 22) Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM et al : Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446 : 801-805, 2007
 - 23) Ueda K, Ohsaki E, Omori H : submitted.

* * *

Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction

Kazuo Takayama^{1,2}, Mitsuru Inamura^{1,2}, Kenji Kawabata^{2,3}, Michiko Sugawara⁴, Kiyomi Kikuchi⁴, Maiko Higuchi², Yasuhito Nagamoto^{1,2}, Hitoshi Watanabe^{1,2}, Katsuhisa Tashiro², Fuminori Sakurai¹, Takao Hayakawa^{5,6}, Miho Kusuda Furue^{7,8}, Hiroyuki Mizuguchi^{1,2,9,*}

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; ²Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan; ³Laboratory of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; ⁴Tsukuba Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki 300-2635, Japan; ⁵Pharmaceutics and Medical Devices Agency, Tokyo 100-0013, Japan; ⁶Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan; ⁷Laboratory of Cell Cultures, Department of Disease Bioresources Research, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan; ⁸Laboratory of Cell Processing, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; ⁹The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Background & Aims: Hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (hiPSCs) can be utilized as a tool for screening for hepatotoxicity in the early phase of pharmaceutical development. We have recently reported that hepatic differentiation is promoted by sequential transduction of SOX17, HEX, and HNF4 α into hESC- or hiPSC-derived cells, but further maturation of hepatocyte-like cells is required for widespread use of drug screening. **Methods:** To screen for hepatic differentiation-promoting factors, we tested the seven candidate genes related to liver development.

Results: The combination of two transcription factors, FOXA2 and HNF1 α , promoted efficient hepatic differentiation from hESCs and hiPSCs. The expression profile of hepatocyte-related genes (such as genes encoding cytochrome P450 enzymes, conjugating enzymes, hepatic transporters, and hepatic nuclear receptors) achieved with FOXA2 and HNF1 α transduction was comparable to that obtained in primary human hepatocytes. The hepatocyte-like cells generated by FOXA2 and HNF1 α transduction exerted various hepatocyte functions including albumin and urea secretion, and the uptake of indocyanine green and low density lipoprotein. Moreover, these cells had the capacity to metabolize all nine tested drugs and were successfully employed to evaluate drug-induced cytotoxicity.

Conclusions: Our method employing the transduction of FOXA2 and HNF1 α represents a useful tool for the efficient generation of metabolically functional hepatocytes from hESCs and hiPSCs, and the screening of drug-induced cytotoxicity.

© 2012 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem cells (hESCs) [1] or human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) [2] have more advantages than primary human hepatocytes (PHs) for drug screening. While application of PHs in drug screening has been hindered by lack of cellular growth, loss of function, and de-differentiation *in vitro* [3], hESC- or hiPSC-derived hepatocyte-like cells (hESC-hepa or hiPSC-hepa, respectively) have potential to solve these problems.

Hepatic differentiation from hESCs and hiPSCs can be divided into four stages: definitive endoderm (DE) differentiation, hepatic commitment, hepatic expansion, and hepatic maturation. Various growth factors are required to mimic liver development [4] and to promote hepatic differentiation. Previously, we showed that transduction of transcription factors in addition to treatment with optimal growth factors was effective to enhance hepatic differentiation [5–7]. An almost homogeneous hepatocyte population was obtained by sequential transduction of SOX17, HEX, and HNF4 α into hESC- or hiPSCs-derived cells [7]. However, further maturation of the hESC-hepa and hiPSC-hepa is required for widespread use of drug screening because the drug metabolism capacity of these cells was not sufficient.

In some previous reports, hESC-hepa and hiPSC-hepa have been characterized for their hepatocyte functions in numerous ways, including functional assessment such as glycogen storage and low density lipoprotein (LDL) uptake [7]. To make a more precise judgment as to whether hESC-hepa and hiPSC-hepa can be applied to drug screening, it is more important to assess cytochrome P450 (CYP) induction potency and drug metabolism capacity rather than general hepatocyte function. Although Duan *et al.* have examined the drug metabolism capacity of hESC-hepa, drug metabolites were measured at 24 or 48 h [8]. To precisely

Keywords: FOXA2; HNF1 α ; Hepatocytes; Adenovirus; Drug screening; Drug metabolism; hESCs; hiPSCs.

Received 14 November 2011; received in revised form 31 March 2012; accepted 4 April 2012; available online 29 May 2012

* Corresponding author. Address: Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Tel.: +81 6 6879 8185; fax: +81 6 6879 8186.

E-mail address: mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp (H. Mizuguchi).



estimate the drug metabolism capacity, the amount of metabolites must be measured during the time when production of metabolites is linearly detected (generally before 24 h). To the best of our knowledge, there have been few reports that have examined various drugs metabolism capacity of hESC-hepa and hiPSC-hepa in detail.

In the present study, seven candidate genes (*FOXA2*, *HEX*, *HNF1 α* , *HNF1 β* , *HNF4 α* , *HNF6*, and *SOX17*) were transduced into each stage of hepatic differentiation from hESCs by using an adenovirus (Ad) vector to screen for hepatic differentiation-promoting factors. Then, hepatocyte-related gene expression profiles and hepatocyte functions in hESC-hepa and hiPSC-hepa generated by the optimized protocol, were examined to investigate whether these cells have PHs characteristics. We used nine drugs, which are metabolized by various CYP enzymes and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), to determine whether the hESC-hepa and hiPSC-hepa have drug metabolism capacity. Furthermore, hESC-hepa and hiPSC-hepa were examined to determine whether these cells may be applied to evaluate drug-induced cytotoxicity.

Materials and methods

In vitro differentiation

Before the initiation of cellular differentiation, the medium of hESCs and hiPSCs was exchanged for a defined serum-free medium, hESF9, and cultured as previously reported [9]. The differentiation protocol for the induction of DE cells, hepatoblasts, and hepatocytes was based on our previous report with some modifications [5,6]. Briefly, in mesendoderm differentiation, hESCs and hiPSCs were dissociated into single cells by using Accutase (Millipore) and cultured for 2 days on Matrigel (BD biosciences) in differentiation hESF-DIF medium which contains 100 ng/ml Activin A (R&D Systems) and 10 ng/ml bFGF (hESF-DIF medium, Cell Science & Technology Institute; differentiation hESF-DIF medium was supplemented with 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, and 0.5 mg/ml bovine serum albumin, all from Sigma). To generate DE cells, mesendoderm cells were transduced with 3000 VP/cell of Ad-FOXA2 for 1.5 h on day 2 and cultured until day 6 on Matrigel in differentiation hESF-DIF medium supplemented with 100 ng/ml Activin A and 10 ng/ml bFGF. For induction of hepatoblasts, the DE cells were transduced with each 1500 VP/cell of Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α for 1.5 h on day 6 and cultured for 3 days on Matrigel in hepatocyte culture medium (HCM, Lonza) supplemented with 30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4, R&D Systems) and 20 ng/ml FGF4 (R&D Systems). In hepatic expansion, the hepatoblasts were transduced with each 1500 VP/cell of Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α for 1.5 h on day 9 and cultured for 3 days on Matrigel in HCM supplemented with 10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF), 10 ng/ml FGF1, 10 ng/ml FGF4, and 10 ng/ml FGF10 (all from R&D Systems). In hepatic maturation, cells were cultured for 8 days on Matrigel in L15 medium (Invitrogen) supplemented with 8.3% tryptose phosphate broth (BD biosciences), 10% FBS (Vita), 10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate (Sigma), 1 μ M insulin, 25 mM NaHCO₃ (Wako), 20 ng/ml HGF, 20 ng/ml Oncostatin M (OsM, R&D systems), and 10⁻⁶ M Dexamethasone (DEX, Sigma).

Results

Recently, we showed that the sequential transduction of *SOX17*, *HEX*, and *HNF4 α* into hESC-derived mesendoderm, DE, and hepatoblasts, respectively, leads to efficient generation of the hESC-hepa [5–7]. In the present study, to further improve the differentiation efficiency towards hepatocytes, we screened for hepatic differentiation-promoting transcription factors. Seven candidate genes involved in liver development were selected. We then examined the function of the hESC-hepa and hiPSC-hepa

generated by the optimized protocol for pharmaceutical use in detail.

Efficient hepatic differentiation by Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α transduction

To perform efficient DE differentiation, T-positive hESC-derived mesendoderm cells (day 2) (Supplementary Fig. 1) were transduced with Ad vector expressing various transcription factors (Ad-FOXA2, Ad-HEX, Ad-HNF1 α , Ad-HNF1 β , Ad-HNF4 α , Ad-HNF6, and Ad-SOX17 were used in this study). We ascertained the expression of *FOXA2*, *HEX*, *HNF1 α* , *HNF1 β* , *HNF4 α* , *HNF6*, or *SOX17* in Ad-FOXA2-, Ad-HEX-, Ad-HNF1 α -, Ad-HNF1 β -, Ad-HNF4 α -, Ad-HNF6-, or Ad-SOX17-transduced cells, respectively (Supplementary Fig. 2). We also verified that there was no cytotoxicity of the cells transduced with Ad vector until the total amount of Ad vector reached 12,000 VP/cell (Supplementary Fig. 3). Each transcription factor was expressed in hESC-derived mesendoderm cells on day 2 by using Ad vector, and the efficiency of DE differentiation was examined (Fig. 1A). The DE differentiation efficiency based on CXCR4-positive cells was the highest when Ad-SOX17 or Ad-FOXA2 were transduced (Fig. 1B). To investigate the difference between Ad-FOXA2-transduced cells and Ad-SOX17-transduced cells, gene expression levels of markers of undifferentiated cells, mesendoderm cells, DE cells, and extraembryonic endoderm cells were examined (Fig. 1C). The expression levels of extraembryonic endoderm markers of Ad-SOX17-transduced cells were higher than those of Ad-FOXA2-transduced cells. Therefore, we concluded that *FOXA2* transduction is suitable for use in selective DE differentiation.

To promote hepatic commitment, various transcription factors were transduced into DE cells and the resulting phenotypes were examined on day 9 (Fig. 1D). Nearly 100% of the population of Ad-FOXA2-transduced cells and Ad-HNF1 α -transduced cells was α -fetoprotein (AFP)-positive (Fig. 1E). We expected that hepatic commitment would be further accelerated by combining *FOXA2* and *HNF1 α* transduction. The DE cells were transduced with both Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α , and then the gene expression levels of *CYP3A7* [10], which is a marker of fetal hepatocytes, were evaluated (Fig. 1F). When both Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α were transduced into DE cells, the promotion of hepatic commitment was greater than in Ad-FOXA2-transduced cells or Ad-HNF1 α -transduced cells.

To promote hepatic expansion and maturation, we transduced various transcription factors into hepatoblasts on day 9 and 12 and the resulting phenotypes were examined on day 20 (Fig. 1G). We ascertained that the hepatoblast population was efficiently expanded by addition of HGF, FGF1, FGF4, and FGF10 (Supplementary Fig. 4). The hepatic differentiation efficiency based on asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)-positive cells was measured on day 20, demonstrating that *FOXA2*, *HNF1 α* , and *HNF4 α* transduction could promote efficient hepatic maturation (Fig. 1H). To investigate the phenotypic difference between Ad-FOXA2-, Ad-HNF1 α -, and Ad-HNF4 α -transduced cells, gene expression levels of early hepatic markers, mature hepatic markers, and biliary markers were examined (Fig. 1I). Gene expression levels of mature hepatic markers were up-regulated by *FOXA2*, *HNF1 α* , or *HNF4 α* transduction. *FOXA2* transduction strongly upregulated gene expression levels of both early hepatic markers and mature hepatic markers, while *HNF1 α* or *HNF4 α* transduc-

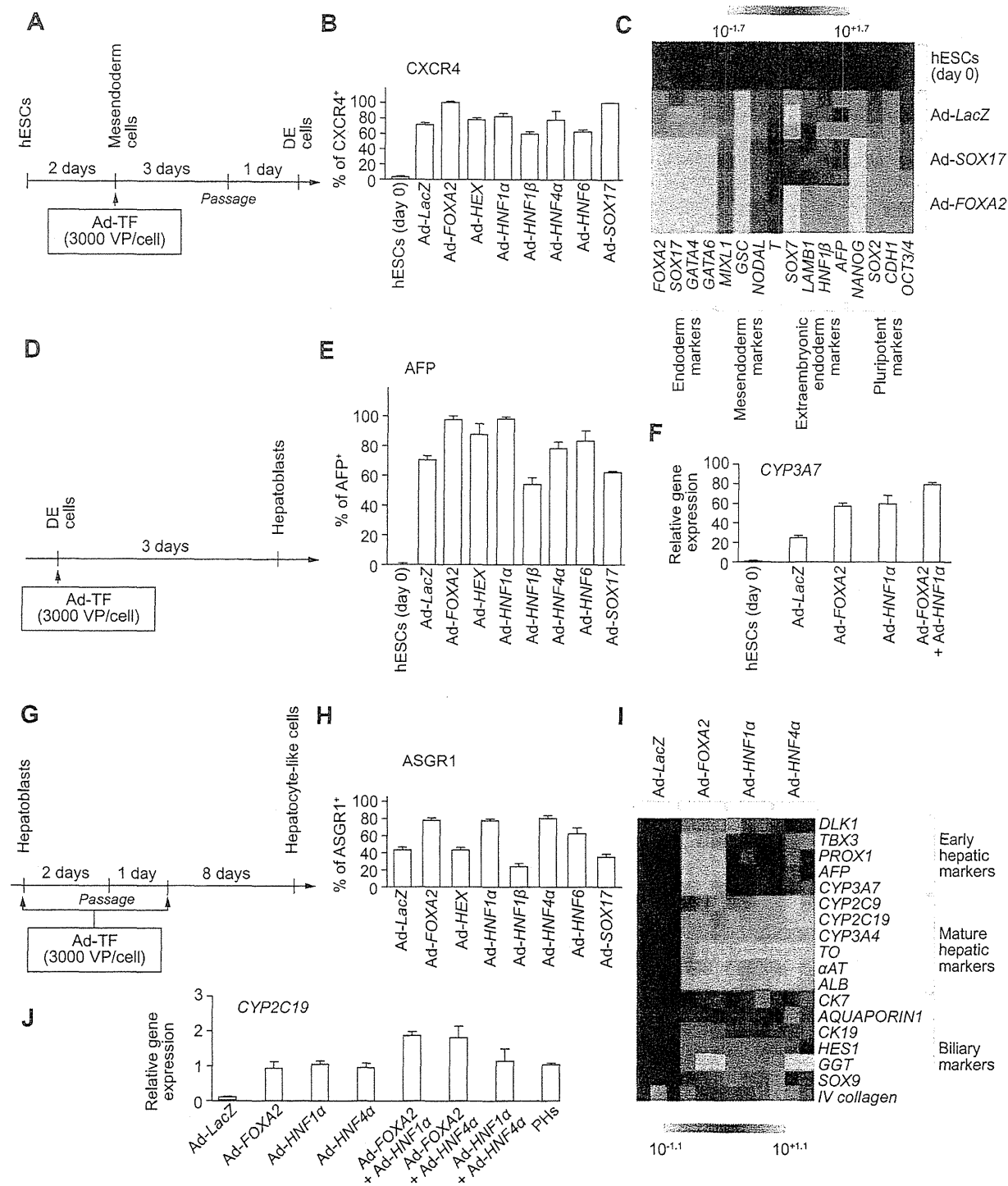
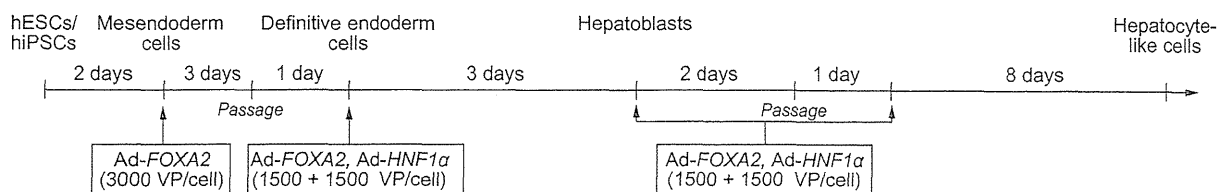


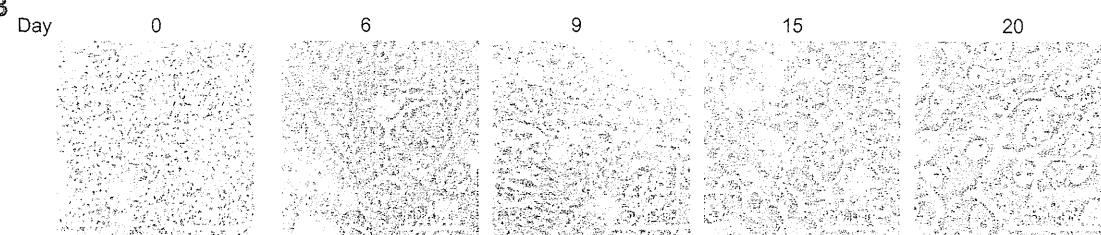
Fig. 1. Efficient hepatic differentiation from hESCs by FOXA2 and HNF1 α transduction. (A) The schematic protocol describes the strategy for DE differentiation from hESCs (H9). Mesoderm cells (day 2) were transduced with 3000 VP/cell of transcription factor (TF)-expressing Ad vector (Ad-TF) for 1.5 h and cultured as described in Fig. 2A. (B) On day 5, the efficiency of DE differentiation was measured by estimating the percentage of CXCR4-positive cells using FACS analysis. (C) The gene expression profiles were examined on day 5. (D) Schematic protocol describing the strategy for hepatoblast differentiation from DE. DE cells (day 6) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 h and cultured as described in Fig. 2A. (E) On day 9, the efficiency of hepatoblast differentiation was measured by estimating the percentage of AFP-positive

A

Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4
Definitive endoderm differentiation	Hepatic specification	Hepatic expansion	Hepatic maturation
Activin A (100 ng/ml), bFGF (10 ng/ml)	BMP4 (30 ng/ml), FGF4 (20 ng/ml)	HGF, FGF1, FGF4, FGF10 (10 ng/ml)	HGF, OsM (20 ng/ml), DEX (10^{-8} M)



B



C

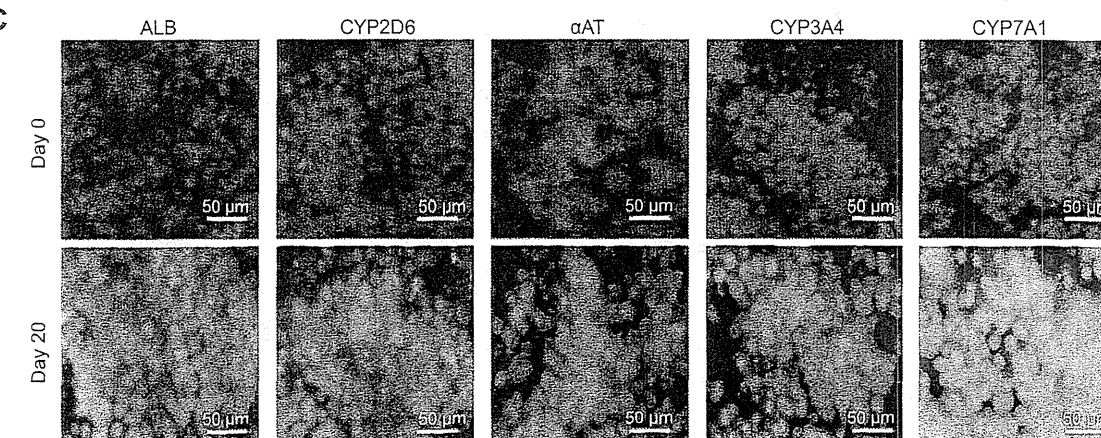


Fig. 2. Hepatic differentiation of hESCs and hiPSCs by FOXA2 and HNF1 α transduction. (A) The differentiation procedure of hESCs and hiPSCs into hepatocytes via DE cells and hepatoblasts is schematically shown. Details of the hepatic differentiation procedure are described in Materials and methods. (B) 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).

tion did not up-regulate the gene expression levels of early hepatic markers. Next, multiple transduction of transcription factors was performed to promote further hepatic maturation. The combination of Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α transduction and the com-

bination of Ad-FOXA2 and Ad-HNF4 α transduction result in the most efficient hepatic maturation, judged from the gene expression levels of CYP2C19 (Fig. 1J). This may happen because the mixture of immature hepatocytes and mature hepatocytes coor-

cells using FACS analysis. (F) The gene expression level of CYP3A7 was 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. (G) The schematic protocol describes the strategy for hepatic differentiation from hepatoblasts. Hepatoblasts (day 9) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-TF for 1.5 h and cultured as described in Fig. 2A. (H) On day 20, the efficiency of hepatic differentiation was measured by estimating the percentage of ASGR1-positive cells using FACS analysis. The detail results of FACS analysis are shown in Supplementary Table 1. (I) Gene expression profiles were examined on day 20. (J) Hepatoblasts (day 9) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-TFs (in the case of combination transduction of two types of Ad vector, 1500 VP/cell of each Ad-TF was transduced) for 1.5 h and cultured. 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 PHs, which were cultured for 48 h after the cells were plated, was taken as 1.0. All data are represented as mean \pm SD (n = 3).

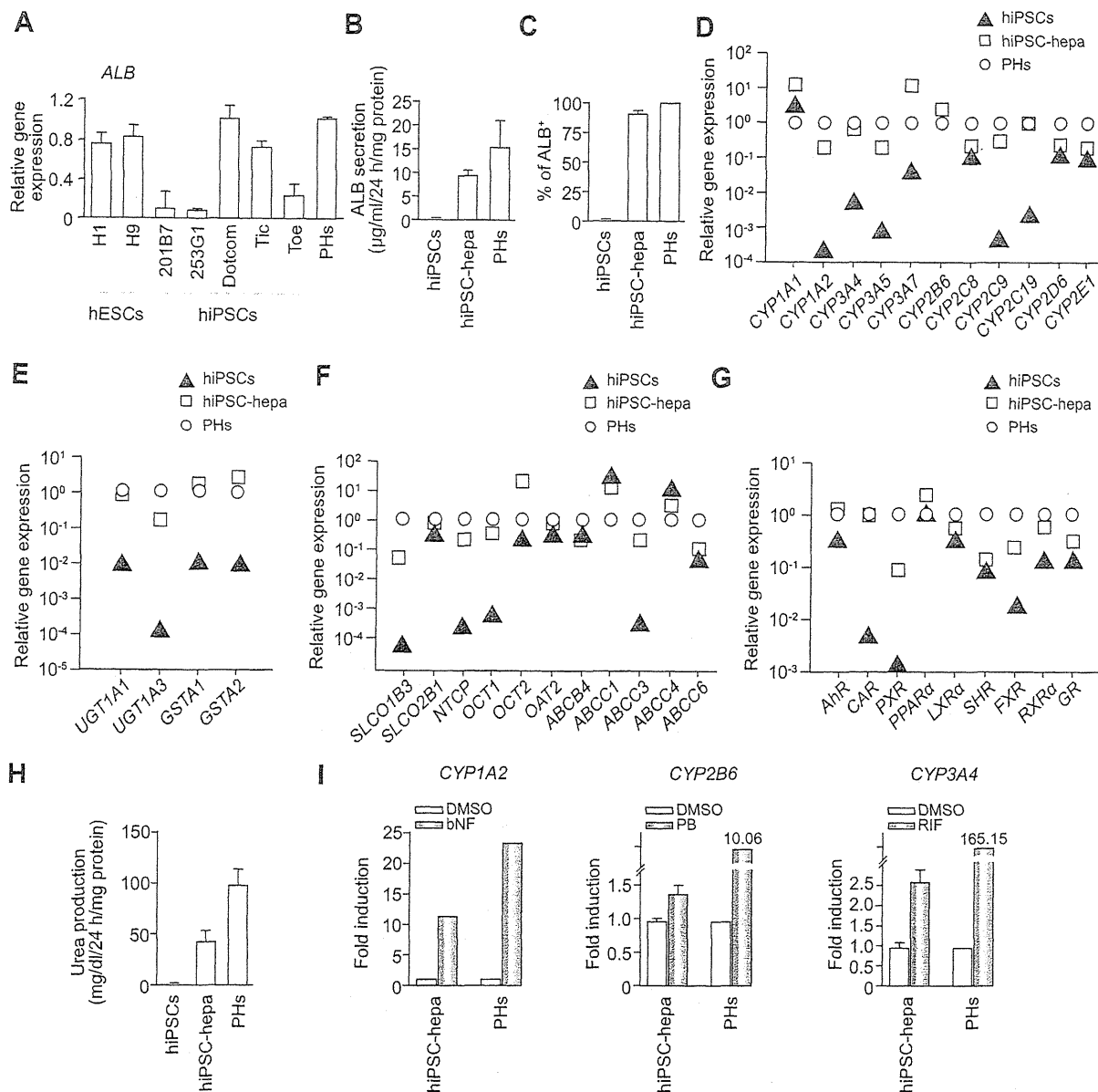


Fig. 3. The hepatic characterization of hiPSC-hepa. hESCs (H1 and H9) and hiPSCs (201B7, 253G1, Dotcom, Tic, and Toe) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 2A. (A) On day 20, the gene expression level of *ALB* was examined by real-time RT-PCR. On the y axis, the gene expression level of *ALB* in PHs, which were cultured for 48 h after cells were plated, was taken as 1.0. (B–I) hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocyte-like cells as described in Fig. 2A. (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 is indicated. (H) The amount of urea secretion was examined in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs. (I) Induction of *CYP1A2*, *2B6*, or *3A4* by DMSO or inducer (BNF, PB, or RIF) of hiPSC-hepa and PHs, cultured for 48 h after the cells were plated, was examined. On the y axis, the gene expression levels of *CYP1A2*, *2B6*, or *3A4* in DMSO-treated cells, which were cultured for 48 h, were taken as 1.0. All data are represented as mean \pm SD ($n = 3$).

dinately works to induce hepatocyte functions. Taken together, efficient hepatic differentiation could be promoted by using the combination of FOXA2 and HNF1 α transduction at the optimal stage of differentiation (Fig. 2A). At the stage of hepatic expansion and maturation, Ad-HNF4 α can be substituted for Ad-HNF1 α (Fig. 1J). Interestingly, cell growth was delayed by FOXA2 and

HNF4 α transduction (Supplementary Fig. 5). This delay in cell proliferation might be due to promoted maturation by FOXA2 and HNF1 α transduction. As the hepatic differentiation proceeds, the morphology of hESCs gradually changed into a typical hepatocyte morphology, with distinct round nuclei and a polygonal shape (Fig. 2B), and the expression levels of hepatic markers

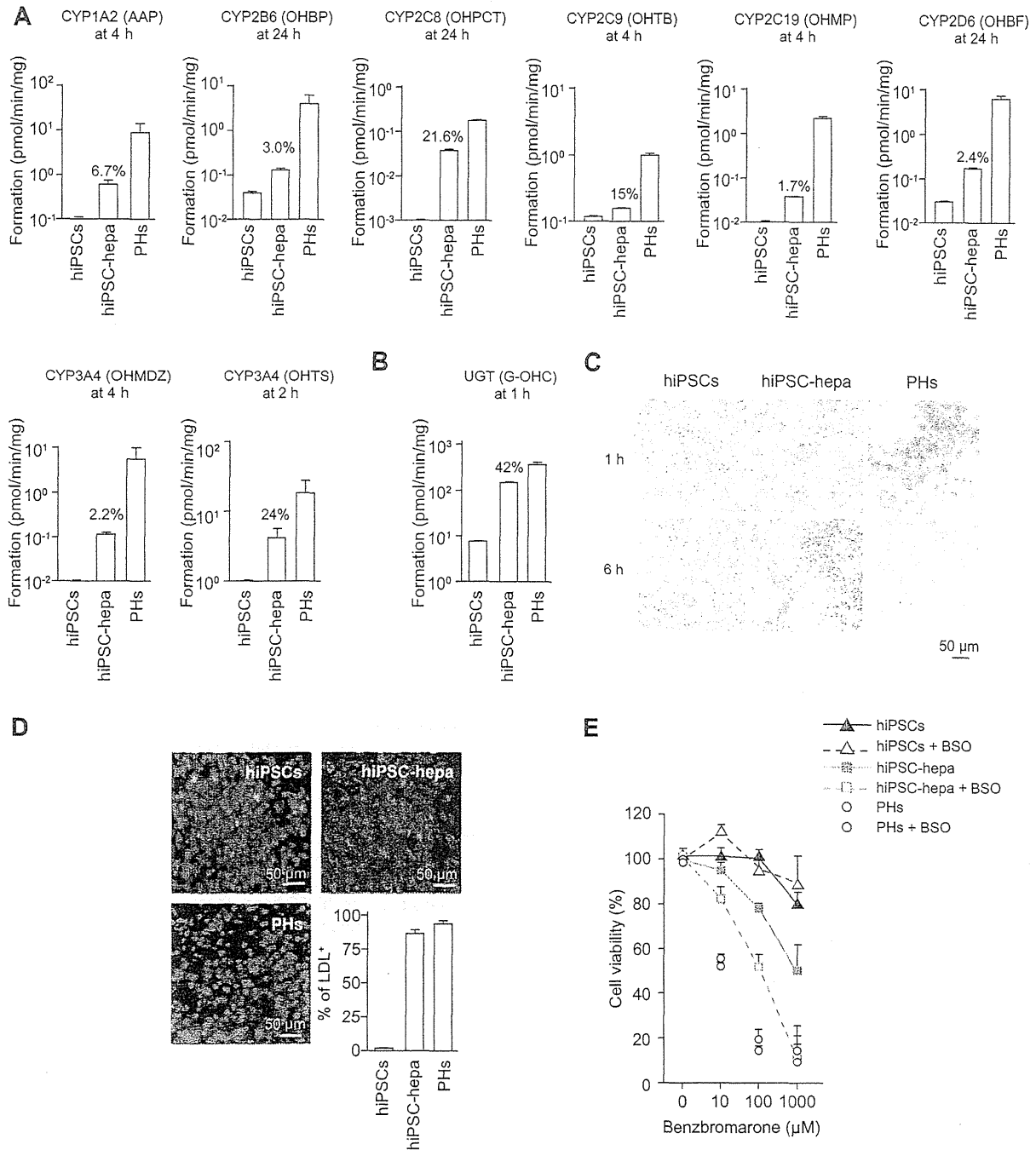


Fig. 4. Evaluation of the drug metabolism capacity and hepatic transporter activity of hiPSC-hepa. hiPSCs (Dotcom) were differentiated into hepatocytes as described in Fig. 2A. (A and B) Quantitation of metabolites in hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs, which were cultured for 48 h after the cells were plated, was examined by treating nine substrates (Phenacetin, Bupropion, Paclitaxel, Tolbutamide, S-mephenytoin, Bufuralol, Midazolam, Testosterone, and Hydroxyl coumarin; these compounds are substrates for CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A4 (A) and UGT (B), respectively), and then supernatants were collected at the indicated time. The quantity of metabolites (Acetaminophen [AAP], Hydroxybupropion [OHBP], 6 α -hydroxypaclitaxel [OHPCT], Hydroxytolbutamide [OHTB], 4'-hydroxymephenytoin [OHMP], 1'-hydroxybufuralol [OHBF], 1'-hydroxymidazolam [OHMDZ], 6 β -hydroxytestosterone [OHTS], 7-Hydroxycoumarin glucuronide [G-OHC], respectively) was measured by LC-MS/MS. The ratios of the activity levels in hiPSC-hepa to the activity levels in PHs rate are indicated in the graph. (C) hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs were examined for their ability to take up ICG (top) and release it 6 h thereafter (bottom). (D) hiPSCs, hiPSC-hepa, and PHs were cultured with medium containing Alexa-Flour 488-labeled LDL (green) for 1 h, and immunohistochemistry was performed. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The percentage of LDL-positive cells was also measured by FACS analysis. (E)

Research Article

(ALB, CYP2D6, alpha-1-antitrypsin [α AT], CYP3A4, and CYP7A1) increased (Fig. 2C). Hepatic gene expression levels (Supplementary Fig. 6A), amount of ALB secretion (Supplementary Fig. 6B), and CYP2C9 activity level (Supplementary Fig. 6C) of Ad-FOXA2- and Ad-HNF1 α -transduced cells were significantly higher than those of Ad-SOX17-, Ad-HEX-, and Ad-HNF4 α -transduced cells. These results indicated that FOXA2 and HNF1 α transduction promotes more efficiently hepatic differentiation than SOX17, HEX, and HNF4 α transduction.

Characterization of the hESC-hepa/hiPSC-hepa

As we have previously reported [6], hepatic differentiation efficiency differs among hESC/hiPSC lines. Therefore, it is necessary to select a hESC/hiPSC line that is suitable for hepatic maturation in the case of medical applications such as drug screening. In the present study, two hESC lines and five hiPSCs lines were differentiated into hepatocyte-like cells, and then their gene expression levels of ALB (Fig. 3A) and CYP3A4 (Supplementary Fig. 7A), and their CYP3A4 activities (Supplementary Fig. 7B) were compared. These data suggest that the iPSC line, Dotcom [11,12], was the most suitable for hepatocyte maturation. To examine whether the iPSC (Dotcom)-hepa has enough hepatic functions as compared with PHs, the amount of albumin (ALB) secretion (Fig. 3B) and the percentage of ALB-positive cells (Fig. 3C) were measured on day 20. The amount of ALB secretion in hiPSC-hepa was similar to that in PHs and the percentage of ALB-positive cells was approximately 90% in iPSC-hepa. We also confirmed that the gene expression levels of CYP enzymes (Fig. 3D), conjugating enzymes (Fig. 3E), hepatic transporters (Fig. 3F), and hepatic nuclear receptors (Fig. 3G) in hiPSC-hepa were similar to those of PHs, although some of them were still lower than those of PHs. Because the gene expression level of the fetal CYP isoform, CYP3A7, in hiPSC-hepa was higher than that of PHs, mature hepatocytes and hepatic precursors were still mixed. We have previously confirmed that Ad vector-mediated gene expression in the hepatoblasts (day 9) continued until day 14 and almost disappeared on day 18 [7]. Therefore, the hepatocyte-related genes expressed in hiPSC-hepa are not directly regulated by exogenous FOXA2 or HNF1 α . Taken together, endogenous hepatocyte-related genes in hiPSC-hepa should have been upregulated by FOXA2 and HNF1 α transduction.

To further confirm that hiPSC-hepa have sufficient levels of hepatocyte functions, we evaluated the ability of urea secretion (Fig. 3H) and glycogen storage (Supplementary Fig. 8). The amount of urea secretion in hiPSC-hepa was about half of that in PHs. HiPSC-hepa exhibited abundant storage of glycogen. Because CYP1A2, 2B6, and 3A4 are involved in the metabolism of a significant proportion of the currently available commercial drugs, we tested the induction of CYP1A2, 2B6, and 3A4 by chemical stimulation (Fig. 3I). CYP1A2, 2B6, and 3A4 are induced by β -naphthoflavone [bNF], phenobarbital [PB], or rifampicin [RIF], respectively. Although undifferentiated hiPSCs did not respond to either bNF, PB, or RIF (data not shown), hiPSC-hepa produced

more metabolites in response to chemical stimulation, suggesting that inducible CYP enzymes were detectable in hiPSC-hepa (Fig. 3I). However, the induction potency of CYP1A2, 2B6, and 3A4 in hiPSC-hepa were lower than that in PHs.

Drug metabolism capacity and hepatic transporter activity of hiPSC-hepa

Because metabolism and detoxification in the liver are mainly executed by CYP enzymes, conjugating enzymes, and hepatic transporters, it is important to assess the function of these enzymes and transporters in hiPSC-hepa. Among the various enzymes in liver, CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4, UGT are the important phase I and II enzymes responsible for metabolism. Nine substrates, Phenacetin, Bupropion, Paclitaxel, Tolbutamide, *S*-mephenytoin, Bufuralol, Midazolam, Testosterone, and Hydroxyl coumarin, which are the substrates of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A4 (Fig. 4A), and UGT (Fig. 4B), respectively, were used to estimate the drug metabolism capacity of hiPSC-hepa compared with that of PHs. To precisely estimate the drug metabolism capacity, the amounts of metabolites were measured during the phase when production of metabolites was linear (Supplementary Fig. 9). These results indicated that our hiPSC-hepa have the capacity to metabolize these nine substrates, although the activity levels were lower than those of PHs. The hepatic functions of hiPSC-hepa were further evaluated by examining the ability to uptake Indocyanine Green (ICG) and LDL (Fig. 4C and D, respectively). In addition to PHs, hiPSC-hepa had the ability to uptake ICG and to excrete ICG in a culture without ICG for 6 h (Fig. 4C), and to uptake LDL (Fig. 4D). These results suggest that hiPSC-hepa have enough CYP enzyme activity, conjugating enzyme activity, and hepatic transporter activity to metabolize various drugs.

To examine whether our hiPSC-hepa could be used to predict metabolism-mediated toxicity, hiPSC-hepa were incubated with Benzbromarone, which is known to generate toxic metabolites, and then cell viability was measured (Fig. 4E). Cell viability of hiPSC-hepa was decreased depending on the concentration of Benzbromarone. However, cell viability of hiPSC-hepa was much higher than that of PHs. To detect drug-induced cytotoxicity with high sensitivity in hiPSC-hepa, these cells were treated with Buthionine-SR-sulfoximine (BSO), which depletes cellular GST, and result in a decrease of cell viability of hiPSC-hepa as compared with that of non-treated cells (Fig. 4E). These results indicated that hiPSC-hepa would be more useful in drug screening under a condition of knockdown of conjugating enzyme activity.

Discussion

The establishment of an efficient hepatic differentiation technology from hESCs and hiPSCs would be important for the application of hESC-hepa and hiPSC-hepa to drug toxicity screening. Although we have previously reported that sequential transduc-

The cell viability of hiPSCs, hiPSC-hepa, PHs, and their BSO-treated cells (0.4 mM BSO was pre-treated for 24 h) was assessed by Alamar Blue assay after 48-hr exposure to different concentrations of benzbromarone. The cell viability is expressed as a percentage of that in cells treated only with solvent. All data are represented as mean \pm SD (n = 3).