

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
化粧品等の QSAR/in silico/インフォマテクス技術等の安全性評価応用
に関する調査研究
平成 25 年度分担研究報告

- in silico 予測系を iPS 細胞等の実験系に適用していくための検討課題
や問題点の調査 -

研究分担者：松永 民秀（名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授）

研究要旨：ヒト iPS 細胞由来肝細胞あるいは腸管上皮細胞は、創薬研究等における薬物動態試験あるいは安全性評価試験等への応用が強く期待されている。本研究では、薬物動態試験あるいは安全性評価応用において *in silico* 予測系を iPS 細胞等の実験系に適用していくための検討課題や問題点を明確にするために、ヒト iPS 細胞の肝細胞及び腸管上皮細胞への分化誘導について、文献調査及び学会参加による情報収集を行った。その結果、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導については多くの報告がなされているが、胎児等の未成熟な細胞の特徴を有しているのが問題であった。また、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化に関する報告は、肝細胞への分化と比較して顕著に少ないため、これからの研究の進展が期待される。

キーワード：ヒト iPS 細胞、肝細胞、腸管上皮細胞、薬物動態試験、安全性評価

A. 研究目的

現在使用されている医薬品の多くは、投与が容易で低侵襲性であることから、散剤、錠剤、カプセル剤など、経口投与の剤形として開発されている。経口投与される医薬品の効果は、経口アベイラビリティによって大きく影響されるため、その予測は医薬品の適正使用及び安全性・有効性評価に極めて重要である。経口アベイラビリティは、消化管粘膜透過率、消化管壁での非代謝率及び肝臓での抽出・代謝を免れる率を用いて表わすことができる。経口アベイラビリティを予測する方法は、*in vitro* での手法や実験動物を用いた代謝実験結果を生理学的モデルに組み込むことにより、ある程度可能である。しかし、薬物動態関連酵

素の性質には種差があるため、吸収と初回通過代謝の結果決定される経口バイオアベイラビリティのより正確な予測にはヒト正常細胞あるいは組織等を用いたモデル系が望ましい。そこで、肝臓に関してはヒト肝ミクロソームや肝細胞等を用いて解析が行われているが、肝ミクロソームは可溶性酵素や誘導の評価に欠ける。また、ヒト肝細胞はロット間差が大きく、量に限りがあるうえに非常に高価である。一方、小腸は代謝の寄与が小さいと考えられ、主に吸収・排泄が注目されてきた。しかし、門脈血液中の非結合型薬物のみがその影響を受ける肝代謝に対し、小腸では上皮細胞を透過する際にほぼ全ての薬物が代謝酵素に暴露される。そのため、代謝酵素の絶対量以上に小腸の寄与は大きく、

CYP3A で代謝される医薬品の体内動態や薬物相互作用に小腸初回通過代謝が大きく関与することが最近知られるようになってきた。しかし、ヒト正常小腸上皮細胞の入手は現時点で不可能である。このため、薬物の吸収・排泄の予測には大腸がん由来 Caco-2 細胞が最もよく利用されているが、薬物トランスポーター発現が小腸組織と異なる上に、CYP3A4 など薬物代謝酵素の発現が極めて低い。また、受容体 PXR が発現していないため酵素誘導の評価ができないなど様々な欠点がある。一方、消化管壁での非代謝率予測を容易にするために、小腸組織の様なヒト *in vitro* 系 (*Eur J Pharm Sci* **48**:166-180, 2013) 及びヒト小腸/十二指腸マイクロソーム (*Drug Metab Dispos* **39**:1633-1642, 2011) を用いて評価されてきた。しかし、高い代謝能を有する組織の入手の困難さや、適切な scaling factor に対するコンセンサスの欠如などにより、定量的な利便性は限られている。

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、様々な細胞に分化可能な分化多能性を有し、ほぼ無限の増殖能をもつ細胞である。ヒト iPS 細胞は体細胞から樹立することが出来るためヒト胚を滅失して作製されるヒト胚性幹細胞の様な生命倫理的な問題が少なく、再生医療のみならず薬物動態試験、安全性評価等の新規実験材料としても世界中で注目されている。また、疾患特異的 iPS 細胞研究は稀少疾病等の疾患メカニズム研究への利用も期待されている。

そこで、薬物動態試験あるいは安全性評価応用において *in silico* 予測系を iPS 細胞等の実験系に適応していくための検討課題や問題点を明確にするために、ヒト iPS 細胞の肝細胞及び腸管上皮細胞への分化誘導について、文献調査及び学会参加による情報収集を行った。

B. 研究方法

本年度は新規実験材料として期待される iPS

細胞の肝細胞及び腸管上皮細胞への分化誘導並びにこれら細胞機能について、文献調査及び学会参加を通じて情報収集を行った。

C. 研究結果

(1) ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導にサイトカイン類の液性因子を用いる方法がこれまで多数報告されている (*Hepatology* **51**:1754-65, 2010 他)。しかし、液性因子のみを用いる方法は効率の面で不十分なうえに、液性因子が高価であるため非常に経費がかかることが問題である。近年、液性因子に加え肝細胞への分化に関与する複数の核内転写因子の遺伝子をウイルスベクターにて過剰発現させ、分化を促進させる方法が報告された (*J Hepatol* **57**:628-636, 2012)。さらに、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト間葉系幹細胞と共培養させることにより組織としての肝臓を構築させる方法 (*Nature* **499**:481-484, 2013) が報告された。これらの方法は、液性因子のみを用いる方法と比較して非常に手間がかかり、またウイルス等の異物の混入の可能性が避けられないが、肝機能が顕著に向上したと報告されている。著者らも、核内転写因子 HNF6 を導入することにより、最低限の液性因子の添加で肝細胞マーカーや薬物代謝酵素の顕著な発現量増加及び代謝酵素の誘導など、ヒト凍結肝細胞とほぼ同等の機能を獲得することを報告している (*Drug Metabol Pharmacokinet* **28**:250-259, 2013)。

近年、低分子化合物による分化誘導が、特に再生医療を念頭に、安全性及び低コスト化を目的に研究が行われている。著者らも、低分子化合物を用いることで、最低限の液性因子の使用においてもヒト iPS 細胞を効率よく肝細胞に分化誘導する方法を確立した (特許申請 特願 2012-131240、PCT/JP2013/065298 松永民秀ら、「人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導

する方法」)。また、この方法により得られた肝細胞は、薬物代謝誘導能及び薬物代謝活性を有し、アセトアミノフェンによる肝細胞毒性評価が可能である。

しかし、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化における核内転写因子及び低分子化合物の利用においても、液性因子の添加が必要であり、分化誘導の全過程を網羅するものはこれまで報告されていない。言い換えれば、遺伝子導入や低分子化合物のみでは、高い機能を有する肝細胞を効率よく分化誘導することは現時点では困難である。例えば、低分子化合物による分化誘導において最も問題となるのは内胚葉への分化と成熟過程である。すなわち、ヒト iPS 細胞から内胚葉に分化するのにほとんどの研究者はアクチビン A を用いており、著者らも同じ方法で行っている (Fig. 1)。マウス ES/iPS 細胞においては低分子化合物 (IDE-1, IDE-2 等) により、効率よく内胚葉に分化することが知られており、既に試薬として販売されている。しかし、ヒト iPS 細胞においては内胚葉への分化は困難である。そのため、アクチビン A に匹敵する低分子化合物を見出すことが非常に重要である。著者らは、内胚葉から肝芽細胞への分化にジメチルスルホキシド (DMSO) を用いている (Fig. 1)。また、肝芽細胞から肝細胞への分化には、デキサメタゾン (DEX) に加えて、肝細胞増殖因子 (HGF) とオンコスタチン M (OSM) を用いている。肝芽細胞から肝細胞への分化と成熟化にデキサメタゾン、肝細胞増殖因子、オンコスタチン M 処理が多くの報告で行われている最も一般的な方法である。しかし、この方法では胎児肝特異的な α -フェトプロテインの高発現が認められることから (Fig. 2)、胎児様の性質であることが示唆される。

内胚葉への分化は、低分子化合物に限らなければアクチビン A で十分である。しかし、肝細胞の成熟化に関しては核内転写因子の過剰発

現や他の細胞との共培養など様々な方法が試みられているが、世界的に十分使用に耐えられるものは作り出されておらず、最も大きな課題とされている。現在、最大の欠点である未熟性を克服するは容易でなく、更なる研究が必要と考えられる。

(2) ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化

シトクロム P450 3A (CYP3A) と P 糖タンパク質 (MDR1/P-gp) に対して重複する基質においては相乗的な相互作用が考えられている (*Int J Pharm* 277:3-9, 2004; *Curr Drug Metab* 14:102-111, 2013)。また、小腸には CYP3A と共に複数のグルクロン酸転移酵素 (UGT) が高発現しており、これらによる初回通過代謝が、Raloxifene をはじめとする薬物の低い経口バイオアベイラビリティの要因であることも報告されている (*Drug Metab Pharmacokin* 26:592-601, 2011)。さらに、カルボキシエステラーゼや還元酵素の予測の重要性も指摘されており (*Life Sci* 81:924-932, 2007; *Drug Metab Dispos* 41:1104-1111, 2013)、総合的な小腸代謝評価の重要性が非常に高まっている (*Drug Metab Rev* 43:476-498, 2011; *Drug Metab Dispos*, 2013 Aug 5. [Epub ahead of print])。

腸管幹細胞から腸管上皮細胞への分化には、幹細胞ニッチといわれる微小環境が重要であり、Wnt, BMP, Notch 等のシグナル経路が関与する (*Gastroenterology* 134: 849-864, 2008)。また、MEK/ERK 経路も腸管上皮細胞の分化に関与するとの報告もある (*Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 301: G719-730, 2011)。一方、Hino らは腸管特異的遺伝子群を制御している HNF-1 α が miR-194 も制御していることを明らかにし、miRNA が腸管上皮細胞の成熟に重要な役割を果たしている可能性を示唆した (*RNA* 14:1433-1442, 2008)。また、Liao らは腸管上皮細胞の分化誘導に関与する TGF- β の恒常性に

miR-146b が重要な役割を演じていると報告している (*Genes Nutr* 8:69-78, 2013.)。

肝細胞への分化と比較して、iPS 細胞から腸管組織への分化誘導に関する知見は非常に乏しく、2010 年にマウス iPS 細胞から胚様体を形成し、腸管組織を作成したとの報告が最初である (*Biochem. Biophys Res Commun* 391:38-42, 2010)。その後、腸管上皮幹細胞の培養法を応用し、初めてヒト iPS 細胞から腸管様構造を形成させたとの報告がなされた (*Nature* 470:105-109, 2011)。ごく最近、Ogaki らは Wnt 及び Notch シグナルに影響する低分子化合物が腸管細胞系譜への分化を促進するとの報告を行った (*Stem Cells* 31:1086-1096, 2013)。しかし、これらの報告において、薬物動態の機能に関する解析は全くなされておらず不明である。

著者らは、ヒト iPS 細胞をアクチビン A にて内胚葉に、FGF2 にて腸管幹細胞に分化後、EGF にて腸管上皮細胞へと分化誘導する方法を確立した (Fig. 3, *Drug Metabol. Pharmacokin* 29:44-51, 2014)。本法にて分化した腸管上皮細胞において、腸管上皮細胞特異的に発現するマーカー mRNA の発現 (Fig. 4) 及び sucrase-isomaltase のタンパク質発現が認められた。また、本細胞はペプチドトランスポーターの基質の取り込み機能を有していることが明らかになった。これらの結果は、ヒト iPS 細胞が特徴的な機能を有する腸管上皮細胞に分化したことを意味するものである。しかし、本法において分化した場合、sucrase-isomaltase 抗体で染色されるのは 10%程であり、分化効率の低さが課題であった。そこで、肝細胞への分化誘導の場合と同様、サイトカイン類に加え、複数の低分子化合物を添加したところ、50%以上の細胞に sucrase-isomaltase のタンパク質発現が認められた。また、CYP の活性に加え、UGT 及び SULT 活性も認められた。さらに、腸管上皮細胞特徴的な機能として CYP3A4 の活性化型ビタミン D₃

による顕著な誘導も認められたことから、機能を有する細胞に分化したことが示唆された。本技術は、現在特許申請中であり、詳細な記載はできないが、これまでヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞で薬物動態機能を評価した初めての細胞である。

D. 考察

ヒト iPS 細胞から薬物代謝能および薬物輸送能を有する腸管上皮細胞が作製できれば、小腸における薬物動態研究に多大なる影響を与えることができる。また、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞及び腸管上皮細胞を用いて薬物動態の評価系が構築されれば、より優れた動態特性を有する医薬品の開発にも貢献できるものと考えられる。さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞及び腸管上皮細胞の結果を、臨床研究から得られる初回通過バイオアベイラビリティの結果と比較し、そのギャップを *in silico* で補正できれば今後薬物動態試験での利用が期待できる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞由来の未熟な肝細胞の結果から、成熟した肝細胞における薬物動態あるいは安全性評価の結果を *in silico* の手法を用いて予測し、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞との組み合わせによる評価系ができれば、iPS 細胞の創薬研究への利用は加速するものと思われる。

F. 研究発表

1. 奥村 啓樹、鶴飼 茜、佐藤 大介、宮本 智美、三好 一郎、平林 真澄、中村 克徳、松永 民秀：プラストシストインジェクションによるラット iPS 細胞由来細胞を持つキメラマウスの作出。日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本, 30pmL-116S)
2. 小野里 太智、佐藤 大介、小枝 暁子、

中村 克徳、松永 民秀:カニクイザル皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立. 日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本、30pmL-117S)

3. 大手 万里子、佐藤 大介、前田 徹、中村 克徳、松永 民秀:糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞を用いた好中球モデルにおける PKC を介した NOX2 活性化機序の解明. 日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本、30pmL-118S)

G. 知的所有権の取得状況

無し

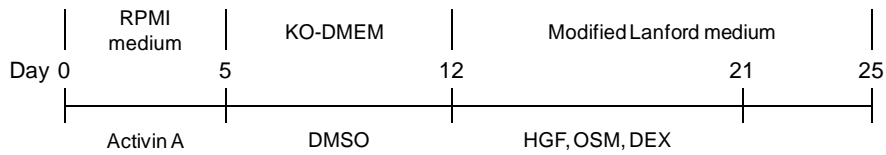


Fig. 1. Schematic of the protocol for the differentiation into hepatocytes from 2 human iPS cell lines. Two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were differentiated into endoderm cells by addition of 100 ng/mL activin A for 5 days, and then into hepatocytes by the addition of 1% DMSO for 7 days. The hepatocytes were then matured by the addition of 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, and 100 nM DEX for 9 days. For the final 4 days, the cells were cultured in modified Lanford medium alone, without HGF, OSM, and DEX.

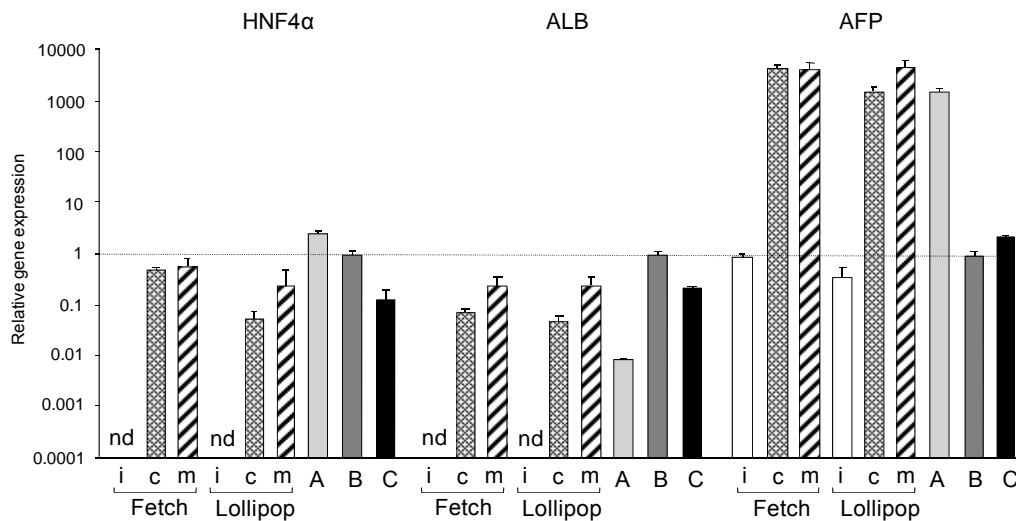


Fig. 2. Expression levels of liver marker protein mRNAs. The expression levels of HNF4 α , ALB, and AFP mRNAs in undifferentiated human iPS cells (i) and hepatocyte-like cells differentiated from two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were analyzed using real-time PCR. Collagen I (c) or Matrigel (m) was used for the differentiation as the extracellular matrix. A, B, and C present HepG2 cells, human adult liver, and hepatocytes, respectively, as positive controls. Each bar represents the mean \pm SD from triplicate experiments. Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the liver was taken as 1. nd, not detected.

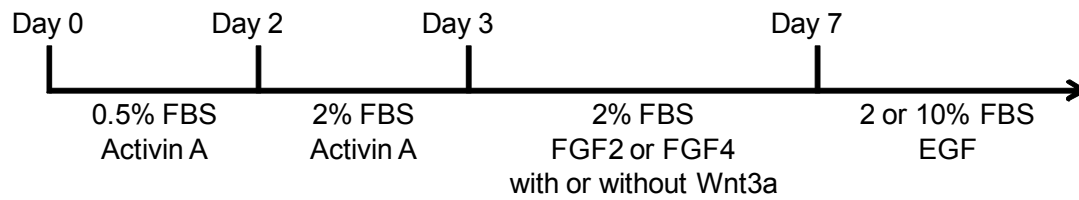


Fig. 3. Schematic of the protocol for the differentiation of human iPS cells into enterocytes

Human iPS cells were cultured in the presence of activin A (100 ng/ml) for 3 days. The cells were further cultured in medium containing FGF2 (250 ng/ml) or FGF4 (250 ng/ml) with or without Wnt3a (50 ng/ml) for 4 days. After 7 days of differentiation, the cells were treated with Y-27632 (10 μ M), passaged, and subsequently cultured in the presence of 2% or 10% FBS and EGF (20 ng/ml) for 19 days.

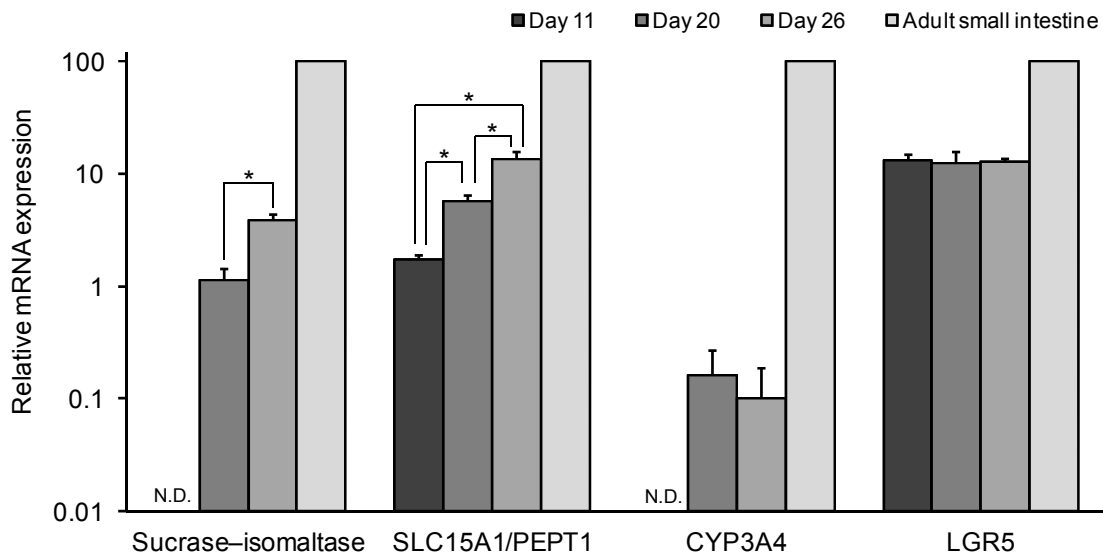


Fig. 4. Time-dependent variation in mRNA expression levels of sucrase-isomaltase, SLC15A1/PEPT1, and LGR5 in differentiated enterocyte-like cells

Human iPS cells were cultured in the presence of activin A for 3 days. The cells were further cultured in medium containing FGF2 for 4 days and then in the presence of 2% FBS and EGF for 4, 13, or 19 days. After 11, 20, or 26 days of differentiation, total RNA was extracted and mRNAs were analyzed by SYBR Green real-time RT-PCR. mRNA expression levels were normalized relative to that of GAPDH. Gene expression levels are represented relative to the level in the adult small intestine, which is set as 100. The adult small intestine was used as a positive control. Data are presented as the mean \pm S.D. (n = 4) except for the adult small intestine. N.D.; not detected. Levels of statistical significance compared among all groups; *P < 0.01.