

201306017A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

種々のバリエーションを有したヒトiPS細胞由来  
分化誘導肝細胞の作製と毒性評価系への応用

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水口裕之

平成26（2014）年4月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

種々のバリエーションを有したヒトiPS細胞由来  
分化誘導肝細胞の作製と毒性評価系への応用

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水口裕之

平成26（2014）年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

種々のバリエーションを有したヒトiPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製 と毒性評価系への応用	----- 1
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 肝細胞分化誘導プロジェクト)	

### II. 分担研究報告

ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と毒性評価系の開発	----- 4
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 肝細胞分化誘導プロジェクト)	
劇症患者由来iPS細胞の作製	----- 13
梅澤 明弘 (独立行政法人国立成育医療研究センター 再生医療センター長)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 15
---------------------	----------

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

種々のバリエーションを有したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製  
と毒性評価系への応用

研究代表者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 肝細胞分化誘導プロジェクト 招へいプロジェクトリーダー

薬物誘発性肝障害（肝毒性）は、医薬品の開発中止や市販後の警告、販売中止に至る主要な有害事象である。ヒト組織の利用により毒性評価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、継続性の観点から実現は困難である。さらに、薬物代謝酵素の活性に個人差（10 倍～1000 倍以上）が大きいことが正確に肝毒性を評価することが困難な原因となっている。そこで本研究では、iPS 細胞技術を駆使することで個人差を反映した薬剤の肝毒性評価系の開発を行う。

本年度は、①ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発の改良を進めるとともに、②平均的な薬物代謝酵素活性を有したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の他に、薬物代謝酵素の活性が個人差の下限レベルである肝細胞や、上限レベルである肝細胞を作製するため、ヒト初代培養肝細胞からヒト iPS 細胞を樹立し、肝細胞への分化誘導を進めるとともに、その肝細胞機能の解析に着手した。さらに、③薬物が主病因となって発症した劇症患者由来 iPS 細胞を用いて肝細胞を分化誘導し、極めて稀な薬物代謝酵素の遺伝子多型を有する評価細胞を作製するための手続きを行った。その結果、

- ① FOXA2、HNF1 $\alpha$  を共搭載した Ad ベクターの方が、FOXA2、HNF1 $\alpha$  を個別に搭載した Ad ベクターよりも肝分化促進効果が強いことを明らかにした。
- ② ヒト初代培養肝細胞からヒト iPS 細胞を樹立することに成功し、若い継代数のヒト肝細胞由来 iPS 細胞は高い肝分化能を有することを明らかにした。
- ③ 劇症肝炎を含む小児先天性代謝異常症から iPS 細胞を樹立するための倫理申請を完了した。

分担研究者

梅澤明弘 国立成育医療研究センター

により毒性評価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、継続性の観点から実現は困難である。さらに、薬物代謝酵素の活性に個人差（10 倍～1000 倍以上）が大きいことが正確に肝毒性を評価することが困難な原因となっている。そこで本研究では、iPS 細胞技術を

A. 研究目的

薬物誘発性肝障害（肝毒性）は、医薬品の開発中止や市販後の警告、販売中止に至る主要な有害事象である。ヒト組織の利用

駆使することで個人差を反映した薬剤の肝毒性評価系の開発を行う。具体的には、①ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発の改良を進めるとともに、②平均的な薬物代謝酵素活性を有したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の他に、薬物代謝酵素の活性が個人差の下限レベルである肝細胞や、上限レベルである肝細胞を作製する。さらに、③薬物が主病因となって発症した劇症患者由来 iPS 細胞を用いて肝細胞を分化誘導し、極めて稀な薬物代謝酵素の遺伝子多型を有する評価細胞を作製する。最終的には、④これらの毒性評価細胞パネルを用いた毒性評価や、酵素誘導の評価系の確立を行う。

## B. 研究方法

本研究は、研究代表者水口、研究分担者（梅澤）の計 2 名が遂行した。当該年度においては、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と毒性評価系の開発、および劇症患者由来 iPS 細胞の作製、に分けて遂行された。

## C. 研究結果

### 1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と毒性評価系の開発

まず、ヒト iPS 細胞から成熟した分化誘導肝細胞を作製する技術の改良を行うこととした。これまでに我々は FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することにより、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進できることを報告してきた (J. Hepatol. 57, 628-636, 2012)。その際に、これらの遺伝子を別々の Ad ベクターに搭載して遺伝子導入していたが、遺伝子導入による分化促進効果をさらに強めるために、FOXA2、HNF1 $\alpha$  を共搭載した Ad ベクター

(Ad-FOXA2-HNF1 $\alpha$ ) を作製した。Ad-FOXA2-HNF1 $\alpha$  をヒト iPS 細胞由来の分化途中の細胞に作用させたところ、FOXA2、HNF1 $\alpha$  を別々の Ad ベクターに搭載して作用させた時と比べて、 $\alpha$ AT 遺伝子発現量が約 1.5 倍増加した。また、ALB 産生量が約 11  $\mu$ g/ml/24h/mg protein から約 14  $\mu$ g/ml/24h/mg protein まで増加した。さらに、CYP3A4 活性は約 1.3 倍に増加した。以上のことから、FOXA2、HNF1 $\alpha$  を共搭載した Ad ベクターの方が、FOXA2、HNF1 $\alpha$  を個別に搭載した Ad ベクターよりも肝分化促進効果が強いことが分かった。

次に、薬物代謝酵素活性の個人差を反映したヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製するために、平均的な薬物代謝活性を有するヒト初代培養肝細胞および、薬物代謝活性が上限・下限であるヒト初代培養肝細胞を購入し、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。

ヒト初代培養肝細胞 (PHHs) からヒト iPS 細胞を作製するために、山中 4 因子を搭載したセンダイウイルスベクター (SeV-4F) を用いた。PHHs に山中 4 因子を遺伝子導入することで、典型的な iPS 様コロニーが多数出現した。また、それらのコロニーはアルカリフォスファターゼ陽性であった。さらに、これらのコロニーにおいて、各種未分化マーカー (NANOG、OCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-81) が発現していることを確認した。したがって、PHHs からヒト iPS 細胞が樹立できたことが明らかとなった。以後、PHHs 由来ヒト iPS 細胞と PHH-iPSCs と表記する。

PHH-iPSCs の性質をさらに詳細に評価するために、PHH-iPSCs における未分化関連遺伝子および肝関連遺伝子の発現を解析した。その結果、PHH-iPSCs における未分化関連遺伝子の発現量はヒト ES 細胞である K3 やヒト iPS 細胞である Toe と同程度であり、PHHs よりも有意に高いこと

が確認できた。また、PHH-iPSCs における肝関連遺伝子発現量は K3 や Tic と同程度であり、PHHs よりも有意に低いことが示された。以上の結果から PHH-iPSCs は未分化能を獲得しており、肝細胞ではないことが示唆された。

若い継代数のヒト iPS 細胞は、元の細胞の性質を引き継ぐことが知られているため、様々な継代数（継代数 7 から 40）の PHH-iPSCs の肝分化能を調べることとした。その結果、いずれの継代数においても ALB 産生能をもつ肝細胞に分化できることが確認できた。また、若い継代数の PHH-iPSCs の方が高い肝分化能を有することも示された。したがって、肝機能が高い分化誘導肝細胞の調製したい場合は、若い継代数の PHH-iPSCs を用いることが望ましいと考えられる。

## 2. 劇症患者由来 iPS 細胞の作製

劇症肝炎を含む小児先天性代謝異常症に対する倫理申請を完了した。患者選定、同意取得のプロセスを経た後に劇症肝炎患者由来の iPS 細胞の樹立を行うことになる。また、iPS 細胞から肝細胞分化に向けた検討を行い、プロトコールを確定した。

## D. 考察

本年度は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術を改良するために、FOXA2、HNF1  $\alpha$  を共搭載した Ad ベクター (Ad-FOXA2-HNF1  $\alpha$ ) を作製した。その結果、Ad-FOXA2-HNF1  $\alpha$  は FOXA2、HNF1  $\alpha$  を個別に搭載した Ad ベクターよりも肝分化促進効果が強いことが分かった。今後は分化誘導肝細胞のさらなる成熟化を目指すために、三次元培養や共培養を実施する予定である。

また、PHHs からヒト iPS 細胞を作製することにも成功した。今後は PHH-iPSCs の肝分化能 (CYP 酵素活性など) をさらに詳細に評価することが必要である。次年度は、平均的な薬物代謝酵素活性を有した肝細胞の他に、薬物代謝酵素の活性が個人差の下限レベルである肝細胞や、上限レベルである肝細胞から作製したヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導し、元の PHHs の薬物代謝活性を反映するかどうか調べる予定である。

さらに、劇症肝炎を含む小児先天性代謝異常症から iPS 細胞を樹立するための倫理申請を完了し、受入準備を整えることができた。患者の臨床検体を用いる研究においては、倫理的手続きが重要である。希少疾患である小児肝疾患の患者数は少ないものの、従来までの受入実績を鑑み、当該 iPS 細胞の樹立を行うことは十分可能であると考えられた。

## E. 結論

本年度は、ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発の改良を進めた。また、ヒト初代培養肝細胞からヒト iPS 細胞を樹立し、肝細胞への分化誘導を進めるとともに、その肝細胞機能の解析に着手した。

さらに、劇症肝炎を含む小児先天性代謝異常症から iPS 細胞を樹立するための倫理申請を完了した。

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と毒性評価系の開発

研究分担者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 肝細胞分化誘導プロジェクト 招へいプロジェクトリーダー

薬物誘発性肝障害（肝毒性）は、医薬品の開発中止や市販後の警告、販売中止に至る主要な有害事象である。ヒト組織の利用により毒性評価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、継続性の観点から実現は困難である。さらに、薬物代謝酵素の活性に個人差（10 倍～1000 倍以上）が大きいことが正確に肝毒性を評価することが困難な原因となっている。そこで本研究では、iPS 細胞技術を駆使することで個人差を反映した薬剤の肝毒性評価系の開発を行う。本年度は、①ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発の改良を進めるとともに、②平均的な薬物代謝酵素活性を有した肝細胞の他に、薬物代謝酵素の活性が個人差の下限レベルである肝細胞や、上限レベルである肝細胞からヒト iPS 細胞の作製を行った。

研究協力者

古川智久 (独)医薬基盤研究所  
大阪大学大学院薬学研究科

高山和雄 (独)医薬基盤研究所  
大阪大学大学院薬学研究科

**A. 研究目的**

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（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、医薬品開発の効率および安全性を高めることが行われている。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。また、薬物代謝酵素の活性に個人差（10 倍～1000 倍以上）が大きいことが正確に肝毒性を評価することが困難な原因となっている。そこで本研究では、iPS 細胞技術を駆使することで個人差を反映した薬剤の肝毒性評価系の開発を試みた。まず、ヒト iPS 細胞から成熟した分化誘導肝細胞を作製する技術の改良を行うこととした。これまでに我々は FOXA2、HNF1  $\alpha$  遺伝子を導入することに

より、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進できることを報告してきた (J. Hepatol. 57, 628-636, 2012)。その際に、これらの遺伝子を別々のアデノウイルスベクターに搭載して遺伝子導入していたが、遺伝子導入による分化促進効果をさらに強めるために、FOXA2、HNF1 $\alpha$  を共搭載したアデノウイルスベクターを作製した。次に、薬物代謝酵素活性の個人差を反映したヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製するために、平均的な薬物代謝活性を有するヒト初代培養肝細胞および、薬物代謝活性が上限・下限であるヒト初代培養肝細胞を購入し、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. アデノウイルス (Ad) ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミドは pHMEF5 を使用した。EF1 $\alpha$  プロモーター制御下でヒト forkhead box protein A2 (FOXA2) および hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 $\alpha$ )

(FOXA2 と HNF1 $\alpha$  の間に 2A ペプチドが存在する) を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-FOXA2-2A-HNF1 $\alpha$  を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化した K7 型ベクタープラスミド (pAdHM41K7) に挿入することにより、pAdHM41K7-EF-FOXA2-2A-HNF1 $\alpha$  を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で消化し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてヒト胎児腎細胞由来細胞である HEK293 細胞にトランスフェクションすることにより、

AdK7-EF-FOXA2-2A-HNF1 $\alpha$  を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。各 Ad ベクターの物理学的 (particle) タイターは Maizel らの方法により測定した。

### B-2. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 Dotcom (国立生育医療センター梅澤明弘教授から供与) は 10 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学工業社) を含む iPS 細胞用培地である ReproStem (ReproCELL) を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞 (MEF、ミリポア) 上で培養した。4-6 日ごとに 0.1 mg/mL dispase (Roche) を用いてヒト iPS 細胞のコロニーを回収した後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

### B-3. ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導は以下の方法で行った。ヒト iPS 細胞を dispase を用いて剥離したのち、MEF-conditioned human ES culture medium に懸濁し、マトリゲルコート (50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Matrigel) された 12 well plate (住友ベークライト) に播種した。80%コンフルに達したのち、100 ng/ml Activin A (R&D systems) を含む L-wnt3a-conditioned differentiation RPMI1640 medium (4 mM L-glutamine、1 $\times$ B27 supplement、0.2% FBS を含む RPMI1640 培地) に培地交換した。培地交換は毎日行い、分化誘導 4 日目まで培養した。

### B-4. 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞



胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3 に記載された方法に準じて分化誘導した内胚葉（培養 4 日目）を 20 ng/ml FGF4 (R&D system)、20 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D systems) を含む differentiation RPMI1640 培地で 9 日目まで培養した。その間、毎日培地交換を行った。

#### B-5. 肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3 および B-4 に記載された方法に準じて 9 日間培養して分化誘導した肝幹前駆細胞を 20 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (R&D systems) を含む differentiation RPMI1640 medium を用いて培養した。培地交換は毎日行い、分化誘導 14 日目まで培養した。その後、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems) を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、11 日間（培養 14 日目から培養 25 日目まで）培養した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入を行う場合は、培養 4、9、14 日目の細胞に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2-2A-HNF1  $\alpha$ ) を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で 90 分間作用させた。

#### B-6. 定量的リアルタイム PCR

各細胞集団から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて Total RNA を抽出した。ヒト初代培養肝細胞は 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  type I-A collagen (新田ゼラチン) をコートした細胞培養用 12 ウェルプレートの各ウェルに  $1.2 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度で 10% FCS を含む HCM で播種したのち、6 時間後に一度上記培地

で培地交換し、合計 48 時間培養した。各 Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。定量的リアルタイム PCR には SYBR Green PCR Master Mix を使用し、StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) により定量した。

#### B-7. アルブミン・尿素産生能の評価

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

#### B-8. CYP 活性測定法

B-3~B-5 に示す方法により分化誘導されたヒト iPS 細胞由来肝細胞において P450-Glo™ CYP3A4 Assay Kit (Promega) を用いて CYP3A4 の活性を測定した。活性はルミノメーター (Lumat LB 9507、Berthold) を用いて定量した。CYP 活性は総タンパク量で補正した。なお、総タンパク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) を用いた。

#### B-9. ヒト iPS 細胞の樹立

山中 4 因子を搭載したセンダイウイルスベクター (SeV-4F; 産業技術総合研究所・

中西真人先生より供与)を用いて、ヒト初代培養肝細胞(市販品)からiPS細胞を樹立した。

#### B-10. 蛍光免疫抗体染色

B-3~B-5に示す方法により分化誘導されたヒトiPS細胞由来肝細胞をPBSにて2回洗浄し、メタノール(Wako)もしくは4% paraformaldehyde (Wako)を用いて室温で10分処理したのち、2% BSA (Sigma)、0.2% Triton X-100 (Sigma)を含むPBSで45分間ブロッキングを行った。各1次抗体を4°Cで一晩反応させ、続いてAlexa Fluor 488またはAlexa Fluor 594で標識した2次抗体(Molecular Probe)を室温で1時間反応させた。その後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen)を用いて核染色を行った後、2% paraformaldehydeにて固定し、蛍光顕微鏡(BIOREVO BZ-9000、キーエンス)にて観察した。

#### C. 研究結果

これまでに我々はFOXA2、HNF1 $\alpha$ 遺伝子を導入することにより、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化を促進できることを報告してきた(J. Hepatol. 57, 628-636, 2012)。その際に、これらの遺伝子を別々のAdベクターに搭載して遺伝子導入していたが、遺伝子導入による分化促進効果をさらに強めるために、FOXA2、HNF1 $\alpha$ を共搭載したAdベクター(Ad-FOXA2-HNF1 $\alpha$ )を作製した(Figure 1A)。Ad-FOXA2-HNF1 $\alpha$ をヒトiPS細胞由来の分化途中の細胞に作用させたところ(Figure 1B)、FOXA2、HNF1 $\alpha$ を別々のAdベクターに搭載して作用させた時と比べて、 $\alpha$ AT遺伝子発現量が約1.5倍増加した。また、ALB産生量が約11  $\mu$

g/ml/24h/mg protein から約14  $\mu$ g/ml/24h/mg proteinまで増加した。さらに、CYP3A4活性は約1.3倍に増加した。以上のことから、FOXA2、HNF1 $\alpha$ を共搭載したAdベクターの方が、FOXA2、HNF1 $\alpha$ を個別に搭載したAdベクターよりも肝分化促進効果が強いことが分かった。

次に、薬物代謝酵素活性の個人差を反映したヒトiPS細胞由来肝細胞を作製するために、ヒトiPS細胞の作製を試みた(Figure 2)。ヒト初代培養肝細胞(PHHs)からヒトiPS細胞を作製するために、山中4因子を搭載したセンダイウイルスベクター(SeV-4F)を用いた。PHHsに山中4因子を遺伝子導入することで、典型的なiPS様コロニーが多数出現した。また、それらのコロニーはアルカリフォスファターゼ陽性であった。さらに、これらのコロニーにおいて、各種未分化マーカー(NANOG、OCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-81)が発現していることを確認した。したがって、PHHsからヒトiPS細胞が樹立できたことが明らかとなった。以後、PHHs由来ヒトiPS細胞とPHH-iPSCsと表記する。

PHH-iPSCsの性質をさらに詳細に評価するために、PHH-iPSCsにおける未分化関連遺伝子および肝関連遺伝子の発現を解析した。その結果、PHH-iPSCsにおける未分化関連遺伝子の発現量はヒトES細胞であるK3やヒトiPS細胞であるToeと同程度であり、PHHsよりも有意に高いことが確認できた。また、PHH-iPSCsにおける肝関連遺伝子発現量はK3やTicと同程度であり、PHHsよりも有意に低いことが示された。以上の結果からPHH-iPSCsは未分化能を獲得しており、肝細胞ではないことが示唆された。

PHH-iPSCsの肝分化能を調べるために、

B-3~B-5 に示す方法を用いて分化誘導した。若い継代数のヒト iPS 細胞は、元の細胞の性質を引き継ぐことが知られているため、様々な継代数（継代数 7 から 40）の PHH-iPSCs の肝分化能を調べることにした。その結果、いずれの継代数においても ALB 産生能をもつ肝細胞に分化できることが確認できた。また、若い継代数の PHH-iPSCs の方が高い肝分化能を有することも示された。したがって、肝機能が高い分化誘導肝細胞の調製したい場合は、若い継代数の PHH-iPSCs を用いることが望ましいと考えられる。

#### D. 考察

本年度は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術を改良するために、FOXA2、HNF1  $\alpha$  を共搭載した Ad ベクター (Ad-FOXA2-HNF1  $\alpha$ ) を作製した。その結果、Ad-FOXA2-HNF1  $\alpha$  は FOXA2、HNF1  $\alpha$  を個別に搭載した Ad ベクターよりも肝分化促進効果が強いことが分かった。今後は分化誘導肝細胞のさらなる成熟化を目指すために、三次元培養や共培養を実施する予定である。

また、PHHs からヒト iPS 細胞を作製することにも成功した。今後は PHH-iPSCs の肝分化能 (CYP 酵素活性など) をさらに詳細に評価することが必要である。次年度は、平均的な薬物代謝酵素活性を有した肝細胞の他に、薬物代謝酵素の活性が個人差の下限レベルである肝細胞や、上限レベルである肝細胞から作製したヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導し、元の PHHs の薬物代謝活性を反映するかどうか調べる予定である。

#### E. 結論

本年度は、ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞

を創出する技術開発の改良を進めた。また、初代培養肝細胞からヒト iPS 細胞を樹立し、肝細胞への分化誘導を進めるとともに、その肝細胞機能の解析に着手した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Rep.*, 1, 322-335 (2013)
- 2) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Inamura M., Ohashi K., Okuno H., Yamaguchi T., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Okano T., Furue MK., Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF  $\beta$  receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision. *Development*, 141, 91-100 (2014)
- 3) Higuchi M., Mizuguchi H. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro. *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application (the Springer publishing)*, in press.
- 4) Watanabe H., Takayama K., Inamura M., Tachibana M., Mimura N., Tashiro K., Nagamoto Y., Sakurai F., Kawabata K., Furue MK., Mizuguchi H. HEX Promotes Hepatic-Lineage Specification

Through the Negative Regulation of Eomesodermin. *PLoS ONE*, in press.

- 5) 長基康人、高山和雄、水口裕之；3次元組織化技術を利用したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法、遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞の3次元組織化ーその最先端技術と材料技術、メディカルドゥ、田畑泰彦編集、244-248 (2014)
- 6) 水口裕之、高山和雄；iPS 細胞由来組織細胞を用いた毒性試験、実験医学別冊 ES・iPS 細胞実験スタンダード、羊土社、中辻憲夫監修、末盛博文編集、345-350 (2014)
- 7) 高山和雄、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用、組織培養研究、32, 183- 187 (2013)
- 8) 水口裕之、高山和雄、川端健二；ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた毒性評価、In vitro 毒性・動態評価の最前線、シーエムシー、小島肇夫監修、63-70 (2013)

## 2. 学会発表

- 1) Takayama K., Nagamoto Y., Kawabata K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human pluripotent stem cells, Boston, June, 2013
- 2) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Comparative analysis of transplantation efficacy of human iPS cell-derived hepatic cells at various differentiation stages in mice. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, June, 2013
- 3) Takayama K., Nagamoto Y., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human ES/iPS cells、第 20 回大会、肝細胞研究会、大阪、2013 年 9 月
- 4) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice、第 20 回大会、肝細胞研究会、大阪、2013 年 9 月
- 5) Takayama K., Morisaki Y., Furukawa N., Higuchi M., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Comparison of hepatic functions between genetically identical primary human hepatocytes and human iPS-derived hepatocyte-like cells、第 28 回日本薬物動態学会年会、東京、2013 年 10 月
- 6) 高山和雄、長基康人、田代克久、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肝幹・前駆細胞の維持と複製、第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月
- 7) Takayama K., Nagamoto Y., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Generation of long-term

expandable hepatoblasts differentiated from human iPS cells enables large-scale preparation of hepatocytes for drug discovery and development. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (iPS Cells in Drug Discovery & Development)、大阪、2014年1月

胞、特願 2013-80557 号

2. 実用新案登録

3. その他

- 8) 長基康人、高山和雄、田代克久、立野知世、櫻井文教、立花雅史、川端健二、池田一雄、田中靖人、水口裕之、活性型 Bcl-xL (FNK) 過剰発現によるヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス生着効率向上、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014年3月
- 9) 高山和雄、水口裕之、創薬研究への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014年3月
- 10) 長基康人、高山和雄、田代克久、立野知世、櫻井文教、立花雅史、川端健二、池田一雄、田中靖人、水口裕之、活性増強型 Bcl-xL (FNK) 過剰発現を利用したヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス肝置換効率向上、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014年3月
- 11) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の腎被膜下への移植、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014年3月

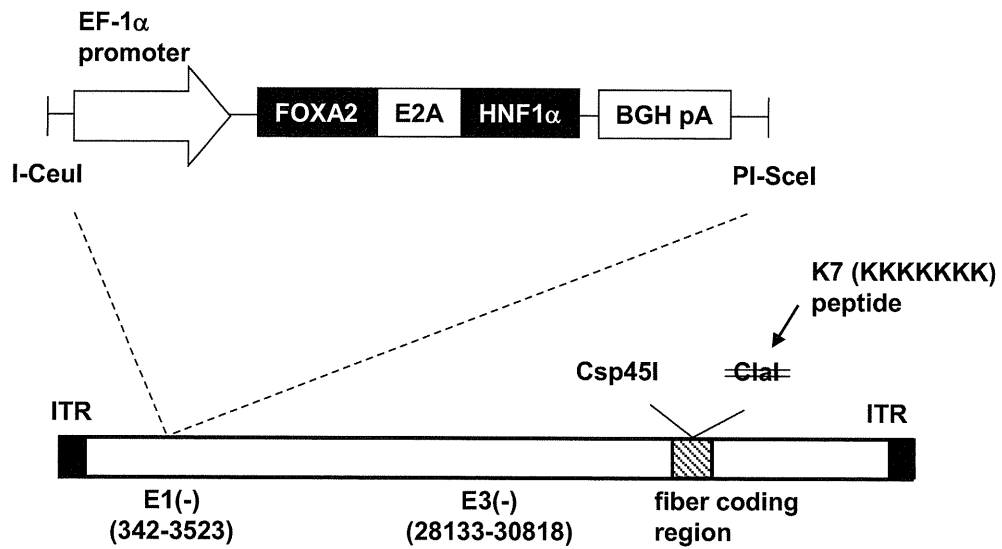
#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 水口裕之、川端健二、高山和雄(発明人)、肝幹前駆様細胞の培養方法及び培養細

Figure 1

A



B

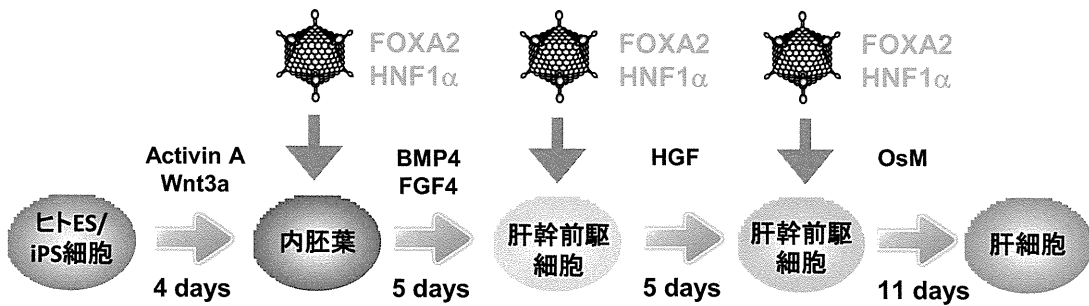


Figure 1 Hepatic differentiation of human ESCs and iPSCs transduced with Ad-FOXA2-HNF1 $\alpha$ .  
 (A) Schematic representation of Ad-FOXA2-HNF1 $\alpha$  used in this study.  
 (B) The procedure for differentiation of human ESCs and iPSCs into hepatocyte-like cells.

Figure 2

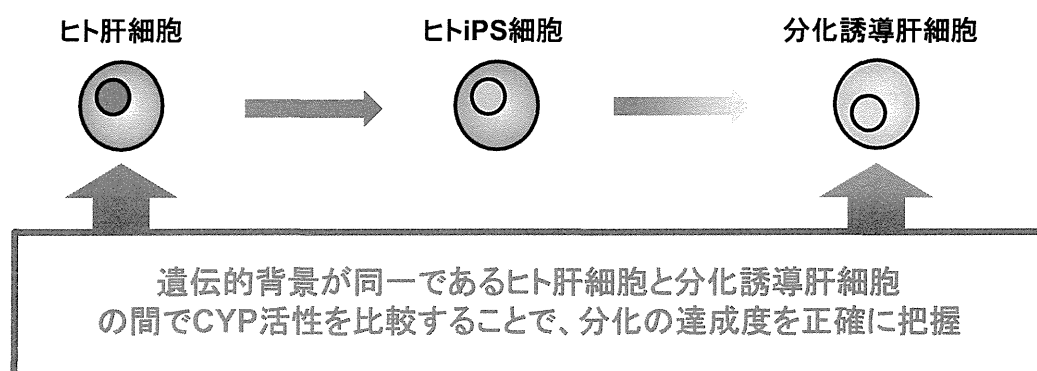


Figure 2 Generation and differentiation of primary human hepatocyte-derived iPSCs.

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

劇症患者由来 iPS 細胞の作製

研究分担者 梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 再生医療センター長

研究要旨

小児劇症肝炎患者から iPS 細胞を樹立し、特異的な遺伝的多型を有する iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を作製するとともに、その性質を精査する

A. 研究目的

本研究は、小児劇症肝炎患者から iPS 細胞を樹立し、特異的な遺伝子多型を有する iPS 細胞由来肝細胞を作製するとともに、その性質を精査し、毒性評価研究に利用するための材料の提供を行うことを目的とする。

B. 研究方法

劇症肝炎患者由来の iPS 細胞の作製を行うための、倫理的手続きを行った。また、その予備実験として、既存 iPS 細胞を用いて多分化能（胚葉体形成、奇形腫形成）、ゲノム（核型、CGH 等）、未分化性（免疫組織化学、RT-PCR、Transcriptome 等）、形態、エピジェネティクス（Bisulfite sequence 法、Illumina assay 等）、純度（細菌、マイコプラズマ、ウイルス、エンドトキシン等）の解析項目を決定し、評価を行った。

（倫理面への配慮）

組織については、平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想されるため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番

号 2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

劇症肝炎を含む小児先天性代謝異常症に対する倫理申請を完了した（受付番号 660, 738)。患者選定、同意取得のプロセスを経た後に劇症肝炎患者由来の iPS 細胞の樹立を行うことになる。また、iPS 細胞から肝細胞分化に向けた検討を行い、プロトコールを確定した。

D. 考察

患者の臨床検体を用いる研究においては、倫理的手続きが重要である。その手続きを完了し、受入準備を整えることができた。希少疾患である小児肝疾患の患者数は少ないものの、従来までの受入実績を鑑み、当該 iPS 細胞の樹立を行うことは十分可能であると考えられた。

E. 結論

劇症肝炎を含む小児先天性代謝異常症に対する倫理申請を完了した（受付番号 660, 738)。また、iPS 細胞から肝細胞分化に向けた検討を行い、



プロトコールを確定した。

#### G. 研究発表

Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, **Umezawa A**, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source for hepatocytes. *Liver Transpl.* 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水口裕之、高山和雄、川端健二	ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた毒性評価	小島肇夫監修	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー	日本	2013	63-70
水口裕之、高山和雄	iPS細胞由来組織細胞を用いた毒性試験	中辻憲夫監修、末盛博文編集	実験医学別冊 ES・iPS細胞実験スタンダード	羊土社	日本	2014	345-350
長基康人、高山和雄、水口裕之	3次元組織化技術を利用したヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導法	田畑泰彦編集	遺伝子医学MOOK別冊 細胞の3次元組織化ーその最先端技術と材料技術	メディカルドゥ	日本	2014	244-248

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H.	Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes.	Stem Cell Rep.	1	322-335	2013
Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Inamura M., Ohashi K., Okuno H., Yamaguchi T., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Okano T., Furue MK., Mizuguchi H.	CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision.	Development	141	91-100	2014
Higuchi M, Mizuguchi H.	Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro.	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application (the Springer publishing)	in press		
Watanabe H., Takayama K., Inamura M., Tachibana M., Mimura N., Tashiro K., Nagamoto Y., Sakurai F., Kawabata K., Furue MK., Mizuguchi H.	HEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin.	PLoS ONE	in press		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
高山和雄、川端健二、水口裕之	ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用	組織培養研究	32	183-187	2013
Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M.	Hepatocyte transplantation using a living donor reduced graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source of hepatocytes.	Liver Transpl	20	391-393	2014

## 第4章 ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた 毒性評価

水口裕之\*<sup>1</sup>, 高山和雄\*<sup>2</sup>, 川端健二\*<sup>3</sup>

### 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年程度の期間及び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七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し、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（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）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、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、それを利用した毒性評価系への応用の可能性について著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の毒性評価系への応用も強く期待されている。これまで肝組織の*in vitro*モデルとしてヒト初代培養肝細胞がしばしば用いられてきた。ヒト初代培養肝細胞は薬物代謝酵素や

\*1 Hiroyuki Mizuguchi 大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野 教授

\*2 Kazuo Takayama 大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野

\*3 Kenji Kawabata ㈱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