

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<sup>1)</sup>。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞は、ドナーが制限され日本人由来のヒト初代培養肝細胞は入手が困難であり100%輸入に頼っていること、ロット差が大きいこと、高価であること、増殖しないために安定供給が難しいこと、培養後急速にシトクロムP450薬物代謝酵素等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<sup>2~4)</sup>。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、心筋等の三胚葉由来の組織へ分化することができる<sup>5, 6)</sup>。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、以下に解説するヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導法は、ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導法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いた(図1)。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<sup>7)</sup>。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

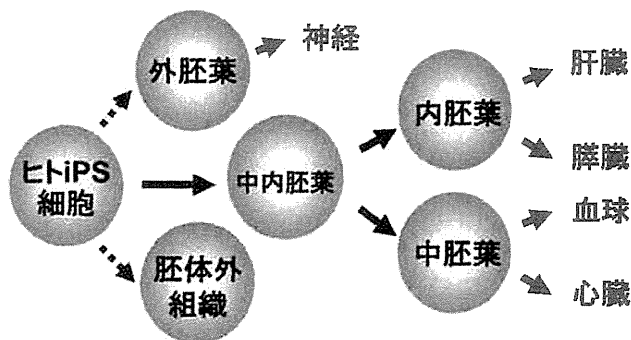


図1 ヒトiPS細胞から三胚葉への分化誘導  
ヒトiPS細胞はヒトES細胞とおなじく三胚葉に分化することができる。

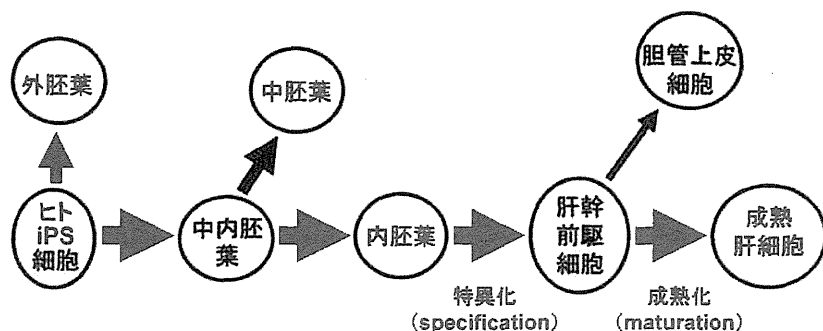


図2 ヒトiPS細胞から肝細胞への分化

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。

法が開発された (図2)<sup>8)</sup>。

ヒトiPS細胞から内胚葉への分化誘導ステップでは、アクチビンAがほぼ全てのプロトコールで使われている<sup>9, 10)</sup>。アクチビンAはTGF (transforming growth factor)- $\beta$ 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<sup>11)</sup>。アクチビンAと同時作用させる形で、FGF (fibroblast growth factor) 2やWnt3aも内胚葉分化誘導に用いられることがある<sup>12, 13)</sup>。

### 3.2 内胚葉から肝幹前駆細胞への分化

内胚葉が肝幹前駆細胞へ分化 (特異化; specification) すると、細胞は $\alpha$ -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 (図2)<sup>14, 15)</sup>。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<sup>16)</sup>。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や<sup>12)</sup>、ヒストン脱アセチル化酵素であるDMSO (dimethyl sulfoxide) やSodium butyrateが肝細胞への方向付けにおいて有効であることが報告されている<sup>17)</sup>。

### 3.3 肝幹前駆細胞から肝細胞への分化・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種類の系列細胞に分化することができる (図2)。肝幹前駆細胞から肝実質細胞へ分化するにつれて $\alpha$ -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<sup>18, 19)</sup>。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し、オンコスタチンMは肝前駆細胞の成熟化を促進することが知られている。

さらに各分化ステップで、基礎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。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、毒性評価系に応用するにはさらなる技術改良が必要である。著者らや他のグループは、内胚葉分化に重要な転写因子であるSOX17遺伝子をヒトiPS細胞からアクチビンAで分化誘導した中内胚葉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<sup>20, 21)</sup>。また、内胚葉で強く発現している転写因子のFOXA2遺伝子を中内胚葉に導入することでも内胚葉分化は促進される<sup>22)</sup>。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著者らと他のグループにより報告されている<sup>23, 24)</sup>。

著者らはさらに、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一連の分化を飛躍的に向上させることに成功した。即ち、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 $\alpha$ 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<sup>25)</sup>。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 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6) による分化促進効果をスクリーニングした結果、FOXA2およびHNF1 $\alpha$ 遺伝子を組み合わせて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)<sup>26)</sup>。

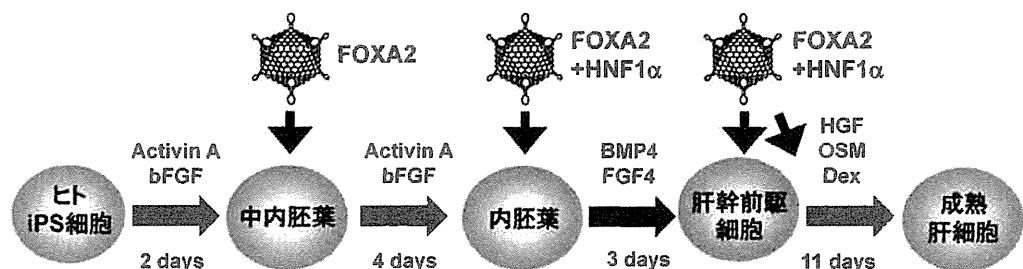


図3 遺伝子導入を用いたヒトiPS細胞から成熟肝細胞への分化誘導。分化の適切な時期に適切な遺伝子を一過性に発現させることにより、効率良く肝細胞を分化誘導できる。

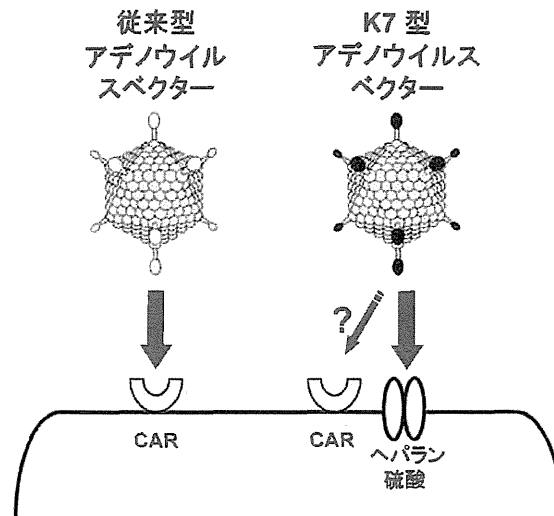


図4 改良型アデノウイルスベクター

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。

なお、本分化誘導における遺伝子導入には、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段階的に起こる場合には、各分化ステップでだけ導入遺伝子が機能するように（後の細胞分化に影響を与えないように）遺伝子発現期間は一過性であること、そして効率よく細胞集団を分化させるためには、100%の遺伝子発現効率で遺伝子発現させることが必須となるが、改良型アデノウイルスベクターはこのような目的に唯一叶うベクターである。本研究で用いた改良型アデノウイルスベクターは、細胞への感染に関与するウイルス表面タンパク質のファイバータンパク質のC末端領域にポリリジン配列（KKKKKKK；リジン（K）が7つ続くのでK7と略称）を遺伝子工学的に付与しており、細胞表面のヘパラン硫酸を認識して多くの細胞種に効率よく遺伝子導入が可能となる（図4）<sup>27)</sup>。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<sup>24)</sup>。

### 3.5 三次元培養技術による肝細胞の成熟化

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、シトクロムP450酵素やアルブミンの遺伝子発現は、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三次元培養や、繊維芽細胞や血管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、シトクロムP450酵素やアルブミン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三次元共培養し、肝機能の向上が可能か検討した<sup>25)</sup>。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。さらに、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細胞との積層三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ひとつであることが明らかとなった。

最近では、簡便に三次元培養が可能な基材が各社から販売されており、これらの基材を用いてもヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の成熟化亢進が期待できる。著者らはナノピラープレート（日立ハイテクノロジーズ社）に、ヒトiPS細胞から分化誘導した肝幹前駆細胞を播種し、スフェロイドを形成させ長期間培養、肝成熟化を施したところ、シトクロムP450酵素やアルブミン等の遺伝子発現量が上昇し、シトクロムP450酵素による薬剤代謝能も上昇することを確認し<sup>29)</sup>、培養法の工夫によっても肝細胞への分化効率が向上することを明らかにした。このような基材は、特殊な技術を必要とせず、スループット性にも優れるため、毒性評価等の創薬研究には極めて有用と考えられる。

#### 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様の形状をしており、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（シトクロムP450 3A4, 7A1, 2D6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<sup>29)</sup>。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様々なヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いて同様の検討を行う予定である。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 $\alpha$ 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<sup>30)</sup>。したがって、将来的には病態、あるいは個人差を反映したヒ

トiPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた毒性評価も可能になるであろう。

著者らは、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。肝毒性を示す化合物について、ナノピラープレート上で分化誘導した肝細胞を用いて細胞毒性を生じるか評価したところ、通常の2次元培養したヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞やHepG2細胞（ナノピラープレート上で培養）を用いた場合に比べ、より感度良く細胞毒性を示し、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<sup>29)</sup>。したがって、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いることによって、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再現性良く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、著者らが作製したヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞は、薬物の毒性スクリーニングに使用できる可能性が示唆された。

## 5 おわりに

従来のヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞は、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、著者らが開発した遺伝子導入を駆使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。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必要があり、細胞供給の観点から効率が悪いと考えられる。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、株式会社リプロセルよりReproHepatoとして市販されている（用いているヒトiPS細胞の由来が著者らとは異なっているため性質は同一ではない）。

## 文 献

- 1) N. J. Hewitt *et al.*, *Drug Metab. Rev.*, **39**, 159 (2007)
- 2) C. Terry, R. D. Hughes, *Methods Mol. Biol.*, **481**, 25 (2009)
- 3) M. A. Baxter *et al.*, *Stem Cell Res.*, **5**, 4 (2010)
- 4) N. Safinia, S. L. Minger, *Methods Mol. Biol.*, **481**, 169 (2009)
- 5) J. A. Thomson *et al.*, *Science*, **282**, 1145 (1998)

- 6) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, **131**, 861 (2007)
- 7) T. Hamazaki *et al.*, *FEBS Lett.*, **497**, 15-19 (2001)
- 8) Y. Duan *et al.*, *Stem Cells*, **25**, 3058-3068 (2007)
- 9) K. A. D'Amour *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1534 (2005)
- 10) S. Sulzbacher *et al.*, *Stem Cell Rev.*, **5**, 159 (2009)
- 11) Y. G. Chen *et al.*, *Exp. Biol. Med.*, **231**, 534 (2006)
- 12) G. Brolen *et al.*, *J. Biotechnol.*, **145**, 284 (2010)
- 13) D. C. Hay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **105**, 12301-12306 (2008)
- 14) R. Gualdi *et al.*, *Genes Dev.*, **10**, 1670 (1996)
- 15) S. Asgari *et al.*, *Stem Cell Rev.* (in press)
- 16) J. Cai *et al.*, *Hepatology*, **45**, 1229 (2007)
- 17) D. C. Hay *et al.*, *Stem Cells*, **26**, 894-902 (2008)
- 18) K. Si-Tayeb *et al.*, *Dev. Cell*, **18**, 175 (2010)
- 19) S. Snykers *et al.*, *Stem Cells*, **27**, 577 (2009)
- 20) C. A. Seguin *et al.*, *Cell Stem Cell*, **3**, 182 (2008)
- 21) K. Takayama *et al.*, *PLoS One*, **6**, e21780 (2011)
- 22) S. Kanda *et al.*, *Hepatol. Res.*, **26**, 225 (2003)
- 23) A. Kubo *et al.*, *Hepatology*, **51**, 633 (2010)
- 24) M. Inamura *et al.*, *Mol. Ther.*, **19**, 400 (2011)
- 25) K. Takayama *et al.*, *Mol. Ther.*, **20**, 127 (2012)
- 26) K. Takayama *et al.*, *J. Hepatol.*, **57**, 628 (2012)
- 27) N. Koizumi *et al.*, *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2003)
- 28) Y. Nagamoto *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 4526 (2012)
- 29) K. Takayama *et al.*, *Biomaterials*, **34**, 1781-1789 (2013)
- 30) S. T. Rashid *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **120**, 3127 (2010)

# 2 iPS細胞由来組織細胞を用いた毒性試験

水口裕之、高山和雄

iPS細胞は生命現象の解明や病気のメカニズム解明などの基礎研究における利用だけでなく、再生医療や医薬品開発における創薬研究への応用が期待されている。本項では、創薬研究、特に医薬品開発における毒性試験へのヒトiPS細胞の応用について、心毒性および肝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。



iPS細胞由来組織細胞を用いた毒性試験

## はじめに

創薬のプロセスは、一般的に1,000億円超の開発費と10～15年の期間を要する。その過程で約20,000件の候補化合物の中から薬効、毒性などの評価を経て1つが医薬品として承認を受ける。この過程を迅速化させるための新しい技術の1つとして、iPS細胞技術が注目されている。

医薬品開発過程は、上流からさかのぼると、①疾患のメカニズム解明や創薬ターゲット分子の検索、②スクリーニング系の構築と化合物スクリーニング、③化合物の最適化や薬効評価試験・安全性薬理試験・毒性試験・薬物動態試験、④製造法の最適化（確立）や品質管理試験などのCMC試験、⑤臨床試験、へと続く。ヒトiPS細胞を用いた創薬研究は、大きく分けて特定の病態の反映が期待できる疾患（患者）由来のiPS細胞（疾患iPS細胞）を用いた研究と、健康人由来のiPS細胞を用いた研究に分けられるが、疾患iPS細胞や健康人由来のiPS細胞は主に上記①②③の研究段階に利用可能と期待されている。なお、ヒトiPS細胞自身がこれらの創薬研究に利用されることはほとんどなく、ヒトiPS細胞から特定の細胞に分化させた細胞が利用される。したがって、ヒトiPS細胞が創薬研究に利用できるか否か（あるいはどのような創薬研究に利用できるか）は、ヒトiPS細胞から分化させた細胞の“分化度”に大きく依存しており、未熟な分化細胞では実際のヒトにおける病態や機能を反映していないことが多く、利用できないことになる。

一方、2008～2010年の間に米国においてフェーズII臨床試験で開発中止になった医薬品候補化合物の開発中止理由は、有効性の欠如（51%）、戦略上の問題（29%）、毒性（安全性）（19%）となっており<sup>1)</sup>、毒性の問題は大きなウェートを占めている。また1976～2005年の間に、毒性が原因で米国市場から撤退した28医薬品の毒性を分類すると、肝毒性（21%）、腎毒性（7%）心毒性（7%）、トルサ・デ・ポアン（21%）となっており<sup>2)</sup>、トルサ・デ・ポアンを心毒性に含めると、心毒性と肝毒性が主要な毒性であることがわかる。

トルサ・デ・ポアン：心室頻拍。薬物誘発性QT延長を伴う。



表1 ヒトiPS細胞を創薬研究に応用する際の利点

- ・ヒトES細胞と異なり受精卵を壊す必要がないため、倫理的障壁が小さい
- ・ヒト細胞であるため、種差を考慮する必要がない
- ・生検で採取不可能な組織細胞を作製できる
- ・ヒトiPS細胞はすべてのヒトから作製可能であるため、個人差や病態差を反映した評価が可能である
- ・適切なモデルがない疾患についても、モデル細胞を構築できる
- ・疾患によっては、疾患発症前から発症後の過程を追跡することができる

本項では、健常人由来のiPS細胞を心筋細胞や肝細胞に分化させ、創薬研究過程における毒性試験（安全性試験）に応用する試みを中心に解説する。また、これらの試みの成否は、iPS細胞から作製した心筋細胞や肝細胞の“分化度”に大きく依存することから、分化誘導技術の現状についても簡単に解説する。

## iPS細胞由来組織細胞を用いた毒性試験

上述のように、ヒトiPS細胞から分化させた細胞（特に、心筋、肝細胞など）は医薬品開発研究の最上流の疾患のメカニズム解明や創薬ターゲット分子の検索研究だけでなく、化合物スクリーニングや、薬効評価試験・安全性薬理試験・毒性試験・薬物動態試験など、前臨床試験においても活用が期待されている。細胞を用いた*in vitro*アッセイ系は、薬理作用（有効性）の評価や毒性評価のためにこれまでも活用されてきたが、多くは株化細胞や初代培養（ヒト）細胞を用いたものである。株化細胞はスループット性に優れているが、生体の状態（病態や機能）を必ずしも反映しているとはいえず、一方で初代培養ヒト細胞は高価であり、性質の均一な単一ロットの細胞を安定して入手することが困難であること、さらには組織によっては入手自体が不可能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（表1）。なお、健常人由来のiPS細胞を用いた創薬研究は、ヒトES細胞を用いた同様の研究が先行しており、以下ではヒトES細胞とiPS細胞の両者を用いた研究について区別せずに紹介する。

## ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心毒性試験

ヒトES細胞やiPS細胞から分化させた細胞の応用としては、心筋細胞が研究・開発が最も進んでおり、特に薬物誘発性QT延長アッセイ系をはじめとする心毒性評価系はリプロセル社、ChanTest社、Cellular Dynamics International社などによりすでに実用化されている。

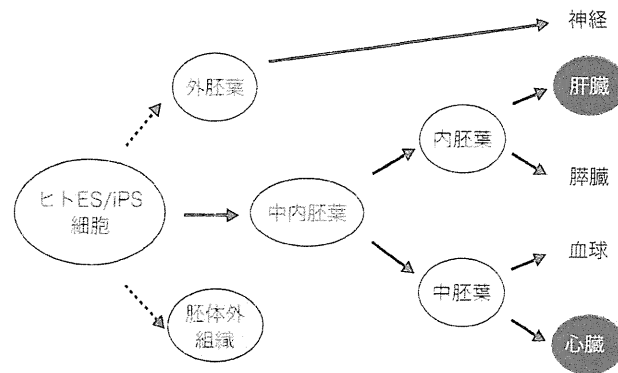


図1 ヒトES・iPS細胞から心臓、肝臓、神経細胞への分化誘導  
ヒトES・iPS細胞から心臓（心筋細胞）、肝臓（肝細胞）、神経細胞などへの分化は、それぞれ中胚葉、内胚葉、外胚葉を通して起こる

## 1. 薬物誘発性QT延長アッセイ

薬物誘発性QT延長とは、心室筋の活動電位持続時間に相当する心電図のQT間隔が延長することを特徴とし、致死性不整脈を起こす原因となる。QT延長の主な原因としては、薬剤が $K^+$ チャネルの形成サブユニットであるhERG (human *ether-a-go-go* related gene) チャネルの機能を阻害することであることが明らかとなっている。日米EU医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation : ICH) において制定された安全性薬理試験ガイドラインにおいては、医薬品候補化合物の催不整脈作用、特にQT間隔延長作用の有無を検討することが求められており、hERG遺伝子を導入しhERG  $K^+$ チャネルを発現させたHEK293細胞やCHO細胞などを用いて、化合物のhERG  $K^+$ チャネルに対する機能抑制作用を調べる試験が安全性薬理試験として推奨されている。

リプロセル社が開発したQT延長試験 (QTempo) は、ヒトiPS細胞由来の拍動心筋細胞を用いて心電図のQT間隔に相当する波形を無侵襲の電気生理学的な手法を用いて測定するcell-based QT延長試験法であり、QT延長だけでなく、拍動数の変化、 $K^+$ イオン以外の複数イオンチャネルへの影響も観察できることを特徴としている。hERG遺伝子を導入した株化細胞を用いた従来の試験法と比較し、ヒトiPS細胞由来の拍動心筋細胞は多種多様なイオンチャネルを発現していることなどから、より正確な薬物誘発性QT延長試験が期待できる。

## 2. ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化誘導の現状

心筋細胞は、ES・iPS細胞から中胚葉を経由して分化誘導される (図1)。ES・iPS細胞から心筋細胞への分化誘導技術開発は比較的進んでおり、胚様体 (embryoid body : EB) 形成法あるいはnoggin<sup>3)</sup>などの液性因子を順次作用させる多段階分化誘導法を用いることで心筋マーカーである $\alpha$ -actinin, cardiac troponin I, cardiac troponin T, connexin 43, myosin heavy chain 6陽性の細胞を作製できる。南らは、心筋分化を促進できる低分

子化合物をスクリーニングし、ヒトES・iPS細胞から心筋細胞への分化を飛躍的に高める化合物を見出した<sup>4)</sup>。また、遠山らは心筋細胞特異的な代謝特性を利用して、分化誘導心筋細胞に用いる培養液からすべての細胞の生存に必須とされるグルコース（ブドウ糖）を除去し、その代替物として心筋細胞だけが利用できる乳酸を培養液に添加することで、未分化細胞の混入が少ない高純度な分化誘導心筋細胞の精製に成功した<sup>5)</sup>。一方、分化誘導心筋細胞の増幅に向けては、分化誘導心筋細胞を顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）で作用させることにより、拍動心筋コロニー数が約5倍に増加することが報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、ヒトES・iPS細胞由来分化誘導心筋細胞は、ヒト心筋細胞よりも静止膜電位が浅く、一部の成熟心筋マーカー遺伝子の発現量が少ないことなど胎児型に近いことが知られており、より一層の分化誘導技術の改良が必要になっている。

ヒトES細胞由来心筋細胞はCollectis社から、ヒトiPS細胞由来心筋細胞はリプロセル社やCellular Dynamics International社から販売されている。リプロセル社をはじめとしたヒトiPS細胞由来心筋細胞では、上述のQT延長試験に加えて、カルシウムイメージングやパッチクランプなどの試験への応用が確認されており、毒性を評価するうえでのアッセイ方法の選択肢の幅が広がることが期待できる。

## ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた毒性試験

肝臓（肝細胞）は生体内外の物質の代謝、解毒、排出などに関与する主要な臓器（細胞）であり、体内に投与された医薬品は主に肝細胞で薬物代謝酵素（シトクロムP450：CYP）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うる高い潜在的毒性発現を研究開発の初期段階に予測できれば、研究開発費の抑制や、より安全性の高い医薬品を効率よく開発することにつながると考えられる。

現在は、主に初代培養ヒト肝細胞（ヒト凍結肝細胞を含む）や肝ミクロソームを用いて、薬剤あるいは反応性代謝物（薬剤が薬物代謝酵素により代謝された代謝物）による細胞傷害性などを試験する毒性試験や、薬物代謝酵素の誘導や阻害などの薬物動態評価試験が施行されている。しかしながら、コストや高機能なヒト肝細胞ロットの安定供給の問題などから、（これらの問題の克服が可能な）ヒトES・iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた毒性・薬物動態評価系の開発が期待されている。また、薬物代謝酵素の活性は個人差が大きい（例えば市販の薬剤の約50%を代謝することが知られている最も主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4では10～100倍の個人差がある）ことが知られており、iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた場合には、さまざまな個人から樹立したiPS細胞を利用することで、将来的には従来の評価系では検討できなかった個人差や病態差を反映した評価系が開発できる可能性もある。さらに、ヒトES・iPS細胞由来分化誘導肝細胞は肝炎ウイルス（B型肝炎やC型肝炎ウイルス）研究にも有用であり、疾患のメカニズム解明や創薬ターゲット分子の検索研究にも応用が期待されている。

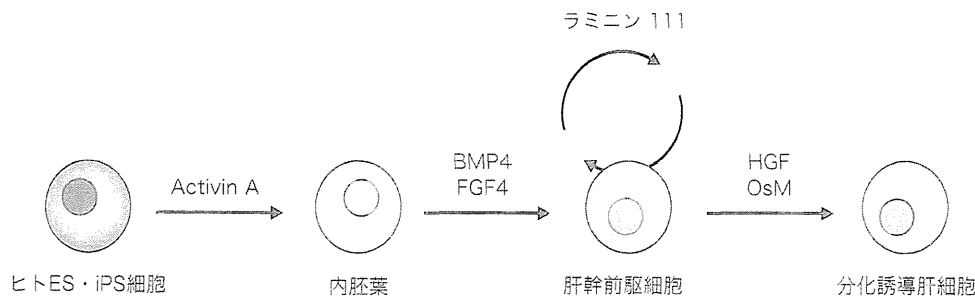


図2 ヒトES・iPS細胞から肝細胞への分化誘導

ヒトES・iPS細胞から肝細胞までの分化は大きく分けて3段階に分けられ、各分化段階に応じてActivin、FGF4、BMP4、HGF、OsMなどの液性因子を添加することにより、肝分化が促進される(本文参照)。また、肝幹前駆細胞の段階で、基底膜としてラミニン111を用いて培養することで肝幹前駆細胞の維持・増幅ができる



iPS細胞由来組織細胞を用いた毒性試験

## 1. ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導の現状

肝細胞は、ES・iPS細胞から中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞を経由して分化誘導される(図1、図2)。ヒトES・iPS細胞から肝細胞への分化誘導研究は、心筋細胞への分化誘導と比べると遅れていたが、ここ数年にかなり技術開発が進んできた。当初は胚葉体(EB)を経由した方法が用いられていたが、現在は平面培養で分化誘導させる方法が一般的であり、ヒトES・iPS細胞から中内胚葉や内胚葉への分化にはActivin Aなどを、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化にはBMP4 (bone morphogenetic protein 4) やFGF4 (fibroblast growth factor 4) などを、肝細胞の成熟化にはHGF (hepatocyte growth factor) やOsM (オンコスタチンM) などを用いて分化誘導する方法が汎用されている。しかしながら、これらの方法を用いて分化誘導された肝細胞の薬物代謝酵素活性は、初代培養ヒト肝細胞に比べると一般的には1~2オーダー以上低いことが多く、より一層の分化誘導効率の改善が必要である。

## 2. アデノウイルスベクターを用いた高効率な肝細胞分化誘導法の開発

われわれは、一過性に効率よく目的遺伝子を発現させることが可能なアデノウイルスベクター(ファイバー領域を改変することで遺伝子導入効率をさらに高めた改良型アデノウイルスベクター)の特徴を最大限に生かして、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化過程において、肝臓の発生に重要な遺伝子を、分化の適切な時期に導入することにより、肝細胞への分化効率を飛躍的に高めることに成功した<sup>7)8)</sup>。具体的には、ヒトiPS細胞由来の中内胚葉に対してFOXA2、内胚葉に対してFOXA2とHNF1A、肝幹前駆細胞に対してはFOXA2とHNF1Aといった機能遺伝子を導入することにより、肝細胞への各分化段階での分化効率を高め、培養20日目にして従来の方法に比べ飛躍的に高い薬物代謝能を有した機能性肝細胞を分化誘導できることを見出した<sup>8)</sup>。さらに、これらの分化誘導肝細胞を3次元培養することで肝細胞の成熟化を亢進できること、種々の肝毒性を示す薬剤に対してヒト初代培養肝細胞と同等の細胞障害性を示すことを明らかにし<sup>9)</sup>、*in vitro*薬物毒性評価系にも応用可

能なヒトiPS細胞由来肝細胞のための分化誘導系の基礎を構築した。また、肝細胞への分化段階の手前に位置する（ヒトES・iPS細胞由来）肝幹前駆細胞を、基底膜としてラミニン111を用いて培養することで、肝幹前駆細胞としての性質を保持したまま細胞増幅できる技術開発にも成功した（図2）<sup>10)</sup>。分化誘導肝細胞の薬物代謝酵素の発現は胎児型に近いことが知られており、心筋同様、肝細胞の成熟化を亢進させることが今後の課題である。

すでにリプロセル社は、われわれが開発した分化誘導系を利用して作製したヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を世界に先駆けて販売し、われわれの分化誘導技術をいち早く実用化している。リプロセル社では細胞の提供だけではなく、本分化誘導肝細胞を用いたCYP酵素活性やCYP誘導試験、毒性試験あるいは顧客のニーズに応じたカスタムサービスを含めた受託試験も行っている。また、Collectis社もヒトES細胞やヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の販売を開始している。

## おわりに

本項では、ヒトES・iPS細胞を用いた毒性評価研究として、最も研究が進展している心毒性、および肝毒性評価系についての現状を述べたが、心筋細胞や肝細胞は薬効評価系としてもきわめて重要なターゲット細胞である。これらの細胞以外にも、例えば神経細胞や膵臓β細胞、免疫系細胞も、創薬応用を目的に研究が進んでいる。また、現在のところ、分化誘導技術が未成熟な腎臓や小腸由来細胞も、創薬研究には重要なターゲット細胞であり、今後のより一層の基礎研究の発展が期待される。本邦発のiPS細胞技術が、再生医療への応用のみならず、創薬研究の加速化、効率化にもつながり、有効性や安全性に優れたよりよい医薬品が1日も早く患者さんの元に届くことを祈願している。

### 謝辞

本項をまとめるにあたり、貴重なご助言をいただきました稲村充博士（リプロセル社）に深謝致します。

### 文献

- 1) Arrowsmith, J. : Nat. Rev. Drug Discov., 10: 328-329, 2011
- 2) Wilke, R. A. et al. : Nat. Rev. Drug Discov., 6: 904-916, 2007
- 3) Yuasa, S. et al. : Nat. Biotechnol., 23: 607-611, 2005
- 4) Minami, I. et al. : Cell Rep., 2: 1448-1460, 2012
- 5) Tohyama, S. et al. : Cell Stem Cell, 12: 127-137, 2013
- 6) Shimoji, K. et al. : Cell Stem Cell, 6: 227-237, 2010
- 7) Takayama, K. et al. : Mol. Ther., 20: 127-137, 2012
- 8) Takayama, K. et al. : J. Hepatol., 57: 628-636, 2012
- 9) Takayama, K. et al. : Biomaterials, 34: 1781-1789, 2013
- 10) Takayama, K. et al. : Stem Cell Rep., 1: 322-335, 2013

### 参考図書

- 1) 高山和雄ほか：最新医学, 68: 141-144, 2013
- 2) 長基康人ほか：三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, in press

### 5. 細胞集合体技術

## 4) 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

長基康人・高山和雄・水口裕之

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、再生医療への応用や創薬応用、特に *in vitro* 薬物毒性試験への応用が期待されている。近年では様々な手法を用いて、その肝成熟化の促進が盛んに試みられており、本稿では特に 3 次元培養技術を用いて肝細胞を分化誘導する方法について解説する。

#### キーワード

ES 細胞, iPS 細胞, 再生医療, 創薬応用, 肝細胞, 肝毒性, ナノピラー, スキャフォールド, スフェロイド, 細胞シート

#### はじめに

近年、ヒト胚性幹 (embryonic stem : ES) 細胞<sup>1)</sup> やヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem : iPS) 細胞<sup>2)</sup> から分化誘導した肝細胞 (以下、分化誘導肝細胞と略す) が、*in vitro* 薬物毒性評価試験や肝細胞移植治療などの再生医療に用いる新たな細胞供給源として注目されている。

通常、医薬品開発の非臨床過程では、薬物の肝毒性を予測するために、株化肝細胞やヒト初代培養 (凍結) 肝細胞を用いた *in vitro* 薬物毒性評価試験が実施されている。しかしながら、株化肝細胞は生体の状態を必ずしも反映しておらず、ヒト初代培養 (凍結) 肝細胞はロット差が大きいうえ、同一ロットの細胞供給量に限りがあり、安定的な *in vitro* 薬物毒性評価試験を行うことは困難である。ヒト ES/iPS 細胞は無限に増殖できることから、効率的に肝細胞を分化誘導できれば、機能的な肝細胞を安定的かつ大量に供給することも可能になり、株化肝細胞やヒト初代培養 (凍結) 肝細胞のもつ問題点を解決できると考えられる。

一方、本邦における死亡原因の第 10 位 (2012 年) は肝炎であり、その多くを劇症肝炎、肝硬変、肝がんなどが占めている。これらの疾患に対する有効な根

治療は肝臓の臓器移植であるが、ドナー数が不足しているため多くの患者が移植を受けることなく死亡している。そのため、分化誘導肝細胞を肝細胞移植療法などの再生医療へ応用し、臓器移植の代替、もしくは臓器移植までの橋渡し (bridge use) としての利用が期待されている。

以上のように、分化誘導肝細胞は創薬への応用と再生医療への応用の両面において期待が大きい。しかしながら、従来の分化誘導法で作製された肝細胞の肝機能は不十分で、分化誘導肝細胞のさらなる成熟化技術の開発が必要である。そこで、薬物代謝能などの肝機能が高い分化誘導肝細胞を作製するために、肝細胞の生体内における微小環境を模倣し (すなわち肝細胞の周囲に細胞外マトリクスや非実質細胞を適切に配置し)、より肝機能が高い分化誘導肝細胞を作製することをめざして、3 次元組織化を利用した分化誘導が試みられている。本稿では創薬や再生医療への応用をめざし、3 次元培養技術を用いてヒト ES/iPS 細胞から肝細胞を分化誘導する方法について解説する。

## I. 3次元培養技術を用いた肝細胞への分化誘導法

ES/iPS 細胞は中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞を経由して、肝細胞へ分化することが知られている。ES/iPS 細胞から肝細胞を分化誘導する方法としては、ES/iPS 細胞から中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞への各分化段階にアクチビン A や HGF、オンコスタチン M などの液性因子を添加することで、段階的に分化誘導する方法が一般的である。詳細については代表的な総説を参照されたい<sup>1)2)</sup>。肝細胞分化誘導法における 3次元培養技術は、分化誘導肝細胞の成熟化充進を目的に研究が進められている。本稿で紹介する 3次元培養技術を利用した主な肝細胞分化誘導法については、表④にまとめたので適宜参照されたい。なお本稿では、ヒト ES/iPS 細胞を用いた研究だけでなく、マウスやサル ES/iPS 細胞を用いた研究についても紹介する。両者は共通のストラテジーが適用できると考えられる。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は、ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導を応用して同様の方法で研究が進んでおり、両者を区別することなく紹介する。

### 1. スキャフォールド法

スキャフォールドとは、細胞が 3 次元的に接着し増殖するための環境である「足場」を意味し、様々な素材で作製された各種スキャフォールド中で ES/iPS 細胞から肝細胞を分化誘導する方法が報告されている。これまでにコラーゲンで作製したスキャフォールド<sup>3)4)</sup> や、ポリグリコール酸とポリ乳酸の共重合体

で形成されたスキャフォールド<sup>5)6)</sup>、アルギン酸スキャフォールド<sup>7)</sup>、ポリウレタンスキャフォールド<sup>8)</sup> などを用いて分化誘導肝細胞を作製する方法が報告されている。これらのスキャフォールド内で分化誘導肝細胞を培養することにより、各種肝関連遺伝子の発現量やアルブミンの産生量が上昇し、肝成熟化が促進されることが明らかにされている<sup>3)8)</sup>。また、スキャフォールド内で分化誘導した肝細胞において、肝細胞の特徴である微細な微絨毛が発達し、細胞間で強固なタイトジャンクションが形成されることが報告されている<sup>3)4)</sup>。以上のことから、分化誘導肝細胞の成熟化にスキャフォールドを用いた 3次元培養技術が有用であることが示唆される。また、スキャフォールドは物理的な強度もあり、移植の際に容易に取り扱うことができることから、再生医療への応用も期待されている。しかしながら、スキャフォールドを用いた 3次元培養は簡便であるものの、スキャフォールド内における細胞の分布や数を正確に制御することが難しいため、分化誘導した細胞の不均一性が問題となっており、更なる改良が必要とされている。

近年ではスキャフォールド法の一つとして、脱細胞化技術に注目が集まっている。脱細胞化技術とは、界面活性剤を主成分とする細胞除去液を臓器中に灌流することで、臓器全体の細胞を除去し、臓器を構成する細胞外マトリクスのみを得ることを可能とする技術である。本技術を用いて、脱細胞化した臓器自体をスキャフォールドとして、目的の細胞を分化誘導することが試みられている<sup>9)</sup>。この技術により、肝細胞なら肝臓、膵細胞なら膵臓のように、生体内に存在し、細

表④ 3次元培養を利用した ES/iPS 細胞からの主な肝細胞分化誘導法

使用細胞	動物種	3次元培養法	文献
ES 細胞	マウス	コラーゲンスキャフォールド	3
ES 細胞	マウス	ポリウレタンスキャフォールド	8
ES 細胞	マウス	PLLA/PGA スキャフォールド	5
ES 細胞	マウス	PLLA/PGA スキャフォールド	6
ES 細胞	ヒト	アルギン酸スキャフォールド	7
ES 細胞	ヒト	コラーゲンスキャフォールド	4
ES 細胞	サル	中空糸充填法	12
ES/iPS 細胞	マウス	中空糸充填法	13
ES 細胞	マウス	アルギン酸マイクロビーズ	11
ES/iPS 細胞	マウス	アルギン酸ハイドロゲル	20
ES 細胞	ヒト	バイオリアクター	16
ES 細胞	ヒト	バイオリアクター	15
ES/iPS 細胞	ヒト	ナノビラー	14
ES/iPS 細胞	ヒト	細胞シート工学	18
iPS 細胞	ヒト	血管網を有する 3次元凝集体	19

胞が機能を発揮するのに最適な細胞外マトリクスをスキヤフォールドとして用いることができる。しかしながら、脱細胞化した臓器は巨大かつ複雑なため、十分に細胞を充填することが難しく、効率的な細胞充填法の開発が望まれる。

## 2. スフェロイド形成法（スフェア形成法）

スフェロイド形成法とは、シェーカーで振盪培養を行うことにより、浮遊状態のまま細胞凝集体（スフェロイド）を形成させる方法であり<sup>10)</sup>、培養スケールを大きくすることが容易であるため分化誘導肝細胞の大量調製に適していると考えられる。スフェロイド培養された分化誘導肝細胞をマウスへ移植することで肝臓への生着が確認されていることから<sup>10)</sup>、大量の分化誘導肝細胞を必要とする再生医療への応用も期待される。

しかしながら、スフェロイド培養の課題として、スフェロイド中心部の壊死や細胞の不均一性が挙げられる。これらの問題を解決する方法として、小さなアルギン酸マイクロビーズ中に細胞を封入する方法<sup>11)</sup>や、中空糸と呼ばれる中空の半透性膜内に遠心力を利用して細胞を充填し培養を行う方法<sup>12) 13)</sup>が考案されている。これらの方法は、いずれも簡便に均一な3次元体を作製できるという特徴を有しており、分化誘導肝細胞の肝機能を維持・向上できることが明らかとなっている。

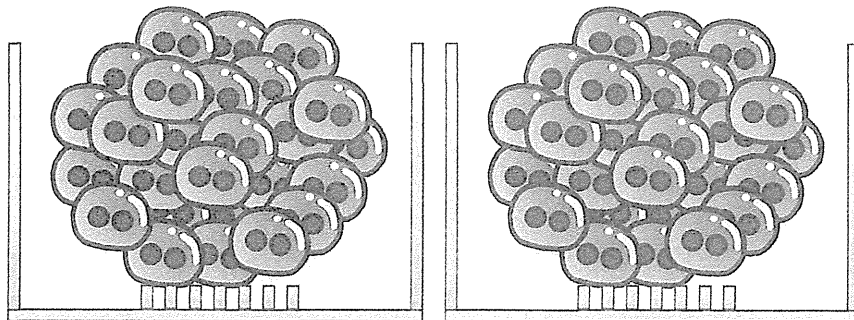
さらに、近年ではマイクロパターニング技術を応用し、ディッシュ表面に微細な凹凸や細胞非接着性分子を配置することで、均一で小さなスフェロイドを大量かつ簡便に作製できる培養機材が多数開発されてい

る。これらの培養機材では、スフェロイドのサイズが一定以上大きくならないように設計されており、一般的なスフェロイド培養の問題点である中心部の壊死や細胞の不均一性の問題を回避できる。ナノピラープレート（日立ハイテクノロジーズ）はマイクロパターニング技術を応用したスフェロイド培養用ディッシュの1つである。われわれはこのナノピラープレート上に分化誘導肝細胞を播種し、小さなスフェロイドを多数形成させることで肝成熟化を促進できるかどうかを検討した<sup>14)</sup>（図⑩）。その結果、2次元的に培養した分化誘導肝細胞と比較して、ナノピラープレート上でスフェロイド培養した分化誘導肝細胞は肝関連遺伝子の発現量が増加し、ヒト初代培養肝細胞に匹敵するレベルであった。また、成熟肝細胞のマーカーであるアジア糖タンパク受容体を発現している細胞の割合を調べたところ、約80%の細胞が陽性で、均一に分化誘導されていることが明らかとなった。さらに、2次元培養の際には肝細胞の特徴である微細胆管構造が見られなかったのに対し、3次元培養では観察されたことから、分化誘導肝細胞が生体内の肝細胞と同様の極性を獲得していることが示唆され、このような生体を模した培養条件が分化誘導肝細胞の成熟化に寄与したことが考えられた。

## 3. バイオリクター法

バイオリクター法は古くから試みられてきた3次元的に肝細胞を培養する方法の1つで、装置内に細胞を充填し、その中に連続的に培地を流すシステムを用いる。培地の流速や細胞密度といった培養条件の最適化が難しいことや、装置が大型かつ複雑で高価である

図⑩ ナノピラープレートを用いたスフェロイド形成



ナノピラープレート上には多数のホールがあり、その中に微細なピラーが並んでいる。このプレート上に細胞を播種するだけで、均一な大きさのスフェロイドを多数形成させることができる。分化誘導肝細胞をナノピラープレート上に播種することでスフェロイドを形成させ、3次元培養を行った。



といった問題点が存在していたが、近年では装置の簡略化や小型化によりこれらの問題点は解消されつつある。このバイオリアクター法も ES/iPS 細胞からの肝細胞分化誘導法に応用されている<sup>15) 16)</sup>。2次元的に分化誘導した場合と比較して、バイオリアクター内で3次元的に分化誘導することで、肝関連遺伝子の発現量の上昇や、アルブミン・尿素産生量の増加、胆管様の構造が観察された。これは3次元的に細胞を培養するだけでなく、連続的に培地を交換し、栄養を供給するという、より生体に近い環境が原因と予想される。

また、バイオリアクター法は急性肝不全などで肝移植が間に合わない場合に、一時的に肝機能を代替する人工肝臓としての利用も期待されている。バイオリアクターを人工肝臓として用いる場合、細胞を生体内に移植せずに、患者からの血液を装置内に導くことで、血液中の毒素の除去や血液凝固因子などの生理活性物質を体内に供給することが可能になる。一般的に、ES/iPS 細胞を再生医療へ用いる際にはテラトーマ形成の危険性が危惧されるが、上記のような人工肝臓は生体内に移植しないため、テラトーマ形成の心配がなく、分化誘導肝細胞を再生医療へ応用しやすい分野の1つであると考えられる。

#### 4. 細胞積層法

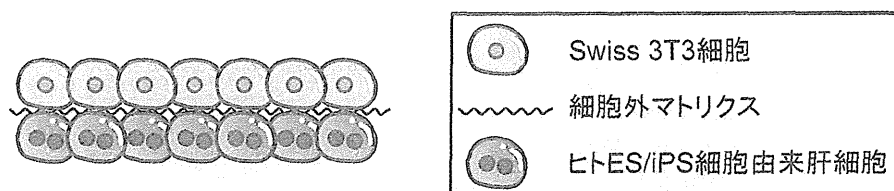
細胞を何層も積層し、3次元体を作製する方法も報告されている。生体肝臓内では肝細胞は層状に並んでいることから、肝細胞を層状に積層し3次元体を構築することは生体を模倣するうえで重要だと考えられる。細胞積層法としては細胞シート工学技術が代表的で<sup>17)</sup>、特殊な温度応答性ディッシュを利用することで細胞をシート状に取り扱うことができる。このとき、トリプシンなどのタンパク分解酵素を用いずに細胞をシート状に回収できるため、細胞が分泌・構成した細胞外マトリクスもそのまま他の細胞上に積層できると

いう特徴がある。われわれはこの細胞シート積層による3次元培養法をヒト ES/iPS 細胞からの肝細胞分化誘導法へ応用することを試みた<sup>18)</sup> (図②)。初代培養肝細胞との共培養に汎用されている Swiss 3T3 細胞を分化誘導肝細胞の上に積層して3次元共培養を行ったところ、肝細胞特異的な遺伝子発現量やアルブミンの産生量が有意に増加することが判明した。また、この肝成熟化機構において、Swiss 3T3 細胞の産生する I 型コラーゲンが主要な要素の1つであることも明らかにした。生体内においては、肝細胞はディッセ腔と呼ばれる I 型コラーゲンなどの細胞外マトリクスが豊富な空間に直接接しており、本培養系はそのような環境を模倣することで肝成熟化を促進したと考えられる。

#### 5. 血管構造を有する自発的な3次元凝集体形成法

最近、特殊な培養機材を用いることなく、分化誘導肝細胞と間葉系幹細胞、臍帯血内皮細胞 (HUVEC) を混合するだけで直径数ミリの細胞凝集体を作ることができると報告された<sup>19)</sup>。このとき、HUVEC は血管網を形成するように細胞凝集体中に配置される。この細胞凝集体をマウス内に移植することで、血管が形成され、血液が流れることも確認された。細胞凝集体を形成させることで分化誘導肝細胞の各種肝関連遺伝子の発現が上昇することも明らかとなった。肝発生では肝細胞と血球系細胞や血管内皮細胞との相互作用が重要であり、その他の臓器発生でも血管網の形成は非常に重要な段階の1つである。したがって、この細胞凝集体形成法は肝分化だけでなく、その他の細胞の分化誘導でも、*in vitro* で血管網形成を伴った臓器発生を模倣する非常に有効な手法となりうる可能性がある。また、この細胞凝集体はサイズが大きく、取り扱うことが容易で、移植による肝不全モデルマウスでの治療効果も確認されたことから、再生治療への応用も期待される。

図② 細胞シート工学技術を用いた細胞積層法



37℃でコンフルエントになるまで培養した細胞の培養温度を32℃以下(多くは20℃)に変化させることで細胞をシート状に剥離、回収できる。この際、細胞が分泌・構成した細胞外マトリクスもそのまま回収し、別の細胞の上に積層できる。分化誘導肝細胞の上に回収した Swiss 3T3 細胞を積層することで3次元共培養を行った。

## おわりに

従来のヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、機能面において十分であるとはいえなかった。しかし、近年では様々な3次元培養法が開発され、その肝成熟化を促進できるようになり、従来よりも肝機能の高い分化誘導肝細胞を作製することも可能となった。本稿

で紹介したような3次元培養法は医学・薬学・生物学だけではなく、工学など様々な分野の研究者が協力して初めて可能となる。今後はより異分野間の研究交流が盛んになり、より一層高い肝機能をもった分化誘導肝細胞の作製法が開発されるとともに、これらの分化誘導肝細胞が再生医療や創薬研究で広く活用されることを期待したい。

## 用語解説

1. 胚性幹 (embryonic stem : ES) 細胞 : 発生初期段階である胚盤胞期で存在する内部細胞塊から樹立された細胞であり、無限に増殖できる自己複製能と体内のほぼすべての細胞に分化できる多分化能を有している。1981年にマウス ES 細胞が、1998年にヒト ES 細胞が初めて樹立さ

れた。

2. 人工多能性幹 (induced pluripotent stem : iPS) 細胞 : 体細胞に数種類の遺伝子を導入することで作製される細胞で、ES 細胞とほぼ同様の特徴をもつ。2006年にマウス iPS 細胞が、2007年にヒト iPS 細胞が初めて樹立された。

## 参考文献

- 1) Snykers S, De Kock J, et al : Stem Cells 27, 577-605, 2009.
- 2) Baxter MA, Rowe C, et al : Stem Cell Res 5, 4-22, 2010.
- 3) Imamura T, Cui L, et al : Tissue Eng 10, 1716-1724, 2004.
- 4) Baharvand H, Hashemi SM, et al : Int J Dev Biol 50, 645-652, 2006.
- 5) Liu T, Zhang S, et al : Tissue Eng Part A 16, 1115-1122, 2010.
- 6) Wang Y, Zhang Y, et al : Tissue Eng Part A 18, 2376-2385, 2012.
- 7) Ramasamy TS, Yu JS, et al : Tissue Eng Part A 19, 360-367, 2013.
- 8) Matsumoto K, Mizumoto H, et al : Transplant Proc 40, 614-616, 2008.
- 9) Ji R, Zhang N, et al : Biomaterials 33, 8995-9008, 2012.
- 10) Gabriel E, Schievenbusch S, et al : PloS One 7, e44912, 2012.
- 11) Fang S, Qiu YD, et al : Acta Pharmacol Sin 28, 1924-1930, 2007.
- 12) Mizumoto H, Aoki K, et al : Transplant Proc 40, 611-613, 2008.
- 13) Amimoto N, Mizumoto H, et al : Tissue Eng Part A 17, 2071-2078, 2011.
- 14) Takayama K, Kawabata K, et al : Biomaterials 34, 1781-1789, 2013.
- 15) Sivertsson L, Synnergren J, et al : Stem Cells Dev 22, 581-594, 2013.
- 16) Miki T, Ring A, et al : Tissue Eng Part C Methods 17, 557-568, 2011.
- 17) Elloumi-Hannachi I, Yamato M, et al : J Intern Med 267, 54-70, 2010.
- 18) Nagamoto Y, Tashiro K, et al : Biomaterials 33, 4526-4534, 2012.
- 19) Takebe T, Sekine K, et al : Nature 499, 481-484, 2013.
- 20) Lau TT, Ho LW, et al : Biomaterials 34, 6659-6669, 2013.

## 長基康人

2011年 大阪大学薬学部薬科学科卒業

2013年 同大学院薬学研究科博士前期課程修了

2014年 同大学院薬学研究科博士後期課程入学

## Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin III-Coated Dishes

Kazuo Takayama,<sup>1,2,3</sup> Yasuhito Nagamoto,<sup>1,2</sup> Natsumi Mimura,<sup>2</sup> Katsuhisa Tashiro,<sup>4</sup> Fuminori Sakurai,<sup>1</sup> Masashi Tachibana,<sup>1</sup> Takao Hayakawa,<sup>5</sup> Kenji Kawabata,<sup>4</sup> and Hiroyuki Mizuguchi<sup>1,2,3,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Hepatocyte Differentiation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

<sup>3</sup>iPS Cell-Based Research Project on Hepatic Toxicity and Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

<sup>4</sup>Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

<sup>5</sup>Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan

<sup>6</sup>The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

\*Correspondence: mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.08.006>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### SUMMARY

The establishment of self-renewing hepatoblast-like cells (HBCs) from human pluripotent stem cells (PSCs) would realize a stable supply of hepatocyte-like cells for medical applications. However, the functional characterization of human PSC-derived HBCs was not enough. To purify and expand human PSC-derived HBCs, human PSC-derived HBCs were cultured on dishes coated with various types of human recombinant laminins (LN). Human PSC-derived HBCs attached to human laminin-111 (LN111)-coated dish via integrin alpha 6 and beta 1 and were purified and expanded by culturing on the LN111-coated dish, but not by culturing on dishes coated with other laminin isoforms. By culturing on the LN111-coated dish, human PSC-derived HBCs were maintained for more than 3 months and had the ability to differentiate into both hepatocyte-like cells and cholangiocyte-like cells. These expandable human PSC-derived HBCs would be manageable tools for drug screening, experimental platforms to elucidate mechanisms of hepatoblasts, and cell sources for hepatic regenerative therapy.

### INTRODUCTION

Human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have the ability to self-replicate and to differentiate into all types of body cells including hepatoblasts and hepatocytes. Although cryopreserved primary human hepatocytes are useful in drug screening and liver cell transplantation, they rapidly lose their functions (such as drug metabolism capacity) and hardly proliferate in *in vitro* culture systems. On the other hand, human hepatic stem cells from fetal and postnatal human liver are able to self-replicate and able to differentiate into hepatocytes (Schmelzer et al., 2007; Zhang et al., 2008). However, the source of human hepatic stem cells is limited, and these cells are not available commercially. Therefore, the human pluripotent stem cell (hPSC)-derived hepatoblast-like cells (HBCs), which have potential to differentiate into the hepatocyte-like cells, would be an attractive cell source to provide abundant hepatocyte-like cells for drug screening and liver cell transplantation.

Because expandable and multipotent hepatoblasts or hepatic stem cells are of value, suitable culture conditions for the maintenance of hepatoblasts or hepatic stem cells obtained from fetal or adult mouse liver were developed (Kamiya et al., 2009; Tanimizu et al., 2004). Soluble factors, such as hepatocyte growth factor (HGF) and epidermal growth factor (EGF), are known to support the proliferation

of mouse hepatic stem cells and hepatoblast (Kamiya et al., 2009; Tanimizu et al., 2004). Extracellular matrix (ECM) also affects the maintenance of hepatoblasts or hepatic stem cells. Laminin can maintain the character of mouse hepatoblasts (Dlk1-positive cells) (Tanimizu et al., 2004). However, the methodology for maintaining HBCs differentiated from hPSCs has not been well investigated. Zhao et al. (2009) have reported that hESC-derived hepatoblast-like cells (sorted N-cadherin-positive cells were used) could be maintained on STO feeder cells. Although a culture system using STO feeder cells for the maintenance of hepatoblast-like cells might be useful, there are two problems. The first problem is that N-cadherin is not a specific marker for human hepatoblasts. N-cadherin is also expressed in hESC-derived mesendoderm cells and definitive endoderm (DE) cells (Sumi et al., 2008). The second problem is that residual undifferentiated cells could be maintained on STO feeder cells. Therefore, their culture condition cannot rule out the possibility of the proliferation of residual undifferentiated cells. Because it is known that hPSC-derived cells have the potential to form teratomas in the host, the production of safer hepatocyte-like cells or hepatoblast-like cells has been required. Therefore, we decided to purify hPSC-derived HBCs, which can differentiate into mature hepatocyte-like cells, and then expand these cells.

In this study, we attempt to determine a suitable culture condition for the extensive expansion of HBCs derived



from hPSCs. We found that the HBCs derived from hPSCs can be maintained and proliferated on human laminin-111 (LN111)-coated dishes. To demonstrate that expandable, multipotent, and safe (i.e., devoid of residual undifferentiated cells) hPSC-derived HBCs could be maintained under our culture condition, the hPSC-derived HBCs were used for hepatic and biliary differentiation, colony assay, and transplantation into immunodeficient mice.

## RESULTS

### Human PSC-Derived Hepatoblast-like Cells Could Adhere onto Human LN111 via Integrin $\alpha 6$ and $\beta 1$

The HBCs were generated from hPSCs (hESCs and hiPSCs) as described in Figure 1A (details of the characterization of hPSC-derived HBCs are described in Figure 3). Definitive endoderm differentiation of hPSCs was promoted by stage-specific transient transduction of FOXA2 in addition to the treatment with appropriate soluble factors (such as Activin A). Overexpression of FOXA2 is not necessary for establishing the hPSC-derived HBCs, but it is helpful for efficient generation of the hPSC-derived HBCs. On day 9, these hESC-derived populations contained two cell populations with distinct morphology (Figure 1B). One population resembled human hepatic stem cells that were isolated from human fetal liver (shown in red) (Schmelzer et al., 2007), whereas the other population resembled definitive endoderm cells (shown in green) (Hay et al., 2008). The population that resembled human hepatic stem cells was alpha-1-fetoprotein (AFP) positive, whereas the other population was AFP negative (Figure 1C, left). On day 9, the percentage of AFP-positive cells was approximately 80% (Figure 1C, right). To characterize these two cell populations (hESC-derived HBC and non-HBC [NHBC] populations), the colonies were manually isolated by using a pipette, and then the gene expression analysis was performed. The gene expression levels of *AFP*, *CD133*, *EpCAM*, *CK8*, and *CK18* in the hESC-derived HBCs were higher than those in the bulk population containing both hESC-derived HBCs and NHBCs (*CD133*, *EpCAM*, *CK8*, and *CK18* were named as pan-hepatoblast markers and are known to be strongly expressed in both human hepatic stem cells and hepatoblasts [Schmelzer et al., 2007; Zhang et al., 2008]) (Figure 1D). On the other hand, the gene expressions of *AFP*, *CD133*, *EpCAM*, *CK8*, and *CK18* in the hESC-derived NHBCs were hardly detected. The gene expression levels of DE, mesendoderm, and pluripotent markers in the hESC-derived NHBCs were higher than those in the hESC-derived HBCs, indicating that the hESC-derived NHBCs could remain in a more undifferentiated state than the hESC-derived HBCs (Figures S1A–S1C available online). These results suggest

that hepatoblast-like cells could be differentiated from hPSCs.

To purify the hESC-derived HBCs, these cells were plated onto dishes coated with various laminins. There are 15 different laminin isoforms in human tissues. Although laminin is known to be useful to sustain mouse hepatoblasts (Tanimizu et al., 2004), it remains unknown which human laminin isoform has the potential to purify and expand the HBCs. To identify a human laminin isoform that would be useful for purifying hESC-HBCs, the hESC-HBCs and -NHBCs were plated onto dishes coated with various types of commercially available human laminins (Figure 1E). The hESC-derived HBCs could more efficiently adhere onto the human LN111-coated dish compared with hESC-derived NHBCs or unseparated populations (containing both HBCs and NHBCs). These data suggest that a hESC-derived HBC population can be purified from the unseparated populations by culturing on human LN111-coated dishes. Because integrins are known to be important molecules for cell adhesion to the ECM including laminins, we expected that certain types of integrins would allow selective adhesion of the hESC-derived HBCs to human LN111-coated dish. The gene expression levels of various integrins were examined (Figure 1F). Among the integrin  $\alpha$  subunits, the gene expression level of *integrin  $\alpha 6$*  in the hESC-derived HBCs was significantly higher than that in the hESC-derived NHBCs. In contrast, among the integrin  $\beta$  subunits, the gene expression level of *integrin  $\beta 1$*  was higher than those of *integrin  $\beta 2$*  and *integrin  $\beta 3$*  in all cell populations. The hESC-derived HBCs, but not NHBCs, expressed both integrin  $\alpha 6$  and  $\beta 1$  (Figure S1D). Almost all adhesion of the hESC-derived HBCs to a human LN111-coated dish was inhibited by both function-blocking antibodies to integrin  $\alpha 6$  and  $\beta 1$  (Figure 1G). These results indicated that the hESC-derived HBCs could attach to a human LN111-coated dish via integrin  $\alpha 6$  and  $\beta 1$ .

### The hPSC-Derived HBCs Could Be Proliferated and Maintained on a Human LN111-Coated Dish

To obtain the purified hESC-derived HBC population, the hESC-derived cells (day 9) were plated onto a human LN111-coated dish, and then unattached cells were removed at 15 min after plating (Figure 2A). Among various laminins, only human LN111 could proliferate (Figure 2B) and purify (Figure 2C) the AFP-positive population in the presence of HGF and EGF. During culture on the human LN111-coated dish, the morphology of the hESC-derived HBCs gradually changed into that of human hepatoblasts (Figure S1E) (Schmelzer et al., 2007). Therefore, the characteristics of hESC-derived HBCs might be changed by culturing on a human LN111-coated dish (details of the characterization of the hESC-derived HBCs are described in Figure 3). After culturing on a human LN111-coated