

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、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、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、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、

FOXA2、HNF1 を共搭載した Ad ベクターの方が、FOXA2、HNF1 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。

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。

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

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

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。具体的には、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るとともに、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、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、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 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 を共搭載した Ad ベクター

(Ad-FOXA2-HNF1) を作製した。Ad-FOXA2-HNF1 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 を別々の Ad ベクターに搭載して作用させた時と比べて、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 μ g/ml/24h/mg protein から約 14 μ 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 を共搭載した Ad ベクターの方が、FOXA2、HNF1 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。

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 を共搭載した Ad ベクター（Ad-FOXA2-HNF1）を作製した。その結果、Ad-FOXA2-HNF1 は FOXA2、HNF1 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。