

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、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 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 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 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) (FOXA2 と HNF1 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 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 P1-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 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 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 μ g/cm² 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）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 1.2×10^5 cells/ 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-GloTM 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 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 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 (Figure 1A)。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 (Figure 1B)、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、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 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。

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 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 - 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

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

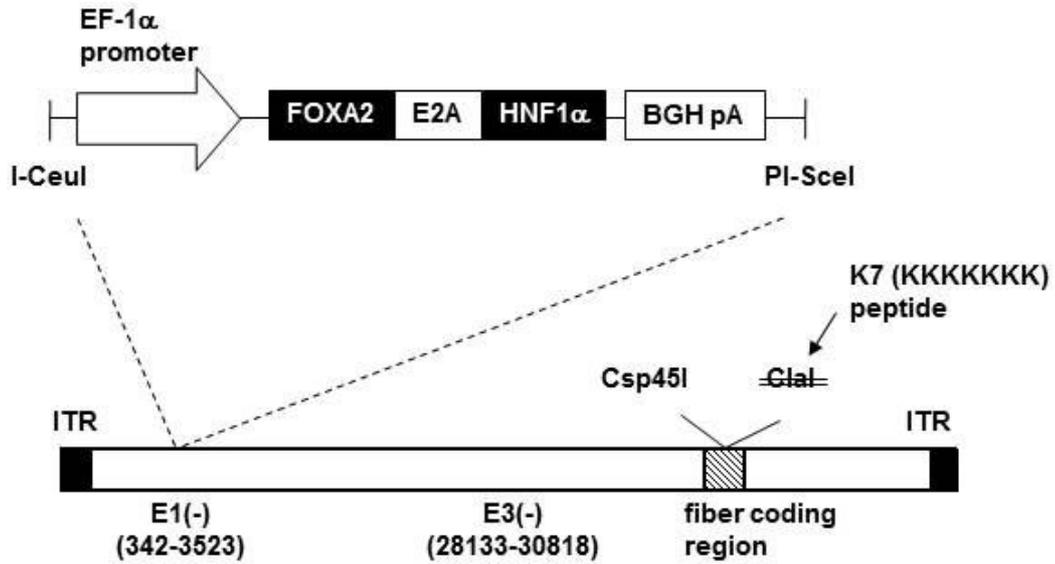
1. 特許取得

- 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胞、特願 2013-80557 号

2. 実用新案登録

Figure 1

A



B

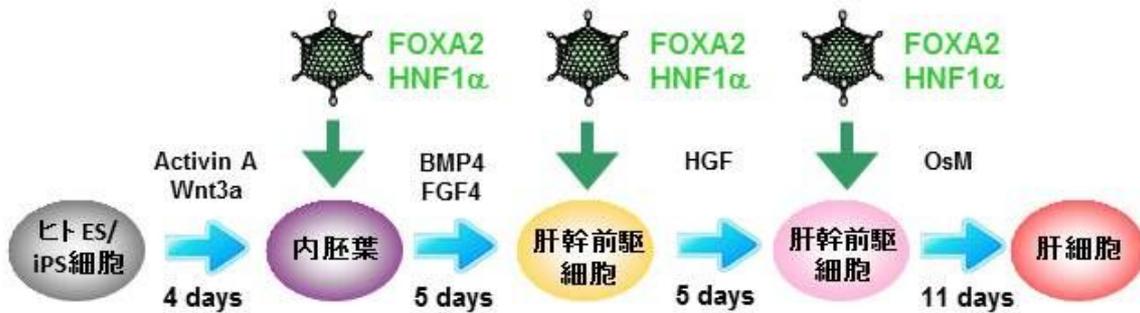


Figure 1 Hepatic differentiation of human ESCs and iPSCs transduced with Ad-FOXA2-HNF1 α .
(A) Schematic representation of Ad-FOXA2-HNF1 α used in this study.
(B) The procedure for differentiation of human ESCs and iPSCs into hepatocyte-like cells.

Figure 2

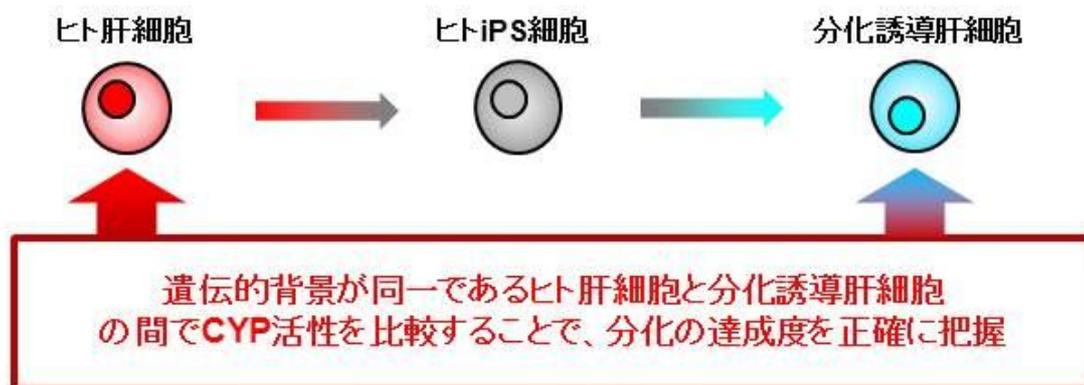


Figure 2 Generation and differentiation of primary human hepatocyte-derived iPSCs.