

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、様々な薬物代謝酵素活性を有した個人由来のヒト iPS 細胞から肝細胞を作製し、それらの細胞における薬物代謝酵素活性を評価した。また、CYP2D6 活性が極めて低くなる SNP を有する個人のヒト初代培養肝細胞（PHH）からヒト iPS 細胞を樹立・肝細胞分化誘導したのち、作製した分化誘導肝細胞において元の個人に特徴的な CYP2D6 活性と CYP2D6 による解毒作用が引き継がれるかどうか検証した。さらに、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、薬物が主病因となって発症した劇症肝炎由来の iPS 細胞の樹立を行った。その結果、

ヒト iPS 細胞株に依らない高効率肝分化誘導法を開発した。

様々な薬物代謝酵素活性を示す分化誘導肝細胞パネルを構築した。

CYP2D6 活性が極めて低くなる SNP を有する個人の PHH からヒト iPS 細胞を樹立・肝細胞分化誘導したのち、作製した分化誘導肝細胞において元の個人に特徴的な CYP2D6 活性と CYP2D6 による解毒作用が引き継がれていることを確認した。

劇症肝炎由来の iPS 細胞の樹立に成功した。

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

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

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

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

これまでのヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術は、iPS 細胞株によって肝細胞への分化効率に大きな違いが生じる。iPS 細胞株によらない効率良い分化誘導技術の開発は、分化誘導肝細胞株間の薬物代謝酵素活性を比較するために必須であると考えられる。そこで、肝幹前駆細胞（肝細胞の前駆細胞）を純化してから肝細胞へと分化誘導することによって、iPS 細胞株による肝分化指向性の違いが解消されるかどうか検証した。ラミニン 111 を用いて肝幹前駆

細胞を純化する工程を経ることによって、iPS 細胞株の肝分化指向性に関わらず、どの iPS 細胞株においても 85%以上の効率でアルブミン陽性の肝細胞へ分化可能であった。以上のことから、肝幹前駆細胞を純化してから、肝細胞へと分化誘導することで、iPS 細胞株によらず肝細胞へと高効率に分化できることが分かった。

次に、平均的な薬物代謝活性を有する PHH および、薬物代謝活性が上限・下限である PHH（合計 12 ドナー）を購入し、ヒト iPS 細胞を作製した。上述で開発した分化誘導技術を用いて、12 株の iPS 細胞を肝細胞へと分化誘導させたのち、CYP1A2, 2C9, 3A4 活性を測定した。PHH 由来 iPS 細胞から作製した分化誘導肝細胞における薬物代謝酵素活性は、PHH の薬物代謝酵素活性の個人差を反映していた。たとえば、CYP3A4 活性の高い PHH から作製した分化誘導肝細胞は CYP3A4 が高かった。以上のことから、薬物代謝酵素活性の個人差を反映したヒト iPS 細胞由来肝細胞が作製できたと示唆される。

さらに、CYP2D6 活性が極めて低くなる SNP を有する個人（poor metabolizer、PM）から分化誘導肝細胞を作製するために、まず CYP2D6 の PM となる SNP を有する PHH からヒト iPS 細胞を作製した。本研究で使用した 12 ドナーの PHH のうち、PHH8 と PHH11 は CYP2D6 の PM となる SNP を有していた。分化誘導肝細胞が個々の CYP2D6 の SNP を反映した CYP2D6 活性を有するかどうか調べるために、PHH8、PHH11 およびそれらの細胞から作製した分化誘導肝細胞（PHH8-iPS-HLCs、PHH11-iPS-HLCs）における CYP2D6 活性を測定した。その結果、PHH8、PHH11、PHH8-iPS-HLCs、PHH11-iPS-HLCs における CYP2D6 活性は他ドナーと比較して有意に低かった。したがって、CYP2D6 の

PMとなるSNPを有するPHHから作製した分化誘導肝細胞は親細胞と同様に、CYP2D6活性が極めて低いことが分かった。次に、分化誘導肝細胞が個々人のCYP2D6のSNPを反映したCYP2D6による薬物解毒作用を有するかどうか調べるために、デシプラミンをPHHおよびPHH-iPS-HLCsに作用した。デシプラミンはCYP2D6により解毒され、肝毒性を示さない代謝産物になる。CYP2D6のPMとなるSNPを有するPHH(PHH-NUL)・PHH-iPS-HLCs(HLC-NUL)において、CYP2D6活性が正常値となるSNPを有する個人のPHH(PHH-WT)、PHH-iPS-HLCs(HLC-WT)と比較して、有意に強い細胞毒性が確認された。なお、PHH-WTやHLC-WTにおけるデシプラミンの解毒作用はCYP2D6阻害剤であるquinidineによって弱まることから、これらの細胞におけるデシプラミンの解毒はCYP2D6を介したものであることが示唆される。以上のことから、CYP2D6のPMとなるSNPを有するPHHから作製した分化誘導肝細胞は親細胞と同様に、デシプラミンなどの薬物のCYP2D6を介した解毒作用が弱いことが分かった。

## 2. 劇症患者由来iPS細胞の作製

劇症肝炎患者由来組織より得られた繊維芽細胞より2株のiPS細胞の樹立に成功した。具体的には、センダイウイルスベクターを用いてKLF4, OCT3/4, SOX2, c-MYCの4遺伝子を導入した。その結果、ウイルス感染後10日ほどでドーム状の形態をもった細胞集団のコロニーが現れた。このコロニーを継代培養するとiPS様のコロニーが形成された。センダイウイルスが除去されたことを確認し、SSEA-4, NANOG等の未分化マーカーによる免疫化学染色を行った結果、いずれも陽性であった。また、マ

ウスへの移植による奇形種形成で、三胚葉への分化が確認された。

## D. 考察

今年度は様々な薬物代謝酵素活性を有するPHHからヒトiPS細胞を介して分化誘導肝細胞を作製した。また、CYP2D6のPMとなるSNPを有するPHHから分化誘導肝細胞を作製し、元の個人に特徴的なCYP2D6活性とCYP2D6による解毒作用が引き継がれることを確かめた。今後は、本分化誘導肝細胞パネルを用いて、毒性評価試験への応用を試みる。具体的には、薬物代謝酵素のよって代謝され肝毒性を生じる薬物を本パネル細胞に作用させ、各細胞における細胞毒性・ミトコンドリア毒性を評価する予定である。さらに、本分化誘導肝細胞パネルを用いて、酵素誘導の評価系を確立する。まず、本パネルが酵素誘導の評価系への応用が可能かどうか検証するため、代表的な誘導薬物(リファンピシン、フェノバルビタールなど)を作用させ、CYPのmRNA量の変動を調べる予定である。

さらに、劇症患者由来iPS細胞の樹立実験を2回行ったが、1回目と2回目で樹立効率に顕著な差が見られた。このことから、iPS細胞を樹立する際に重要な条件として様々なことが示唆された。1細胞あたりに感染させるウイルス量の違い、遺伝子導入細胞の若さおよび増殖能の違い、ピックアップするコロニーの形態学的違い、継代を行うタイミングなどが挙げられる。これらのことから、樹立効率を向上させるには、遺伝子を導入する細胞に応じて適切な条件を選択することが必要であると考えられた。これらのiPS細胞を用いて、特異的遺伝子

多型の SNP を同定することとなる。

## **E . 結論**

本年度は、ヒト iPS 細胞株に依らない高効率肝分化誘導法を開発した。また、様々な薬物代謝酵素活性を示す分化誘導肝細胞パネルを構築した。さらに、CYP2D6 活性が極めて低くなる SNP を有する個人の PHH からヒト iPS 細胞を樹立・肝細胞分化誘導したのち、作製した分化誘導肝細胞において元の個人に特徴的な CYP2D6 活性と CYP2D6 による解毒作用が引き継がれていることを確認した。

さらに、劇症肝炎由来の iPS 細胞の樹立に成功した。

## **F . 健康危険情報**

該当事項無し。