

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・販売中止に至る有害事象の一つである。ヒト初代培養肝細胞の利用により毒性評価の向上が見込まれるものの、非常に高価格であり、供給面に不安があるため、大規模スクリーニングの実施は困難である。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物の肝毒性評価系の開発を目標としている。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。さらに、cytochrome P450 2D6(CYP2D6)活性が極めて低くなる一塩基多型(SNP)を有する個人のヒト初代培養肝細胞からヒト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。

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

同定し、医薬品開発の効率および安全性を高めることが試みられている。しかしながら、PHH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細胞テクノロジーを駆使することで個人差を反映した薬物の肝毒性評価系の開発を試みた。我々は昨年度までに、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を購入し、ヒトiPS細胞を作製した。本年度は、

A. 研究目的

薬物により引き起こされる肝障害は、医薬品の開発中止・医薬品の市場撤退の主たる原因の1つである。現在は、ヒト初代培養肝細胞(PHH;ヒト凍結肝細胞を含めてヒト初代培養肝細胞と表記)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初期段階において

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。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るかどうか検証した。

B. 研究方法

B.1. ヒト iPS 細胞の樹立

山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を搭載したセンダイウイルスベクター (SeVdp-iPS ベクター) を用いて PHH からヒト iPS 細胞を作製した。PHH を播種した 24 時間後 (細胞密度は 6.12×10^4 cells/cm²) PHH に対して 5 multiplicity of infection (MOI) で SeVdp-iPS ベクターを作用させ、HCM-iPS 培地 (HCM-iPS 培地は HCM に rock inhibitor を加えた培地 (rock inhibitor は Y27632 (10 μM、Millipore) あるいは Thiazovivin (0.5 μM、Santa Cruz Biotechnology) を使用) で培養した。SeVdp-iPS ベクターを作用させた 3 時間後、新鮮な HCM-iPS 培地に交換した。翌日、MEF を 1×10^4 cells/cm² の細胞密度で PHH の上から播種し、HCM-iPS 培地で 24 時間培養した。その後、PHH を ReproStem-iPS 培地 (ReproStem-iPS 培地は ReproStem 培地に 10 ng/ml FGF2、2 μM SB431542 (ALK inhibitor, Wako)、0.5 μM PD0325901 (MEK inhibitor, Wako)、rock inhibitor (10 μM Y27632 あるいは 0.5 μM Thiazovivin を加えた培地) で 2-3 週間維持した。iPS 様コロニーが出現したのちは、トランスファーピペットを用いて MEF 上に継代し、10 ng/ml FGF2 を含む ReproStem 培地で維持した。

B.2. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株は 10 ng/mL bFGF を含む iPS 細胞用培地 ReproStem (ReproCELL) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。4-6 日ごとに 0.1 mg/mL Dispase II (Roche) を用いてヒト ES/iPS 細胞コロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。ヒト ES/iPS 細胞の状態に応じてトランスファーピペット (Thermo Scientific) を用いてメカニカルに細胞を継代する場合もある。

B.3. ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

肝細胞への分化を開始する前に、ヒト iPS 細胞を dispase で剥離し、Matrigel 上に継代し、MEF-conditioned medium を用いて 3-4 日間培養した。ヒト ES/iPS 細胞を内胚葉細胞へ分化誘導する際は、100 ng/ml Activin A、4 mM L-Glutamine、0.2% FBS (PAA Laboratories)、1×B27 Supplement Minus Vitamin A (Life Technologies) を含む L-Wnt3A-expressing cell (ATCC、CRL2647)-conditioned RPMI1640 培地で 4 日間培養した。内胚葉細胞から肝幹前駆細胞へ分化誘導する際は、30 ng/ml BMP4、20 ng/ml FGF4、4 mM L-Glutamine、1×B27 Supplement Minus Vitamin A を含む RPMI1640 培地で 5 日間培養した。ヒト LN111 を用いた肝幹前駆細胞の純化法は我々の過去の報告を参考にされたい (Stem Cell Reports. 2013 Oct 3;1(4):322-35.)。肝幹前駆細胞から肝細胞へ分化誘導する際は、20 ng/ml HGF、4 mM L-Glutamine、1×B27 Supplement Minus Vitamin A を含む RPMI1640 培地で 5 日間培養したのちに、20 ng/ml OsM を含む HCM 培地 (HCM 培地は EGF を含まないものを使用) で 11 日間培養した。

B.4. FACS

ヒト ES/iPS 細胞およびその分化細胞を単細胞に分散したのち、4%

Paraformaldehyde で 10 分間固定した。抗ヒト AFP 抗体を用いて一次抗体反応をさせたのち、alexa 488-labeled 抗体を用いて二次抗体反応を行った。FACS 解析は FACS LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) を用いて行った。

B.5. LC-MS/MS

CYP1A2、2D6、2C9、3A4 を測定するために、ヒト iPS 細胞、分化誘導肝細胞、PHH をそれぞれ 10 μ M phenacetin (PHE、Cambridge Isotope Laboratories)、10 μ M diclofenac (DIC、Wako)、1 μ M bufuralol (BF、Santa Cruz Biotechnology)、100 μ M testosterone (TS、Wako) を含む培地で培養した。上記の薬物の CYP による代謝物はそれぞれ acetaminophen (APAP)、4'-hydroxy diclofenac (OHDIC)、1'-hydroxybufuralol (OHBF)、6 β -hydroxytestosterone (OHTS) である。各サンプル液に含まれる代謝物の量は UPLC-MS/MS を用いて定量した。UPLC 解析は Acquity UPLC (Waters)、MS/MS 解析は Q-Premier XE (Waters) を用いて実施した。各代謝物量は検量線を用いて算出したのちに、タンパク量で補正した。

B.6. desipramine による細胞毒性の評価

B.3. の方法により作製した分化誘導肝細胞および PHH に対して、5 μ M desipramine (Sigma) を作用した。また、肝毒性化合物の解毒作用が CYP2D6 を介したものであるか調べる際は、3 μ M quinidine (Sigma) を使用した。細胞生存率は WST-8 assay kit (Dojindo) を用いた。細胞生存率は DMSO 作用群を 100%としている。

C. 研究結果

C.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

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 (Figure 1A)。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 (Figure 1A) 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 (Figure 1B)。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。

C.2. 薬物代謝酵素活性の個人差を反映したヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製

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 C.1. 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 (Figure 2A-2C)。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。

C.3. CYP2D6 の poor metabolizer となる SNP を有する分化誘導肝細胞の解析

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 (Figure 3A)。分化誘導肝細胞が個々人の 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 (Figure 3B)。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 (Figure 3C)。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 (Figure 3D)。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 (Figure 3E)、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。

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、薬物代謝酵素に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。

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y.,

Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. Cell Transplantation, in press.

- 2) Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A., 2014; 111:16772-7.
- 3) Kuno S, Sakurai F, Shimizu K, Matsumura N, Kim S, Watanabe H, Tashiro K, Tachibana M, Yokoi T, Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4. Drug Metab Pharmacokinet. 2014; 29: 296-304.
- 4) 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, 147-158, 2014, In: M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki (eds.)

2. 学会発表

- 1) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼

太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之; ヒト iPS 細胞由来肝細胞の肝障害マウスへの効率良い移植法の開発、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月

- 2) 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 ES/iPS 細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下移植と組織化の検討、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 3) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之; 同一遺伝情報を有するヒト iPS 細胞由来肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能の比較解析、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 4) 水口裕之; 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術の現状と今後の課題・可能性、第 41 回日本毒性学会学術集会、神戸、2014 年 7 月
- 5) Takayama K., Morisaki Y., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Comparison of capacity for drug metabolism between genetically matched human hepatocytes and iPS-derived hepatocyte-like cells、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014 年 6 月
- 6) Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation enhances the survival rate of acute liver failure mice、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014 年 6 月

- 7) 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 ES/iPS 細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下への移植法の検討、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 9 月
- 8) 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞由来肝細胞を用いた次世代型創薬の実現を目指した基盤技術創成、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 10 月
- 9) 今川和生、高山和雄、磯山茂美、野口恵美子、新開真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、須磨崎亮、水口裕之；疾患特異的 iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた進行性家族性胆汁うっ滞症 2 型の病態再現、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
- 10) 水口裕之、高山和雄；再生医療、創薬応用を目指した多能性幹細胞由来肝細胞の創出、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
- 11) 小澤辰哉、高山和雄、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；薬物動態評価系への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月
- 12) 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；マウス腎被膜下への分化誘導肝細胞の移植法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月
- 13) 塙守史、高山和雄、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト ES/iPS 細胞を用いた肝分化誘導系における HNF アイソフォームの機能解析、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月
- 14) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；同一遺伝的背景を持つヒト iPS 細胞由来肝細胞と初代培養肝細胞の間における薬物代謝能・薬物応答能の比較解析、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月
- 15) Takayama K., Morisaki Y., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Prediction of inter-individual differences in drug metabolism and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocyte-like cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (iPS Cells for Regenerative Medicine)、大阪、2015 年 1 月
- 16) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを用いた効率良い新規移植法の検討、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 17) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 由来肝細胞を用いた薬物応答能の個人差の予測 CYP2D6 遺伝子の SNP の相違による個人差の再現、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 18) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、末永洋志、川端健二、水口裕之；マウス腎被膜下への分化誘導肝細胞移植における最適なヒト ES/iPS 細胞株の探索、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

H. 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、関口清敏（発明人）肝幹前駆様細胞の培養方法及びその培養物、PCT/JP2014/60228号
- 2) 水口裕之、高山和雄（発明人）薬物評価用細胞及び薬物評価方法、特願2014-134701号

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し

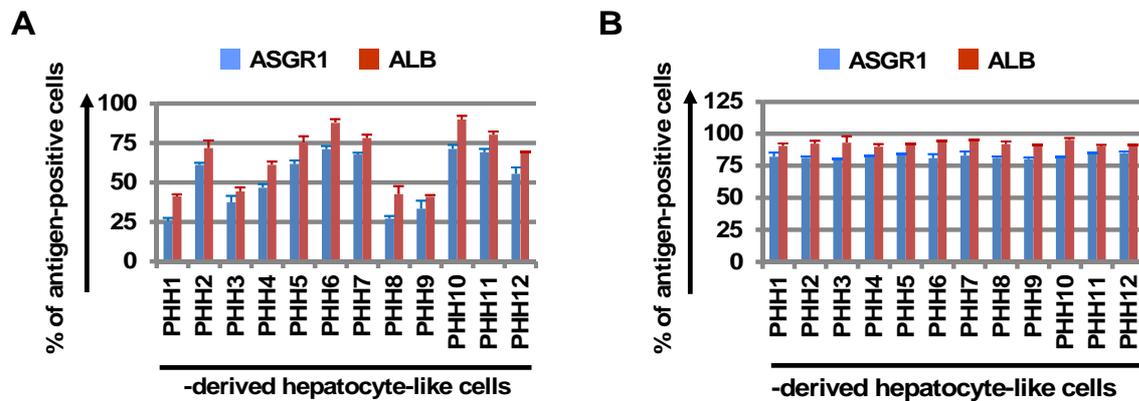


Figure 1. Highly Efficient Hepatocyte Differentiation from PHH-iPSCs Independent of Their Differentiation Tendency.

(A) PHH-iPSCs were differentiated into the HLCs via the HBCs. On day 25 of differentiation, the efficiency of hepatocyte differentiation was measured by estimating the percentage of ASGR1- or ALB-positive cells using FACS analysis. (B) PHH-iPSCs were differentiated into the hepatic lineage, and then PHH-iPS-HBCs were purified and maintained for 3 passages on human LN111. Thereafter, expanded PHH-iPS-HBCs were differentiated into the HLCs. The efficiency of hepatic differentiation from PHH-iPS-HBCs was measured by estimating the percentage of ASGR1- or ALB-positive cells using FACS analysis. Data represent the mean \pm SD from three independent differentiations.

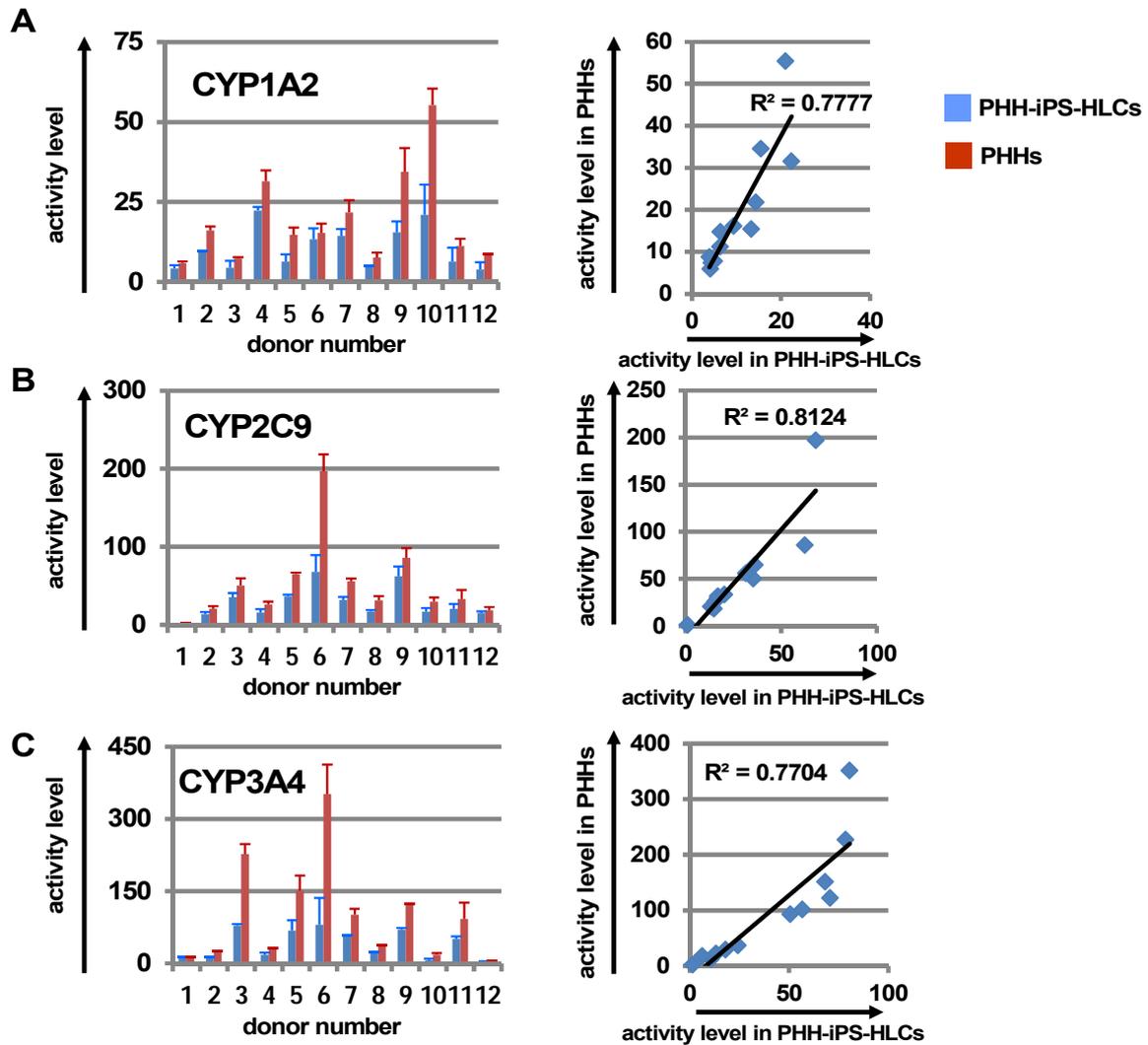


Figure 2. The Drug Metabolism Capacity and Drug Responsiveness of PHH-iPS-HLCs Were Highly Correlated with Those of Their Parental PHHs. (A-D) CYP1A2 (A), 2C9 (B), and 3A4 (C) activity levels in PHH-iPS-HLCs and PHHs were measured by LC-MS/MS analysis. The R-squared values are indicated in each figure. Data represent the mean \pm SD from three independent experiments.

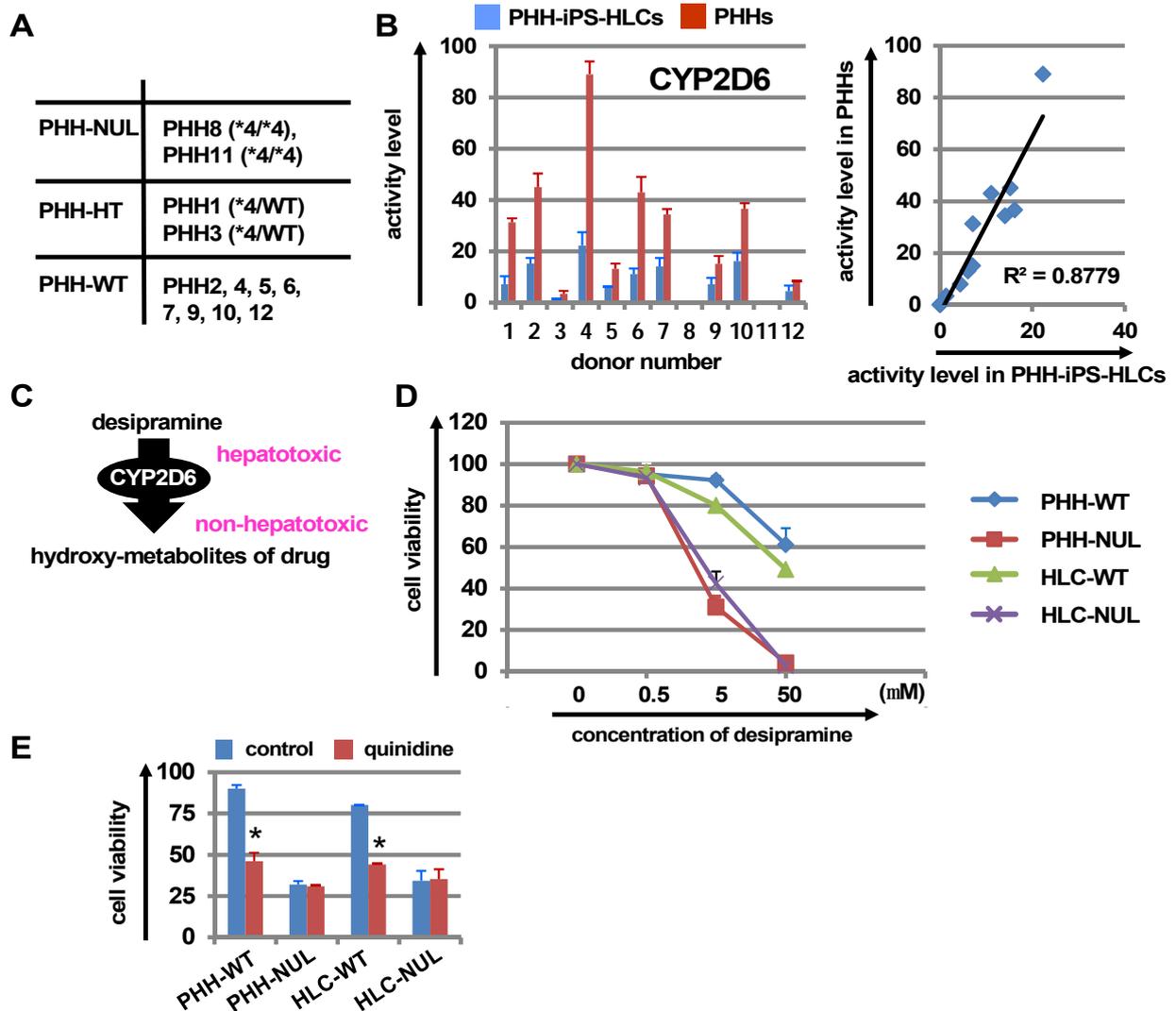


Figure 3. The Inter-Individual Differences in CYP2D6 Metabolism Capacity and Drug Responsiveness Induced by SNPs in CYP2D6 are Reproduced in the PHH-iPS-HLCs. (A) SNPs (CYP2D6*3, *4, *5, *6, *7, *8, *16, and *21) in the CYP2D6 gene were analyzed. (B) The CYP2D6 activity levels in PHH-iPS-HLCs and PHHs were measured by LC-MS/MS analysis. (C) The detoxification of desipramine-dependent conversion to its conjugated form by the CYP2D6. (D) The cell viability of PHH-WT, PHH-NUL, HLC-WT, and HLC-NUL was assessed after 24 hr exposure to different concentrations of desipramine. (E) The cell viability of the PHH-WT and HLC-WT was assessed after 24 hr exposure to 5 μ M of desipramine in the presence or absence of 5 μ M quinidine (a CYP2D6 inhibitor). In Figures 4E, Student's *t* test indicated that the cell viability in the "control" was significantly higher than that in the "quinidine" group ($P < 0.01$).