

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

(分担)研究報告書

iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証

研究分担者 山田 弘

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨

iPS 細胞の創薬への応用に関する研究が精力的に行われている中、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞に関する品質管理技術の確立が急務となっている。

本分担研究の目的は、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースの情報を活用し、当データベースに蓄積されたヒト初代培養肝細胞と hiPS 由来肝細胞様細胞の薬剤応答性トランスクリプトームデータをインフォマティクス手法で比較解析することにより、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることである。

本年度は、hiPS 由来肝細胞様細胞に係る一連の基礎データを取得するため、分担研究者・櫻井により作製された hiPS 由来肝細胞様細胞の品質評価を開始した。具体的には、作製日の異なる hiPS 由来肝細胞様細胞についてトランスクリプトームデータを取得し、分化誘導実験の間でのデータ比較を行った(日間差の確認)。

その結果、hiPS 由来肝細胞様細胞の誘導実験間での再現性は、ヒト凍結初代肝細胞の同一ロット間での実験間再現性よりも低く、異なるロット間での再現性とは同等あるいはやや低い結果が得られた。また、hiPS 由来肝細胞様細胞間の比較で、一部遺伝子に著しい発現値の違いが認められたが、これら多くには分化度の差に起因する遺伝子の変動が含まれると考えられた。

今後、hiPS 由来肝細胞様細胞からの追加基礎データ及び薬剤応答性トランスクリプトームデータ取得などを行い、品質評価系の確立を目指す。

研究協力者

**中津 則之** (独立行政法人 医薬基盤研究所)

**五十嵐芳暢** (独立行政法人 医薬基盤研究所)

保が不可欠となる。

本研究事業は、iPS 細胞の品質を変動させる要因を明らかにするとともに、実用化に向けて開発が進んでいる培養技術の標準化を目指している。この中で本分担研究は、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースの情報を活用し、当データベースに蓄積されたヒト初代培養肝細胞と hiPS 由来肝細胞様細胞の薬剤応答性トランスクリプトームデータをインフォマティクス手法で比較解析することにより、iPS 細胞及び iPS 細胞由

A. 研究の目的

iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞を創薬に応用するためには、それら細胞の性状を明らかにするとともに、安定した品質の確

来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることを目的としている。トキシコゲノミクスデータベースには、医薬品を中心とした約 170 種の化合物をヒト初代培養肝細胞に曝露した際の遺伝子発現情報が蓄積されている。データベース構築においてはヒト肝細胞を用いているが、曝露した化合物の多くは薬効メカニズムが知られた医薬品であることから、単に肝毒性に関わる遺伝子発現変化だけでなく、薬理作用に起因した変化も捉えられる可能性がある。従って、まずは肝細胞の特性に着目した研究を進めるが、次の段階では肝細胞で得られた知見の他臓器細胞への応用についても検証を行う。

## B. 研究の方法

### (1)測定サンプル

分担研究者・櫻井により作製された分化誘導実験日の異なる3種のhiPS由来肝細胞様細胞(iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3)から調製したサンプルを測定に用いた。当サンプルは分化誘導開始25日目の細胞から抽出されたtotal RNAであり、測定直前まで-80℃で凍結保存されていたサンプルである。

### (2)網羅的遺伝子発現測定

測定はアフィメトリクス社のプロトコールに従いGeneChip 3'IVT Plus Kit及びHuman Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いて行った。total RNA 100 ngよりT7-oligo dTプライマーを用いて逆転写し、一本鎖cDNAを合成した。さらにT4 DNA polymeraseにより、二本鎖DNAを合成・精製した。次にIVT反応により標識化された

cRNAを合成・精製後、300-500bpとなるように断片化し、ターゲット液とした。断片化の前後で吸光度測定及びアガロースゲル電気泳動を行い、純度及び分解の有無を確認した。ターゲット液をHuman Genome U133 Plus 2.0 Arrayにて18時間ハイブリダイゼーションし、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンで染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。測定したデータはMAS5法・メディアン値によるglobal normalizationにより標準化した。

### (3)遺伝子発現データの解析

遺伝子発現データの実験間再現性及び変動は、スキャッタープロットにより検討した。また、肝臓で選択的に発現している遺伝子を抽出するため、先ず平成23年度までに取得済みのラット組織別遺伝子発現データよりROKU法を用いてラット肝臓に選択的に発現している遺伝子を抽出し、続いてこれらの遺伝子の中で発現量の大きい上位50遺伝子についてNetAffyによりヒト遺伝子へオルソログ変換して肝臓選択的発現遺伝子群とした。

### (倫理面への配慮)

本年度、特に関連する事項はなかった。

## C. 研究結果

異なる時期に実施された分化誘導実験において取得された3種のサンプル(iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3)について、サンプル間の遺伝子発現レベルの相関性をスキャッタープロットにより確認した(図1)。

その結果、iPS-hepa1 と iPS-hepa2 間、iPS-hepa1 と iPS-hepa3 の間では異なる遺伝子発現を示す細胞集団(プロットの偏り)が認められた。一方、iPS-hepa2 と iPS-hepa3 の間には、大きなプロットの偏りは認められなかった。

iPS-hepa2 と iPS-hepa3 の間でのプロットの収束性について、ヒト初代肝細胞のロット内(2 ロット)及びロット間(3 ロット)での収束性と比較したところ、ヒト初代肝細胞のロット内(図 2-1)での収束性よりも低く、ヒト初代肝細胞のロット間(図 2-2)との比較では、ほぼ同等あるいはやや低い傾向が認められた。

次に iPS-hepa1 と iPS-hepa2、iPS-hepa1 と iPS-hepa3 の間で発現レベルに差を示した遺伝子について解析を行った。肝臓に選択的に発現している遺伝子の中から発現量の大きい上位 50 遺伝子をスクATTERプロットに重ねてプロットしたところ(図 3)、約半数が iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 において非常に高い発現値を示していた。これらの遺伝子の中には肝実質細胞で高発現を示すとしてよく知られているアルブミンやフィブリノーゲンなどが含まれていた。

## D. 考察

異なる時期に実施された分化誘導実験において取得された3種の hiPS 由来肝細胞様細胞(iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3)より抽出された total RNA サンプルについて、サンプル間の遺伝子発現レベルの相関性をスクATTERプロットにより確認したところ、iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 で高い発現値を示す遺伝子集団

を見出した(図1)。この集団を除いた全体的なスクATTERプロット及び iPS-hepa2 と iPS-hepa3 間のスクATTERプロットの分布との比較において、hiPS 由来肝細胞様細胞の誘導実験間での再現性は、ヒト凍結初代肝細胞の同一ロット間での実験間再現性よりも低く、異なるロット間での再現性とは同等あるいはやや低い結果となった(図 2)。これらの結果は、改善の余地はあるものの、現状の分化誘導法で得た hiPS 由来肝細胞様細胞においても、ヒト凍結初代肝細胞に近い再現性の下で実験が実施できる可能性を示しているものと考えられた。

iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 で高い発現値を示す遺伝子集団について解析したところ、ヒトアルブミン等の肝実質細胞で高発現を示す遺伝子を多数含んでいることが明らかとなった。分担研究者・櫻井らにより測定されたアルブミン産生量は、iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3 で、それぞれ  $9.24 \pm 1.04$ 、 $15.23 \pm 2.19$ 、 $13.9 \pm 0.92$  ( $\mu\text{g/ml}/24\text{hr}/\text{mg protein}$ )であり、iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 において高いアルブミン産生量が示されている。従って、スクATTERプロットで示されたプロットの偏りは、肝実質細胞への分化の程度の差、あるいは分化の異なる細胞の混在等を示唆するものと考えられた。また、本研究で設定した肝臓選択的発現遺伝子群は、hiPS 由来肝細胞様細胞の品質管理に応用できる可能性があると考えられた。

今後、分化誘導過程、特に hiPS 由来肝細胞様細胞になる時期と設定されている分化誘導開始 25 日目前後における経時的遺伝子発現プロファイル等を確認することにより、スクATTERプロットで示されたプロットの

偏りの原因を明らかにして行く予定である。

## E. 結論

hiPS 由来肝細胞様細胞に係る一連の基礎データを取得するため、本年度は作製日の異なる hiPS 由来肝細胞様細胞からトランスクリプトームデータを取得し、分化誘導実験の間でのデータ比較を行った(日間差の確認)。その結果、hiPS 由来肝細胞様細胞の誘導実験間での再現性は、ヒト凍結初代肝細胞の同一ロット間での実験間再現性よりも低く、異なるロット間での再現性とは同等あるいはやや低い結果が得られた。また、hiPS 由来肝細胞様細胞間の比較で、一部遺伝子に著しい発現値の違いが認められたが、これら多くには分化度の差に起因する遺伝子の変動が含まれると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Onishi, M., Ozasa, K., Kobiyama, K., Ohata, K., Kitano, M., Taniguchi, K., Homma, T., Kobayashi, M., Sato, A., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Wijaya, E., Igarashi, Y., Nakatsu, N., Ise, W., Inoue, T., Yamada, H., Vandenbon, A., Standley, DM., Kurosaki, T., Coban, C., Aoshi, T., Kuroda, E., and Ishii, KJ. (in press). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh5 responses to the co

administered antigen. *J. Immunol.*

- 2) Igarashi, Y., Nakatsu, N., Yamashita, T., Ono, A., Ohno, Y., Urushidani, T. and Yamada, H. (2015). Open TG-GATES: a large-scale toxicogenomics database. *Nucleic acids research* 43(Database issue), D921-7.
- 3) Hanafusa, H., Morikawa, Y., Uehara, T., Kaneto, M., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). Comparative gene and protein expression analyses of a panel of cytokines in acute and chronic drug-induced liver injury in rats. *Toxicology* 324, 43-54.
- 4) Minami, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Omura, K., Kanki, M., Horinouchi, A., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). miRNA expression atlas in male rat. *Scientific Data* 1, 10.1038/sdata.2014.5.
- 5) Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Comprehensive analysis of DNA methylation and gene expression of rat liver in a 2-stage hepatocarcinogenesis model. *J Toxicol Sci* 39(6), 837-48.
- 6) Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis model.

cinogenesis study in rats. *J Toxicol Sci* 39(5), 785-794.

- 7) Saito, K., Maekawa, K., Ishikawa, M., Senoo, Y., Urata, M., Murayama, M., Nakatsu, N., Yamada, H. and Saito, Y. (2014). Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicological Sciences* 141(2), 377-386.
- 8) Uehara, T., Horinouchi, A., Morikawa, Y., Tonomura, Y., Minami, K., Ono, A., Yamate, J., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). Identification of metabolic biomarkers for drug-induced acute kidney injury in rats. *Journal of applied toxicology : JAT* 34(10), 1087-1095.

## 2. 学会発表

【招待講演】

山田弘, Overview:トキシコゲノミクスプロジェクト, 第41回日本毒性学会年会, トキシコゲノミクスの活用例と今後の展開(神戸), 2014.7.

山田弘, 堀井郁夫, 第41回日本毒性学会年会, 日本毒性学会&日本中毒学会合同シンポジウム 急性中毒の予後に影響するバイオマーカーの臨床および基礎毒性的な考察(神戸), 2014.7.

Yamada H., Future approach for safety assessment / evaluation with new science & technology, International Workshop of Nonclinical Safety Studies for Human Clinical Trials (Seoul, Korea), 2014.11.

山田弘, 大規模トキシコゲノミクスデータベースを活用した安全性バイオマーカー探索, 第8回ラットリソースリサーチ研究会(京都), 2015.1.

【ポスター発表】

中津則之, 五十嵐芳暢, 青枝大貴, 石井健, 山田弘, 麻酔剤としてのイソフルラン, ジエチルエーテル, ペントバルビタールがラット肝遺伝子発現に及ぼす影響についての検討, 第41回日本毒性学会学術年会(神戸), 2014.7.

五十嵐芳暢, Johan T Nystrom-Persson, 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxigetes:トキシコゲノミクスデータ解析プラットフォームの実装, 第41回日本毒性学会学術年会(神戸), 2014.7.

坂手龍一, 深川明子, 水口賢司, 山田弘, 増井徹, 塩谷恭子, 松田潤一郎, 宮本恵宏, 松山晃文, 創薬・疾患研究のための生物資源・疫学研究データベースの開発, トーゴの日シンポジウム 2014(東京), 2014.10.

五十嵐芳暢, Johan T. Nystrom-Persson, 山田弘, 石井健, 水口賢司, アジュバントデータベースの開発とトキシコゲノミクスデータの統合に向けて, トーゴの日シンポジウム 2014(東京), 2014.10.

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, 安全性評価モデルのアジュバント遺伝子発現情

報への適用に向けて, 第8回次世代アジュ  
バント研究会(大阪), 2015.1.

## H. 知的財産所有権の出願・登

### 録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1 hiPS 由来肝細胞様細胞(3ロット)間での遺伝子発現レベルの相関性

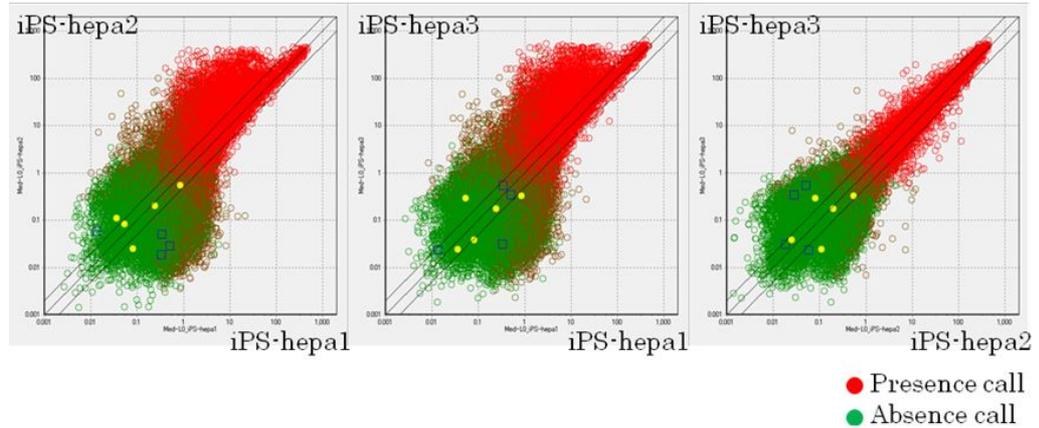
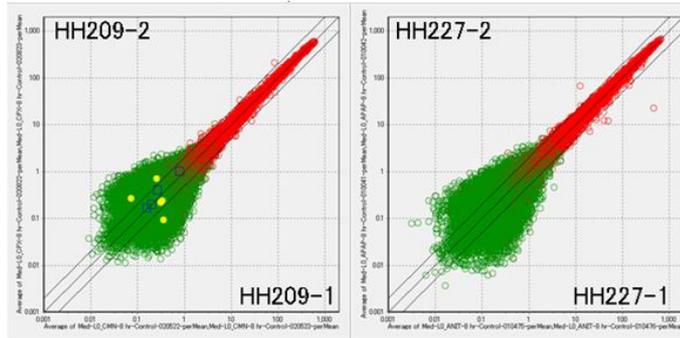


図2 ヒト初代肝細胞におけるロット内及びロット間でのプロットの収束性

1) ロット内でのプロットの収束性(2ロット)



2) ロット間でのプロットの収束性(3ロット)

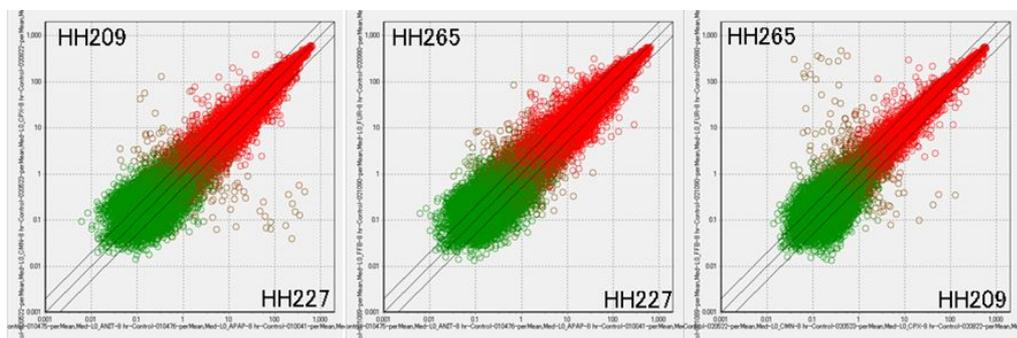


図3 hiPS 由来肝細胞様細胞のスクアタープロットにおける肝臓選択的遺伝子の分布

