

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 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究

研究分担者 櫻井 文教

大阪大学大学院 薬学研究科

分子生物学分野 准教授

研究要旨: 本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的にヒト iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足がヒト iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明することを目的としている。本研究において、我々はヒト iPS 由来肝細胞を用いた創薬研究を目指す研究者らがコントロールとして使用できる再現性の高い肝細胞への分化プロトコルを策定したのち、様々な品質のヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導能の評価を行う予定である。本年度は、これまでに論文発表されている代表的な肝細胞への分化プロトコルの収集を行った。さらに、複数の代表的な分化プロトコルを用いて肝細胞を作製し、分化プロトコルの評価を開始した。

研究協力者

水口裕之

大阪大学大学院薬学研究科

独立行政法人 医薬基盤研究所

高山和雄

大阪大学大学院薬学研究科

独立行政法人 医薬基盤研究所

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は創薬過程において薬効評価および毒性評価等への応用が期待されている。高品質なヒト iPS 細胞を安定的に供給するには高い水準の培養操作技術レベルを要する。そのため、研究者間でヒ

ト iPS 細胞の品質が大きく変動することが深刻な

問題となっている。ヒト iPS 細胞由来製品

を創薬応用するには、再現よく分化誘導できる高品質なヒト iPS 細胞

を培養する技術を開発することが急務である。本課題では、(i)培

養手技の違いが iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検証する。また、(ii)

培養条件の違いによる品質変動を検証する。iPS 細胞を創薬応用す

る際には、特定の組織細胞に分化させた細胞が利用されるため、(i)分

化プロトコルを標準化し、また、(ii)個々の品質変動要因が細胞の

分化誘導の再現性に及ぼす影響を

評価・検証を行う。我々は本課題のうち、(i)肝細胞への分化プロトコールの標準化および(ii)ヒトiPS細胞の品質を変動させる要因が肝細胞への分化誘導の再現性に及ぼす影響の評価を実施する。本年度は、これまでに公開されている代表的な肝細胞への分化プロトコールを収集する。さらに、複数の代表的な肝細胞分化プロトコールを用いて肝細胞を作製し、分化プロトコールの評価を開始した。

B. 研究方法

B.1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株(Tic)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.2. 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 細胞から肝細胞への分化誘導法は図 2 を参照にされたい。

B.3. 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。抗ヒトアジア糖タンパク受容体 1 (ASGR1) 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.4. アルブミン (ALB) 産生能の評価

ヒト iPS 由来肝細胞について、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) を用いて測定した。アルブミン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。

C. 研究結果

これまでに公表されているヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコールの収集を行った。図 1 に記載する通り、Stephen Duncan 研 (Stem

Book
(<http://www.stembook.org/>);
Hepatology. 2010
Jan;51(1):297-305.)、David Hay
研 (Stem Book
(<http://www.stembook.org/>);
Stem Cells Transl Med. 2014
Feb;3(2):141-8.)、Ludovic
Vallier 研 (Nat Protoc. 2013
Feb;8(2):430-7. ; Hepatology.
2010 May;51(5):1754-65.)におけ
る分化プロトコルを比較した。こ
のようにヒト iPS 細胞から肝細胞
への分化プロトコルは研究室間
で大きく異なっていることが確認
できた。

図1の3つの分化プロトコル
(一部改編)のうちどのプロトコル
が最も再現性良く高機能な肝細胞
を作製できるか調べるために、図
2に示す3プロトコルを用いて
ヒト iPS 細胞から肝細胞を作製し
た。作製したヒト iPS 由来肝細胞の
肝機能を評価するため、ASGR1 陽性
細胞率を FACS により評価すると
ともに、ALB 産生量を ELISA により計
測した。プロトコル1を用いて作
製した肝細胞の ASGR1 陽性率は80%
以上であったが、プロトコル2お
よび3を用いて作製した肝細胞の
ASGR1 陽性率はいずれも30%以下で
あった(図3A)。また、プロトコ
ル1を用いて作製した肝細胞の
ALB 産生量は $11 \mu\text{g/ml}/24\text{hr}/\text{mg}$
protein 程度であったが、プロトコ
ル2を用いて作製した肝細胞の
ALB 産生量は $7 \mu\text{g/ml}/24\text{hr}/\text{mg}$

protein であった(図3B)。以上の
ことから、プロトコル1を用いる
ことにより、プロトコル2,3よ
りも高い肝機能を持つヒト iPS 由
来肝細胞を作製できることが示唆
された。図3の結果は独立した3回
の分化誘導結果であることから、プ
ロトコル1はプロトコル2,3
よりも高い肝機能を有するヒト iPS
由来肝細胞を再現よく作製できる
ことが示唆された。

D. 考察

プロトコル1を用いること
により、高い肝機能を有するヒト iPS
由来肝細胞を再現良く作製できる
ことが確認できたため、今後は本プ
ロトコルを用いて様々な品質の
ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘
導を実施していく。また、本プロト
コルを用いて作製したヒト iPS
由来肝細胞における薬物代謝酵素
活性などのさらなる詳細な機能解
析も実施していく。

E. 結論

本年度は、ヒト iPS 細胞から肝細胞
への分化プロトコルの収集を
行うとともに、再現良く高機能な肝
細胞を作製できるプロトコルの
策定を開始した。

F. 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.

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) 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
- 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 埜守史、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
 - 11) 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
 - 12) 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

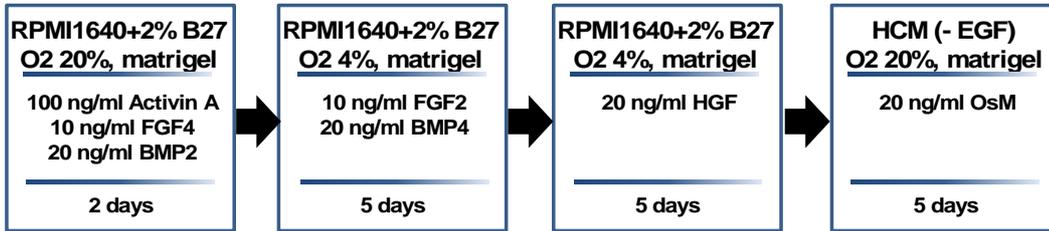
- 13)長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを用いた効率良い新規移植法の検討、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 14)高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 由来肝細胞を用いた薬物応答能の個人差の予測 CYP2D6 遺伝子の SNP の相違による個人差の再現、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 15)岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、末永洋志、川端健二、水口裕之；マ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

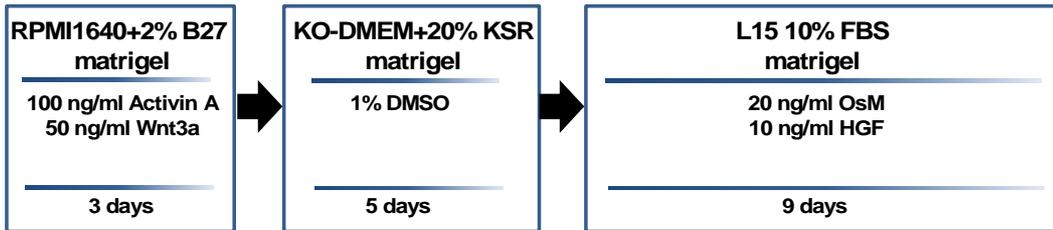
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し。
2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他
該当無し。

Stephen Duncan Lab.



David Hay Lab.



Ludovic Vallier Lab.

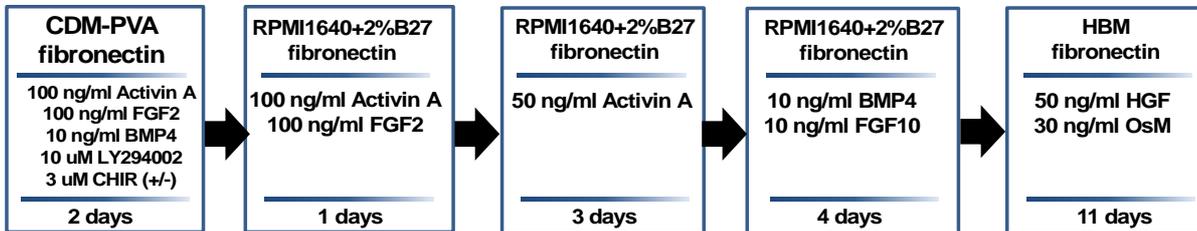
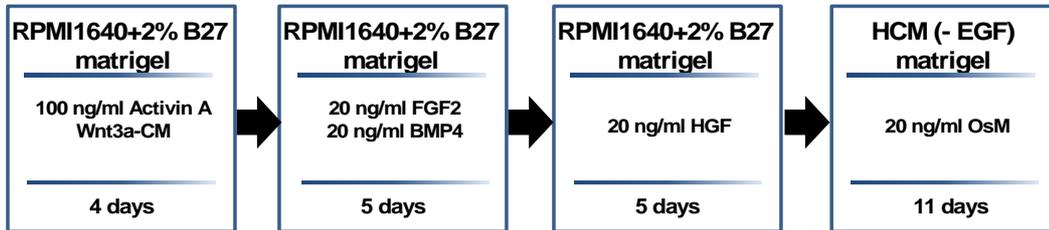
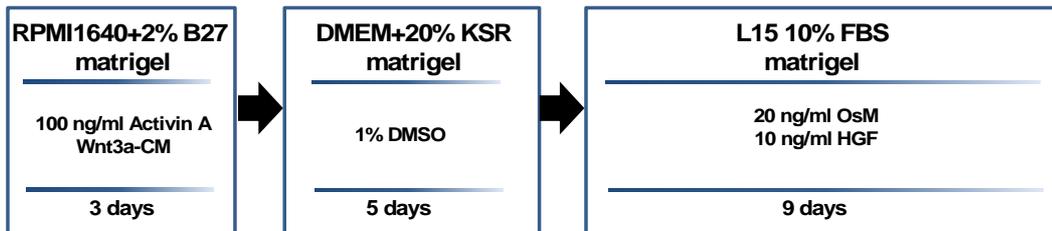


図1 . Stephen Duncan 研、David Hay 研、
Ludovic Vallier 研におけるヒト iPS 細胞
から肝細胞への分化プロトコール

Protocol 1



Protocol 2



Protocol 3

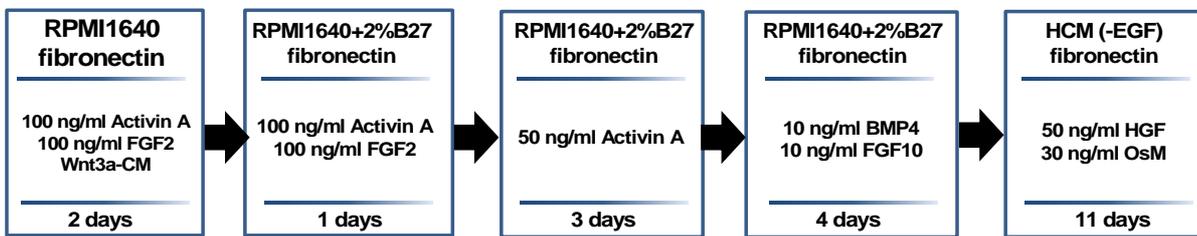


図2 . 本実験にて検討した3分化プロトコールの概略

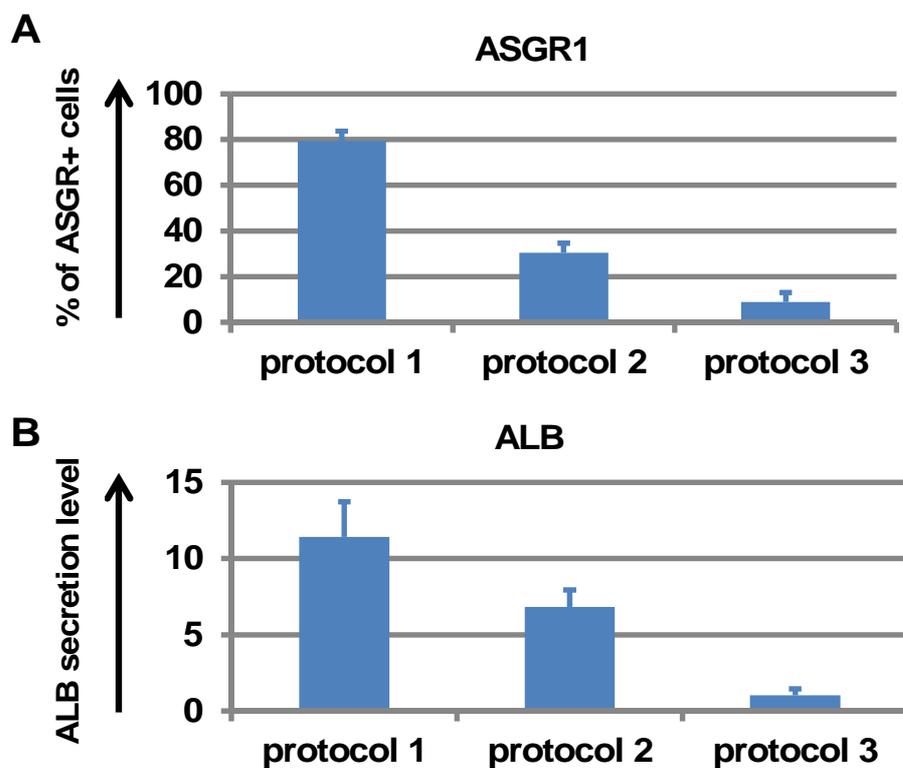


図3．複数の肝細胞への分化プロトコールの比較

ヒト iPS 細胞 (Tic) を図2に示す3分化プロトコールを用いて肝細胞へ分化誘導した。(A)ヒト iPS 由来肝細胞の ASGR1 陽性細胞率を FACS を用いて計測した。(B)また、ヒト iPS 由来肝細胞の ALB 産生量を ELISA 法を用いて評価した。