

ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導と毒性評価系への応用

大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 教授

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

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 水口 裕之 みずぐち ひろゆき

大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 特任助教 高山 和雄 たかやま かずお

ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、再生医療への応用のみならず、創薬過程における毒性評価系や薬効評価系への応用が期待されている。本稿では、著者らが研究開発を進めているヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法、および創薬研究、特に医薬品開発研究における毒性試験へのヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の応用について、現状と課題、可能性について解説する。



1 はじめに

肝臓（肝細胞）は生体内外の物質の代謝、解毒、排出などに関与する主要な臓器（細胞）であり、体内に投与された医薬品は主に肝細胞でシトクロム P450（CYP）などの薬物代謝酵素により代謝され、抱合系酵素により解毒を受け、トランスポーターにより排出される（図1）。薬物誘発性肝障害（肝

毒性）は、毒性が原因で生じる医薬品候補化合物の開発中止の約2～3割を占め、最も主要な原因の1つである。現行の毒性試験では、主に齧歯類を用いた *in vivo* 試験や、齧歯類由来の初代培養肝細胞やHepG2細胞などのヒト由来の肝がん細胞株、ヒト初代培養（凍結）肝細胞（本稿では、ヒト凍結肝細胞も含めてヒト初代培養肝細胞と

記載する）を用いた *in vitro* 試験が行われている。しかしながら、動物を用いた試験には「種差の壁」の限界があり、ヒト特異的に発生しうる毒性を予測することは困難であり、HepG2細胞などのヒト肝がん細胞株はCYP活性が極めて低く、CYPによる代謝に関連した毒性を評価できない。また、ヒト初代培養肝細胞は培養後急速にCYPを

はじめとする薬物代謝酵素などの活性低下がみられること、安定供給や継続性の観点からその利用には限界がある為（ヒト初代培養肝細胞は *in vitro* では増殖しないため、同じロットの細胞を用いた試験を安定に行うことができない）、より安定に使用できるヒト由来の細胞系を用いた肝毒性評価系の確立が望まれている。ヒトiPS（induced Pluripotent Stem）細胞から分化誘導した肝細胞は、従来の

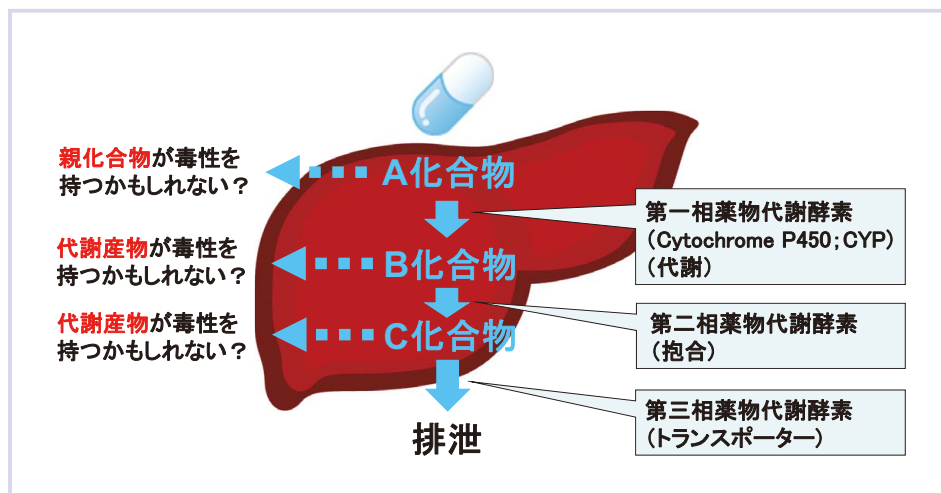


図1 肝臓における薬物代謝酵素とその機能

毒性評価の問題点の克服が期待でき、(大量生産できれば) 比較的安価に、同一ロットの細胞を安定供給できる可能性を有するといった利点を有し、肝毒性評価のための新しい細胞ソースとして期待されている(図2)。本稿では、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導法に関する技術開発と、毒性評価系への応用の可能性について著者らの成果を中心に紹介する。

2 ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導

海外においては特に、ヒトES細胞(Embryonic Stem Cells)から肝細胞への分化誘導に関する研究が先行して進められてきた。2005年、D'Amourらが、アクチビンAがヒトES細胞から内胚葉への分化に有効であることを発表して以来¹⁾、それまで中胚葉や外胚葉系列の細胞と比べて遅れていた内胚葉系列への分化誘導研究が急速に進んできた。なお、ヒトES細胞とiPS細胞は共通の方法で分化誘導できるため、本稿ではこれらを区別せずに解説する。

ヒトiPS細胞は中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞を経由して成熟した肝細胞へと分化することが知られており(図3)、それぞれの分化過程で、サイトカインや増殖因子、低分子化合物などを、発生段階を模倣したように添加していくことで、ヒトiPS細胞から肝細胞へ分化誘導する方法が開発されている。ヒト(未分化)iPS細胞から

内胚葉への分化誘導ステップでは、アクチビンAがほぼ全てのプロトコールで使われており、アクチビンAと同時に作用させる形で、Wnt3a(あるいはWnt3aシグナルを刺激する化合物)も用いられることが多い。内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程ではFGF(Fibroblast Growth Factor)シグナルとBMP(Bone Morphogenetic Protein)シグナルが重要であることが知られており、FGF4とBMP2の組み合わせや²⁾、FGF1/2/4とBMP2/4の組み合わせ³⁾によって、内胚葉から肝幹前駆細胞が分化誘導できることが報告されている。また、DMSO(dimethyl sulfoxide)によるヒストンのアセチル化が有効であることも報告されている⁴⁾。肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程においては、HGF(Hepatocyte Growth Factor)やオンコスタチンM(OsM)、デキサメタゾン(DEX)などを用いて分化誘導する方法が一般的である^{5,6)}。さらに各分化ステップで、添加する液性因子

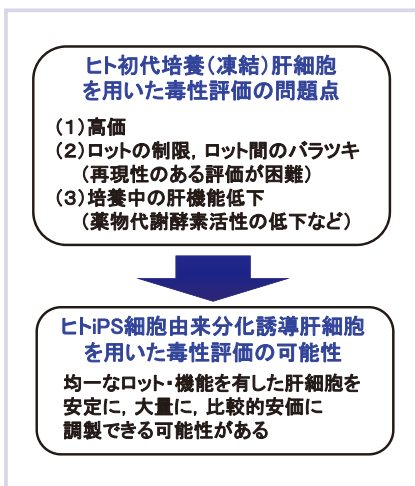


図2 ヒト初代培養(凍結)肝細胞を用いた毒性評価の問題点とヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞への期待

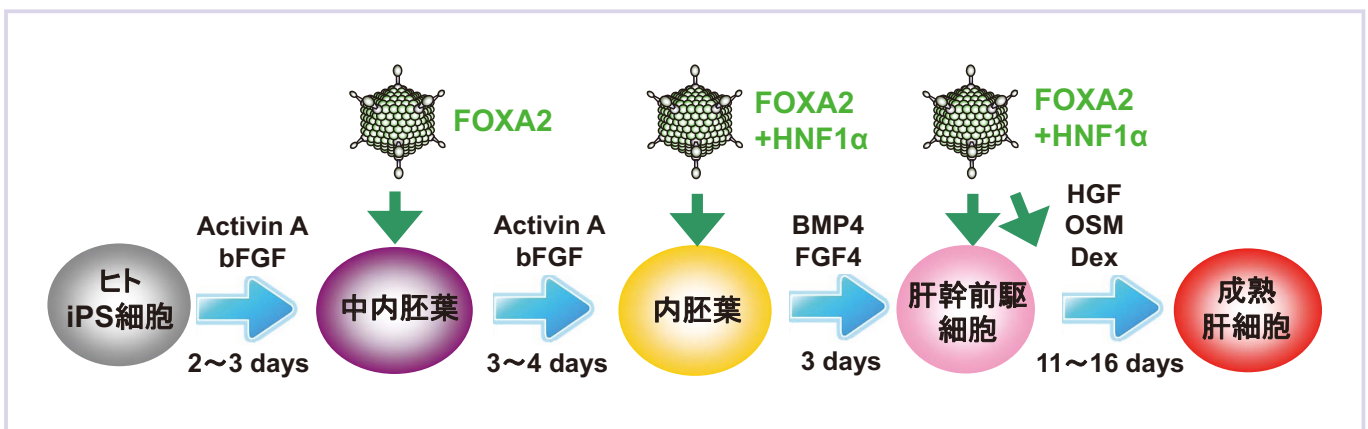


図3 液性因子と転写因子の導入の組み合わせによるヒトiPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導

ヒトiPS細胞をアクチビンAで培養することによって得られた培養2-3日目の中内胚葉に対してFOXA2発現アデノウイルスベクターを作用させた。さらに、アクチビンAで3-4日間培養した後、培養6日目の内胚葉に対してFOXA2およびHNF1 α 発現アデノウイルスベクターを作用させた。BMP4とFGF4を用いて3日間培養した後、培養9日目の肝幹前駆細胞に対してFOXA2およびHNF1 α 発現アデノウイルスベクターを作用させた。その後、肝幹前駆細胞をHGF、オンコスタチンM(OsM)、デキサメタゾン(DEX)を用いて11-16日間培養することによって(培養12日目にFOXA2およびHNF1 α 発現アデノウイルスベクターをさらに作用)、高い薬物代謝機能やアルブミン産生能等を有した肝細胞へ分化させることができる。

に加え、基本培地や細胞外マトリックス（マトリゲルやI型コラーゲン、ラミニンが汎用される）の種類、血清やフィーダー細胞の有無などが各プロトコルで工夫されている。

3 高機能なヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の作製を目指した試み

ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞を創薬の毒性試験に利用するためには、薬物代謝酵素の活性がヒト初代培養肝細胞に匹敵するレベルであることが最重要事項となる。一方で、上述の分化誘導法で作製されたヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞は、薬物代謝酵素の活性がヒト初代培養肝細胞と比較して依然として低いものであり、より一層の技術開発が必要となっている。

ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の更なる機能向上を促す方法としては、肝発生のメカニズム解明に関するより一層の基礎研究の成果を、*in vitro*での分化誘導研究に応用することが最も有効である。他の方法として、分化関連遺伝子を導入することや、三次元培養

や支持細胞との共培養により肝機能を高めること、肝細胞だけを純化・濃縮していくこと、肝細胞分化に適したiPS細胞を作製・選択すること、などが考えられる。我々は、肝細胞分化に重要な役割を果たす転写因子（FOXA2, HNF1 α など）を、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化途中の細胞に、一過性に高効率遺伝子導入が可能なアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入することによって、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化効率を高めることに成功した（図3, 4）⁷⁾。また、肝細胞は生体内で肝細胞同士、あるいは他の細胞との相互作用のもと機能を発揮していると考えられ、そのような細胞同士の相互作用を、三次元培養や、繊維芽細胞や血管内皮細胞などとの共培養を行うことで*in vitro*で一部模倣し、機能向上が得られることが報告されている^{8,9)}。一方、iPS細胞は株間で分化指向性が異なることが知られており、肝細胞分化に適したヒトiPS細胞株を選択することも重要である。さらには、細胞表面マーカーを用いたソーティング、あるいは特定の細胞外マトリックスへの接

着能など、何らかの方法を用いて、目的の細胞を純化・濃縮させることも高機能なヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の作製に極めて有効と考えられる。

4 ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の毒性評価系への応用と将来展望

ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞が毒性試験に利用できるか否かの指標としては、薬物が薬物代謝酵素で代謝されて生じる反応性代謝物による毒性を検出できるかどうかあげられる。筆者らは、CYP3A4で代謝されることによって毒性を生じるAflatoxin B1や、CYP2C9で代謝されることによって細胞障害性を示すBenzbromaroneを用いることで、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞が反応性代謝物による細胞毒性を検出可能なことを実証した（図5）⁹⁾。本細胞が、毒性試験に使用するための最低限の特性は保持していると言える。

興味深いことに、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞は、iPS細胞の樹立に使用された個人の遺伝的背景を

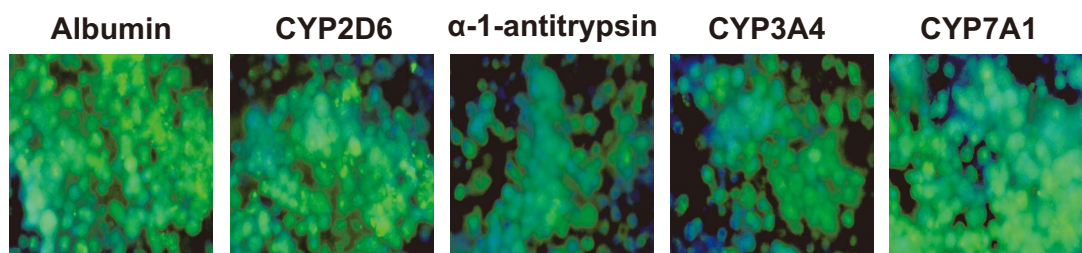


図4 ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞

様々な肝細胞特異的のマーカータンパク質の発現が陽性である。（文献7より転載）

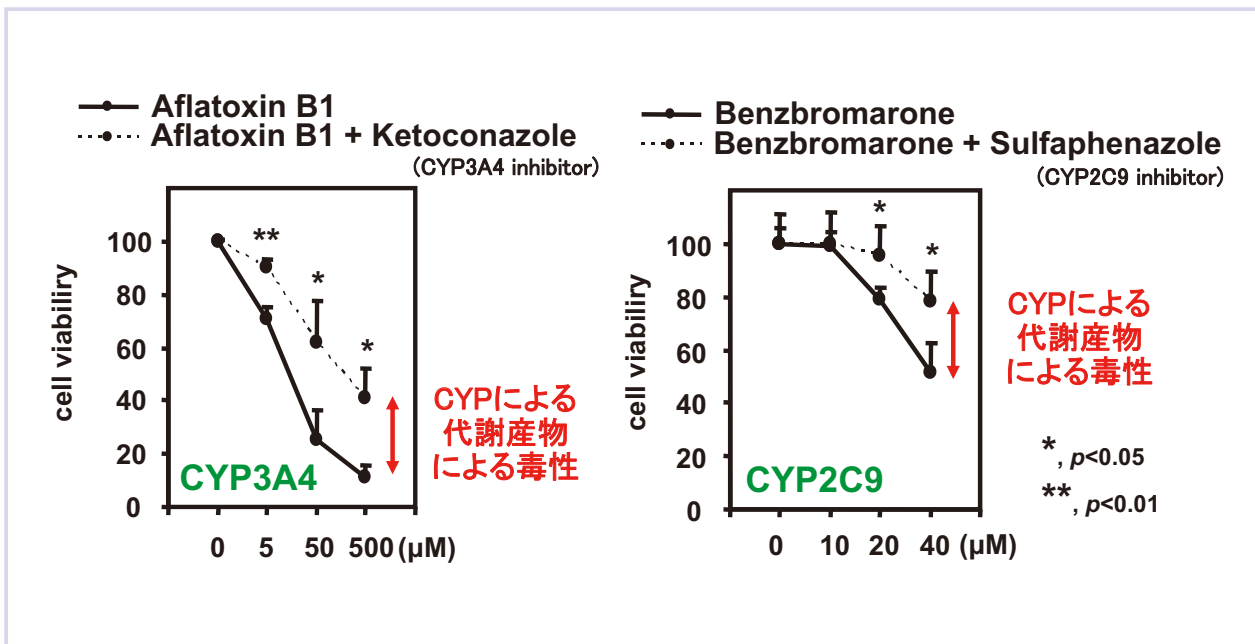


図5 Aflatoxin B1, BenzbromaroneによるヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の細胞毒性

それぞれCYP3A4, CYP2C9で代謝されることによって細胞障害性を示すAflatoxin B1, BenzbromaroneをヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞に作用させたとこ、濃度依存的な細胞毒性を示した。ここに、CYP3A4, CYP2C9の阻害剤(それぞれKetoconazole, Sulfaphenazole)を作用させたとこ、細胞毒性が減弱し、本細胞を用いて薬物代謝酵素によって代謝された代謝産物(反応性代謝物)による細胞毒性が検出可能なことが示唆された。(文献9より改変転載)

引き継ぎ、それぞれ個人差を反映した細胞になっていることを確認した(図6)¹⁰⁾。例えば、CYP2D6のpoor metabolizer由来のヒトiPS細胞(CYP2D6遺伝子座のSNPのためにCYP2D6タンパク質自体が産生されない遺伝的背景を有したヒトiPS細胞)やextensive metabolizer由来のヒトiPS細胞(通常のCYP2D6遺伝子座を有したヒトiPS細胞)から肝細胞を分化誘導し、CYP2D6による代謝によって毒性の有無が決まるdesipramineやperhexilineを作用させると、その細胞毒性が、ヒト初代培養肝細胞を用いた場合と同様にCYP2D6活性の有無によって反映されること確認した(図7)¹⁰⁾。このような特異な遺伝的背景を有した肝細胞は、従来安定的に入手することが困難であり、ヒト初代培養肝細胞を用いた

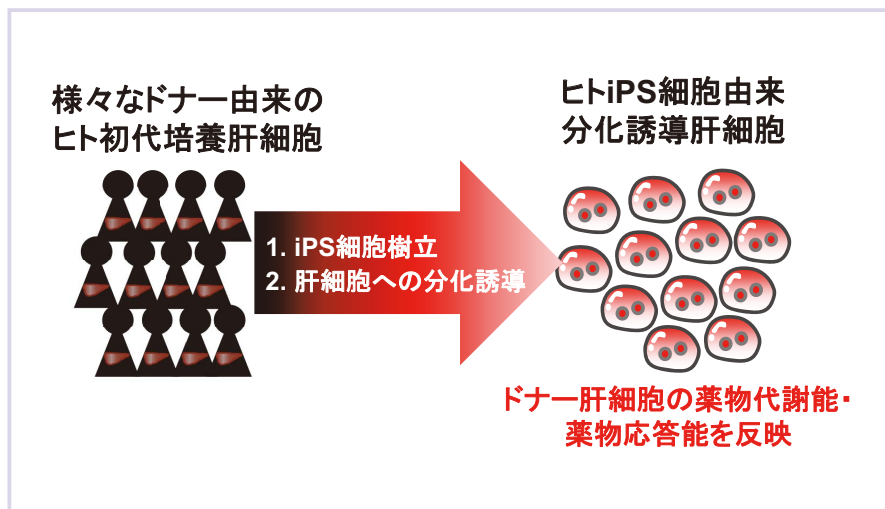


図6 ヒト初代培養肝細胞における薬物代謝能

薬物応答能の個人差がヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞においても確認できる。

場合には、これらの肝細胞を用いた毒性試験を実施することは不可能であった。iPS細胞技術を利用することで、これまで安定供給が困難であった特異な薬物代謝酵素の遺伝子座を有した個

人由来の肝細胞の安定供給が可能となり、従来技術では解析が困難であった毒性試験も可能になる道が開けてきたと言える。

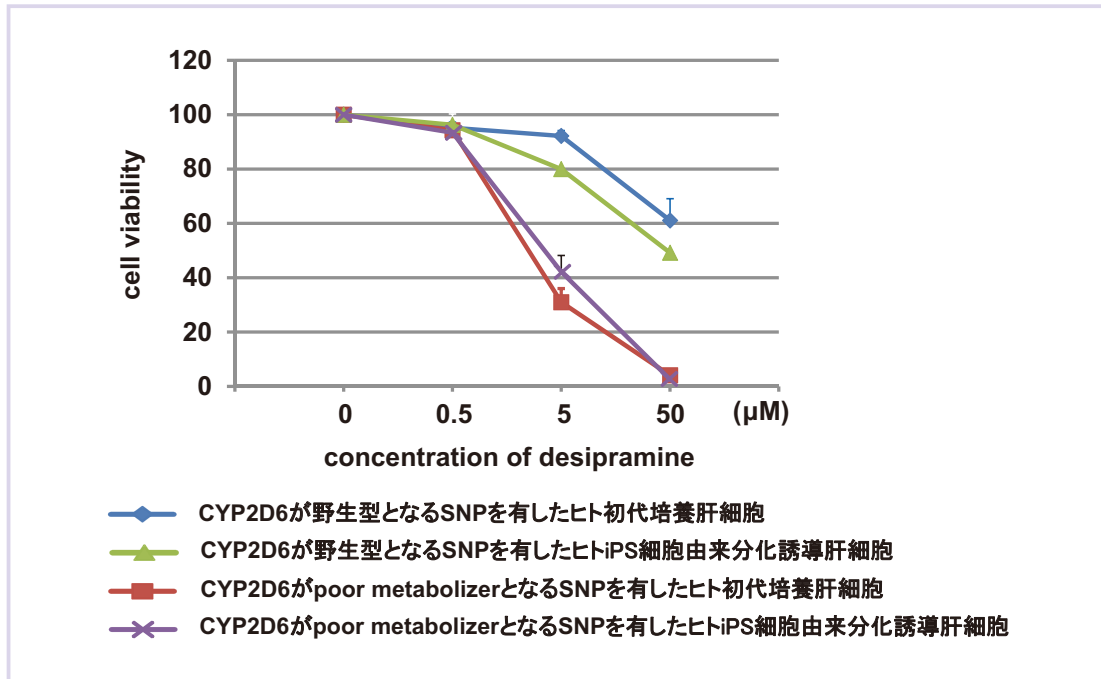


図7 Desipramineによる細胞毒性に及ぼすCYP2D6の影響

CYP2D6により代謝されることで解毒化されるdesipramineの細胞毒性を検討したところ、CYP2D6がpoor metabolizerとなるSNPを有しているヒト初代培養肝細胞あるいはヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞においては、CYP2D6が野生型のヒト初代培養肝細胞あるいはヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞と比較して強い細胞毒性が確認された。(文献10より転載)

5 おわりに

本稿でも述べたように、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導技術は劇的な進歩をとげている。一方で、依然として特に単離直後のヒト初代培養肝細胞と比較すると、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の薬物代謝酵素活性は大きく劣るのが現状である。また、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞は、胎児型の薬物代謝酵素として知られているCYP3A7も発現しており、胎児型と成人型の肝細胞が混在した状態になっている。従って、現状では、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞がヒト初代培養肝細胞に取って代わって、全ての試験（創薬研究）に使用できるわけではない。今後、このような課題が克服され、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞が毒性試験をはじめとする様々な創薬研究で広く活用されることを期待している。

文献

- 1) K.A. D'Amour et al., Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1534-1541 (2005)
- 2) J. Cai et al., Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*, **45**, 1229-1239 (2007)
- 3) G. Brolen et al., Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J. Biotechnol.*, **145**, 284-294 (2010)
- 4) D.C. Hay et al., Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells*, **26**, 894-902 (2008)
- 5) K. Si-Tayeb et al., Organogenesis and development of the liver. *Dev. Cell*, **18**, 175-189 (2010)
- 6) S. Snykers et al., In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*, **27**, 577-606 (2009)
- 7) K. Takayama et al., Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1α transduction. *J. Hepatol.*, **57**, 628-636 (2012)
- 8) Y. Nagamoto et al., Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, **33**, 4526-4534 (2012)
- 9) K. Takayama et al., 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, **34**, 1781-1789 (2013)

- 10) K. Takayama et al., Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, 16772-16777 (2014)

著者略歴

【水口裕之】(写真左)

1996年 大阪大学大学院薬学研究所博士課程修了博士(薬学)

その後、大阪大学微生物病研究所研究員、米国ワシントン大学医学部Senior Fellow、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員・主任研究官・副プロジェクト長、独立行政法人医薬基盤研究所プロジェクトリーダーを経て、

2008年 大阪大学大学院薬学研究所分子生物学分野教授(現在に至る)

現在 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 招へいプロジェクトリーダーを併任
大阪大学国際医工情報センター教授、
大阪大学大学院医学系研究科教授を兼任

〈受賞歴〉

2012年 第10回産学官連携功労者表彰(厚生労働大臣賞)
2014年 平成26年度科学技術分野文部科学大臣表彰
科学技術賞(研究部門)

【高山和雄】(写真右)

2010年 大阪大学薬学部卒業

2015年 大阪大学大学院薬学研究所博士課程修了(薬科学博士)

同年4月 大阪大学大学院薬学研究所分子生物学・特任助教
同年11月 K-CONNEX研究者(京阪神次世代グローバル研究リーダー育成コンソーシアム)としても勤務

〈研究テーマ〉

ヒトiPS細胞由来内胚系細胞を用いた創薬・再生医療応用