

# ヒトES/iPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導と 毒性評価系への応用



研究ノート

稲村 充<sup>\*</sup>, 高山 和雄<sup>\*\*</sup>, 川端 健二<sup>\*\*\*</sup>, 水口 裕之<sup>\*\*\*\*</sup>

Efficient generation of hepatocytes from human ES / iPS cells by  
gene transfer for drug toxicity screening

Key Words : drug screening, induced pluripotent stem (iPS) cell,  
embryonic stem (ES) cell, adenovirus vector, hepatocytes



<sup>\*</sup> Mitsuru INAMURA

1980年4月生  
大阪大学大学院薬学研究科博士課程卒  
(2011年)  
現在、大阪大学 薬学研究科分子生物学  
分野 大学院生 博士(薬学) 幹細胞  
生物学  
TEL : 06-6879-8185  
FAX : 06-6879-8186  
E-mail : minamura@nibio.go.jp



<sup>\*\*</sup> Kazuo TAKAYAMA

1986年12月生  
大阪大学薬学部薬科学科卒(2010年)  
現在、大阪大学 薬学研究科分子生物学  
分野 大学院生 学士 薬学  
TEL : 06-6879-8185  
FAX : 06-6879-8186  
E-mail : k-kiban@nibio.go.jp



<sup>\*\*\*</sup> Kenji KAWABATA

1969年2月生  
京都大学大学院薬学研究科博士後期課程  
卒(1997年)  
現在、独立行政法人医薬基盤研究所 創  
薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト  
プロジェクトリーダー 博士(薬学)  
免疫学・血液学  
TEL : 072-641-9815  
FAX : 072-641-9816  
E-mail : kawabata@nibio.go.jp



<sup>\*\*\*\*</sup> Hiroyuki MIZUGUCHI

1968年6月生  
大阪大学大学院薬学研究科博士課程卒  
(1996年)  
現在、大阪大学 薬学研究科分子生物学  
分野 教授、独立行政法人医薬基盤研  
究所 創薬基盤研究部幹細胞制御プロ  
ジェクト チーフプロジェクトリーダー(併任)  
博士(薬学) 分子生物学  
TEL : 06-6879-8185  
FAX : 06-6879-8186  
E-mail : mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp

## 1. はじめに

医薬品候補化合物の開発中止原因の一つとして毒性の判明がある<sup>1)</sup>。中でも、肝臓において薬物が代謝されることにより生じる肝毒性は主要な有害事象である<sup>2)</sup>。したがって、正常肝細胞を用いて将来起こりえる高い潜在的毒性発現を研究開発の初期段階に予測できれば、より安全性の高い医薬品を効率良く開発することができる。このような薬物の *in vitro* 毒性評価系構築への安定した肝細胞の供給源として、ヒトES/iPS細胞から分化誘導した肝細胞の利用が期待される。しかしながら、ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導効率は低く、*in vitro* 毒性評価系へヒトES/iPS細胞由来肝細胞を応用するうえでの課題は多い。本稿では、*in vitro* 毒性評価系の構築のために、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞を利用するメリットや分化誘導技術開発の現状と問題点に関して概説するとともに、我々が開発を進めている遺伝子導入技術を利用したヒトES/iPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法について紹介したい。

## 2. ヒトES/iPS細胞由来肝細胞を利用するメリット

現行の薬物毒性評価系では、主にモデル動物やヒト初代培養肝細胞が使用されている。しかしながら、動物実験には「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る(表1)<sup>3)</sup>。また、ヒト初代培養肝細胞を用いた薬物毒性評価系は、上述した「種差の壁」の克服は見込めるが、細胞自体が高価であり、かつロット差が極めて大きいために、安定的な *in vitro* 毒性評価を行うことは困難である。一方、無限に増殖可能なヒトES/iPS細胞から肝細胞を安定的かつ大量に供給することができれば、実用性の高い *in vitro* 毒性評価

表1. 各種毒性評価系のメリット・デメリット<sup>3)</sup>

	動物実験	ヒト初代培養肝細胞	ヒトES/iPS細胞由来肝細胞
種差の壁	あり	なし	なし
供給面	不可	ロット差が大きく安定供給が困難	安定的に供給可能
コスト	高価	高価	比較的安価
病態・性差	反映不可能	入手機会に限りがあり困難	様々な遺伝子多型を持ったiPS細胞を樹立し、肝細胞を分化誘導することにより実現の可能性はある

系の構築が可能となる。さらに、将来的には個人の体細胞から樹立されるヒト iPS 細胞由来の肝細胞を用いることにより、個人間の性別・病態等を反映した質の高い *in vitro* 毒性評価系の構築、すなわちテーラーメイド医療の実現も期待できる。

### 3. ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と問題点

ヒト ES/iPS 細胞は中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞等を経由して薬物代謝能を有した肝細胞へと分化することが知られている (図1)<sup>4), 5)</sup>。これまでの研究により、ヒト ES/iPS 細胞から中内胚葉や内胚葉への分化には Activin A などが、内胚葉から肝幹前駆細胞への分化には骨形成蛋白質 BMP4 (bone morphogenetic protein 4) などが、肝細胞の成熟化にはオンコスタチン M (OSM) などがそれぞれ有効であることがわかっている。しかしながら、培養液中にこれらの液性因子を添加する従来の分化誘導法は長期の培養期間を必要とし、分化誘導効率も低く、得られた肝細胞の薬物代謝酵素活性も低いことが課題となっている。

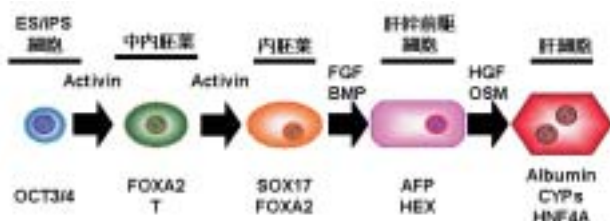


図1. 肝細胞への分化モデル<sup>4), 5)</sup>  
 ES/iPS 細胞から肝細胞までの各分化段階は以下のマーカー遺伝子の発現によって特徴づけられる。未分化マーカー:OCT3/4, 中内胚葉マーカー:FOXA2, T, 内胚葉マーカー:SOX17, FOXA2, 肝幹前駆細胞マーカー:AFP, HEX, 肝細胞マーカー:Albumin, CYPs, HNF4A. これまでに、各分化段階に応じて Activin, FGF, BMP, HGF, OSM 等の液性因子を添加することにより、肝分化が促進されることが報告されている (文献4, 5 参照)。

### 4. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

分化効率を改善する手段の一つとして、ベクターを用いて細胞分化に関与する転写因子をコードする遺伝子を導入する方法が考えられる。しかしながら、細胞分化を促進する転写因子の中には、分化段階や細胞種が異なると逆に分化を抑制するものもある<sup>6), 7)</sup>。したがって、遺伝子導入により分化誘導を促進させるには、適切な分化状態の細胞に効率良く遺伝子導入可能で、かつ導入する遺伝子の発現も一過性である必要がある。以上のような要件を満たすベクターとしてアデノウイルス (Ad) ベクターがあげられる。Ad ベクターを用いれば、様々な細胞に効率良く機能遺伝子を発現させることが可能であり、その発現も一過性である<sup>8)</sup>。したがって、発生を模倣するように、適切な分化状態の細胞に意図するタイミングで機能遺伝子を発現させることが可能であり、細胞分化の方向付けを行うには最適なベクターである (図2)。

当研究室では既に、ヒト ES/iPS 細胞から各分化

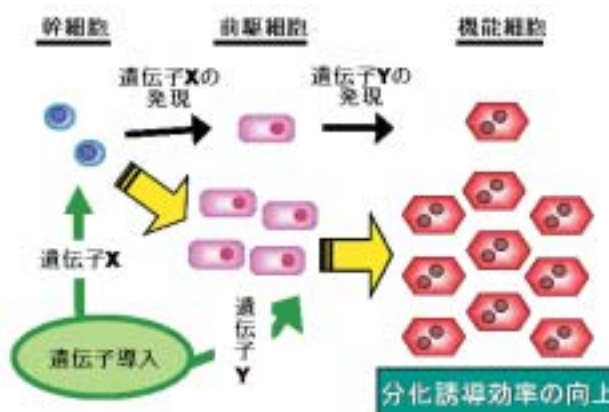


図2. 機能遺伝子の導入による分化誘導効率の向上  
 適切な分化状態の細胞に効率良くかつ一過性に機能遺伝子を発現させることにより、目的の機能細胞を効率良く分化誘導することが期待できる。

段階にある細胞にAdベクターを用いて種々の遺伝子を導入することにより、従来法と比較し肝細胞への分化誘導効率を飛躍的に向上させることに成功している<sup>9), 10)</sup>。具体的には、ヒトES/iPS細胞由来の中内胚葉に対してSOX17、内胚葉に対してHEX、肝幹前駆細胞に対してはHNF4Aといった機能遺伝子を導入することにより、肝細胞への各分化段階での分化効率を高め、わずか培養20日目にして十分な薬物代謝能を有した機能性肝細胞を分化誘導できることを見出している。得られた肝細胞はヒト初代培養肝細胞に匹敵する量の各種チトクロームP450薬物代謝酵素を発現していた。例えば、肝臓における主要な薬物代謝酵素の一つであるCYP3A4の代謝活性はヒト初代培養肝細胞と同等であり、薬物による酵素誘導もみとめられた。したがって、従来法で課題とされていた分化効率・培養日数・機能のいずれもが、本分化誘導法により顕著に改善され、*in vitro* 薬物毒性評価系にも応用可能なヒトES/iPS細胞由来肝細胞のための分化誘導系の基礎を構築できたといえる。

##### 5. おわりに

Adベクターを用いて、細胞分化の適切な時期に機能遺伝子を導入することにより、ヒトES/iPS細胞からヒト初代培養肝細胞に類似した肝細胞を分化誘導できる可能性が提示された。しかしながら、一部のP450薬物代謝酵素の発現量はヒト初代培養肝

細胞と比較して未だに低いものであることから、生体の薬物代謝を反映した*in vitro* 毒性評価系構築の実現化には課題が残されている。分化誘導した肝細胞の機能向上・成熟化を促す方法としては、Adベクターを用いてさらなる分化関連遺伝子を導入すること、あるいは、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などが考えられる。今後、ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導法の開発を通じて、質の高い*in vitro* 毒性評価系構築の一刻も早い実現化が期待される。

##### 6. 文献

- 1) Frank, R. & Hargreaves, R. *Nat Rev Drug Discov.* 2 : 566-580 (2003).
- 2) Teranishi, M. & Manabe, S. *Folia Pharmacol. Jpn.* 132 : 347-350 (2008).
- 3) Ebert, A. D. & Svendsen, C. N. *Nat Rev Drug Discov.* 9 : 367-372 (2010).
- 4) Baxter, M. A. et al. *Stem Cell Res.* 5 : 4-22 (2010).
- 5) Zorn, A. M. *StemBook.* : Harvard Stem Cell Institute (2008).
- 6) Kubo, A. et al. *Hepatology.* 51 : 633-641 (2010).
- 7) Spence, J. R. et al. *Dev Cell.* 17 : 62-74 (2009).
- 8) Mizuguchi, H. *Drug Delivery System.* 25 : 493-503 (2010).
- 9) Inamura, M. et al. *Mol Ther.* 19 : 400-407 (2011).
- 10) Takayama, K. et al. *PLoS One*, in press.

