



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1701号
学位記番号	第347号
氏名	奥村 啓樹
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	多能性幹細胞からの機能的な肝細胞の作製
論文審査担当者	主査： 木村 和哲 副査： 松永 民秀， 林 秀敏， 肥田 重明

氏 名	おくむら ひろき 奥村 啓樹
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 347 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	多能性幹細胞からの機能的な肝細胞の作製
論文審査委員	（主査）教授 木村 和哲 （副査）教授 松永 民秀・教授 林 秀敏・教授 肥田 重明

## 論文内容の要旨

### 【序論】

肝臓は多くの代謝酵素を豊富に発現しており、医薬品などの薬物代謝における中心的な臓器である。その中でも cytochrome P450 (CYP) 3A4 は肝臓に存在している薬物代謝酵素の大部分を占め、臨床で使用される 50%以上の医薬品の代謝に関与する分子種である。そのため、医薬品開発において肝臓での CYP3A4 による代謝は薬物動態を予測するうえで非常に重要である。現在、薬物代謝試験にはヒト初代肝細胞や肝ミクロソームが *in vitro* 評価系としてよく利用されている。しかし、ヒトでは新鮮な肝臓の入手が困難であるとともに、ヒト初代肝細胞は培養後急速に薬物代謝酵素の活性が低下するなど問題点が存在し、十分な機能を有する良質な肝細胞を安定して使用することが難しく、医薬品開発における障害の一つとなっている。

胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞などの多能性幹細胞 (PSCs) は、ほぼ無限の増殖能と様々な細胞に分化可能な分化多能性を有することから、目的の細胞を大量に作製することが可能である。そのため、ヒト PSCs から薬物動態試験に利用可能な肝細胞を作製する研究が数多く行われている。しかしながら、ヒト PSCs から分化誘導した肝細胞の機能は十分ではなく、ヒト初代培養肝細胞と比較し CYP3A4 などの薬物代謝関連遺伝子の発現や薬物代謝活性が低いことが明らかとなっている。そこで本研究では、PSCs からより機能的な肝細胞を得ることを目的に、以下に示す 2 点について検討を行った。

1. ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化におけるセレコキシブの効果
2. 異種間キメラ動物作出において ES 細胞が最も肝臓に寄与する手法の開発

### 【本論】

#### 第一章 ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化におけるセレコキシブの効果

##### 1. 背景と目的

これまで、ヒト iPS 細胞からより機能的な肝細胞への分化誘導法として、特殊な培養器材を用いた立体培養法、他の細胞との共培養法、ウイルスベクターを用いて転写因子等を発現させる方法などが報告されている。これらの方法は、分化した細胞が肝細胞としての機能を獲得するために有用な方法であるが、操作が煩雑であることや、改変アデノウイ

ルスのような特殊な材料を扱う技術が必要であることなど多くの課題が残っている。そのため、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に複雑な工程を必要としない、簡便な方法の開発が望まれている。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ヒト初代培養肝細胞と比較すると CYP3A4 などの薬物代謝関連遺伝子の発現や薬物代謝活性が低いことが問題である。さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞には胎児肝臓に発現し、成人肝臓ではほぼ発現していないとされる CYP3A7 が高発現しているなど、未熟な状態であることが示唆されている。このため、ヒト iPS 細胞から簡便な方法で肝細胞への分化を促進させ、より成熟化させる必要がある。近年、ヒト PSCs から肝細胞への分化を促進する低分子化合物が報告されている。一般に、低分子化合物は大量かつ高純度で合成が可能のためコストが低く、ロット間差も少ない。また、前述の立体培養法や共培養法などとは異なり、分化培地に化合物を添加するのみで効果を発揮するため非常に簡便であり、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導因子として有益であると考えられる。

セレコキシブは非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) として用いられている低分子化合物であり、炎症性メディエーター生成に関与するシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) を阻害することにより抗炎症、鎮痛及び解熱作用を示す。近年、セレコキシブはラットにおいて肝がん形成抑制作用を示すとともに、STAT5 の活性化作用を介して発がんによる種々の CYP 発現量低下を抑制し、正常レベルへと回復させることや、マウスにおいて STAT5 の欠損は CYP の発現に影響を与えることが報告されており、STAT5 は CYP の発現調節に重要な転写因子であることが示唆されている。そのため、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程にセレコキシブを添加することで、分化後の肝細胞の薬物代謝酵素発現に影響を与えるのではないかと考えた。そこで本章では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に与えるセレコキシブの効果及びその機序について検討を行った。

## 2. ヒト iPS 細胞から肝細胞分化に与えるセレコキシブの効果

本研究ではヒト iPS 細胞から肝細胞への分化は本研究室で確立したプロトコルを用いて行い、分化 16 日目から 8 日間セレコキシブ添加の効果を検討した。その結果、分化終了後のヒト iPS 細胞由来肝細胞では、肝細胞マーカーである asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1) や tyrosine aminotransferase (TAT)、CYP3A4 や CYP の誘導に関与する核内受容体 pregnane X receptor (PXR) の発現がセレコキシブ添加により有意に増加した。また、CYP3A4 活性においてもセレコキシブ添加により有意な増加が確認された。さらに、セレコキシブ添加群では CYP3A4 を誘導することが知られるリファンピシンにより、CYP3A4 の有意な発現増加が認められ、セレコキシブ添加により分化誘導した肝細胞は CYP3A4 の誘導能を有していることが示唆された。以上のことから、セレコキシブがヒト iPS 細胞から肝細胞への分化における分化誘導因子として有用であることが示唆された。

## 3. セレコキシブによる肝細胞分化誘導促進作用の機序解明

セレコキシブは COX 阻害作用以外にも PPAR $\gamma$  活性化作用が報告されており、どの作用により肝細胞への分化誘導が促進されているか検討を行った。セレコキシブと同じく COX 阻害作用を有するアセチルサリチル酸、ケトプロフェン、メロキシカム、ニメスリドを添加しても CYP3A4 の発現上昇は認められず、COX1/2 の阻害は肝分化に影響しないことが示唆された。また、PPAR $\gamma$  作動薬であるピオグリタゾン添加や、PPAR $\gamma$  刺激により誘導される phosphatase and tensin homolog (PTEN) 阻害剤である bpV (phen) をセレコキシブと同時に添加しても CYP3A4 の発現量に影響を与えないことから、PPAR $\gamma$  活性化作用も肝分化に影響しないことが示唆された。その一方で、STAT5 阻害作用を有するピモジドをセレコキシブと同時に添加することで CYP3A4 発現量が減少した。以上のことから、セレコキシブは STAT5 活性化作用により肝細胞分化を促進させることが示された。

## 第二章 異種間キメラ動物作出において ES 細胞が最も肝臓に寄与する手法の開発

### 1. 背景と目的

近年、PSCs からの機能的な臓器の作製法として、胚盤胞補完法による *in vivo* での臓器作製が報告された。この報告では、膵臓の発生や  $\beta$  細胞の成熟化に必須の転写因子である Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox1) をノックアウトした Pdx1 ノックアウトマウスの胚盤胞にラット PSCs を注入することによって、マウス体内にほぼ全てがラット PSCs 由来の機能的な膵臓を作製することに成功している。また、同様の方法による胸腺の作製も報告されており、ど

らの場合も作製された PSCs 由来臓器はその組織特有の機能を有することが示されている。その一方で、腎臓においては同手法によるマウス体内でのラット PSCs 由来腎臓の作製ができないことが報告されており、胚盤胞補完法が全ての臓器に適応できるわけではないことが示唆されている。

胚盤胞補完法の技術は、受精卵と PSCs を用いたキメラ動物作出手法である胚盤胞注入法に基づいている。キメラ動物作出手法は、受精卵に PSCs を注入する注入法と、透明帯を除去した受精卵と PSCs を共培養して 1 つに凝集させる凝集法の 2 つに分類される。さらに、注入法は用いるホスト受精卵の発生段階により細分化される。以前より、マウス受精卵とマウス PSCs を用いた同種間キメラ動物の作出はトランスジェニックマウスの作製に広く用いられており、作出手法によるキメラ動物の作出効率が検討されている。しかしながら、胚盤胞補完法への応用を目指した異種間キメラ動物の作出において、作出効率や各臓器（心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓）における異種 PSCs 由来細胞の寄与率は検討がなされていない。そこで本章では、胚盤胞補完法による異種 PSCs 由来肝臓作製の前段階として、キメラ動物作出手法によるキメラ動物の作出効率及び肝臓における異種 ES 細胞の寄与率の違いを比較し、*in vivo*での異種 PSCs からの機能的な肝臓作製の可能性について検討した。

## 2. マウス/ラット ES 細胞異種間キメラマウスの作出

蛍光タンパク質（tdTOMATO）で標識したラット ES 細胞を胚盤胞あるいは 8 細胞期胚へ注入、もしくは透明帯を除去した 8 細胞期胚とラット ES 細胞と共培養することによりマウス/ラット ES 細胞異種間キメラマウスを作出した。作出したマウスは体表部に tdTOMATO の蛍光が認められ、ラット ES 細胞が寄与したキメラマウスであることが確認された。また、移植胚数に対するキメラマウスの作出率は胚盤胞注入法（12.5%）、8 細胞期胚注入法（4.7%）、8 細胞期胚注入法（3.3%）と胚盤胞を用いた方が 8 細胞期胚を用いるよりも高率であった。

## 3. 各臓器におけるラット ES 細胞寄与率の算出

4 週齢のマウス/ラット細胞異種間キメラマウスの各臓器（肝臓、脾臓、心臓、肺、腎臓）からゲノム DNA を抽出し、qPCR 解析によりそれぞれの臓器におけるラット ES 細胞の寄与率を算出した。胚盤胞補完法の際に行われる胚盤胞注入法で作出したキメラマウスにおいて、肝臓へのラット ES 細胞の寄与はほとんど認められなかった。一方、8 細胞期胚注入法で作出したキメラマウスにおいて、肝臓へのラット ES 細胞の寄与率が有意に上昇し、およそ 10%程度であった。これは胚盤胞注入法で作出したキメラマウスの脾臓における寄与率よりも高く、既に報告されている胚盤胞補完法による脾臓の作製と同様に 8 細胞期胚補完法により、ES 細胞由来肝臓の作製が可能であることが示唆された。その一方で、腎臓においては作出手法に関わらずラット ES 細胞の寄与は認められなかった。

## 4. キメラマウス肝臓におけるラット CYP2C6 の発現

キメラマウス肝臓においてラット CYP2C6 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、ラット ES 細胞由来細胞が肝実質細胞に寄与しているか検討した。8 細胞期胚凝集法及び 8 細胞期胚注入法により作製したキメラマウス肝臓において、ラット CYP2C6 陽性細胞が認められた。その一方で、胚盤胞注入法により作製したキメラマウス肝臓において、ラット CYP2C6 陽性細胞はほとんど認められなかった。このことから、8 細胞期胚を用いたキメラ動物作出によりラット ES 細胞が肝実質細胞に寄与しており、マウス体内でラットの薬物代謝酵素を発現していることが示された。

## 【総括】

1. 第一章では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程においてセレコキシブを添加することにより、STAT5 活性化作用を介して肝機能を向上させることを明らかにした。セレコキシブは取り扱いの容易な低分子化合物であり、ヒト iPS 細胞からの薬物動態試験や再生医療への利用を目指した、より機能的な肝細胞作製や、肝細胞の大量作製を行う際の分化誘導因子として有用であると考えられる。
2. 第二章では、既存の手法である胚盤胞注入法と比較し、8 細胞期胚注入法により肝臓におけるラット ES 細胞の寄与率が顕著に上昇することを明らかにした。これは、8 細胞期胚補完法によりマウス体内に異種 PSCs 由来肝臓が作製可能であることを示唆するものであり、今後、本手法を用いてマウス体内に 100% PSCs 由来の機能的な肝臓が作製されることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

肝臓は、医薬品などの薬物代謝における中心的な臓器である。医薬品開発において肝臓での CYP3A4 による代謝は薬物動態を予測するうえで非常に重要である。その予測にヒト初代肝細胞が用いられるが、新鮮な肝臓の入手が困難であるとともに、培養後急速に薬物代謝酵素の活性が低下するなど問題点が存在する。また、十分な機能を有する良質な肝細胞を安定して使用することが難しく、医薬品開発における障害の一つとなっている。胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞などの多能性幹細胞 (PSCs) は、ほぼ無限の増殖能と様々な細胞に分化可能な分化多能性を有することから、薬物動態試験に利用可能な肝細胞を作製する研究が数多く行われている。しかしながら、ヒト PSCs から分化誘導した肝細胞の機能は十分ではなく、ヒト初代培養肝細胞と比較し CYP3A4 などの薬物代謝関連遺伝子の発現や薬物代謝活性が低いことが明らかとなっている。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程においてセレコキシブを添加することにより、STAT5 活性化作用を介して肝機能を向上させることを明らかにした。セレコキシブは取り扱いの容易な低分子化合物であり、ヒト iPS 細胞からの薬物動態試験や再生医療への利用を目指した、より機能的な肝細胞作製や、肝細胞の大量作製を行う際の分化誘導因子として有用であると考えられる。既存の手法である胚盤胞注入法と比較し、8 細胞期胚注入法により肝臓におけるラット ES 細胞の寄与率が顕著に上昇することを明らかにした。これは、8 細胞期胚補完法によりマウス体内に異種 PSCs 由来肝臓が作製可能であることを示唆するものであり、今後、本手法を用いてマウス体内に 100% PSCs 由来の機能的な肝臓が作製されることが期待される。

上記の研究は、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の機能を高め、創薬研究に有用な細胞を作る新たな方法を提案したものであり、創薬試験研究材料研究において重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本研究者は、博士 (薬学) の学位を得る資格があると認める。