



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1453号
学位記番号	第305号
氏名	近藤 祐樹
授与年月日	平成26年3月31日
学位論文の題名	薬物動態試験へ応用可能なヒト人工多能性幹細胞由来肝細胞の作出
論文審査担当者	主査： 頭金 正博 副査： 松永 民秀, 湯浅 博昭, 尾関 哲也

氏名	こんどう ゆうき 近藤 祐樹
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 305 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 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	薬物動態試験へ応用可能なヒト人工多能性幹細胞由来肝細胞の作出
論文審査委員	(主査) 教授 頭金 正博 (副査) 教授 松永 民秀・教授 湯浅 博昭・教授 尾関 哲也

## 論文内容の要旨

### 【序論】

ヒト人工多能性幹（iPS）細胞は、2007年に山中らにより、体細胞に OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC の 4 遺伝子を導入することによって樹立された、多分化能とほぼ無限の増殖能をもつ細胞である。このヒト iPS 細胞は、再生医療や細胞治療だけではなく、医学研究や創薬研究における研究材料として利用することも期待されている。

薬物代謝は腎臓、小腸や肺でも行われるが、最も主要な臓器は肝臓である。したがって、*in vitro* での薬物代謝に関する試験は、初代肝細胞や肝ミクロソームがよく利用されている。しかし、ヒトでは倫理的な面に加えて、新鮮な肝臓の入手が困難であるとともに、顕著な個体差が存在するなどの問題があるため、良質の肝細胞を安定して使用することが難しい。そこでこれらの問題を解決するために、ヒト iPS 細胞から薬物動態試験に利用可能な肝細胞への分化誘導に関する研究が興味を持たれている。

現在、iPS 細胞から肝細胞への分化誘導方法については、複数種類の液性因子を用い、ウイルスベクターによる遺伝子導入や他の細胞との共培養を行うことでヒト iPS 細胞が機能を有した肝細胞へ分化することが報告されている。しかしながら液性因子は非常に高価であることやウイルスベクターの取り扱いの困難さ、分化した細胞に共培養用の細胞が混入していること等が問題となっている。そのため、安価で取り扱いの容易な低分子化合物を分化誘導因子として用いることは非常に有用であると考えられる。バルプロ酸（VPA）はてんかん用いる代表的な薬物であり、 $\gamma$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ阻害作用やイオンチャネル阻害作用を有しており、近年ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害作用も示すことが明らかとなった。幹細胞研究においても、VPA は iPS 細胞の樹立効率を増加させるという報告がある。しかし、VPA がヒト iPS 細胞の肝細胞への分化に与える影響については未だ明らかとなっていない。

また、ヒト iPS 細胞からの分化誘導において、肝臓のような内胚葉由来組織は、他の組織と比べて分化誘導が困難であることが知られている。そのため、高純度にヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化誘導させる技術の開発が求められている。細胞は様々な代謝経路を有し、必要な栄養源を自ら合成する能力が存在する。この中で、糖代謝、アミノ酸代謝および尿素回路に関わる経路において、肝細胞特異的な経路が存在することが明らかとなっている。そのため、これら肝細胞のみが利用できる栄養素を含む培地で培養することで、多能性を有するヒト iPS 細胞から、肝細胞以外に分化した他の細胞を死滅させることが可能であると考えられる。

そこで、本研究では、ヒト胚性幹（ES）細胞で検討した分化誘導方法を用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を行

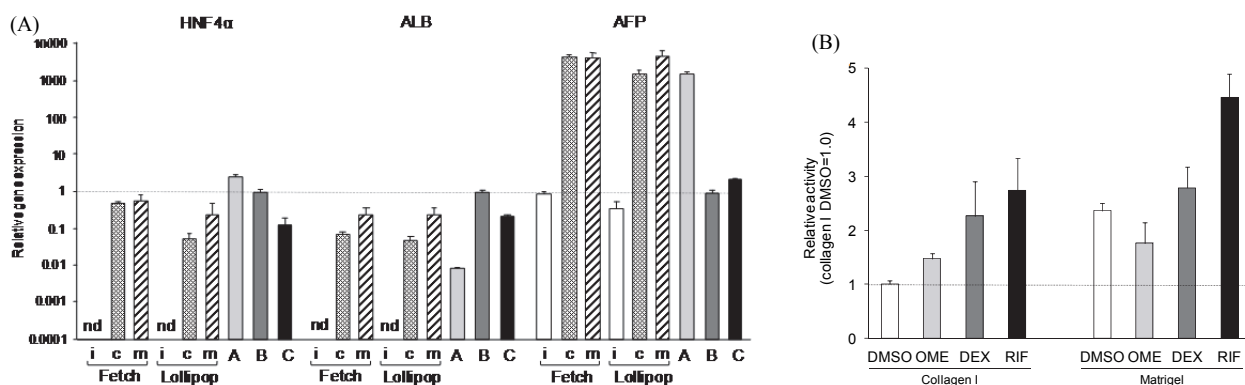
った。また、ロット間差が少なく安価な VPA を分化誘導因子として用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に与える影響を明らかにすることを目的とした。さらに、最終的に得られるヒト iPS 細胞由来肝細胞の純度を向上させるために、分化の過程で肝特異的酵素を利用した培地（変法 L-15 培地）を用いてヒト iPS 細胞から肝細胞に分化した細胞のみを選択的に培養する技術を開発することを目的とした。

## 【本論】

### 1. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化及び低分子化合物による分化促進

#### 1-1. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞をアクチビン A、ジメチルスルホキシド (DMSO)、オンコスタチン M、デキサメタゾン (DEX)、肝細胞増殖因子によって成熟させる分化誘導方法を用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化及び細胞外マトリックスについて検討を行った。分化させた細胞において、肝細胞マーカーである  $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP)、アルブミン (ALB) 及び肝細胞核因子 (HNF) 4 $\alpha$  の mRNA 発現が認められた (Fig. 1A)。また分化に用いる細胞外マトリックスとしてマトリゲルを用いた場合、I 型コラーゲンと比較してこれらの mRNA 発現は増加した。CYP3A4 の誘導剤である DEX あるいはリファンピシン (RIF) 処理により、CYP3A4 の mRNA が約 1.5~3 倍に誘導された。また、ビリルビンのグルクロン酸抱合反応を触媒するウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1 の mRNA 発現は、オメプラゾール (OME) 処理により約 20 倍に増加した。CYP3A4 特異的なテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性も検出され、その活性は DEX 及び RIF 処理により I 型コラーゲンでは各々 2.3 及び 2.7 倍、マトリゲルでは各々 1.2 及び 1.9 倍に誘導された (Fig. 1B)。以上の結果から、ヒト iPS 細胞が機能的な肝細胞に分化していることが示唆された。

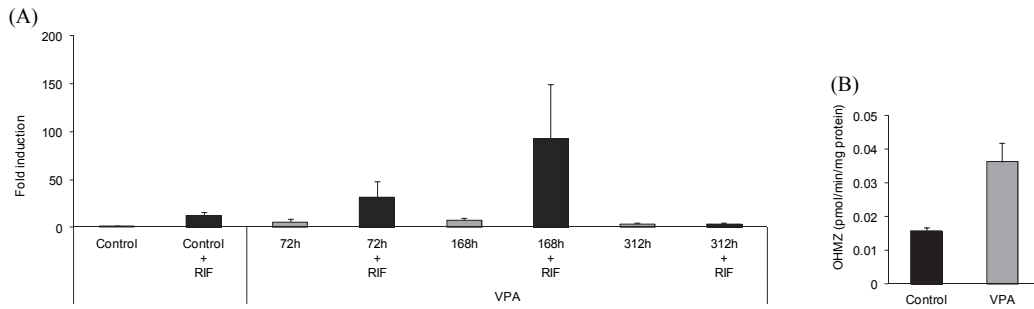


**Fig. 1. Expression levels of hepatic marker mRNAs (A) and effects of inducers on testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity (B) in hepatocyte-like cells**

(A) Two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were differentiated into hepatocyte-like cells on collagen I (c) or Matrigel (m). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). nd, not detected; i, undifferentiated human iPS cells; A, HepG2 cells; B, human adult liver; C, hepatocytes. (B) The hepatocyte-like cells (Fetch) were treated with OME, DEX, and RIF for 72 hours. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

#### 1-2. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に対する VPA の効果

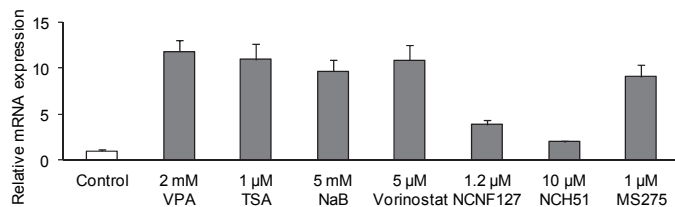
ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化の際に、VPA を分化後 18 日目から 72 時間もしくは分化後 12 日目から 168 時間添加すると、肝細胞マーカーである ALB やチロシンアミノ基転移酵素 (TAT)、CYP3A4 や CYP3A4 の RIF による誘導に参与するプレグナン X 受容体 (PXR) の mRNA 発現が増加した。しかし、VPA を分化後 12 日目から 312 時間添加すると、むしろ TAT や PXR の mRNA 発現の減少が認められた。CYP3A4 の誘導剤である RIF 処理を行ったところ、VPA を 72 時間添加することで約 6 倍、168 時間添加することで約 12 倍に CYP3A4 の mRNA 発現が誘導された (Fig. 2A)。一方、VPA を 312 時間添加した群では RIF に対する CYP3A の誘導は認められなかった。各種薬物代謝酵素のプロブ薬物を基質として用い、生成する代謝物を測定したところ、CYPs、UGT 及び硫酸転移酵素 (SULT) の活性が認められた。また、CYP2C19 及び CYP3A4/5 活性は VPA を分化後 12 日目から 168 時間添加することにより増加した (Fig. 2B)。さらに、このように分化させた細胞はほとんど全てが ALB 免疫蛍光染色にて陽性を示した。これらの結果から、VPA はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導において、分化の効率化あるいは機能獲得に有用であることが示唆された。また、VPA を分化成熟の段階において一定期間処理することで肝細胞への分化効率が上昇することが示唆され、分化促進剤として用いるには添加期間が重要であると考えられた。



**Fig. 2. Effect of RIF on CYP3A4 mRNA expression (A) and CYP3A4/5 activity (B)**  
 (A) VPA was treated for 72 hours from day 18 (72h), for 168 hours from day 12 (168h), or 312 hours from day 12 (312h), respectively. Hepatocyte-like cells were treated with 40  $\mu$ M RIF for 48 hours. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 2-3$ ). (B) VPA was treated for 168 hours from day 12. CYP3A4/5 activity was determined by measuring 1'-hydroxymidazolam (OHMZ). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

### 1-3. HDAC 阻害作用がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進する

VPA は様々な薬理作用を有することから、どの作用が分化促進作用を示すかを明らかにするために、それらの作用と同じ作用を持つ複数の化合物で検討した。その結果、HDAC 阻害作用を有する化合物を用いて分化させた細胞においてのみ全ての化合物で ALB の mRNA 発現の増加が認められた (Fig. 3)。また、分化した細胞は HDAC 活性を有しており、VPA を添加している期間中はその活性は抑制された。以上のことから、VPA の分化促進作用は、HDAC 阻害作用 (特に HDAC1 及び HDAC2 阻害) 作用によることが示唆された。

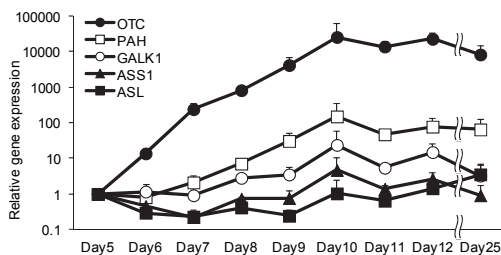


**Fig. 3. ALB mRNA expression in hepatocyte-like cells differentiated with HDAC inhibitors**  
 HDAC inhibitors were added for 168 hours from day 12. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). TSA, toricostatin A; NaB, sodium butyrate.

## 2. 変法 L-15 培地を用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞の選択的培養法

### 2-1. 肝細胞特異的な栄養代謝酵素発現

変法 L-15 培地による選択培養時期を設定するために、ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞で肝細胞特異的な栄養代謝経路に関与する酵素の発現を経時的に解析した。ガラクトースをガラクトース 1 リン酸に変換し、グルコース源として利用するために必要なガラクトキナーゼ 1 (GALK1) 及びフェニルアラニンをチロシンに変換するフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) の発現量は分化後 10 日目まで経時的に上昇した (Fig. 4)。このことから、培地にグルコース源としてガラクトースを添加し、チロシンを除去する時期は分化後 10 日目以前が適していることが考えられた。また、尿素回路の酵素であり、オルニチンからアルギニンを生成するアルギニノコハク酸シンターゼ 1 (ASS1) 及びアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) の発現量には大きな変化は認められなかったものの、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) の発現量は分化後 10 日目まで経時的に上昇した。尿素回路を回転させるためには OTC、ASS1 及び ASL の 3 種類の酵素が必要であるため、アルギニンを培地から除去する時期は分化後 10 日目付近が適していることが考えられた。



**Fig. 4. Time-dependent changes of the mRNA expression of the enzymes participated in liver-specific metabolic pathways**  
 Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ , except for a part of OTC expression.).

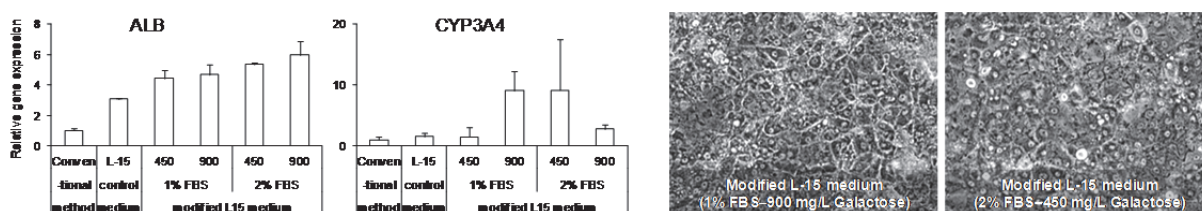
### 2-2. 変法 L-15 培地による培養時期の検討

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程において、肝細胞特異的に存在する栄養素の合成経路に関わる酵素の発現量の経時変化が明らかとなったため、次に変法 L-15 培地の培養時期、栄養素の添加時期及び培地中に添加する血清をウシ胎

児血清 (FBS) とノックアウト血清代替物 (KSR) に分け、肝細胞への分化を行った。分化後の細胞について mRNA 発現解析を行ったところ、ALB 及び CYP3A4 の発現が認められた。これらの mRNA 発現レベルは、血清として FBS を含み、分化後 9 日目からグルコース及びチロシンを除去してガラクトースを添加し、分化後 10 日目からアルギニンを除去した条件で培養した群において最も発現量が高く、当研究室で用いている従来の方法と比較して増加した。このことから、栄養素の添加、除去及び変法 L-15 培地を適切な時期に用いることはヒト iPS 細胞由来肝細胞の選択的培養に効果的であることが示唆された。さらに、肝細胞への分化には KSR よりも FBS の方が適していることが明らかとなった。

### 2-3. 変法 L-15 培地中 FBS 及びガラクトース濃度の最適化

肝細胞はグルコースを細胞外に放出する能力を有している。そのため、変法 L-15 培地を用いて培養することにより、ガラクトースから合成されたグルコースが培地中に放出され、肝細胞以外に分化した細胞が利用できる可能性がある。また、10% FBS を含む変法 L-15 培地中にはグルコースが約 100 mg/L 含まれていた。そこで、肝細胞の選択性をより向上させるため、変法 L-15 培地に含まれる FBS 及びガラクトース濃度の組み合わせについて検討を行った。分化した細胞の mRNA 発現解析を行ったところ、L-15 コントロール培地を用いた群と比較して、ALB 及び薬物代謝酵素の mRNA 発現は、1% FBS-900 mg/L ガラクトースもしくは 2% FBS-450 mg/L ガラクトースを含む変法 L-15 培地を用いた群で増加した (Fig. 5A)。また、これらの細胞の形態学的変化及び ALB 免疫蛍光染色した細胞を顕微鏡下で観察したところ、細胞が単層で多核な形態を示し (Fig. 5B)、ほぼすべての細胞で ALB 陽性像が認められた。さらに、これらの変法 L-15 培地でヒト胎児肝 (hFL) 細胞及びヒト胎児肺線維芽 (HFL-III) 細胞を培養したところ、hFL 細胞は生存し、HFL-III 細胞は死滅することが明らかとなった。これらのことから、FBS 及びガラクトースを適切な濃度の組み合わせで変法 L-15 培地に添加することにより、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を選択的に培養することが可能となり、分化した肝細胞を高純度で得られることが示唆された。



**Fig. 5. Effects of FBS and D-(+)-galactose concentration on hepatocyte-like cells differentiated from human iPS cells**  
Human iPS cells were differentiated using conventional method, L-15 control medium or modified L-15 medium containing D-(+)-galactose (450 or 900 mg/mL) and FBS (1 or 2%) from day 9 to 16. (A) Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). (B) Morphological changes in differentiated human iPS cells.

## 【結論】

### 1. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化及び低分子化合物による分化促進

本研究では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への効率的な分化法の確立を目的として検討を行った。肝細胞マーカータンパク質の mRNA 発現解析、薬物代謝酵素活性測定の結果より、ヒト iPS 細胞が機能を有する肝細胞様細胞へ分化したことが明らかとなった。さらに、今回用いた VPA はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進剤として有用であることが明らかとなった。

### 2. 変法 L-15 培地を用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞の選択的培養法

本研究では、分化の過程で変法 L-15 培地を用いることにより、ヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化した細胞のみを選択的に培養することを目的として検討を行った。その結果、2% FBS-450 mg/L ガラクトースもしくは 1% FBS-900 mg/L ガラクトースを含んだ変法 L-15 培地で培養することにより、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が高純度で得られることが明らかとなった。

簡便かつ安価に分化・選択が可能でこれらの方法は、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を薬物動態試験をはじめとした創薬研究に広く利用していくうえで、非常に有用であると考えられる。

(基礎となる報文)

1. Y. Kondo, T. Iwao, K. Nakamura, T. Sasaki, S. Takahashi, N. Kamada, T. Matsubara, Frank J. Gonzalez, H. Akutsu, Y. Miyagawa, H. Okita, N. Kiyokawa, M. Toyoda, A. Umezawa, K. Nagata, T. Matsunaga and S. Ohmori  
An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 237–243 (2014).
2. Y. Kondo, T. Iwao, S. Yoshihashi, K. Mimori, R. Ogihara, K. Nagata, K. Kurose, M. Saito, T. Niwa, T. Suzuki, N. Miyata, S. Ohmori, K. Nakamura and T. Matsunaga  
Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells  
*PLoS One*, **9**, e104010 (2014).
3. Y. Kondo, S. Yoshihashi, K. Mimori, R. Ogihara, Y. Kanehama, Y. Maki, S. Enosawa, K. Kurose, T. Iwao, K. Nakamura, and T. Matsunaga  
Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2014, (in press)

参考論文

1. T. Sasaki, S. Takahashi, Y. Numata, M. N Tanaka, T. Kumagai, Y. Kondo, T. Matsunaga, S. Ohmori and K. Nagata  
Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**, 250-259 (2013).

特許等

1. 出願特許 特願 2012-247010 人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法  
松永民秀、岩尾岳洋、近藤祐樹、吉橋幸美
2. PCT 出願 PCT/JP2013/065298 人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法  
近藤祐樹、岩尾岳洋、松永民秀、吉橋幸美、宮田直樹、鈴木孝禎

## 論文審査の結果の要旨

医薬品開発における薬物動態試験には、ヒト肝での薬物代謝を比較的正確に予測可能なヒト初代培養肝細胞がよく利用されている。しかし、新鮮な肝臓の入手は困難であるとともに、顕著なロット間差や個体差が存在するなどの問題があるため、良質の肝細胞を安定して使用することが難しい。そこで、申請者は本研究においてヒト iPS 細胞を簡便かつ安価な方法で肝細胞へ分化させる技術の開発を試みた。

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化は、3 種類の液性因子 (AA、HGF、OSM) と 2 種類の低分子化合物 (DMSO、DEX) のみを用いることで行った。この簡便な方法で分化した細胞はヒト肝細胞の特徴を有しており、ヒト iPS 細胞が機能を有した肝細胞様細胞へ分化していることが示唆された。さらに、薬物代謝酵素の誘導剤に応答したことから、薬物動態の評価が可能な細胞であることを示した。しかし、分化効率や肝細胞マーカーの発現が低かったことから、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進させる低分子化合物を検討したところ、VPA が分化を促進することを発見した。申請者は、VPA がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進するためには添加期間が重要であることを見出し、さらに VPA の有する種々の作用のうち、HDAC 阻害作用がヒト iPS 細胞の肝細胞への分化促進に寄与していることを明らかとした。また申請者は高純度な肝細胞を得るために、ヒト iPS 細胞から分化した肝細胞のみを選択的に培養する技術の確立も試みた。選択的培養を行うために肝細胞特異的な代謝に着目し、肝細胞のみが利用可能な栄養素を含む培地(肝細胞選択培地)を考案した。ヒト iPS 細胞は分化に伴い肝細胞特異的な栄養代謝経路に関わる酵素を発現したため、添加する栄養素の時期及び濃度を検討した。その結果、この肝細胞選択培地を用いてヒト iPS 細胞から分化した細胞は肝細胞の特徴を有し、ほとんど全ての細胞が ALB 免疫蛍光染色に陽性像を示した。このことは、肝細胞選択培地を用いることで、簡便かつ高純度にヒト iPS 細胞由来肝細胞が得られることを示唆した。これらの簡便かつ安価な分化方法はヒト iPS 細胞由来肝細胞を薬物動態試験へ供給される可能性を示し、将来的には細胞移植治療等の再生医療への応用も期待できる成果である。

上記のように、申請者は薬物動態試験へ応用可能なヒト人工多能性幹細胞由来肝細胞を作出するために数々の検討を行い、価値のある成果を見出した。また口頭諮問の結果から論文に関連する分野に関して十分な知識を持ち、行った研究の背景や社会的意義を理解していると評価した。よって本研究成果は名古屋市立大学大学院薬学研究科博士後期課程の学位論文としての条件を満たしていると認め、論文審査委員会にて最終試験を合格と判定した。