



## 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

名古屋市立大学学位論文

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

平成 25 年度（2014 年 3 月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

近藤 祐樹

一. 本論文は 2014 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 頭金 正博 教授

副査 湯浅 博昭 教授

尾関 哲也 教授

松永 民秀 教授

二. 本論文は、学術情報誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1. **Yuki Kondo**, Takahiro Iwao, Katsunori Nakamura, Takamitsu Sasaki, Shogo Takahashi, Noboru Kamada, Tsutomu Matsubara, Frank J. Gonzalez, Hidenori Akutsu, Yoshitaka Miyagawa, Hajime Okita, Nobutaka Kiyokawa, Masashi Toyoda, Akihiro Umezawa, Kiyoshi Nagata, Tamihide Matsunaga, and Shigeru Ohmori  
An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity  
*Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **29**, 237–243 (2014).
2. **Yuki Kondo**, Takahiro Iwao, Sachimi Yoshihashi, Kayo Mimori, Ruri Ogihara, Kiyoshi Nagata, Kouichi Kurose, Masayoshi Saito, Takuro Niwa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Shigeru Ohmori, Katsunori Nakamura, and Tamihide 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. **Yuki Kondo**, Sachimi Yoshihashi, Kayo Mimori, Ruri Ogihara, Yoshinori Kanehama, Yoshiyuki Maki, Shin Enosawa, Kouichi Kurose, Takahiro Iwao, Katsunori Nakamura, and Tamihide Matsunaga  
Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells  
*Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **29**, 407–413 (2014).

三. 本論文の基礎となる研究は、松永 民秀 教授の指導のもとに名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

## 略語一覧

2-ME	2-メルカプトエタノール
AFP	$\alpha$ -フェトプロテイン
AhR	芳香族炭化水素受容体
ALB	アルブミン
ASL	アルギニノコハク酸分解酵素
ASS1	アルギニノコハク酸合成酵素
BMP	骨形成タンパク質
BMSS	骨髄間葉系幹
CAR	構成的活性化アンドロスタン受容体
CEBP $\alpha$	CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 $\alpha$
collagen I	タイプ I コラーゲン
COS medium	Cosmedium 004 for Hepatocyte/F12 based
CYP	シトクロム P450
DAPI	4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
DEX	デキサメタゾン
DMEM/F12	DMEM/ハム F-12 培地
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地
DMSO	ジメチルスルホキシド
EGF	上皮成長因子
ES	胚性幹
FBS	ウシ胎仔血清
FGF	線維芽細胞増殖因子
FLT	Fms 様チロシンキナーゼ
FOXA2	フォークヘッドボックス A2
GABA	$\gamma$ -アミノ酪酸
GALK1	ガラクトキナーゼ 1
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
hFL	ヒト胎児肝
HGF	肝細胞増殖因子
HNF	肝細胞核因子
iPS 細胞	人工多能性幹細胞
KGF	ケラチノサイト成長因子
KO-DMEM	ノックアウト DMEM

KSR	ノックアウト血清代替物
L-Glu	L-グルタミン溶液
Matrigel	BD マトリゲル™基底膜マトリックス (Growth Factor Reduced)
MEF	マウス胎児線維芽細胞
MEM NEAA	最小必須培地用非必須アミノ酸
MTT	3- (4,5-ジメチル-2-チアゾリル) -2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド
NaB	酪酸ナトリウム
OME	オメプラゾール
OSM	オンコスタチン M
OTC	オルニチントランスカルバミラーゼ
PAH	フェニルアラニン水酸化酵素
PXR	プレグナン X 受容体
RIF	リファンピシン
RPMI 培地	ロズウェルパーク記念研究所培地
RT	逆転写
SULT	硫酸転移酵素
TAT	チロシンアミノ基転移酵素
TSA	トリコスタチン A
UGT	ウリジンジリン酸-グルクロン酸転移酵素
UPLC/MS/MS	超高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計
VPA	バルプロ酸

## 目次

第一章 序論	1
第二章 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化	3
2.1 緒言	3
2.2 実験方法	4
2.2.1 試薬及び細胞	4
2.2.2 ヒト iPS 細胞の培養	4
2.2.3 ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化	5
2.2.4 誘導剤処理	5
2.2.5 RNA 抽出及び逆転写 (RT) 反応	5
2.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析	6
2.2.7 テストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性	6
2.2.8 cDNA マイクロアレイ解析	7
2.3 結果	8
2.3.1 肝細胞マーカー遺伝子の発現	8
2.3.2 CYP 及び UGT 遺伝子の発現	8
2.3.3 誘導剤に対する薬物代謝酵素発現及び活性の応答性	10
2.4 考察	12
2.5 小括	14
第三章 低分子化合物によるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進	15
3.1 緒言	15
3.2 実験方法	16
3.2.1 試薬及び細胞	16
3.2.2 凍結ヒト肝細胞の培養	16
3.2.3 ヒト iPS 細胞の培養	17
3.2.4 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化	17
3.2.5 RNA 抽出及び逆転写反応	18
3.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析	18

3.2.7	ALB 免疫蛍光染色	19
3.2.8	薬物代謝酵素活性測定	19
3.2.9	HDAC 活性測定	20
3.2.10	統計学的解析	20
3.3	結果	21
3.3.1	VPA を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化	21
3.3.2	ALB 免疫蛍光染色	21
3.3.3	ヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物代謝酵素の発現及び活性	24
3.3.4	ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に対する HDAC 阻害剤の効果	26
3.4	考察	28
3.5	小括	31
第四章 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		32
4.1	緒言	32
4.2	実験方法	34
4.2.1	試薬及び細胞	34
4.2.2	肝細胞選択培地	34
4.2.3	細胞培養	34
4.2.4	ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化	35
4.2.5	RNA 抽出及び逆転写反応	35
4.2.6	リアルタイム RT-PCR 解析	35
4.2.7	MTT アッセイ	36
4.2.8	ALB 免疫蛍光染色	36
4.3	結果	38
4.3.1	変法 L-15 培地の効果及び肝特異的栄養代謝酵素の発現	38
4.3.2	変法 L-15 培地による培養時期及び栄養素の添加・除去時期の検討	38
4.3.3	ガラクトース及び FBS 濃度の検討	40
4.3.4	変法 L-15 培地を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化	42
4.4	考察	43
4.5	小括	45

第五章 総括	46
謝辞	47
引用文献	49



## 第一章 序論

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は, ウイルスベクターを用いて体細胞に 4 つの遺伝子, OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC を導入することによって樹立された<sup>1)</sup>. このヒト iPS 細胞は, 1998 年に Thomson らによって樹立されたヒト胚性幹 (ES) 細胞<sup>2)</sup>と同様な, 多分化能とほぼ無限の増殖能をもつ細胞である.

ES 細胞は再生医療や細胞治療に利用できる可能性があることから, ヒト ES 細胞が樹立された後, 臨床応用を目指した研究が盛んに行われている. しかし, 生命の萌芽であるヒト胚を滅失するという生命倫理的な問題に加え, 移植の際の免疫学的な拒絶反応も避けられないという医学的課題を抱えていた. 一方, ヒト iPS 細胞は体細胞から樹立することが出来るため, ヒト ES 細胞の抱える様々な問題を一気に解決する画期的な細胞として, 発表以来世界中から注目されている. そして, 免疫拒絶のない再生医療や細胞治療の他にも, 稀少疾病等の疾患メカニズムの解明に繋がる可能性もあることから, ヒト iPS 細胞に関する研究が盛んに行われている. しかし, ヒト iPS 細胞の利用は再生医療や細胞治療への応用だけに限ったことではない. 例えば, 多分化能を有するという特長を生かし, ある特定の細胞に分化させることにより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<sup>3,4)</sup>.

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<sup>5)</sup>. その主要な酵素である CYP は, 肝臓の発達段階に応じて異なる発現を示す. CYP3A7 は, ヒト胎児および新生児の肝臓における主要な酵素である<sup>6,7)</sup>. 一方で, CYP3A4 は出生後に発現し, 最終的にヒト成人肝の総シトクロム P450 (CYP) の量の約 30%を占める<sup>8,9)</sup>. 胎児及び成人に発現している CYP3A は多くの医薬品の代謝に関わり, その発現は様々な医薬品に暴露されることで影響を受ける<sup>10-12)</sup>. また, 医薬品の相互作用にも深く関与することから, 創薬研究における薬物代謝試験は非常に重要である. 現在, この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初代肝細胞や肝ミクロソームが *in vitro* の評価系としてよく利用されている<sup>13,14)</sup>. 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<sup>5,15)</sup>, 良質の肝細胞を安定して使用することが難しく, 大きな問題の一つとして研究の障害となっている. そこでこれらの問題を解決するために, 大量培養が可能なヒト 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, ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化方法が報告されており, その主な方法として組換

えタンパク質である成長因子等が使用されている<sup>16-19)</sup>。さらに、肝細胞への分化を促進させるため、組換えタンパク質による分化誘導と併せて他の細胞と共培養する方法やウイルスベクターを用いて転写因子を強制発現させる方法が報告された<sup>20-23)</sup>。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、液性因子は非常に高価であることや共培養用の細胞の調整には手間がかかること、また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とされる。また、分化した肝細胞様細胞を薬物動態試験へ応用するためには、大量培養やバリデーションが必要であり、これらの方法は分化した肝細胞様細胞を大量に得るために多くの課題が残っていると考えられる。そのため、分化に複雑な工程を必要とせず、簡便な方法でヒト iPS 細胞から機能的な肝細胞への分化方法の開発が望まれている。

ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞は、ヒト初代培養肝細胞と比較すると薬物代謝関連遺伝子の発現が低いことや、薬物代謝活性が低いことも明らかとなっている。そこで、ヒト iPS 細胞から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、ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化を促進するいくつかの低分子化合物が報告された<sup>24-26)</sup>。一般的に、低分子化合物は大量かつ安定的に、高純度で合成することが可能であり、組換えタンパク質やウイルスベクター、共培養用細胞を用いる方法よりもリスク、コスト及びロット間差が低い場合、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に用いる分化誘導因子として有益であると考えられる。しかしながら、肝分化を促進する低分子化合物に関する知見は乏しく、どのような効果を持った化合物が肝分化に有用であるかということはよく分かっていない。

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と言われている。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を行った際、肝細胞以外の細胞に分化した細胞も存在していると考えられる。薬物代謝試験への利用を考えた場合、薬物動態をより正確に予測するためには高純度なヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いることが望ましい。しかしながら、肝細胞を簡便に単離・精製する技術はいまだ確立していない。

そこでこれらの問題を解決するため、本研究では、ヒト ES 細胞で検討した簡便な分化誘導方法<sup>27)</sup>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低分子化合物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促進効果についても検討を行った。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、分化の過程で肝特異的酵素を利用した培地を用いてヒト 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の開発を試みた。

## 第二章 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

### 2.1 緒言

現在、ES/iPS 細胞から肝細胞への分化に関する研究が行われ、様々な分化誘導方法が報告されている<sup>16-28)</sup>。しかしながら、分化に複雑な工程を必要とせず、簡便な方法で分化させた肝細胞の薬物代謝酵素活性等の機能については十分明らかとなっていない。例えば、Touboul らは化学的組成の明らかな条件下での 7 種類の組換えタンパク質、すなわちアクチビン A、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 2、骨形成タンパク質 (BMP) 4、FGF10、FGF4、肝細胞増殖因子 (HGF) 及び上皮成長因子 (EGF) と 2 種類の低分子化合物を用いてヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化を行っているが<sup>17)</sup>、ヒト成人肝に最も豊富に存在し、薬物代謝に最も重要な CYP3A4 の発現及び活性については示されていない。また、Song らも 6 種類の組換えタンパク質、すなわちアクチビン A、FGF4、BMP2、HGF、ケラチノサイト成長因子 (KGF) 及びオンコスタチン M (OSM) と 1 種類の低分子化合物、2 種類の添加物を用いてヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を行っているが<sup>18)</sup>、CYP2B の薬物代謝酵素活性を認めたものの、Touboul らの報告と同様に CYP3A4 の機能は明らかとなっていない。Takayama らは 9 種類の組換えタンパク質、すなわちアクチビン A、FGF2、BMP4、FGF4、HGF、FGF1、FGF10、HGF 及び OSM と 1 種類の低分子化合物を用いる方法に加えて、改変アデノウイルスベクターを用いてフォークヘッドボックス A2 (FOXA2) 及び肝細胞核因子 (HNF) 1 $\alpha$  遺伝子を複数回導入することでヒト ES/iPS 細胞から機能的な肝細胞への分化を行った<sup>21)</sup>。分化した肝細胞は凍結初代肝細胞に匹敵する薬物代謝酵素を発現しており、薬物誘導試験や肝毒性試験が行える細胞集団を得た。しかし、これらの方法の課題として、組換えタンパク質は非常に高額であるため、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を安価に供給することが困難であることや、ウイルスベクターを用いる危険性が存在することが挙げられる。

薬物代謝試験にヒト iPS 細胞由来肝細胞を広く利用していくにあたっては、安価かつ安定的に細胞を供給する必要があると考えられ、そのためのヒト iPS 細胞から肝細胞への分化方法は組換えタンパク質の使用を最小限とし、簡便な方法で行うことが望ましい。近年、我々の研究グループもヒト ES 細胞から肝細胞様細胞への簡便な分化方法を確立した<sup>27)</sup>。そこで本研究では、ヒト ES 細胞で検討した簡便な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、薬物動態試験に利用可能な肝細胞を作出すること目的として、代表的な誘導剤による薬物代謝酵素の応答性についても検討を行った。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬及び細胞

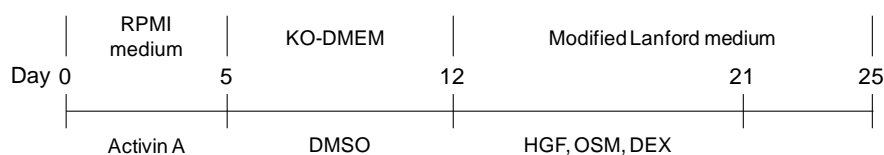
HepG2 細胞は理化学研究所バイオリソースセンター（筑波）より，マウス胎児線維芽細胞 (MEF) はオリエンタル酵母社（東京）より，BD マトリゲル™基底膜マトリックス (Growth Factor Reduced) (Matrigel) は BD バイオサイエンス社（マサチューセッツ州ベッドフォード, 米国）より，ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM), DMEM/ハム F-12 培地 (DMEM/F12), 2-メルカプトエタノール (2-ME), L-グルタミン溶液 (L-Glu) はシグマアルドリッチ社（ミズーリ州セントルイス, 米国）より，ノックアウト血清代替物 (KSR), ノックアウト DMEM (KO-DMEM), ロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI 培地, グルタマックス含有), グルタマックス, 最小必須培地用非必須アミノ酸 (MEM NEAA) はインビトロジェン社（カリフォルニア州カールズバッド, 米国）より，ウシ胎仔血清 (FBS) はハイクロン社（マサチューセッツ州ウォルサム, 米国）より，FGF2, アクチビン A はペプロテック社（ニュージャージー州ロッキーヒル, 米国）より，変法ランフォード培地はチャールスリバー社（東京）より，アクターゼはエムエステクノシステムズ社（大阪）より，HGF は R&D システムズ社（ミネソタ州ミネアポリス, 米国）より，OSM, デキサメタゾン (DEX), オメプラゾール (OME), リファンピシン (RIF), ジメチルスルホキシド (DMSO), ヒト成人正常肝臓総 RNA (64 歳男性由来) は和光純薬工業社（大阪）より，タイプ I コラーゲン (Collagen I) コートしたマイクロプレートは旭硝子社（千葉）より，霊長類 ES/iPS 細胞用細胞剥離液はリプロセル社（東京）より購入して用いた．その他の試薬は全て市販の高速液体クロマトグラフ用もしくは特級品を用いた．

### 2.2.2 ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (Fetch : NIHS0604 及び Lollipop : JCRB1336) は，ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 から樹立され，国立成育医療研究センター研究所の梅澤明弘博士よりご供与いただいた．ヒト iPS 細胞は 20% KSR, 1% MEM NEAA, 2 mM L-Glu, 0.1 mM 2-ME, 5 ng/mL FGF2 を含む DMEM/F12 を用いて，マイトマイシン C 処理により不活化した MEF 上で培養した．培地交換は毎日行い，3~4 日毎に霊長類 ES/iPS 細胞用細胞剥離液を用いて剥離し，継代培養を行った．

### 2.2.3 ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化は、ヒト iPS 細胞未分化コロニーの占める割合が培養皿に対し約 70% になった状態で開始した。0.5% FBS, 100 ng/mL アクチビン A を含む RPMI 培地（グルタマックス含有）で 3 日間、2% KSR, 100 ng/mL アクチビン A を含む RPMI 培地（グルタマックス含有）で 2 日間培養することで内胚葉に分化させた<sup>29)</sup>。その後、細胞はアクターゼを用いて 5 分間処理することにより剥離し、あらかじめヒト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した Matrigel もしくは Collagen I にてコーティングしたプレートに播種した。尚、セリンスレオニン蛋白リン酸化酵素の阻害剤である Y-27632 は剥離前 1 時間及び播種後 24 時間、10  $\mu$ M となるように培地に添加した。細胞播種後、20% KSR, 1% グルタマックス, 1% MEM NEAA, 0.1 mM 2-ME, 1% DMSO を含む KO-DMEM で 7 日間培養することで肝芽細胞に分化させた<sup>30)</sup>。最後に、10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, 100 nM DEX を含む変法ランフォード培地で 9 日間、変法ランフォード培地のみで 4 日間培養することで肝細胞へ分化させた<sup>31-33)</sup> (Fig. 2-1)。



**Figure 2-1.** Schematic of the protocol for the differentiation into hepatocytes from 2 human iPS cell lines

Two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were differentiated into endoderm cells by addition of 100 ng/mL activin A for 5 days, and then into hepatocytes by the addition of 1% DMSO for 7 days. The hepatocytes were then matured by the addition of 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, and 100 nM DEX for 9 days. For the final 4 days, the cells were cultured in modified Lanford medium alone, without HGF, OSM, and DEX.

### 2.2.4 誘導剤処理

薬物代謝酵素の誘導剤は以前に報告された濃度を参考に<sup>27,34-36)</sup>, 50  $\mu$ M OME, 100  $\mu$ M DEX あるいは 40  $\mu$ M RIF を含む変法ランフォード培地で細胞回収前に 3 日間培養することで処理した。

### 2.2.5 RNA 抽出及び逆転写 (RT) 反応

総 RNA はヒト iPS 細胞の分化誘導終了後, RNeasy Mini Kit (キアゲン社, カリフォルニア州バレンシア, 米国) の添付マニュアルに従い抽出した。cDNA の合成は SuperScript III (インビトロジェン社) を使用し, 2-4  $\mu$ g の総 RNA から添付マニュアルに従って行った。

## 2.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析

PCR プライマーは、Table 2-1 に示したものをを用いた。リアルタイム RT-PCR の反応混合液は SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (タカラバイオ社, 滋賀) を用い、反応はアプライドバイオシステムズ 7300 リアルタイム PCR システム (アプライドバイオシステムズ社, カリフォルニア州フォスターシティ, 米国) を用いて行った。結果は内在性コントロールとしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いて補正した。

**Table 2-1.** Sequences of primers for real-time RT-PCR analysis

Gene names	Forward primer sequences (5'-...-3')	Reverse primer sequences (5'-...-3')
HNF4 $\alpha$	GAGCTGCAGATCGATGACAA	TACTGGCGGTCGTTGATGTA
ALB	GAGCTTTTTGAGCAGCTTGG	GGTTCAGGACCACGGATAGA
AFP	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	TCTGCAATGACAGCCTCAAG
CYP1A2	CTTTGACAAGAACAGTGTCGG	AGTGTCCAGCTCCTTCTGGAT
CYP1B1	ACCAGGTATCCTGATGTGCAGAC	AGGTGTTGGCAGTGGTGGCATGAG
CYP2C9	GAACACCAAGAATCGATGGACA	TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA
CYP3A4	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTCCTCCTGCAG
CYP3A5	CTCTCTGTTTCCAAAAGATACC	TGAAGATTATTGACTGGGCTG
CYP3A7	AGATTTAATCCATTAGATCCATTCG	AGGCGACCTTCTTTTAICTG
UGT1A1	CAGCAGAGGGGACATGAAAT	ACGCTGCAGGAAAGAATCAT
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

## 2.2.7 テストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性

ヒト iPS 細胞から分化した細胞は、100  $\mu$ M テストステロンを含む変法ランフォード培地で6時間インキュベートした。インキュベート後、上清を1.25 mL の酢酸エチルと混合し、内部標準物質として1  $\mu$ M エトキシレゾルフィン溶液を10  $\mu$ L 添加した。サンプルは遠心分離後、上層 (有機層) をマイクロ遠心チューブに移し、窒素ガス存在下で蒸発乾固させた。得られた残渣に10 mM 酢酸アンモニウム、0.1%ギ酸を含むメタノール100  $\mu$ L を加え再溶解させ、代謝物を LC-MS/MS で測定した<sup>37)</sup>。

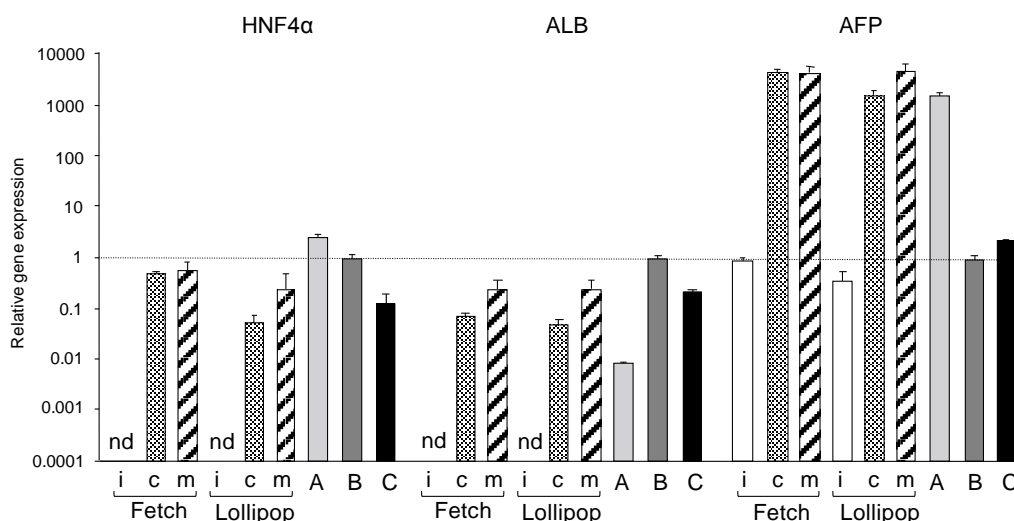
### 2.2.8 cDNA マイクロアレイ解析

RNAはRNeasy Mini column(キアゲン社)を用いて抽出し,その後 SuperScript Indirect cDNA Labeling Kit (インビトロジェン社)と Cy<sup>TM</sup>3 もしくは Cy<sup>TM</sup>5 Mono-Reactive Dye (GE ヘルスケア, バックinghamシャー州リトルチャルフォント, 英国)を用いて逆転写・標識した. 色素と結合した cDNA は MiniElute PCR purification kit (キアゲン社)を用いて精製し, Agilent 44 K human 60-mer oligo microarray (アジレント・テクノロジー社, カリフォルニア州サンタクララ, 米国)に添付マニュアルに従いハイブリダイズさせた. サンプルは Agilent microarray scanner (アジレント・テクノロジー社)を用いて乾燥, 洗浄した後, スキャンした. データの解析には Genespring GX software package (アジレント・テクノロジー社)を用いた. また, Ingenuity IPA software (インジェニュイティ・システムズ社, カリフォルニア州レッドウッドシティ, 米国)を用いてパスウェイ解析も行った.

## 2.3 結果

### 2.3.1 肝細胞マーカー遺伝子の発現

ヒト iPS 細胞から分化させた細胞において、HNF4 $\alpha$ 、アルブミン (ALB) 及び  $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) の mRNA 発現が認められた (Fig. 2-2). これらの mRNA 発現量は Fetch, Lollipop のいずれの株も Matrigel 上で培養した群において Collagen I 上で培養した群よりも高かった. HNF4 $\alpha$ , ALB の mRNA 発現量は肝細胞と同等の発現量を示した. しかしながら, 未成熟な肝細胞のマーカーである AFP の mRNA 発現は HepG2 細胞と同等の発現を示し, ヒト成人肝及び肝細胞の発現より顕著に高かった.



**Figure 2-2.** Expression levels of liver marker protein mRNAs

The expression levels of HNF4 $\alpha$ , ALB, and AFP mRNAs in undifferentiated human iPS cells (i) and hepatocyte-like cells differentiated from two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were analyzed using real-time PCR. Collagen I (c) or Matrigel (m) was used for the differentiation as the extracellular matrix. A, B, and C present HepG2 cells, human adult liver, and hepatocytes, respectively, as positive controls. Each bar represents the mean  $\pm$  SD from triplicate experiments. Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the liver was taken as 1. nd, not detected.

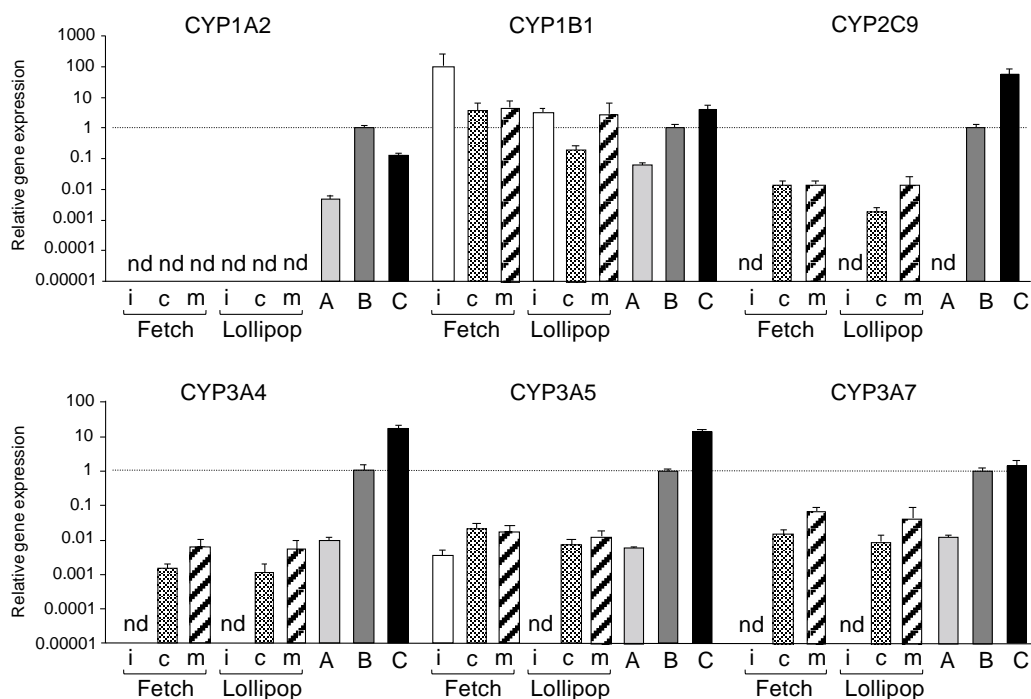
### 2.3.2 CYP 及び UGT 遺伝子の発現

Figure 2-3 にはヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞の CYP の mRNA 発現を示した. 薬物代謝に関与する CYP は組織によってその発現パターンが異なり, 肝では CYP1A2 が組織特異的に発現することが知られている<sup>5,38</sup>. ヒト iPS 細胞から分化させた細胞では CYP1A2 の発現は認められなかった. 一方で, CYP3A 遺伝子の発現は認められたものの, これらの発現量はヒト成人肝及び肝細胞の約 100~1000 分の 1 程度であり, HepG2 細胞の発現量と同等であった. 興味深いことに, CYP2C9 遺伝子の発現は, ヒト成人肝及び肝細胞よりは低い



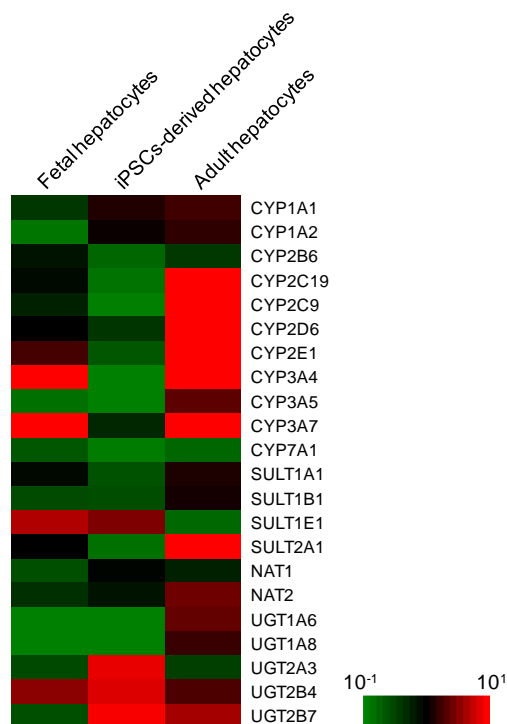
ものの、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞で検出され、HepG2 細胞では検出されなかった。臓器非特異的な発現を示す CYP1B1 は全ての群で同等の発現量を示した。これら CYP の mRNA 発現量は今回分化させた 2 つのヒト iPS 細胞株間で大きな差は無く、Collagen I 上で培養した細胞よりも、Matrigel 上で培養した細胞において高い傾向が認められた。

また、Fetch から分化させた肝細胞様細胞における薬物代謝酵素の発現をマイクロアレイにより解析し、胎児肝細胞及び成人肝細胞と比較した。その結果、薬物代謝における抱合反応酵素であるウリジンジリン酸-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 2A3, UGT2B4 および UGT2B7 の mRNA 発現量は、分化した細胞で最も高い発現が認められた。対照的に、分化した細胞における第一相酵素の mRNA 発現量は、大部分が成人肝細胞よりも低かった (Fig. 2-4)。



**Figure 2-3. Expression levels of CYP mRNAs**

The expression levels of CYP1A2, CYP1B1, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7 mRNAs in undifferentiated human iPS cells (i) and hepatocyte-like cells differentiated from 2 human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were analyzed using real-time PCR. Collagen I (c) or Matrigel (m) was used for the differentiation as the extracellular matrix. A, B, and C present HepG2 cells, human adult liver, and hepatocytes, respectively, as positive controls. Each bar represents the mean  $\pm$  SD from triplicate experiments. Values were normalized to the levels of GAPDH mRNA. The graphs represent the relative gene expression level when the level in the liver was taken as 1. nd, not detected.



**Figure 2-4. Microarray analysis of phase I and II enzymes**

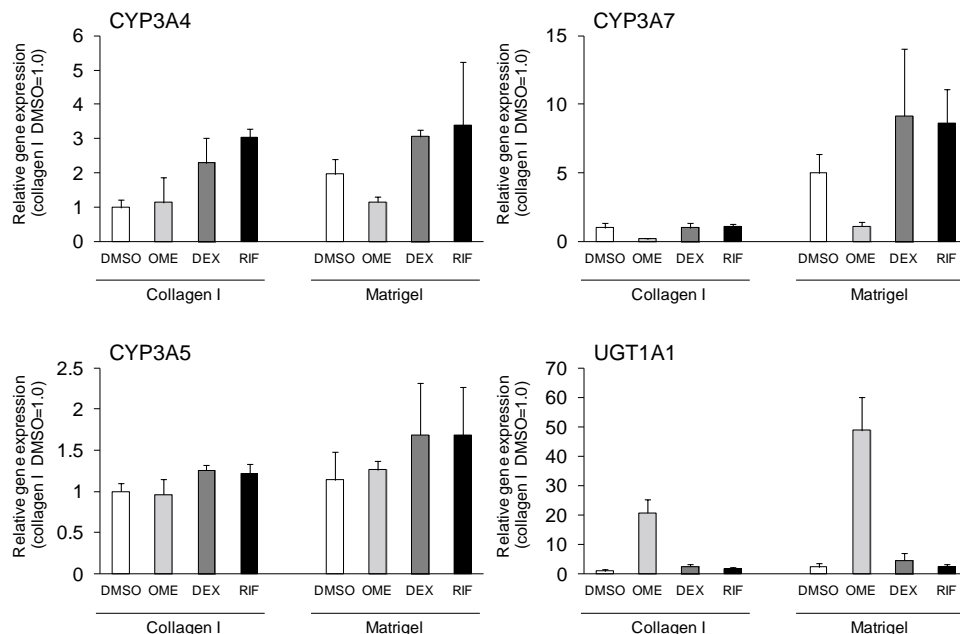
Human iPS cells (Fetch) were differentiated into hepatocyte-like cells. After differentiation, total mRNA was extracted from the cells. The expression levels of phase I and II enzymes were analyzed by microarray analysis as described in Materials and Methods. The expression levels of fetal liver cells, hepatocyte-like cells differentiated from human iPS cells, and adult hepatocytes were presented in the left, center, and right columns, respectively.

### 2.3.3 誘導剤に対する薬物代謝酵素発現及び活性の応答性

Figure 2-5 には CYP3A 及び UGT1A1 の発現に対する誘導剤の効果を示した。Collagen I 上で培養した細胞は、DEX 及び RIF 処理により CYP3A4 遺伝子の発現がそれぞれ 2.5 倍及び 3 倍に増加した。しかし、CYP3A5 及び CYP3A7 遺伝子の発現に顕著な増加は認められなかった。Matrigel 上で培養した細胞は、CYP3A 遺伝子の顕著な誘導は認められなかった。一方で UGT1A1 遺伝子は OME 処理により著明な発現誘導が認められ、Matrigel 上で培養した細胞では 50 倍と Collagen I 上で培養した細胞 (22 倍) より高かった。また、DEX 処理により、その発現量は Collagen I 上で培養した細胞では 2.5 倍、Matrigel 上で培養した細胞では 2 倍に増加した。

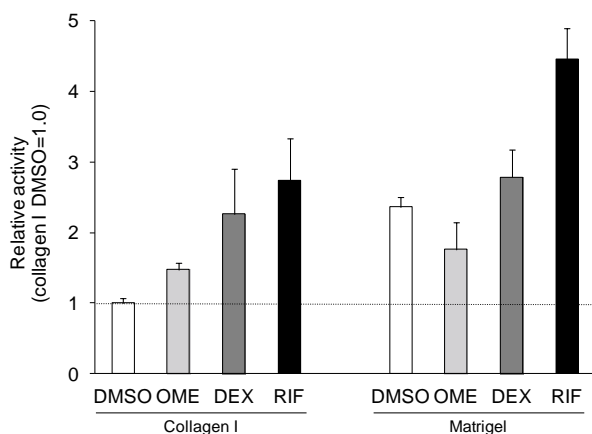
次に基質薬物としてテストステロンを用いて、その 6 $\beta$ -水酸化体を測定することで CYP3A 活性について評価した。その結果、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞においてテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性が認められた (Fig. 2-6)。また、その活性は Collagen I 上で培養した細胞で DEX 及び RIF 処理によりそれぞれ 2.3 及び 2.7 倍に誘導された。Matrigel 上で培養した

細胞の活性は、Collagen I 上で培養した細胞の活性よりも 2.5 倍高く、RIF 処理によってその活性は 1.9 倍増加した。



**Figure 2-5.** Effects of drugs on expression of CYP3A enzymes and UGT1A1 mRNAs in the hepatocyte-like cells

The cells differentiated from human iPS cells (Fetch) were treated with OME, DEX, and RIF for 72 h. The total mRNA was extracted from the cells. The expression of CYP3A and UGT1A1 mRNAs were analyzed by microarray analysis as described in Materials and Methods. Each bar represents the mean  $\pm$  SD from triplicate experiments. Values were normalized to the levels of GAPDH mRNA. The graphs represent the relative gene expression level when the levels in the hepatocyte-like cells using collagen I and DMSO were assigned a value of 1.



**Figure 2-6.** Effects of drugs on testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity in hepatocyte-like cells

The cells differentiated from human iPS cells (Fetch) were treated with OME, DEX, and RIF for 72 h and then cultured with the medium containing testosterone for 6 h. 6 $\beta$ -hydroxytestosterone was analyzed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry as described in Materials and Methods. Each bar represents the mean  $\pm$  SD from triplicate experiments. The graphs represent the relative activity ratios when the value in the hepatocyte-like cells using collagen I and DMSO were assigned a value of 1.

## 2.4 考察

本研究では、3種類の組換えタンパク質と2種類の低分子化合物を用いる簡便な方法でヒト iPS 細胞から CYP3A4 の誘導及び活性能を有する機能的な肝細胞への分化法を確立することが出来た。その方法としては、まずヒト iPS 細胞を 100 ng/mL アクチビン A 処理することで内胚葉に分化させ、1% DMSO 処理することで肝前駆細胞に分化させた。最後に、肝前駆細胞は 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, 100 nM DEX 処理することで成熟させた。内胚葉から肝細胞への分化には、分化誘導因子として DMSO, BMP4, FGF2, FGF7, FGF10 等が用いられている<sup>16,20,30</sup>。我々も、これらの因子を単独もしくは併用して肝細胞への分化を行ったが、これらの因子の違いによる分化効率に大きな差は認められなかった (data not shown)。そのため、我々はこれらの組換えタンパク質よりも構造が安定で安価な DMSO を肝前駆細胞への分化に用いた。DMSO は成人肝細胞の機能を維持する効果<sup>39</sup>や HepaRG 細胞の分化<sup>40</sup>にも用いられることが知られているが、詳細なメカニズムは不明である。

25 日間の分化後、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞は肝細胞マーカーである ALB, AFP, 薬物代謝酵素の mRNA を発現し、これらの発現量は細胞外マトリックスとして Matrigel を用いることでその発現の増加が認められた。Matrigel は肝細胞に豊富に存在する転写因子である HNF4a の mRNA 発現を高く保ち<sup>41</sup>, Matrigel の主要な構成成分であるラミニンは ALB の mRNA 発現及び分泌を増加させる作用が報告されている<sup>42</sup>。したがって、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化にも Matrigel の構成成分が適していたと考えられる。

ヒト iPS 細胞から分化した細胞における CYP2C9 の mRNA の発現量は、肝細胞に比べて低いものの、HepG2 細胞の発現量よりも高かった。この結果は、ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞は、肝癌由来細胞株である HepG2 細胞よりも肝細胞の高い機能を有することを示唆するものであった。加えて、CYP3A4 及び UGT1A1 遺伝子の発現は各々の誘導剤により誘導が認められ、肝細胞に類似した応答性を有していることが明らかとなった。さらに、この細胞は CYP3A4 が触媒するテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性を有しており、RIF もしくは DEX 処理することによってその活性の誘導が認められた。CYP3A 分子種の中でも、特に CYP3A4 は肝臓において RIF 及び DEX により顕著に誘導されることが報告されている<sup>43</sup>。また、UGT1A1 は OME や DEX 処理により mRNA の発現が誘導されることが報告されている<sup>44</sup>。これらの結果から、本研究でヒト iPS 細胞から分化させた細胞は機能を有した肝細胞であることが示唆された。CYP3A4 及び UGT1A1 遺伝子の誘導は、それぞれ核内受容体であるプレグナン X 受容体 (PXR), 構成的活性化アンドロスタン受容体 (CAR) 及び芳香族炭化水素受容体 (AhR) が活性化することで引き起こされる<sup>45</sup>。本研究で分化

させたヒト iPS 細胞由来肝細胞において、AhR や CAR の遺伝子発現は認められたものの、PXR の遺伝子発現は認められなかった (data not shown)。このことから、本研究で観察された CYP3A4 の RIF および DEX による誘導は、それぞれ CAR 及びグルコシルコイド受容体の活性化に依存している可能性が考えられた。

本研究で分化させた肝細胞様細胞は OME で処理することにより CYP3A7 の mRNA 発現が低下した。Krusekopt とも HepG2 細胞を OME で処理することで、CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 遺伝子が減少する傾向が認められることを報告した<sup>46)</sup>。詳細な理由は不明であるが、OME に対する CYP3A 分子種の発現調節メカニズムは分子種により異なる可能性があることが考えられる。

胎児の肝臓では、成人の成熟した肝臓と比較して薬物代謝酵素の発現が極めて低いことが知られている<sup>47)</sup>。ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞は、成熟した肝細胞で発現する転写因子である HNF6 や CCAAT/エンハンサー結合タンパク質  $\alpha$  (CEBP $\alpha$ ) の発現は低かった (data not shown)。また、胎児にはほとんど存在せず、生後 1-3 ヶ月から増加する CYP1A2<sup>48)</sup> の発現は認められなかった。マイクロアレイの結果から、ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞は第二相酵素を高発現していたものの、第一相酵素の発現は低かった。これらの結果から、今回ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞は十分に成熟していないことが示唆された。

本研究では 2 株のヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化させた。しかしながら、他のヒト iPS 細胞株では同じ結果が認められない可能性も考えられる。ヒト ES/iPS 細胞は樹立方法、培養条件及び樹立元の細胞の遺伝的背景により、分化能に差があることが報告されている<sup>49,50)</sup>。そのため、分化方法を各々の株に合わせて改変する、もしくは目的の細胞に分化しやすい株を選択する必要があると考えられる。

## 2.5 小括

本研究ではヒト iPS 細胞から薬物代謝酵素活性及び誘導剤への応答性を示す機能的肝細胞様細胞への安価で簡便な分化法を確立した。しかしながら、薬物代謝酵素の発現は成熟肝細胞よりも低かった。今後、より成熟した肝細胞へ分化させる方法を模索する必要があると考えられる。

### 第三章 低分子化合物によるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進

#### 3.1 緒言

バルプロ酸 (VPA) は抗てんかん薬, 抗躁病または抗片頭痛予防薬として広く使用されている医薬品である. VPA は,  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の分解に関与する GABA トランスマミナーゼを阻害することによりヒト脳内の GABA 濃度を増加させ, てんかん発作を抑制する<sup>51-55)</sup>. この GABA 分解抑制効果は躁状態および片頭痛発作<sup>56,57)</sup>の発症抑制にも寄与している. また, VPA は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{K}^+$  チャンネルを阻害することも報告されている<sup>58)</sup>. 近年, VPA は他にも酸化ストレス産生作用やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を示すことが明らかとなり, 癌治療への応用など, 再び注目を浴びている医薬品の一つでもある<sup>59,60)</sup>. 一方, 幹細胞研究においても VPA はヒト iPS 細胞の樹立効率を増加させるという報告があり<sup>61)</sup>, 癌遺伝子である c-MYC 及び KLF4 を使用せずに, OCT3/4 及び SOX2 と VPA を用いることで初代ヒト線維芽細胞のリプログラミングが可能となった. また, VPA は肝分化においてはヒト骨髄間葉系幹 (BMSS) 細胞<sup>62)</sup>もしくはマウス ES 細胞<sup>63)</sup>からの分化において有用であることが報告されている. これらの報告では, 未分化状態のヒト BMSS 細胞もしくはマウス ES 細胞を VPA で処理し, その後組換えタンパク質を用いて分化させることで肝細胞への分化が促進された. 同様の方法として, Hay らも分化初期の段階で HDAC 阻害剤の一つである酪酸ナトリウム (NaB) を添加し, ヒト ES 細胞から肝細胞への分化を行っている<sup>30)</sup>. これらはいずれも, VPA 及び NaB をおそらく未分化状態の細胞から内胚葉あるいは肝前駆細胞への分化を促進するために使用したと考えられる. しかしながら, VPA がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化成熟の過程にどのような影響を与えるかは未だ明らかとなっていない. さらに, VPA もしくは NaB 以外の HDAC 阻害剤についての研究は行われていないため, これらの化合物が持つどのような作用が肝細胞への分化を促進させるかについては明らかとなっていない.

そこで本研究では, ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化成熟に与える VPA の効果及び作用機序の解明について検討を行った.

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬及び細胞

FGF2, アクチビン A, HGF はペプロテック社より, FBS はバイオウエスト社 (ニューアイエ, フランス) より, アクターゼはエムエステクノシステムズ社より, DMEM, DMEM/F12, MEM NEAA, L-Glu, OSM, DEX, Y-27632, RIF, VPA, ギャバクリン, トリコスタチン A (TSA), NaB, ボリノスタット, プロカインアミド, リドカイン, ゾニサミド, ニフェジピン, ミダゾラムは和光純薬工業社より, Matrigel, ブプロピオン, ヒドロキシブプロピオン, 4'-ヒドロキシジクロフェナク-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, ヒドロキシブプロピオン-d<sub>6</sub> は BD バイオサイエンス社より, DMSO, 2-ME, ウィリアム培地 E (フェノールレッド不含), ビガバトリン, エトスクシミド, MS-275, アセトアミノフェン, 7-ヒドロキシクマリングルクロン酸抱合体, 7-ヒドロキシクマリン硫酸抱合体, カフェインはシグマアルドリッチ社より, (±)-ブフラロール塩酸塩, 1'-ヒドロキシミダゾラム, アセトアミノフェン-d<sub>4</sub>, 4'-ヒドロキシメフェニトイン-d<sub>3</sub>, 1'-ヒドロキシブフラロール-d<sub>9</sub> はトロントリサーチケミカルズ社 (オンタリオ州ノースヨーク, カナダ) より, ジクロフェナクはウルトラファイン社 (マンチェスター, 英国) より, (S)-メフェニトインはエンゾライフサイエンス社 (ニューヨーク州ファーミングデール, 米国) より, フェナセチン, 7-ヒドロキシクマリンはナカライテスク社 (京都) より, 4'-ヒドロキシメフェニトイン, 1'-ヒドロキシブフラロール, 4'-ヒドロキシジクロフェナクは住化分析センター社 (東京) より, 1'-ヒドロキシミダゾラム-d<sub>4</sub> はセリリアント社 (テキサス州ラウンドロック, 米国) より, マウスモノクローナル抗ヒト ALB 抗体はアブカム社 (ケンブリッジ, 英国) より, KSR, KO-DMEM, RPMI 培地 (グルタマックス含有), グルタマックス, Alexa Fluor<sup>®</sup>568 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体はインビトロジェン社より, ヒト胎児正常肝臓総 RNA (38 週齢男性由来), ヒト成人正常肝臓総 RNA (64 歳男性由来) はバイオチェーン社 (カリフォルニア州ニューアーク, 米国) より, Cosmedium 004 for Hepatocyte/F12 based (COS medium) はコスモバイオ社より, MEF はオリエンタル酵母社より購入して用いた. T247 及び NCC149 は鈴木孝禎博士及び宮田直樹博士により合成されたものをご供与いただいた. その他の試薬は全て市販の高速液体クロマトグラフ用もしくは特級品を用いた.

### 3.2.2 凍結ヒト肝細胞の培養

凍結ヒト肝細胞 (lot. HPCH10/0910463; 32~76 歳 10 個体混合肝) はゼノテック社 (カンザス州レネクサ, 米国) より購入し, thawing medium without additives (Cat. No. MIL261 ; バ



イオプレディック社, レンヌ, フランス) を用いて添付マニュアルに従い解凍した. 解凍した肝細胞は additives for hepatocyte seeding medium (Cat. No. ADD221; バイオプレディック社) を含む basal hepatic cell medium (Cat. No. MIL600; バイオプレディック社) に懸濁し, Collagen I にてコートした細胞培養用ディッシュに播種した. 播種 12 時間後に培地を吸引除去し, additives for hepatocyte culture medium (Cat. No. ADD222; バイオプレディック社) を含む basal hepatic cell medium にて 36 時間培養した.

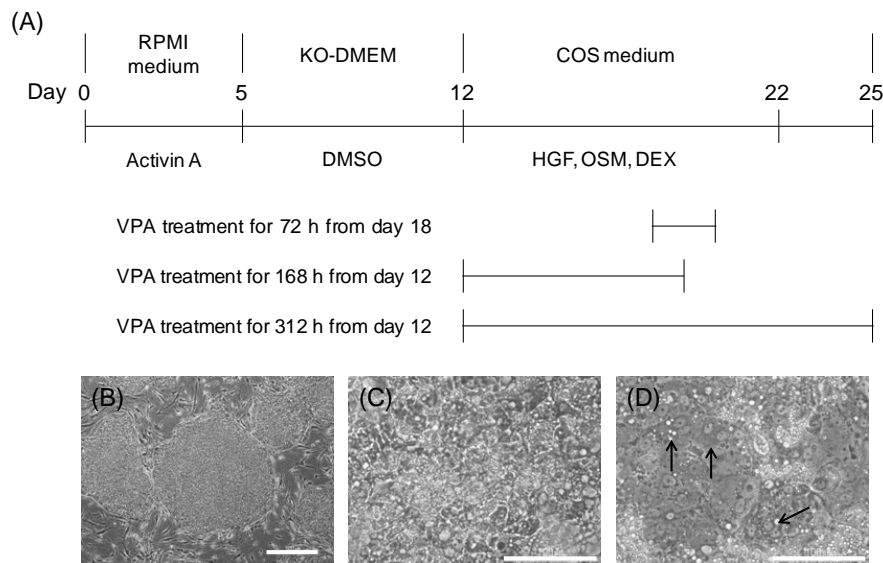
### 3.2.3 ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (Windy, Tic 及び Dotcom) は, 国立成育医療研究センター研究所の梅澤明弘博士らによりヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 から樹立され, ご供与いただいた. 未分化のヒト iPS 細胞の維持培養は MEF 上で行い, 2.2.2 で述べた方法と同様に行った.

### 3.2.4 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化は, ヒト iPS 細胞未分化コロニーの占める割合が培養皿に対し約 70% になった状態で開始した. 0.5% FBS, 100 ng/mL アクチビン A を含む RPMI 培地 (グルタマックス含有) で 3 日間, 2% KSR, 100 ng/mL アクチビンを含む RPMI 培地 (グルタマックス含有) で 2 日間培養することで内胚葉に分化させた. その後, 細胞はアクターゼを用いて 5 分間処理することにより剥離し, あらかじめヒト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した Matrigel にてコーティングしたプレートに播種した. 尚, Y-27632 は細胞剥離前 1 時間及び播種後 24 時間, 10  $\mu$ M となるように培地に添加した. 細胞播種後, 20% KSR, 1% グルタマックス, 1% MEM NEAA, 0.1 mM 2-ME, 1% DMSO を含む KO-DMEM で 7 日間培養することで肝芽細胞に分化させた. 最後に, 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, 100 nM DEX を含む COS medium で 10 日間, COS medium のみで 3 日間培養することで肝細胞へ分化させた.

薬物代謝酵素の誘導剤処理は 40  $\mu$ M RIF を含む COS medium で回収前 48 時間培養することで行った (Fig. 3-1A). また, 分化の際に VPA を 2 mM となるように用時培地に添加 (分化後 18 日目から 72 時間, 分化後 12 日目から 168 時間もしくは分化後 12 日目から 312 時間処理) し, 肝細胞への分化に与える影響について検討した.



**Figure 3-1.** Schematic of the protocols for the differentiation of human iPS cells into hepatocytes and the identification of morphological changes

(A) Human iPS cells were differentiated into endodermal cells using 100 ng/mL activin A for 5 days, and then into hepatocytes using 1% DMSO for 7 days. Finally, the hepatocytes were matured using 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, and 100 nM DEX for 10 days. For the final 3 days, cells were cultured in only COS medium. (B–D) Morphological changes in human iPS cells; (B) Undifferentiated human iPS cells; (C) hepatoblast-like cells after 12 days of differentiation; (D) hepatocyte-like cells after 25 days of differentiation in the presence of 2 mM VPA for 168 h from day 12. Arrows show binuclear cells. Scale bar, 500  $\mu$ m (B) and 100  $\mu$ m (C, D).

### 3.2.5 RNA 抽出及び逆転写反応

総 RNA はヒト iPS 細胞の分化誘導終了後、RNeasy Mini Kit の添付マニュアルに従い抽出した。cDNA の合成は、PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ社) を使用し 0.5  $\mu$ g の総 RNA から添付マニュアルに従い行った。

### 3.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析

PCR プライマーは、Table 3-1 に示したものをを用いた。リアルタイム RT-PCR の反応混合液は SYBR Premix Ex Taq II を用い、反応はアプライドバイオシステムズ 7300 リアルタイム PCR システムを用いて行った。結果は内在性コントロールとして GAPDH を用いて補正した。

**Table 3-1.** Sequences of primers for real-time RT-PCR analysis

Gene names	Forward primer sequences (5'-...-3')	Reverse primer sequences (5'-...-3')
ALB	GAGCTTTTTGAGCAGCTTGG	GGTTCAGGACCACGGATAGA
AFP	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	TCTGCAATGACAGCCTCAAG
TAT	ATCTCTGTTATGGGGCGTTG	TGATGACCACTCGGATGAAA
PXR	AGGATGGCAGTGTCTGGAAC	AGGGAGATCTGGTCCTCGAT
CYP2C9	GACATGAACAACCCTCAGGACTTT	TGCTTGTCGTCTCTGTCCCA
CYP2C19	GAACACCAAGAATCGATGGACA	TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA
CYP3A4	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
UGT1A1	CAGCAGAGGGGACATGAAAT	ACGCTGCAGGAAAGAATCAT
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

### 3.2.7 ALB 免疫蛍光染色

ALB 免疫蛍光染色は、培養後の細胞を氷冷した 4%パラホルムアルデヒドを用いて室温にて 10 分間固定処理し、 $-20^{\circ}\text{C}$  に予冷したメタノールを用いて $-20^{\circ}\text{C}$  にて 5 分間膜透過処理を行い、2% スキムミルクを用いて室温にて 20 分間ブロッキング処理を行った。その後、一次抗体はマウスモノクローナル抗ヒト ALB 抗体 (1:200) を用いて室温にて 60 分間、二次抗体は Alexa Fluor<sup>®</sup>568 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:500) を用いて遮光下室温にて 60 分間反応させた。核染色は 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を遮光下室温にて 5 分間処理することで行った。染色後の細胞は、ECLIPSE Ni microscope (ニコン社、東京) にて観察した。

### 3.2.8 薬物代謝酵素活性測定

分化誘導後の細胞を、40  $\mu\text{M}$  フェナセチン、50  $\mu\text{M}$  ブプロピオン、5  $\mu\text{M}$  ジクロフェナク、100  $\mu\text{M}$  (S)-メフェニトイン、5  $\mu\text{M}$  ブフラロール、5  $\mu\text{M}$  ミダゾラムおよび 10  $\mu\text{M}$  7-ヒドロキシマリンを含む COS medium にて  $37^{\circ}\text{C}$  の  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 6 時間もしくは 24 時間インキュベートした。インキュベート後、各ウェルから反応液を採取し、等量の反応停止液 (定量用内部標準物質を含むアセトニトリル) を加え反応を停止させた。測定用サンプルは測定まで $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。代謝物の測定は超高速液体クロマトグラフ-タン

デム型質量分析計(UPLC/MS/MS)システムを用い,以下の条件で行った.逆相カラム Acquity UPLC BEH C18 column (2.1×50 mm)を用い,移動相は0.025% ギ酸を含む水及び0.025% ギ酸を含むメタノールを使用して,流速0.8 mL/minで行った.またMSの測定はエレクトロスプレーイオン化法で行い,キャピラリー電圧は0.5 kV,イオン源温度は150°Cに設定して行った.また薬物代謝酵素活性は,反応液を採取後のプレート上の細胞を RLT buffer (Qiagen 社)にて回収し,Pierce BCA protein assay kit (サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社,マサチューセッツ州ウォルサム,米国)を用いて添付マニュアルに従い測定した総タンパク量及び反応時間で除することで算出した.

### 3.2.9 HDAC 活性測定

HDAC 活性の測定は,Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所,熊本)及びHDAC-Glo™ I/II Assay Kit (プロメガ社,ウィスコンシン州マディソン,米国)を用いて行った.分化後の細胞は,10 µLのWST-8を含む110 µLのCOS mediumにて37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で60分間インキュベートした.インキュベート後,各ウェルから上清を55 µL採取し,Multiskan FC (サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社)を用いて450 nmの吸光度を測定した.培養皿に接着している細胞は,残存している培地を吸引除去し,2回洗浄を行った後に100 µLの2 mM VPAを含むもしくは含まないウィリアム培地E(フェノールレッド不含)にて37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で30分間インキュベートした.インキュベート後,100 µLのHDAC-Glo™ I/II Assay Reagentを添加し,室温にて15分インキュベートした.インキュベート後,白色ボトム96ウェルプレートに各ウェルから上清を100 µL採取し,GloMAX-Multi+ (プロメガ社)を用いて0.5秒間の化学発光量を測定した.HDAC活性はHDAC-Glo™ I/II Assay Kitを用いて得られた化学発光量をCell Counting Kit-8を用いて得られた吸光度で除することにより算出した.

### 3.2.10 統計学的解析

有意差の検定はStudent's *t*-testを用いて行った.

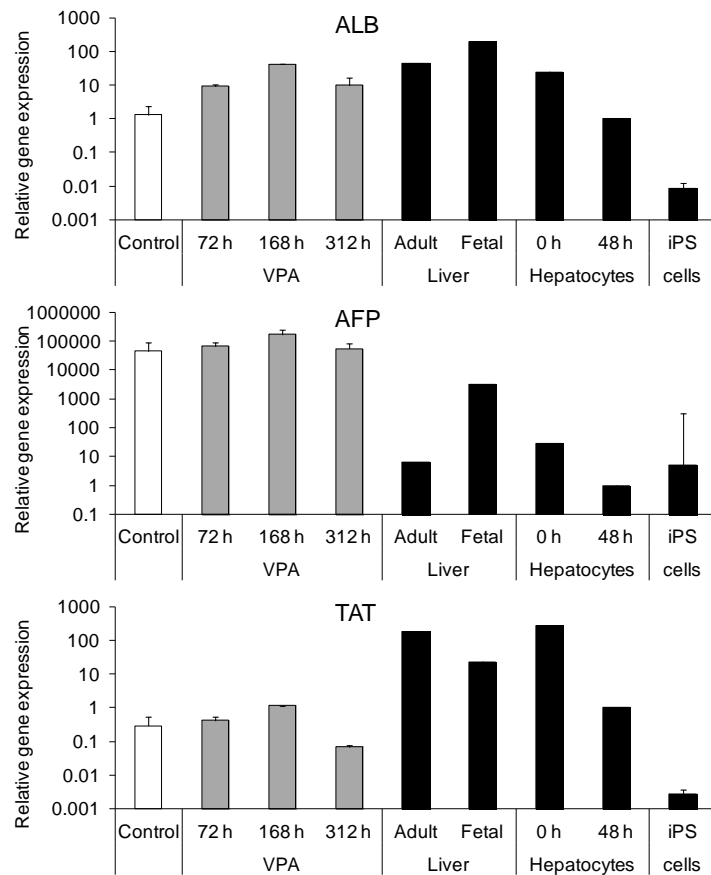
### 3.3 結果

#### 3.3.1 VPA を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

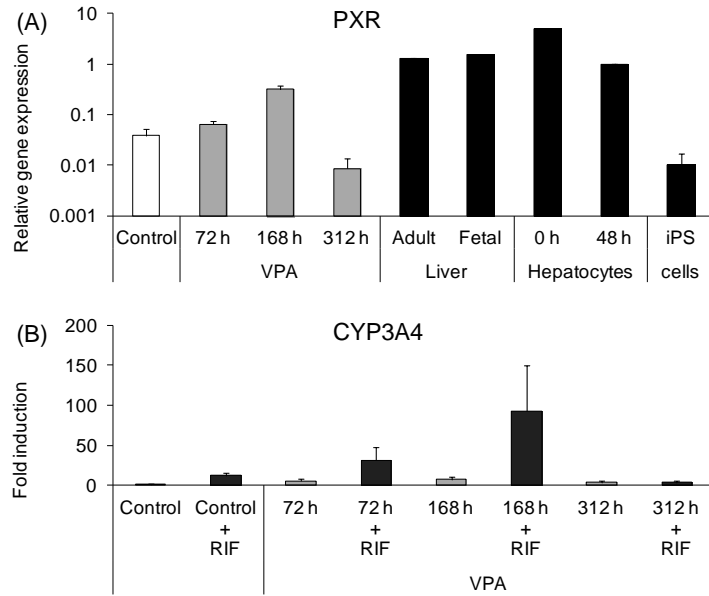
まず初めに、VPA の添加時期について検討を行った。VPA を分化後 18 日目から 72 時間添加すると、ALB では約 7 倍、チロシンアミノ基転移酵素 (TAT) で約 1.5 倍、PXR では約 1.7 倍の mRNA 発現の増加が認められた (Figs. 3-2 and 3-3A)。また、VPA を分化後 12 日目から 168 時間添加すると、分化後の細胞において ALB では約 32 倍、TAT では約 4 倍、PXR では約 5 倍の mRNA 発現の増加が認められた。一方で、VPA を分化後 12 日目から 312 時間添加すると、ALB の mRNA 発現は約 8 倍に増加したものの、TAT では約 1/4、PXR で約 1/5 に mRNA 発現は低下した。CYP3A4 については、VPA を 72 時間添加することにより約 6 倍、168 時間添加することにより約 8 倍の mRNA 発現の増加が認められた。さらに、CYP3A の誘導剤である RIF の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 の発現が誘導された (Fig. 3-3B)。しかし、VPA を 312 時間添加した群では RIF で CYP3A の誘導は認められなかった。

#### 3.3.2 ALB 免疫蛍光染色

VPA を 168 時間処理して分化させた肝細胞様細胞はほとんど全てが ALB 免疫蛍光染色で陽性を示した (Fig. 3-4)。一方で、未分化のヒト iPS 細胞は同条件下で染色した結果、陽性像は認められなかった。

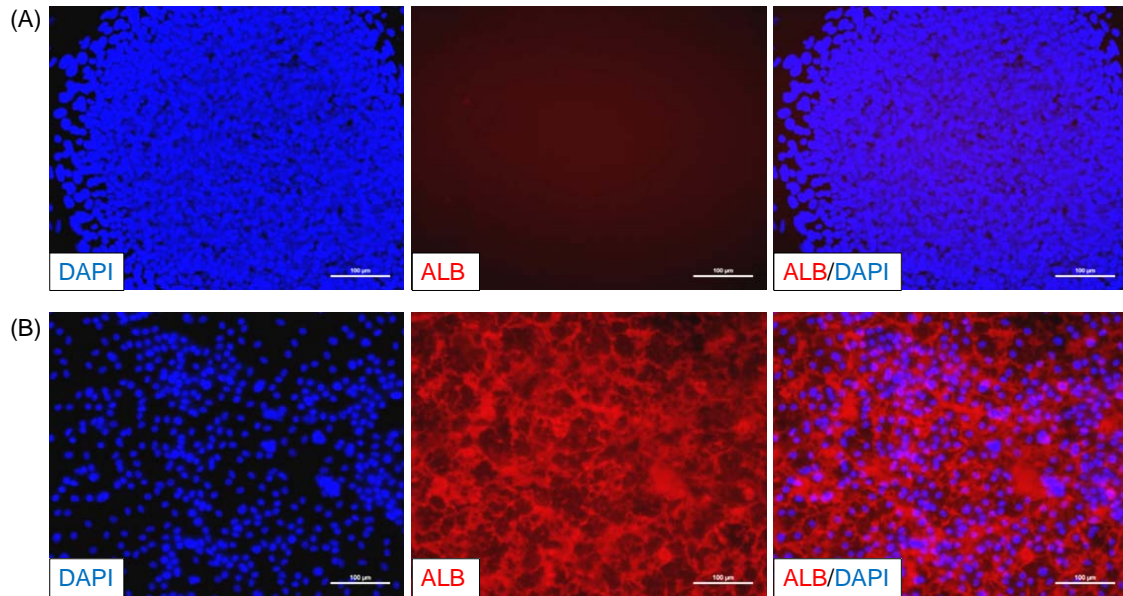


**Figure 3-2.** *Effects of VPA on ALB, AFP, and TAT mRNA expressions in hepatocyte-like cells*  
 Cells were treated with 2 mM VPA for 72 h from day 18 (72 h), 168 h from day 12 (168 h), or 312 h from day 12 (312 h). ALB, AFP, and TAT mRNA expressions were analyzed by real-time RT-PCR. Adult liver, fetal liver, and cryopreserved human hepatocytes were cultured for 0 (just after thawing) and 48 h, and undifferentiated human iPS cells (shown as closed columns) were used as positive and negative controls, respectively. Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents gene expression relative to those in human hepatocytes cultured for 48 h.



**Figure 3-3.** *PXR mRNA expression and effects of rifampicin on CYP3A4 mRNA expression in differentiated VPA-treated hepatocyte-like cells*

(A) Cells were treated with 2 mM VPA for 72 h from day 18 (72 h), 168 h from day 12 (168 h), or 312 h from day 12 (312 h). PXR mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR. Adult liver, fetal liver, and cryopreserved human hepatocytes were cultured for 0 (just after thawing) and 48 h, and undifferentiated human iPS cells (shown as closed column) were used as positive and negative controls, respectively. Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents gene expression relative to that in human hepatocytes cultured for 48 h. (B) Cells were treated with 2 mM VPA for 72 h from day 18 (72 h), 168 h from day 12 (168 h), or 312 h from day 12 (312 h). Hepatocyte-like cells were treated 40  $\mu$ M RIF for 48 h. CYP3A4 mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR. Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 2-3$ ). Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents gene expression relative to that in control cells.



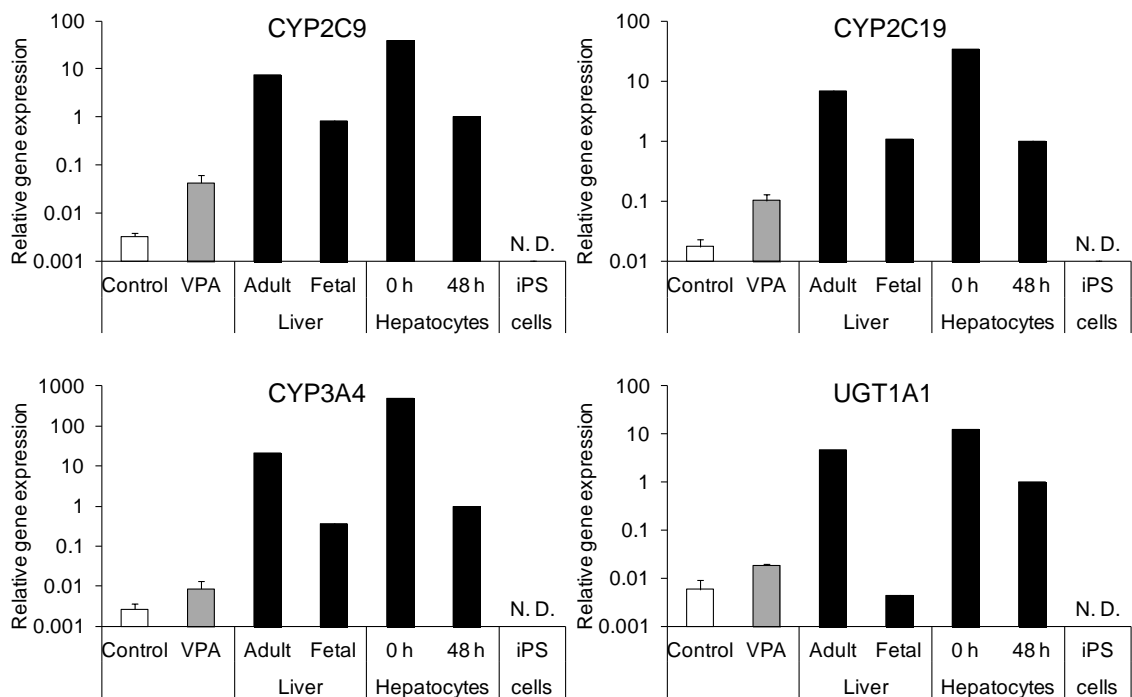
**Figure 3-4. Immunofluorescence staining of ALB**

(A) Undifferentiated human iPS cells and (B) differentiated hepatocyte-like cells were treated with 2 mM VPA for 168 h from day 12 and incubated with anti-ALB antibody, followed by incubation with the Alexa Fluor 568-labeled secondary antibody (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

### 3.3.3 ヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物代謝酵素の発現及び活性

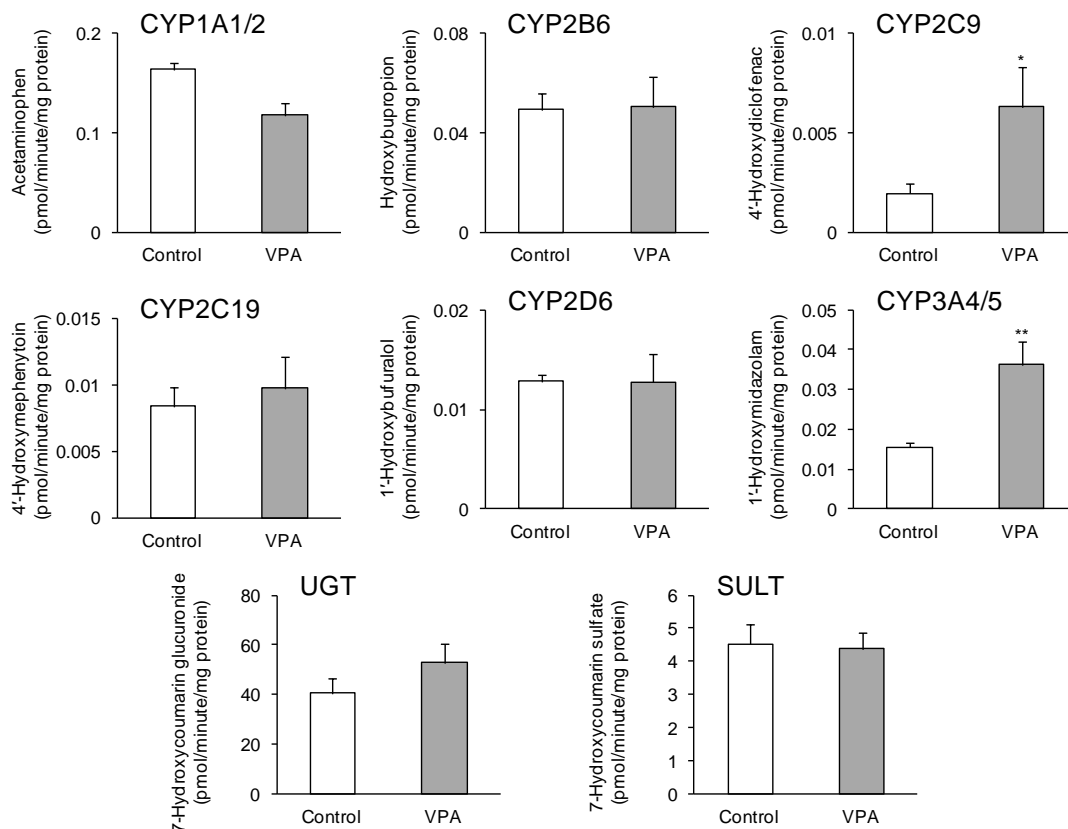
VPA を分化開始後 12 日目から 168 時間処理することで、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化が促進されたことが考えられたため、以降はこの条件下で分化させたヒト iPS 細胞の薬物代謝酵素の発現および機能について検討した。25 日間の分化後、分化させた細胞では主要な薬物代謝酵素の発現が認められ、なかでも CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 及び UGT1A1 の mRNA 発現量は VPA の添加により増加した (Fig. 3-5)。また、これらの細胞を各種薬物代謝酵素のプローブ薬物を基質として培地に添加し、上清に生成される代謝物を測定したところ、CYP1A1/2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5, 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有意に上昇した (Fig. 3-6)。





**Figure 3-5.** Effects of VPA on *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, and *UGT1A1* mRNA expressions in hepatocyte-like cells

Differentiated human iPS cells were treated with 2 mM VPA for 168 h from day 12. *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, and *UGT1A1* mRNA expressions were analyzed by real-time RT-PCR. Adult liver, fetal liver, and cryopreserved human hepatocytes were cultured for 0 (just after thawing) and 48 h, and undifferentiated human iPS cells (shown as closed column) were used as positive and negative controls, respectively. Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents gene expression relative to that in human hepatocytes cultured for 48 h; N.D., not detected.



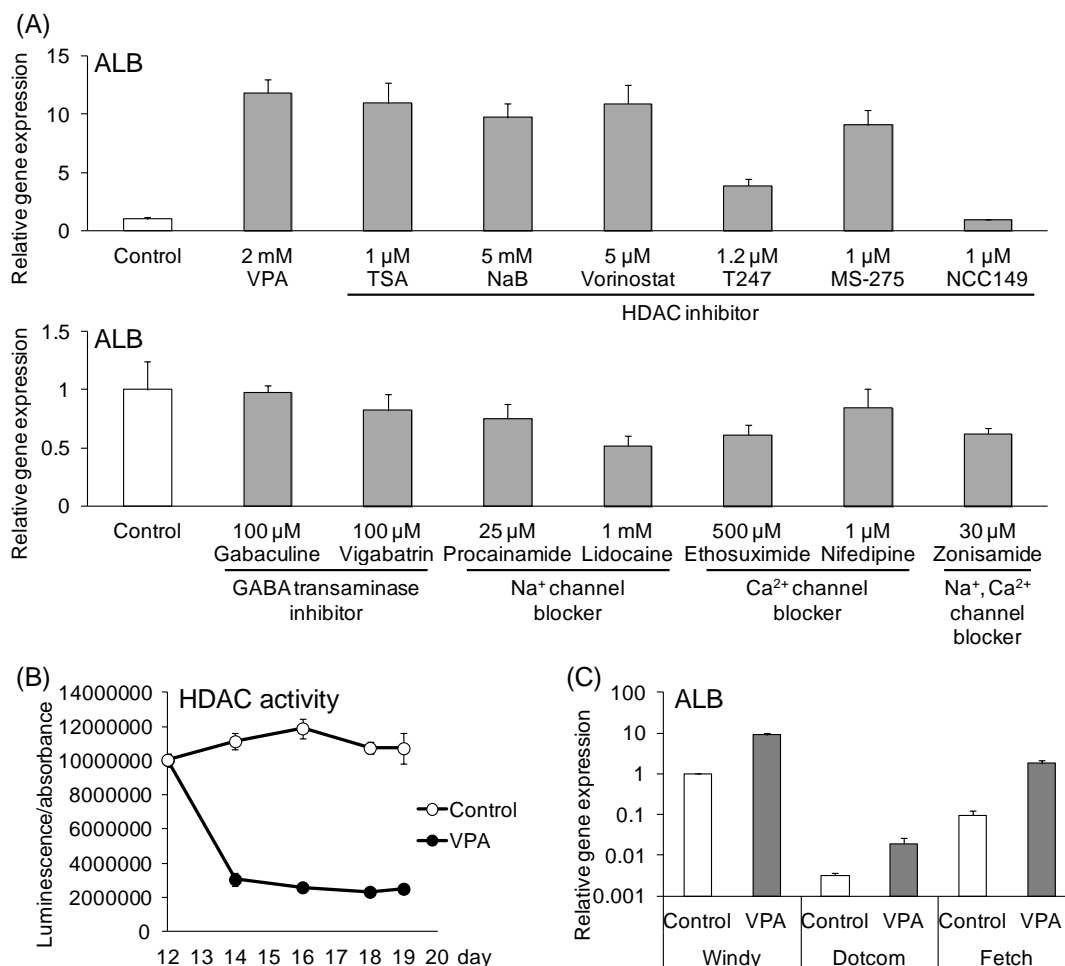
**Figure 3-6.** Drug-metabolizing enzyme activities in hepatocyte-like cells differentiated from human *iPS* cells with and without VPA

Hepatocyte-like cells were incubated at 37°C in COS medium containing specific substrates of drug-metabolizing enzymes for 6 h (CYP1A1/2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5, UGT and SULT) or 24 h (for CYP2C19). Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values were normalized to total protein amounts and incubation times. Levels of statistical significance compared with control; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

### 3.3.4 ヒト *iPS* 細胞から肝細胞への分化に対する HDAC 阻害剤の効果

VPA は、GABA トランスアミナーゼ阻害作用、HDAC 阻害作用および  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{K}^+$  チャネル遮断作用を含む様々な作用を持っている。このように、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を用いて検討した。GABA トランスアミナーゼ阻害剤（ギャバクリン及びピガバトリン）、 $\text{Na}^+$ チャネル遮断薬（プロカインアミドおよびリドカイン）、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬（エトスクシミド及びニフェジピン）、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬（ゾニサミド）を分化後 12 日目から 168 時間処理しても ALB の mRNA 発現量に大きな変化は認められなかった (Fig. 3-7A)。一方で、各種 HDAC 阻害剤 (TSA, NaB, ボリノスタット, T247 及び MS-275) を分化後 12 日目から 168 時間処理することで、ALB の mRNA の発現量は増加した (Fig. 3-7A)。また、分化した細胞は HDAC 活性を有しており、VPA を添加すること

で、その活性は顕著に抑制された (Fig. 3-7B). さらに、複数のヒト iPS 細胞株を用いて、これらに対する VPA の効果を検討したところ、VPA を分化後 12 日目から 168 時間処理することですべての細胞株において ALB の mRNA 発現量は増加した (Fig. 3-7C).



**Figure 3-7.** Effects of small-molecule compounds on the differentiation of human iPS cells into hepatocytes

(A) Real-time RT-PCR analysis of ALB mRNA expression in hepatocyte-like cells; the GABA transaminase inhibitors gabaculine or vigabatrin, the Na<sup>+</sup> channel blockers procainamide or lidocaine, the Ca<sup>2+</sup> channel blockers ethosuximide or nifedipine, the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> channel blocker zonisamide, and the HDAC inhibitors TSA, NaB, vorinostat, T247, or MS-275 were added for 168 h from day 12. Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents gene expression relative to that in untreated hepatocyte-like cells (shown as open columns). (B) Time-dependent changes in HDAC activity in differentiating human iPS cells. Cells were treated with 2 mM VPA for 168 h from day 12. Symbols represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 4$ ). Values were normalized to absorbance values from Cell Counting Kit-8 assays. (C) Real-time RT-PCR analysis of ALB mRNA expression in VPA treated hepatocyte-like cells that were derived from multiple human iPS cell lines. Cells were treated with 2 mM VPA for 168 h from day 12. Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents gene expression relative to that in hepatocyte-like cells that were derived from Windy without VPA.

### 3.4 考察

本研究においてヒト iPS 細胞から分化した肝細胞様細胞は肝細胞マーカーを発現し、肝細胞の形態学的特徴である多核の形態を示した。また、これらの細胞は肝細胞の主要な機能の一つである薬物代謝酵素活性も示した。これらの結果は、ヒト iPS 細胞が機能的な肝細胞様細胞へ分化したことを示唆するものである。また、VPA の添加によってヒト iPS 細胞から分化した肝細胞様細胞は、VPA の添加時間に応じて異なる分化のパターンを示した。ALB や PXR, TAT の mRNA 発現量は、VPA を 72 時間および 168 時間添加することで増加した。このことから、VPA はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進することが示唆された。しかしながら、VPA を 312 時間添加した群では、168 時間添加した群と比較して ALB, AFP, TAT および PXR の mRNA 発現量は低かった。また、VPA を 312 時間添加した群では、脈管様の構造が分化した培養皿内に認められた。これらの細胞は血管内皮細胞マーカー遺伝子である Fms 様チロシンキナーゼ (FLT) 1 およびリンパ管内皮細胞マーカー遺伝子 FLT4 を発現していた (data not shown)。また、RIF による CYP3A4 の誘導能も VPA の処理時間に依存して異なっていた。RIF は PXR のリガンドであるため、この誘導能の違いは PXR 発現量の違いによって引き起こされたと考えられた。実際に、PXR の発現量は VPA を 312 時間添加した群において低かった。これらの結果から、VPA の添加時期および期間がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進するために重要であることが示唆され、VPA の添加時期は分化後 12 日目から 168 時間の処理が最も適していることが明らかとなった。

肝臓は、薬物代謝に重要な役割を果たしている臓器である。薬物代謝の第一相酵素であり、様々なアイソフォームを有する CYP のほとんどは肝臓に存在する<sup>64)</sup>。このうち、ミダゾラム 4'-水酸化およびテストステロン 6 $\beta$ -水酸化反応を触媒する CYP3A4 は、肝臓の発達に応じて発現し<sup>6)</sup>、最終的にヒト成人肝臓の総 CYP のうち約 30% を占める<sup>7,8)</sup>。本研究で分化誘導した細胞は CYP3A をはじめとして、肝臓に発現する様々な薬物代謝酵素活性を有していたことから、ヒト iPS 細胞が機能的な肝細胞様細胞に分化したことが示唆された。また、VPA の添加によって CYP2C9 及び CYP3A4/5 の薬物代謝酵素活性は有意に増加した。

ALB はヒト血清中に存在する主要なタンパク質であり、肝臓で合成される。したがって、ALB 発現は肝細胞への分化の指標であると考えられる。ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞は ALB の mRNA を発現し、その発現量は VPA の添加によって増加した。また、免疫蛍光染色により、VPA を添加した細胞はそのほとんど全てが ALB タンパク質を発現していた。加えて、VPA の分化促進効果は複数のヒト iPS 細胞株において認められたことから、VPA はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に有用であることが明らかとなった。

VPA は GABA トランスアミナーゼ阻害作用やイオンチャネル遮断作用、HDAC 阻害作用など、様々な薬理作用を有する低分子化合物である。VPA の持つどの作用がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進効果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 ALB の mRNA 発現の増加が認められた。実際に、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞は HDAC 活性を示し、VPA はその活性を阻害した。以上のことから、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に対する VPA の分化促進作用は、HDAC 阻害作用に依存することが示唆された。

HDAC には、様々なアイソフォームがあることが知られている<sup>60)</sup>。HDAC3 の選択的阻害剤である T247 の分化促進効果は、他の HDAC 阻害剤と比較すると低かった。また、HDAC8 選択的阻害剤である NCC149 は肝細胞の分化成熟に影響を与えなかった。ヒト iPS 細胞から肝細胞への高い分化促進効果を示した VPA、NaB、TSA、ボリノスタット及び MS-275 はクラス I HDAC に分類される HDAC1、2 及び 3<sup>65)</sup>等を阻害する。言い換えれば、HDAC1 及び HDAC2 を阻害することで、ヒト iPS 細胞から分化した肝細胞様細胞の分化成熟が促進される可能性がある。以前の報告によると、HDAC 阻害剤は、細胞の増殖および分化に関与する転写因子の DNA への結合に影響を与えることが報告されている<sup>66)</sup>。HDAC の阻害が肝細胞の分化を促進する詳細なメカニズムは明らかとなっていないが、DMSO で肝への分化が方向づけられた肝前駆細胞において、肝分化に関与する遺伝子の発現が HDAC の阻害によって増加する可能性が考えられる。

Dong らはヒト BMSS 細胞を VPA で前処理することにより肝細胞様細胞への分化が促進したことを報告した<sup>62)</sup>。これは、未分化状態の細胞を処理することで、目的の細胞への分化を方向づけたと考えられた。また、未分化のマウス ES 細胞は、未分化状態を維持するための白血病阻害因子を除去し、VPA を添加することで肝細胞への分化を開始した<sup>63)</sup>。分化した細胞は肝細胞マーカーを発現し、CYP による 7-エトキシレゾルフィン O-脱アルキル化活性を示した。Yamashita らは HDAC 阻害剤の一つである TSA は、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞の細胞増殖を抑制し、細胞周期を調節することによって分化成熟を促進したことを報告した<sup>67)</sup>。これらの報告は、VPA 及び TSA の細胞周期停止効果もしくは HDAC 阻害効果がこれらの細胞の肝細胞分化を促進したと述べている。しかしながら、VPA 及び TSA の効果が化合物特異的または非特異的であるかを明らかにしなかった。さらに、HDAC 阻害剤がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化成熟過程に与える影響も明らかとなっていない。今回の知見は、ヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞への分化に与える VPA の新たな効果を明ら

かにした。ヒト iPS 細胞から分化させた肝前駆細胞から肝細胞への分化は、VPA の添加期間に依存して影響を受けること、VPA の分化促進効果は複数の iPS 細胞株で認められたこと、VPA の有する HDAC 阻害作用がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化成熟を促進したことが明らかとなった。

### 3.5 小括

低分子化合物である VPA は，ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進し，HDAC 阻害効果が分化促進に寄与していることを証明した．ヒト iPS 細胞から分化した細胞は，薬物代謝酵素の誘導及び活性を示す機能的なヒト肝細胞様細胞であることが明らかとなった．

## 第四章 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

### 4.1 緒言

現在ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法がいくつか報告されているものの、ヒト iPS 細胞から肝細胞を高効率及び高純度で得るためには、非常に高額な費用がかかり、複雑な工程が必要となっている。また、ヒト iPS 細胞は多能性を有しているため、肝細胞への分化誘導後、肝細胞以外の細胞に分化した細胞が存在することが考えられる。

細胞は様々な代謝経路を有し、必要な栄養素を自ら合成する能力が存在する。Tohyama らは乳酸を豊富に含み、グルコースを含まない培地で培養することで、ヒト多能性幹細胞から分化した心筋細胞のみが生存することを見出した<sup>68)</sup>。この方法を用いて、移植後に腫瘍を形成しない心筋細胞が 99%以上の純度で得られた。一方で、肝細胞には糖代謝、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。したがって、肝細胞はこれらの経路で代謝されてエネルギー源として利用可能な栄養素を含む培地中で生存することができると考えられる。糖代謝では、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) が、アミノ酸代謝ではフェニルアラニンをチロシンに変換するために必要なフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) が、また尿素回路ではオルニチンからアルギニンを生合成する経路に関与する酵素であるオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) が肝細胞特異的に発現している<sup>69-72)</sup>。グルコースは細胞のエネルギー源として必要不可欠の栄養素である。チロシンはアセト酢酸およびフマル酸に分解され、エネルギー供給のためにクエン酸回路で利用される。また、チロシンはタンパク質を合成する材料として必要であり、タンパク質内でチロシンキナーゼによりリン酸化され、多くの細胞機能におけるシグナル伝達の調節に寄与する。アルギニンは生体内で毒性を示すアンモニアの除去や細胞分裂、創傷の治癒に重要な役割を果たしている。このように肝細胞はグルコース、チロシン及びアルギニン合成能を有しているため、培地中にガラクトース、フェニルアラニン及びオルニチンが存在していれば、これらから必要な栄養素を合成し、利用することが可能である。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。

Tomizawa らはマウス ES 細胞から分化させた肝芽細胞様細胞をガラクトースとオルニチンを含み、グルコースとアルギニンを含まない培地で培養することにより高純度で得られ



ることを報告している<sup>73)</sup>。また、同様の培地は移植時の腫瘍形成のリスクを示す未分化のヒト iPS 細胞を除去するのにも有用であることが報告されている<sup>74)</sup>。しかし、ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞を選択的に培養する方法については報告が無い。そこで本研究では、これらの栄養代謝経路に焦点を当て、肝細胞特異的な栄養代謝酵素で代謝され肝細胞のみが利用可能な栄養素を含む培地を用いて、ヒト iPS 細胞から分化させた肝細胞の選択的培養法の確立を試みた。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 試薬及び細胞

アクチビン A, HGF はペプロテック社より, FBS はバイオウエスト社より, アクターゼはエムエステクノシステムズ社より, DMEM, DMEM/F12, L-Glu, OSM, DEX, Y-27632, グルコース溶液, ガラクトースは和光純薬工業社より, Matrigel は BD バイオサイエンス社より, ウィリアム培地 E, DMSO はシグマアルドリッチ社より, マウスモノクローナル抗ヒト ALB 抗体はアブカム社より, KSR, KO-DMEM, RPMI 培地 (グルタマックス含有), Alexa Fluor<sup>®</sup>568 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体はインビトロジェン社より, ヒト胎児正常肝臓総 RNA (38 週齢男性由来), ヒト成人正常肝臓総 RNA (64 歳男性由来), ヒト成人正常混合肝臓総 RNA (20~64 歳 5 個体由来) はバイオチェーン社より, 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) は同仁化学研究所より, COS medium はコスモバイオ社より, 凍結ヒト肝細胞 (lot. HPCH10/0910463; 32~76 歳 10 個体混合肝) はゼノテック社 (Lenexa, KS) より, HFL-III 細胞 (Cell No: RCB0523), HepG2 細胞 (Cell No: RCB1886) は理化学研究所バイオリソースセンターより, ヒト胎児肝 (hFL) 細胞 (平均 13 週齢 6 個体混合肝) はアプライドセルバイオロジー社 (ワシントン州カークランド, 米国) より購入して用いた. ガラクトース, チロシン, アルギニン, 血清, ピルビン酸を含まない L-15 特注培地 E はコスモバイオ社よりご供与頂いた. その他の試薬は全て市販の高速液体クロマトグラフ用もしくは特級品を用いた.

### 4.2.2 肝細胞選択培地

肝細胞を選択的に培養するための変法 L-15 培地は, L-15 特注培地 E にガラクトース (100, 200, 450 もしくは 900 mg/L) 及び FBS (1, 2, 5 もしくは 10%) もしくは 10% KSR を添加して作製した. 変法 L-15 培地に対するコントロール培地としての L-15 コントロール培地は, L-15 特注培地 E に 900 mg/L グルコース, 300 mg/L チロシン, 500 mg/L アルギニン及び 10% FBS もしくは 10% KSR を添加して作製した.

### 4.2.3 細胞培養

ヒト iPS 細胞株 (Windy) 及び凍結ヒト肝細胞の培養は 1.2.2 及び 2.2.2 で述べた方法と同様にして行った. ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞及びヒト胎児肺由来線維芽細胞である HFL-III 細胞は, 10% FBS, 2 mM L-Glu を含む DMEM を用いて培養した. ヒト胎児肝細胞である hFL 細胞は 10% FBS, 2 mM L-Glu を含むウィリアム培地 E を用いて培養した.

#### 4.2.4 ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化は、ヒト iPS 細胞未分化コロニーの占める割合が培養皿に対し約 70%になった状態で開始した。0.5% FBS, 100 ng/mL アクチビン A を含む RPMI 培地（グルタマックス含有）で 3 日間, 2% KSR, 100 ng/mL アクチビン A を含む RPMI 培地（グルタマックス含有）で 2 日間培養することで内胚葉に分化させた。その後、細胞はアクターゼを用いて 5 分間処理することにより剥離し、あらかじめヒト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した Matrigel にてコーティングしたプレートに播種した。尚、Y-27632 は剥離前 1 時間及び播種後 24 時間, 10  $\mu$ M となるように培地に添加した。細胞播種後, 20% KSR, 1% グルタマックス, 1% MEM NEAA, 0.1 mM 2-ME, 1% DMSO を含む KO-DMEM で 7 日間培養することで肝芽細胞に分化させた。最後に, 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, 100 nM DEX を含む COS medium で 10 日間, COS medium のみで 3 日間培養することで肝細胞へ分化させた。本章では, この方法を従来法として定義した。L-15 コントロール培地及び変法 L-15 培地は, 肝細胞への分化過程の際に上述した培地に代えて用いた。その際に, DMSO, HGF, OSM 及び DEX は従来法と同じ期間で L-15 コントロール培地及び変法 L-15 培地に添加した。

#### 4.2.5 RNA 抽出及び逆転写反応

総 RNA はヒト iPS 細胞の分化誘導終了後, RNeasy Mini Kit の添付マニュアルに従い抽出した。cDNA の合成は, PrimeScript RT Reagent Kit を使用し 0.5  $\mu$ g の総 RNA から添付マニュアルに従い行った。

#### 4.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析

PCR プライマーは, Table 4-1 に示したものをを用いた。リアルタイム RT-PCR の反応混合液は SYBR Premix Ex Taq II を用い, 反応はアプライドバイオシステムズ 7300 リアルタイム PCR システムを用いて行った。結果は内在性コントロールとして GAPDH を用いて補正した。

**Table 4-1.** Sequences of primers for real-time RT-PCR analysis

Gene names	Forward primer sequences (5'-...-3')	Reverse primer sequences (5'-...-3')
ALB	GAGCTTTTTGAGCAGCTTGG	GGTTCAGGACCACGGATAGA
AFP	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	TCTGCAATGACAGCCTCAAG
TAT	ATCTCTGTTATGGGGCGTTG	TGATGACCACTCGGATGAAA
PXR	AGGATGGCAGTGTCTGGAAC	AGGGAGATCTGGTCCTCGAT
GALK1	AAGTGGCCACGTACACCTTC	GATGAACTGGTCCATGATGC
PAH	TGTCCATGAGCTTTCACGAG	TTAAAACCAGGGTGGTCAGC
OTC	AACAGGCTTTCGACTTCTGG	TCGAGCCAATACTGCATCTG
ASS1	TGAAGGTGACCAACGTCAAG	TCTCCACGATGTCAATACGG
ASL	GCACCAAGGAATTCAGCTTC	CTGTCGGGGTTTTTCTTCTG
CYP3A4	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
CYP3A5	CTCTCTGTTTCCAAAAGATACC	TGAAGATTATTGACTGGGCTG
CYP3A7	AGATTTAATCCATTAGATCCATTCG	AGGCGACCTTCTTTTATCTG
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

#### 4.2.7 MTT アッセイ

HepG2 細胞, HFL-III 細胞及び hFL 細胞は DMEM もしくはウィリアム培地 E を基礎培地とする培養用培地を用いて細胞培養用 96 ウェルプレートに細胞数が  $2.0 \times 10^4$  cells/well になるように播種した。24 時間培養後, 培地を各細胞株の培養用培地, L-15 コントロール培地もしくは変法 L-15 培地に変更し, 合計 7 日間培養を行った。細胞生存率は播種後 3 日間もしくは 7 日間培養した後, MTT を用いて測定した。MTT は最終濃度が  $500 \mu\text{g/mL}$  となるように培地に添加し,  $37^\circ\text{C}$  にて 4 時間インキュベートすることで呈色反応を行った。培地を除去後, 析出したホルマザンを DMSO により溶解した後, Multiskan FC を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

#### 4.2.8 ALB 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色に用いる細胞は Matrigel でコートしたカバーガラス上で培養した。培養後の細胞を氷冷した 4% パラホルムアルデヒドを用いて室温にて 10 分間固定処理し,  $-20^\circ\text{C}$  に

予冷したメタノールを用いて $-20^{\circ}\text{C}$ にて5分間膜透過処理を行い、2% スキムミルクを用いて室温にて20分間ブロッキング処理を行った。その後、一次抗体はマウスモノクローナル抗ヒトALB抗体(1:200)を用いて $4^{\circ}\text{C}$ にて一晩、二次抗体はAlexa Fluor<sup>®</sup>568 標識ヤギ抗マウスIgG抗体(1:500)を用いて遮光下室温にて60分間反応させた。核染色は $0.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$  DAPIを遮光下室温にて5分間処理することで行った。染色後の細胞は、ECLIPSE Ni microscopeにて観察した。

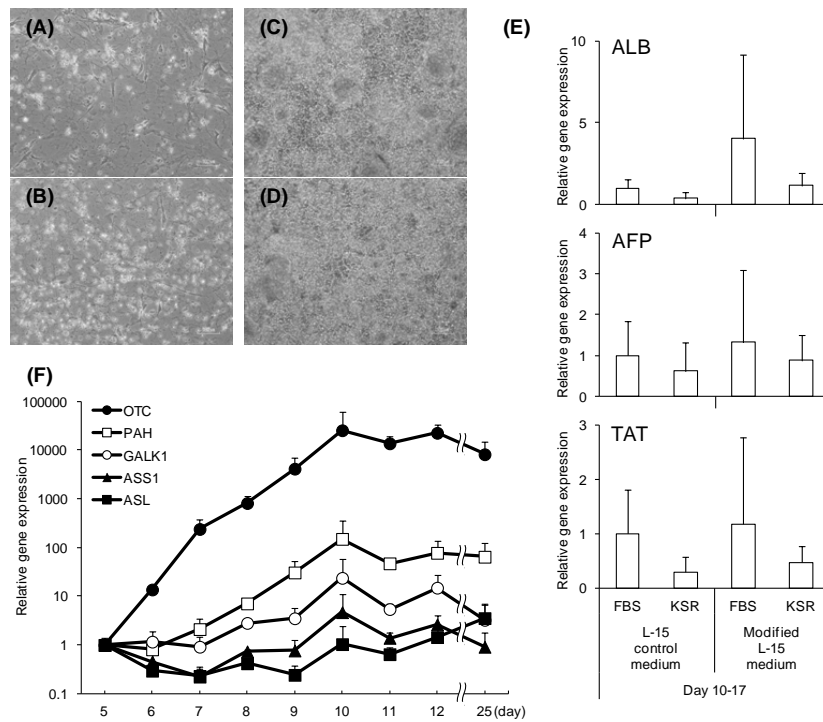
### 4.3 結果

#### 4.3.1 変法 L-15 培地の効果及び肝特異的栄養代謝酵素の発現

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化において、分化後 5 日目から変法 L-15 培地を用いた群では分化後 8 日目の時点でほとんどの細胞が死滅したのに対し、分化後 10 日目から変法 L-15 培地を用いて 7 日間培養した群では細胞の生存が認められた (Figs. 4-1A–4-1D). この細胞は肝細胞マーカーである ALB, AFP や TAT を発現していた (Fig. 4-1E). これらの発現量は血清として FBS を用いた群で KSR を用いた群よりも高かった. また, 変法 L-15 培地を用いて培養することで ALB の mRNA 発現量の増加が認められた. 変法 L-15 培地による選択培養時期を詳細に設定するために, 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. GALK1 及び PAH の発現量は分化後 10 日目まで経時的に上昇した (Fig. 4). 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合成するアルギニノコハク酸合成酵素 (ASS1) 及びアルギニノコハク酸分解酵素 (ASL) の発現量には大きな変化は認められなかったものの, OTC の発現量は分化後 10 日目まで経時的に上昇した. (Fig. 4-1F)

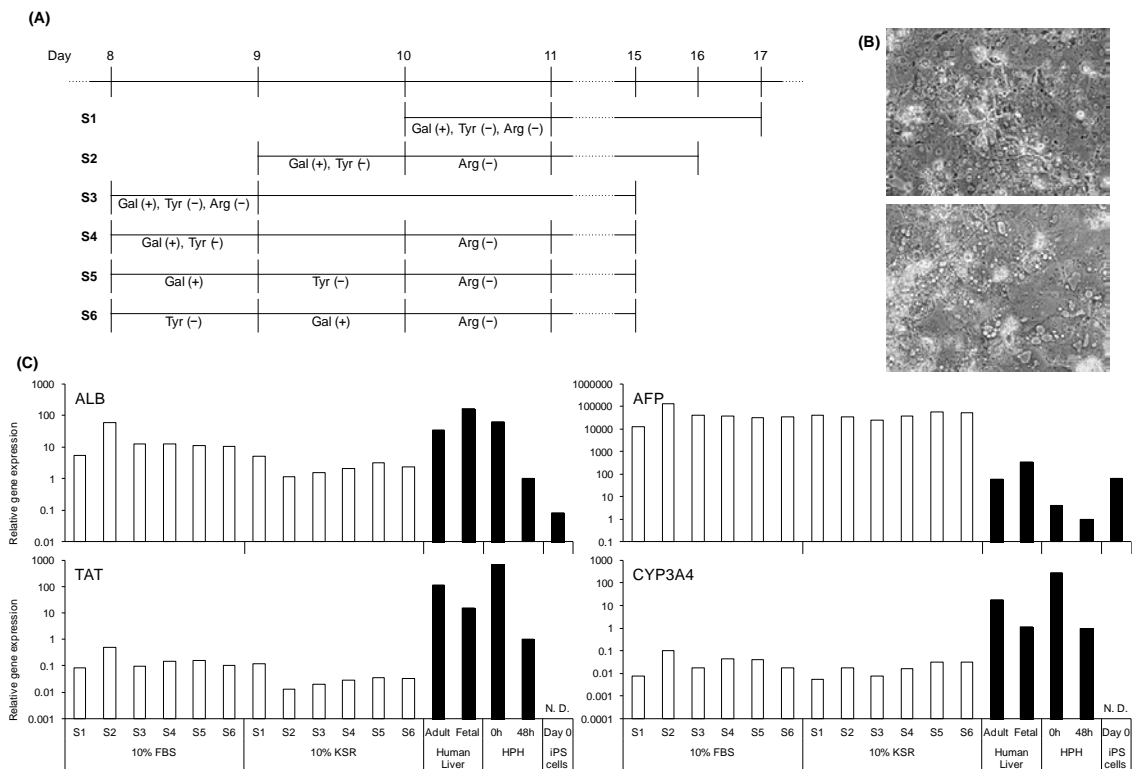
#### 4.3.2 変法 L-15 培地による培養時期及び栄養素の添加・除去時期の検討

肝特異的栄養代謝酵素の発現量を経時的変化の結果を基に, 栄養素の添加・除去時期及び変法 L-15 培地の使用時期を全 6 群に分け (Fig. 4-2A), さらに用いる血清を FBS もしくは KSR とする群に分けて肝細胞への分化誘導を行った. その結果, 形態学的には分化後 20 日目から多くの細胞で肝細胞に特徴的な多核細胞が観察され, これら多核細胞の数は KSR 群より FBS 群で多く認められた (Fig. 4-2B). 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 (S2) において最も発現量が高かった (Fig. 4-2C).



**Figure 4-1. Morphologic changes and mRNA expression in differentiated hiPSCs**

(A–D) Morphologic changes in differentiated hiPSCs on Days 12 (A, B) and 24 (C, D). hiPSCs were differentiated using modified L-15 medium containing 900 mg/L galactose, and either 10% FBS (A, C) or 10% KSR (B, D) from Days 5–12 (A, B) or Days 10–17 (C, D). (E) hiPSCs were cultured in L-15 control medium or modified L-15 medium from Days 10–17. L-15 control medium contained 900 mg/L glucose and either 10% FBS or 10% KSR. Modified L-15 medium contained 900 mg/L galactose and either 10% FBS or 10% KSR. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). The values represent the relative gene expression level when the level in the group of differentiated hiPSCs using L-15 control medium containing FBS from Days 10–17 were taken as 1. (F) Differentiated cells were analyzed for time-dependent changes in the mRNA expression of enzymes that participate in liver-specific nutrient-metabolizing pathways. hiPSCs were differentiated using the conventional method. Each symbol represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ , except for a part of OTC expression). The values represent the relative gene expression level when the level in the group of differentiated hiPSCs at Day 5 was taken as 1. Abbreviations: N.D., not detected.



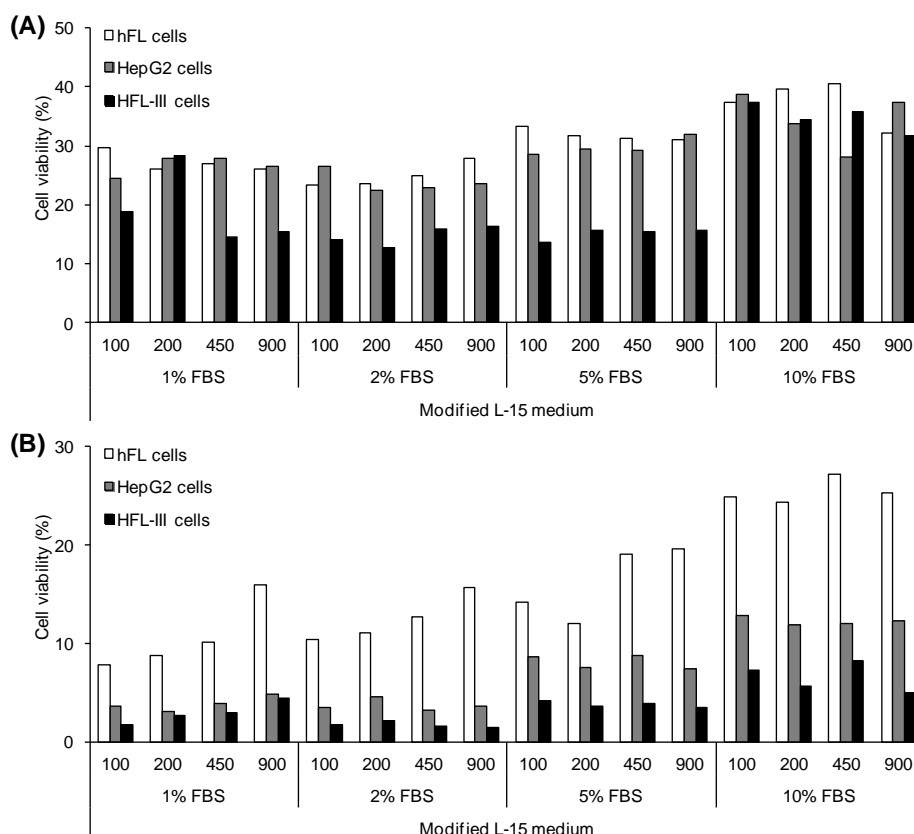
**Figure 4-2. Effects of an additional nutrient period on hepatic differentiation**  
 (A) Schematic of the protocol for the differentiation of hiPSCs into hepatocytes. The scheme shows the culture period using modified L-15 medium. (B) Morphologic changes in the differentiated hepatocyte-like cells using modified L-15 medium containing either 10% FBS (upper) or 10% KSR (lower) in the S2 group. (C) mRNA expression of hepatic marker genes. hiPSCs were cultured in modified L-15 medium containing 900 mg/L galactose, and either 10% FBS or 10% KSR, as shown in Fig. 2A. Each bar represents the mean ( $n = 2$ ). The values represent the relative gene expression level when the level in HPH cultured for 48 h was taken as 1. Abbreviations: N.D., not detected; Gal, galactose; Tyr, tyrosine; Arg, arginine.

#### 4.3.3 ガラクトース及びFBS濃度の検討

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 培地中には血清由来のグルコースが約 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ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞、ヒト胎児肝細胞である hFL 細胞及びヒト胎児肺線維芽細胞である HFL-III 細胞を用いて検討を行った。変法 L-15 培地を用いて 3 日間培養したところ、HFL-III 細胞の生存率は HepG2 細胞および HFL 細胞よりも低い傾向が認められたが、約 10~40% の細胞が残存した (Fig. 4-3A)。変法 L-15 培地を用いて 7 日間培養す



ることで、HFL-III細胞の生存率は3日間培養と比較して非常に強く抑制された (Fig. 4-3B)。その結果、細胞間の生存率の差はより顕著となり、hFL細胞で最も高く、次いで HepG2 細胞であり、HFL-III 細胞で最も低かった。また、7日間培養後の各細胞株における細胞増殖は FBS 濃度依存的に減少したが、FBS 濃度が低い場合、hFL 細胞の細胞生存率はガラクトース濃度依存的に減少した。

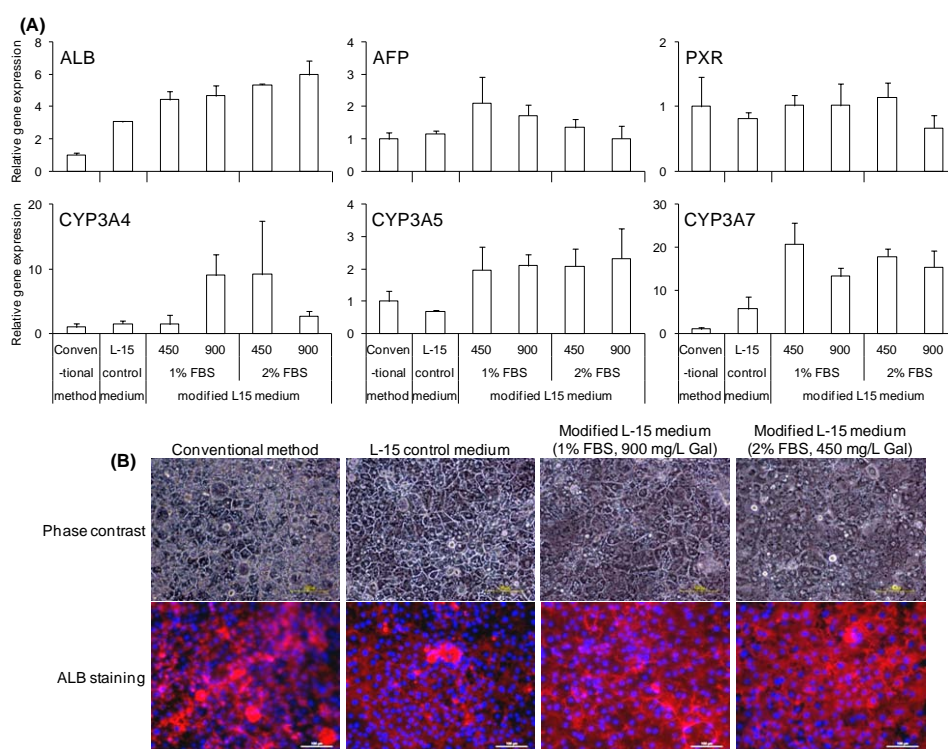


**Figure 4-3.** Growth and survival in hFL, HepG2, and HFL-III cells cultured in modified L-15 medium containing various concentrations of FBS and galactose

Cell viability on Days 3 (A) and 7 (B). hFL, HepG2, and HFL-III cells were seeded with Williams' medium E or DMEM based culture medium. After 24 h of seeding, the medium was changed to a fresh medium: any culture medium, L-15 control medium or modified L-15 medium containing various concentrations of FBS and galactose. MTT assay performed on Days 3 or 7. Cell viability is represented as a ratio to each cell line cultured in L-15 control medium on Days 3 (A) or 7 (B), set at 100%. Each bar represents the mean ( $n = 2$ ). 100, 200, 450, and 900 refer to 100, 200, 450, and 900 mg/L galactose concentrations.

#### 4.3.4 変法 L-15 培地を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

前項の結果から 4 つの条件 (1%もしくは 2% FBS 及び 450 もしくは 900 mg/L ガラクトースを含む組み合わせ) を選択し, 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下でヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化させた. 分化後の細胞は ALB, AFP, PXR, CYP3A4, CYP3A5 及び CYP3A7 遺伝子を発現した (Fig. 4-4A). これらの mRNA 発現量は, L-15 コントロール培地を用いた群と比較して, 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 培地で培養することで両群とも ALB は約 1.6 倍, CYP3A4 は約 6 倍, CYP3A5 は約 3 倍に発現量が上昇した. COS medium のみを用いる従来法と比較すると, 両群の ALB の mRNA 発現量は約 5 倍, CYP3A4 の mRNA 発現量は約 9 倍に増加した. 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, 細胞が単層で多核の形態を示し, ほぼすべての細胞で ALB 陽性像が認められた (Fig. 4-4B).



**Figure 4-4.** Effects of FBS and galactose on differentiated hiPSCs

hiPSCs were differentiated using the conventional method, L-15 control medium, or modified L-15 medium containing FBS (1 or 2%) and galactose (450 or 900 mg/L) from Days 9–16. (A) The expression of hepatic marker genes and drug metabolizing enzymes. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). The values represent the relative gene expression level when the level in the group of differentiated hiPSCs using the conventional method was taken as 1. 450 and 900 refer to 450 and 900 mg/L galactose concentrations. (B) Morphologic changes (upper) and immunofluorescence staining of ALB (lower) in differentiated hiPSCs. The cells were stained with anti-ALB antibody (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

#### 4.4 考察

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を創薬研究および再生医療に応用するためには、分化した肝細胞を選択的に単離する必要がある。肝細胞は、栄養素の代謝や合成に関与する酵素である GALK1, PAH, OTC, ASS1 および ASL を特異的に発現する。そこで本研究では、肝細胞特異的な栄養代謝経路に着目して肝細胞様細胞を容易に選択培養するための方法を検討した。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程で、分化早期に変法 L-15 培地を用いて培養を行うと細胞死が引き起こされた。しかしながら、その数日後から変法 L-15 培地を用いて培養を行うと、細胞の生存が認められた。このことは、分化後 5 日目から分化後 10 日目の間に、肝細胞特異的な栄養代謝酵素が発現することが示唆され、ヒト iPS 細胞から分化した肝細胞様細胞は、肝細胞特異的な代謝経路に関与する栄養素を含む培地で選択的に培養することができる可能性が考えられた。

肝細胞様細胞は GALK1, PAH および OTC を発現し、その発現量は分化後 10 日目まで徐々に増加し、その後プラトーに達した。ASS1 及び ASL の発現量の変化に大きな差は認められなかったものの、分化後 10 日目においてそれらの発現は認められた。そのため、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、GALK1 及び PAH の発現が上昇し始める分化後 8 日目から分化後 10 日目が適していると考えられた。また、オルニチンからアルギニンを生合成する尿素回路を回転させるためには、OTC, ASS1 及び ASL の 3 種類の酵素が機能している必要があるため、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と考えられた。以上の結果を基に、詳細な変法 L-15 培地による適切な培養時期及び栄養素の添加・除去時期を検討したところ、肝細胞マーカー遺伝子および薬物代謝酵素の mRNA 発現量は分化後 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て培養した群において最も高く、また分化に用いる血清としては KSR よりも FBS の方が効果的であることが示唆された。本研究で用いた KSR を 10% 含む変法 L-15 培地中のグルコース含有量は約 10 mg/L と低濃度であることや、KSR はアルギニンを含有しないことから、当初は変法 L-15 培地に用いる血清として KSR が適していると考えられたが、変法 L-15 培地に用いる血清には FBS が適していた理由としては、FBS 中にのみ含まれる増殖因子等の影響が考えられる。

肝細胞はグリコーゲン貯蔵能を有していることから、変法 L-15 培地に含まれるガラクトースを代謝して最終的にグルコースとして細胞外へ放出できる。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 含まれており、ヒト iPS 細胞から分化した肝細胞

胞以外の細胞も、これらのグルコースを利用することができる。そこで、様々な濃度の FBS およびガラクトースを含む変法 L-15 培地を用いて、HepG2 細胞、hFL 細胞及び HFL-III 細胞を用いて培養を行った。HFL-III 細胞は変法 L-15 培地を用いて培養することで細胞増殖および生存が阻害された。このことは、線維芽細胞は変法 L-15 培地中のガラクトース、フェニルアラニンおよびオルニチンをそれぞれグルコース、チロシン、アルギニンに代謝して利用することが出来ず、細胞生存が抑制されたものと考えられた。また、HepG2 細胞は hFL 細胞と比較して細胞増殖および生存が抑制された。その理由として、遺伝子発現を網羅的に解析したシステム生物医学ラボラトリーの遺伝子発現データベースによると、HepG2 細胞における GALK1 の発現がヒト胎児肝と比較して特に低く、また PAH や OTC の発現も低いことから、HepG2 細胞は変法 L-15 培地中に含まれる栄養素を代謝し、利用できなかったことが考えられた。ヒトの未成熟な肝細胞のモデルとして用いた hFL 細胞の生存率は、全ての細胞株の中で最も高かった。しかしながら、hFL 細胞の増殖は FBS 及びガラクトースがどちらも低濃度の場合に抑制された。また、高濃度の FBS を含む変法 L-15 培地は HepG2 細胞及び HFL-III 細胞の生存を十分に抑制することが出来なかった。このことから、低濃度の FBS (1%もしくは2%) 及び高濃度のガラクトース (450 mg/L もしくは 900 mg/L) を含む変法 L-15 培地は、肝細胞を選択的に培養するための培地として適切であることが示唆された。

栄養素の濃度を調整した変法 L-15 培地を適切な時期に用いて分化したヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞は 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 発現が高かった。特に、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 培地は、ヒト成人肝臓における主要な薬物代謝酵素であり<sup>6,7)</sup> 薬物動態学および毒性学的に重要な CYP3A4 の mRNA 発現を大幅に増加させた。これらの細胞は肝細胞の特徴的な形態である単層で多核の形態を示し、ALB 免疫蛍光染色した細胞を顕微鏡下で観察したところ、ほぼすべての細胞で ALB 陽性像が認められた。これらの結果から、本章で検討した方法はヒト iPS 細胞由来の肝細胞様細胞を簡便に単離することが可能であると考えられる。

#### 4.5 小括

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化の適切な時期に, FBS 及びガラクトースを適切な濃度で含む変法 L-15 培地で培養することで, 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明らかとなった. 高純度なヒト iPS 細胞由来肝細胞は創薬研究における薬物動態試験や毒性試験, また再生医療に対する肝細胞の供給源として利用できる可能性がある.

## 第五章 総括

本研究で確立した分化法は，取り扱いが容易で安価な低分子化合物を使用して肝への分化を促進することや肝細胞の選択が可能であるため，外因性のウイルスもしくは他の細胞が混入することなくヒト iPS 細胞から機能的な肝細胞を作製する方法として有用であると考えられる．またヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞を創薬研究における薬物動態試験や肝細胞移植医療の細胞供給源として利用していくために，これらの方法を応用することで大量かつ安定した供給が可能になるものと考えられる．

## 謝 辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 松永 民秀 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、格別の御配慮と御激励を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 鈴木 匡 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品安全性評価学 頭金 正博 教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 湯浅 博昭 教授ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 尾関 哲也 教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際し、機会ある毎に貴重な御助言、御激励を賜り、また研究者としての心得を御教授頂きました信州大学大学院医学系研究科臨床薬理学分野 大森 栄 教授に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、寛容に御支援、御助力を頂きました東北薬科大学大学院薬学研究科環境衛生学分野 永田 清 教授に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、終始丁寧な御指導、有益な御助言を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 中村 克徳 准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、有益な御助言とご協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 菊池 千草 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、終始丁寧な御指導、多大なる御協力を賜りました東北薬科大学大学院薬学研究科環境衛生学分野 佐々木 崇光 助教に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、親身なる御助言と御指導を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 岩尾 岳洋 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ヒト iPS 細胞をご供与頂きました国立成育医療研究センター研究所 阿久津 英憲 博士，宮川 世志幸 博士，大喜多 肇 博士，清河 信敬 博士，豊田 雅士 博士ならびに梅澤 明弘 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、HDAC 阻害剤である T247 及び NCC149 をご供与頂きました京都府立医科大学大学院医学研究科統合医化学専攻医薬品化学分野 鈴木 孝禎 教授ならびに名古屋市立大学創薬基盤科学研究所 宮田 直樹 特任教授に謹んで御礼申し上げます。

研究途上種々の御便宜を図って下さいました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野ならびに薬学部臨床薬学教育研究センターの卒業生，在室生ならびに研究員に感謝致します。



## 引用文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861–872 (2007).
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**, 1145–1147 (1998).
- 3) Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, **79**, 65–73 (2010).
- 4) Hannoun Z, Filippi C, Sullivan G, Hay DC, Iredale JP. Hepatic endoderm differentiation from human embryonic stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **5**, 233–244 (2010).
- 5) Jochheim A, Hillemann T, Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, Wobus AM, Ott M. Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. *Int. J. Dev. Biol.*, **48**, 23–29 (2004).
- 6) Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G, Cresteil T. Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 625–634 (1997).
- 7) Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 573–582 (2003).
- 8) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 414–423 (1994).
- 9) Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **4**, 825–833 (2005).
- 10) Li AP, Rasmussen A, Xu L, Kaminski DL. Rifampicin induction of lidocaine metabolism in cultured human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, 673–677 (1995).
- 11) Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA, Guzelian PS. Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 415–421 (1995).
- 12) Silva JM, Morin PE, Day SH, Kennedy BP, Payette P, Rushmore T, Yergey JA, Nicoll-Griffith D. A., Refinement of an in vitro cell model for cytochrome P450 induction. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 490–496 (1998).
- 13) Puviani AC, Ottolenghi C, Tassinari B, Pazzi P, Morsiani E. An update on high-yield isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. *Comp Biochem Physiol.*, **121**, 99–109, (1998).
- 14) Olsen AK, Hansen KT, Friis C. Pig hepatocytes as an in vitro model to study the regulation of human CYP 3A4: prediction of drug-drug interactions with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Chem.-Biol. Interact.*, **107**, 93–108, (1997).

- 15) Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 233–246, (2003).
- 16) Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology (Hoboken, NJ, U. S.)*, **51**, 297–305 (2010).
- 17) Touboul T, Hannan NR, Corbineau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, Mainot S, Strick-Marchand H, Pedersen R, Di Santo J, Weber A, Vallier L. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology (Hoboken, NJ, U. S.)*, **51**, 1754–1765 (2010).
- 18) Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, Song X, Guo Y, Zhao Y, Qin H, Yin X, Wu C, Che J, Lu S, Ding M, Deng H. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res.*, **19**, 1233–1242 (2009).
- 19) Amimoto N, Mizumoto H, Nakazawa K, Ijima H, Funatsu K, Kajiwara T. Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells during organoid formation in hollow fibers. *Tissue Eng., Part A*, **17**, 2071–2078 (2011).
- 20) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. *Mol. Ther.*, **20**, 127–137 (2012).
- 21) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, Nagamoto Y, Watanabe H, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction. *J. Hepatol.*, **57**, 628–636 (2012).
- 22) Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. The 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).
- 23) Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature (London, U. K.)*, **499**, 481–484, (2013).
- 24) Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, Schreiber SL, Melton DA. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, **4**, 348–358, (2009).
- 25) Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, Sharifi-Zarchi A, Aghdami N, Baharvand H. Treatment of human embryonic stem cells with different combinations of priming and inducing factors toward definitive endoderm. *Stem Cells Dev.*, **22**, 1419–1432, (2013).
- 26) Shan J, Schwartz RE, Ross NT, Logan DJ, Thomas D, Duncan SA, North TE, Goessling W, Carpenter AE, Bhatia SN. Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPSC differentiation. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 514–520, (2013).
- 27) Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori

- S. Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27**, 598–604, (2012).
- 28) Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*, **45**, 1229–1239, (2007).
  - 29) D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazzer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1534–1541, (2005).
  - 30) Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriguen A, Black JR, Elcombe C, Ross JA, Wolf R, Cui W. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells (Durham, NC, U. S.)*, **26**, 894–902, (2008).
  - 31) Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.*, **18**, 2127–2136, (1999).
  - 32) Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett.*, **492**, 90–94, (2001).
  - 33) Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development (Cambridge, U. K.)*, **130**, 2513–2524, (2003).
  - 34) Momose Y, Matsunaga T, Murai K, Takezawa T, Ohmori S. Differentiation of monkey embryonic stem cells into hepatocytes and mRNA expression of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism: comparison of embryoid body formation conditions and matrices. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 619–626, (2009).
  - 35) Maruyama M, Matsunaga T, Harada E, Ohmori S. Comparison of basal gene expression and induction of CYP3As in HepG2 and human fetal liver cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2091–2097, (2007).
  - 36) Nishimura M, Koeda A, Suganuma Y, Suzuki E, Shimizu T, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S, Naito S. Comparison of inducibility of CYP1A and CYP3A mRNAs by prototypical inducers in primary cultures of human, cynomolgus monkey, and rat hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 178–186, (2007).
  - 37) Maezawa K, Matsunaga T, Takezawa T, Kanai M, Ohira S, Ohmori S. Cytochrome P450 3As gene expression and testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity in human fetal membranes and placenta at full term. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 249–254, (2010).
  - 38) Kondraganti SR, Jiang W, Moorthy B. Differential regulation of expression of hepatic and pulmonary cytochrome P4501A enzymes by 3-methylcholanthrene in mice lacking the CYP1A2 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 945–951, (2002).
  - 39) Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T, Sakai Y, Miyajima A. Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology (Hoboken, NJ, U. S.)*, **35**, 1351–1359, (2002).
  - 40) Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D,

- Guguen-Guillouzo C, Corlu A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology (Hoboken, NJ, U. S.)*, **45**, 957–967, (2007).
- 41) Oda H, Nozawa K, Hitomi Y, Kakinuma A. Laminin-rich extracellular matrix maintains high level of hepatocyte nuclear factor 4 in rat hepatocyte culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 800–805, (1995).
  - 42) Caron JM. Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1239–1243, (1990).
  - 43) Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A, El-Sankary W. Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica*, **32**, 165–206, (2002).
  - 44) Nishimura M, Koeda A, Shimizu T, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S, Naito S. Comparison of inducibility of sulfotransferase and UDP-glucuronosyltransferase mRNAs by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and cynomolgus monkey hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 45–53, (2008).
  - 45) Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical. *AAPS J.*, **10**, 391–400, (2008).
  - 46) Krusekopf S, Roots I, Kleeberg U. Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *Eur. J. Pharmacol.*, **466**, 7–12, (2003).
  - 47) Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol. Ther.*, **84**, 429–445, (1999).
  - 48) Sonnier M, Cresteil T. Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver. *Eur. J. Biochem.*, **251**, 893–898, (1998).
  - 49) Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 313–315, (2008).
  - 50) Kajiwarra M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 12538–12543, (2012).
  - 51) Godin Y, Heiner L, Mark J, Mandel P. Effects of DI-n-propylacetate, and anticonvulsive compound, on GABA metabolism. *J. Neurochem.* **16**, 869–873, (1969).
  - 52) Simler S, Ciesielski L, Maitre M, Randrianarisoa H, Mandel P. Effect of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain -aminobutyric acid level. *Biochem. Pharmacol. (Amsterdam, Neth.)*, **22**, 1701–1708, (1973).
  - 53) Sawaya MC, Horton RW, Meldrum BS. Effects of anticonvulsant drugs on the cerebral enzymes metabolizing GABA. *Epilepsia*, **16**, 649–655, (1975).
  - 54) Anlezark G, Horton RW, Meldrum BS, Sawaya CB. Anticonvulsant action of ethanalamine-O-sulphate and di-n-propylacetate and the metabolism of gamma-aminobutyric

- acid (GABA) in mice with audiogenic seizures. *Biochem. Pharmacol. (Amsterdam, Neth.)*, **25**, 413–417, (1976).
- 55) Löscher W, Frey HH. Effect of convulsant and anticonvulsant agents on level and metabolism of gamma-aminobutyric acid in mouse brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **296**, 263–269, (1977).
  - 56) Emrich HM, von Zerssen D, Kissling W, Möller HJ, Windorfer A. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. *Arch. Psychiatr. Nervenkrankh.*, **229**, 1–16, (1980).
  - 57) Cutrer FM, Limmroth V, Ayata G, Moskowitz MA. Attenuation by valproate of c-fos immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis induced by intracisternal capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 3199–3204, (1995).
  - 58) VanDongen AM, VanErp MG, Voskuyl RA. Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. *Epilepsia*, **27**, 177–182, (1986).
  - 59) Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36734–36741, (2001).
  - 60) Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics *Cell Res.*, **17**, 195–211, (2007).
  - 61) Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds *Nat. Biotechnol.*, **26**, 795–797, (2008).
  - 62) Dong X, Pan R, Zhang H, Yang C, Shao J, Xiang L. Modification of histone acetylation facilitates hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One*, **8**, e63405, (2013).
  - 63) Dong XJ, Zhang GR, Zhou QJ, Pan RL, Chen Y, Xiang LX, Shao JZ. Direct hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells induced by valproic acid and cytokines. *World J. Gastroenterol.*, **15**, 5165–5175, (2009).
  - 64) Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*, **5**, 305–318, (2004).
  - 65) Shi P, Scott MA, Ghosh B, Wan D, Wissner-Gross Z, Mazitschek R, Haggarty SJ, Yanik MF. Synapse microarray identification of small molecules that enhance synaptogenesis. *Nat. Commun.*, **2**, 510, (2011).
  - 66) Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, pii: 479364, doi: 10.1155/2010/479364, (2010).
  - 67) Yamashita Y, Shimada M, Harimoto N, Rikimaru T, Shirabe K, Tanaka S, Sugimachi K. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer*, **103**, 572–576, (2003).
  - 68) Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T,

- Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*, **12**, 127–137, (2013).
- 69) Ai Y, Jenkins NA, Copeland NG, Gilbert DH, Bergsma DJ, Stambolian D. Mouse galactokinase: isolation, characterization, and location on chromosome 11. *Genome Res.*, **5**, 53–59, (1995).
- 70) Ohira RH, Dipple KM, Zhang YH, McCabe ER. Human and murine glycerol kinase: influence of exon 18 alternative splicing on function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 239–246, (2005).
- 71) McGee MM, Greengard O, Knox WE. The quantitative determination of phenylalanine hydroxylase in rat tissues. Its developmental formation in liver. *Biochem. J.*, **127**, 669–674. (1972).
- 72) Leffert HL, Paul D. Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. *J. Cell Biol.*, **52**, 559–568, (1972).
- 73) Tomizawa M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Iwase K, Takiguchi M, Saisho H, Yokosuka O. Hepatoblast-like cells enriched from mouse embryonic stem cells in medium without glucose, pyruvate, arginine, and tyrosine. *Cell Tissue Res.*, **333**, 17–27, (2008).
- 74) Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. Survival of primary human hepatocytes and death of induced pluripotent stem cells in media lacking glucose and arginine. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0071897, (2013).