

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06365

研究課題名(和文) 創薬応用を目指した高純度CYP3A4発現ヒトES/iPS由来肝細胞の作製法の開発

研究課題名(英文) Generation of CYP3A4-expressing human ES/iPS cell-derived hepatocytes for drug screening

研究代表者

高山 和雄 (Takayama, Kazuo)

大阪大学・薬学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：10759509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、創薬応用できる高機能(高い薬物代謝酵素活性を有する)かつ高純度な肝細胞をヒトES/iPS細胞から分化誘導することを目的とする。そのためには、肝細胞への分化誘導技術を改良するだけでなく、純度を高めるための技術開発が必須である。本研究では、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞を肝実質細胞あるいは胆管上皮細胞の培養上清を用いて培養することにより、その機能を向上できることを確認した。また、代表的な薬物代謝酵素であるシトクロムP450(CYP)3A4を発現するヒトES/iPS細胞由来肝細胞を薬剤選択により濃縮可能なヒトES/iPS細胞株を作製する実験も行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish an efficient differentiation method for highly functioning hepatocyte-like cells from human ES/iPS cells. First, we attempted to improve the hepatocyte differentiation method. Next, we developed a method to concentrate the highly functioning hepatocyte-like cells. The hepatic functions of human ES/iPS cell-derived hepatocyte-like cells were enhanced by culturing with conditioned medium of hepatocytes and cholangiocytes. In future, our group is going to establish the genetically engineered human ES/iPS cells, which carry puromycin resistant cassette under the CYP3A4.

研究分野：医療系薬学

キーワード：肝細胞 ヒトES/iPS細胞 薬物代謝 CYP 肝毒性 創薬試験

## 1. 研究開始当初の背景

肝毒性は薬物の開発中止や市場撤退となる主たる原因のひとつである。肝毒性を創薬の初期段階において予測するため、現在、多くの製薬企業ではヒト初代培養肝細胞が使用されているが、ヒト初代培養肝細胞は非常に高価であり、ドナー間のバラつきが大きい。そのため、創薬スクリーニングには適していない。そこで、ほぼ無限の増殖能を持つヒト ES/iPS 細胞からヒト初代培養肝細胞と同程度の機能を有する肝細胞を効率良く作製できれば、創薬における非常に貴重な細胞源になりうると期待されている。しかしながら、現行の分化誘導法で作製したヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞は、ヒト初代培養肝細胞と比較して cytochrome P450 (CYP) 活性が劣っており、成人型肝細胞よりも胎児型肝細胞に近い表現型を有しているという課題が複数のグループから報告されている (Baxter et al., *J Hepatol.*, 2015; Mann et al., *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 2015)。また、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞はヘテロな細胞集団であることが指摘されており (Baxter et al., *J Hepatol.*, 2015)、申請者らも分化誘導した細胞は CYP を発現する肝細胞、CYP をほとんど発現しない肝前駆細胞、胆管上皮細胞を含むヘテロな細胞集団であることを確認している (図 1)。純度の高いヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を調製するために、これまでに肝細胞特異的表面抗原を用いたソーティングが試みられてきたが (Vosough et al., *Stem Cell Dev.*, 2013)、肝細胞は剥離・継代によりその肝機能が著しく低下するため、ソート後に肝細胞を播種し、種々の試験に応用することは難しい。このように、申請者を含む国内・国外の多くの研究者が肝細胞分化誘導技術の改良に取り組んできたが、CYP をヒト初代培養肝細胞と同程度発現する高純度なヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の作製に成功した例はない。ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いて、正確かつ再現性のある創薬試験を実現するためには、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞のさらなる成熟度と純度を向上させるための技術開発が必須である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を種々の細胞と共培養することにより、CYP 活性を含む各種肝機能を向上させることを第一の目標とした。肝細胞は生体内では多くの同種細胞や他種細胞と隣接しており、その恒常性維持に不可欠な相互ネットワークを構築している。そのため、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝機能を最大限高めるためには、出来る限り生体内の肝細胞の環境を *in vitro* で模倣することが必要だと考えた。肝細胞の周囲には、同種細胞の他に胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、星細胞等の細胞が局在しているため、これらの細胞をヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞と共培養することによって、

ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝機能の向上を目指した。

次に、薬物代謝において最も重要な CYP である CYP3A4 を発現するヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を薬剤選択により濃縮し、高純度かつ均質なヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を作製することを第二の目標とした。CRISPR や TALEN システムを用いた相同組換えにより、CYP3A4 遺伝子下流にネオマイシン (Neo) 耐性遺伝子をノックインしたヒト ES/iPS 細胞株 (CYP3A4-NeoR-ES/iPS 細胞株) を作出する。樹立した細胞株を肝細胞へと分化誘導したのち、G418 作用により CYP3A4 発現細胞のみを濃縮し、高純度なヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の作製を試みる。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト初代培養肝細胞とほぼ同レベルの CYP3A4 活性を有する高純度なヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を作製するために、分化誘導法の改良と高機能肝細胞の濃縮という 2 つのアプローチを組み合わせる研究を遂行した。

●平成 27 年度は、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を種々の細胞株と共培養し、薬物代謝酵素 CYP3A4 の活性を最も向上できる細胞株「Z」を探索した。また、CYP3A4-NeoR-ES/iPS 細胞株を作製するために必要なプラスミドを構築した。

●平成 28 年度は、肝実質細胞あるいは非実質細胞の細胞株による肝成熟化効果をより詳細に検討するため、薬物誘導能、肝トランスポーター機能の解析などを実施した。また、平成 27 年度に作製したプラスミドを用いて、CYP3A4-NeoR-ES/iPS 細胞株の樹立を試みた。

## 4. 研究成果

1) 共培養によるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の成熟化

ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の成熟化を目指し、様々な肝非実質細胞 (肝実質細胞も検討する) の培養上清を用いた検討を実施した。肝細胞の培養上清を用いることで、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞のグルタミン産生能や cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) 活性が向上することを確認した。また、胆管上皮細胞の培養上清を用いることで、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の尿素合成能が向上することを確認した。以上のことから、肝細胞あるいは胆管上皮細胞の培養上清を用いることで、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の成熟化が促進できる可能性が示唆された (Mitani and Takayama et al., *Mol Ther*, in press)。

2) CYP3A4 発現ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の濃縮

CYP3A4 を強く発現するヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を濃縮することを目指し、CYP3A4 遺伝子直下にネオマイシン耐性遺伝子をノックインしたヒト ES/iPS 細胞の作製を試みた。相同組換え効率を上昇させるために、ドナー

プラスミドの両アームの中央部分にて DNA 二本鎖を切断できる CRISPR/Cas9 システムや RAD51 遺伝子発現プラスミド、バルプロ酸を使用した。現時点では、CYP3A4-NeoR-ES/iPS 細胞株は未取得であるが、樹立でき次第、未分化能および肝細胞への分化能を検証する。そのうち、CYP3A4 高発現肝細胞の濃縮にも着手する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Mitani S., Takayama K., Nagamoto Y., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Mizuguchi H. Human iPS Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells Achieve Zone-Specific Hepatic Properties by Modulation of WNT Signaling. *Molecular Therapy*, in press. [http://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(17\)30165-X](http://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(17)30165-X)
2. Fukuda T., Takayama K., Hirata M., Liu Y., Yanagihara K., Suga M., Mizuguchi H., Furue M. Isolation and Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-derived Hepatic Progenitor Cells by Growth Factor Defined Serum-free Culture Conditions. *Experimental Cell Research*, 2017 Mar 15;352(2):333-345.
3. Takayama K., Igai K., Hagihara Y., Hashimoto R., Hanawa M., Sakuma T., Tachibana M., Sakurai F., Yamamoto T., Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN systems. *Nucleic Acids Research*, in press <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkx130>
4. Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Nakatani K., Takayama K., Tachibana M., Mizuguchi M. Inhibition of CRISPR/Cas9-mediated genome engineering by a type I interferon-induced reduction in guide RNA expression. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2017;40(3):272-277.
5. Hanawa M., Takayama K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Promotes Definitive Endoderm Differentiation From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Reviews & Reports*, in press. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12015-016-9709-x>
6. Imagawa K., Takayama K., Isoyama S., Tanikawa K., Shinkai M., Harada K., Tachibana M., Sakurai F., Noguchi E., Hirata K., Kage M., Kawabata K., Sumazaki R., Mizuguchi H. Generation of a bile salt export pump deficiency model using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Scientific Reports* 2017 Feb 2;7:41806.
7. Takayama K., Mizuguchi H. Prediction of drug-induced liver injury by using human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2017 Feb;32(1):12-20. (review)
8. Yanagihara K., Liu Y., Kanie K., Takayama K., Okamura M., Hirata M., Fukuda T., Suga M., Nikawa H., Mizuguchi H., Kato R., Furue M. Prediction of differentiation tendency toward hepatocytes from gene expression in undifferentiated human pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development* 2016 Dec 15;25(24):1884-1897.
9. Takayama K., Mitani S., Nagamoto Y., Sakurai F., Tachibana M., Taniguchi Y., Sekiguchi K., Mizuguchi H. Laminin 411 and 511 promote the cholangiocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 May 20;474(1):91-6.
10. Negoro R., Takayama K., Nagamoto Y., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Modeling of drug-mediated CYP3A4 induction by using human iPS cell-derived enterocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Apr 15;472(4):631-636.
11. Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Okamoto R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi M. Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure. *Journal of Hepatology* 2016 May;64(5):1068-1075.
12. Nakamori D., Takayama K., Nagamoto Y., Mitani S., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Hepatic Maturation of Human iPS Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells by ATF5, c/EBP $\alpha$ , and PROX1 Transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jan 15;469(3):424-429.
13. Ozawa T., Takayama K., Okamoto R., Negoro R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Generation

of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small intestine. Scientific Reports 2015 Nov 12;5:16479.

[学会発表] (計 13 件)

1. Kazuo Takayama, Tatsuya Ozawa, Fuminori Sakurai, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi ; Generation of enterocyte-like cells from human iPS cells for drug absorption and metabolism studies in small intestine、日本薬物動態学会第 30 回年会、東京、2015 年 11 月 (シンポジウム、一般演題口頭発表)
2. 高山和雄、萩原康子、関口清俊、森尾友宏、小原收、立花雅史、櫻井文教、水口裕之；再生医療への応用を見据えた臨床グレードのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 (ポスター発表)
3. 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞から肝細胞様細胞への高効率分化誘導技術の開発—創薬応用を目指して—、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪、2015 年 10 月 (奨励賞受賞記念講演)
4. 高山和雄、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の創薬・再生医療への応用、K-CONNEX スタートアップシンポジウム、大阪、2016 年 1 月 (シンポジウム)
5. 高山和雄、萩原康子、関口清俊、森尾友宏、小原收、立花雅史、櫻井文教、水口裕之；再生医療応用を目指したヒト iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導法の開発とその品質評価、第 15 回日本再生医療学会総会、大阪、2016 年 3 月 (口頭発表)
6. 高山和雄、萩原康子、関口清俊、櫻井文教、水口裕之、組成が明らかな培養条件でのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製とその品質評価、第 23 回肝細胞研究会、大阪、2016 年 7 月 7-8 日 (ポスター発表)
7. 高山和雄、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の三次元培養による機能向上、細胞凝集研究会 2016、札幌、2016 年 9 月 9 日 (シンポジウム)
8. Takayama K., Negoro R., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Generation of the enterocyte-like cells from human iPS cells for drug-drug interaction studies、日本薬物動態学会第 31 回年会、松本、2016 年 10 月 13-15 日 (口頭発表)
9. 高山和雄、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の創薬応用に向けた取り組み、K-CONNEX ファーストコンタクトプログラム、千葉(竹中技術研究所)、2016 年 11 月 10 日 (招待講演)
10. 高山和雄、萩原康子、関口清俊、櫻井文教、水口裕之、ラミニンアイソフォームを駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞および胆管上皮細胞への分化誘導、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (ポスター発表)
11. 高山和雄、ヒト ES/iPS 細胞由来肝臓細胞の作製とその創薬研究への利用、第 6 回超異分野学会、東京、2017 年 3 月 2-3 日 (招待講演)
12. 高山和雄、秋田尚毅、関口清俊、森尾友宏、小原收、櫻井文教、水口裕之、移植医療応用のためのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と品質評価、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日 (口頭発表)
13. 高山和雄、井貝圭佑、櫻井文教、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞における高効率相同組換え技術の開発、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 25-27 日 (口頭発表)

[図書] (計 4 件)

1. 高山和雄、水口裕之；ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞の作製技術の開発とその創薬応用、バイオサイエンスとインダストリー、Vol.74, No6, 476-481 (2016)
2. 水口裕之、高山和雄；ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導と毒性評価系への応用、住化分析センターSCAS NEWS、通巻 44 号、3-7 (2016)
3. 水口裕之、高山和雄；2 章 再生医療等製品 6. iPS 細胞による再生医療 6-7) 薬物毒性評価、臨床薬学テキストシリーズ、233-239 (2016)
4. 水口裕之、高山和雄；第 3 章 iPS 細胞を用いた病態解明および医薬品評価技術の開発、第 4 節 ヒト iPS 細胞を用いた薬剤評価のための肝細胞の作製、「iPS 細胞の安全・高品質な作製技術」、技術情報協会、124-130 (2016)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：小腸上皮様細胞  
発明者：水口 裕之、高山和雄  
権利者：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所、国立大学法人大阪大学  
種類：PCT  
番号：PCT/JP2016/57312 号 (特願 2015-51475 号)  
出願年月日：2016/3/9  
国内外の別：国外

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高山 和雄 (Kazuo Takayama)

国立大学法人大阪大学大学院薬学研究科・特  
任助教

研究者番号：10759509