

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15397

研究課題名（和文）小児薬剤に対する新型iPS細胞由来肝細胞による先駆的解析システム戦略の創成

研究課題名（英文）Establishment of new pediatric drug screening system by iPS cell derived hepatocytes

研究代表者

儀間 愛子（YOSHIMA, AIKO）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・（非）研究員

研究者番号：10727613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、小児薬剤に対する新型iPS細胞由来肝細胞による先駆的解析システム戦略の創成その有効性の評価を目的とした。臨床応用へ向けての最適な肝細胞分化誘導系の確立と、その有用性の探索などの前臨床試験の基盤技術を整備する。また肝細胞の凍結保存技術は未だ確立されておらず、細胞保存による肝細胞としての機能低下が問題視されている。本研究では、分化誘導肝細胞の移植までの保存法についても技術開発を行なった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of creation of pioneering analysis system strategy by new type iPS cell derived hepatocytes for pediatric drugs. We have developed basic technologies for preclinical testing such as establishing optimal hepatocyte differentiation induction system for clinical application and exploring usefulness.

研究分野：医歯薬学

キーワード：成育医学 先天性代謝異常症 再生医療 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、ヒト細胞加工医薬品を用いた臨床試験、臨床研究に向けた取り組みが世界中で行われている。その中で、アメリカ合衆国の Geron 社、ACT 社による報告が注目を集めていた。特に ACT 社の場合は、ES 細胞を用いた初めての臨床研究となり、その特性解析手法や臨床データが今後の細胞加工医薬品研究に大きな一石を投じたことになる (Lancet, 2014)。また、理化学研究所において、加齢黄斑変性を対象としたヒト iPS 細胞の臨床研究がスタートし、ヒト細胞加工医薬品の開発研究はますます加速すると予想される。

**臨床応用に向けて、安定性、安全性**の高い、簡便な分化誘導系が必要である。最小限の試薬や基材を用いて自然発生的な肝細胞の分化誘導系の開発に挑戦する。また、安全性の検討を行い、オーファンドラッグとしての臨床応用へ向けて、研究実績を蓄積する。また、肝細胞は凍結保存することにより、肝細胞としての機能を消失し、生存率も低下することが知られている。肝細胞の機能維持培養法、機能維持凍結保存法の開発は様々な分野で望まれている。本研究で開発される肝細胞保存法は、細胞生物学の分野にも、創薬研究の分野にも非常に有益な情報をもたらすものとなる。

## 2. 研究の目的

本研究は、小児薬剤に対する新型 iPS 細胞由来肝細胞による先駆的解析システム戦略の創成とその有効性の評価を目的とした。臨床応用へ向けての

最適な肝細胞分化誘導系の確立と、その有用性の探索などの前臨床試験の基盤技術を整備する。また肝細胞の凍結保存技術は未だ確立されておらず、細胞保存による肝細胞としての機能低下が問題視されている。そこで本研究では、分化誘導肝細胞の移植までの保存法についても技術開発を行なった。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を制御する基盤技術の開発

ヒト iPS 細胞を用いて、無血清条件下で液性因子を添加することにより肝細胞への安定した分化誘導方法に関する検討を実施した。分化誘導した肝細胞について、網羅的遺伝子発現解析と機能アッセイにより、肝臓細胞としての成熟度の評価を行った。

ヒト iPS 細胞の in vitro 肝細胞分化誘導方法の開発

特定栄養組成培地により、マウス ES 細胞からの分化方向性を人工的に操作する方法を発展させ、さらに詳細に培養方法を検討し、ヒト iPS を in vitro で成熟度の高い肝細胞へ分化誘導する方法について検討を実施した。

iPS 由来肝細胞の成熟度評価、分化制御の分子機序解明

iPS 由来肝細胞について、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、肝幹細胞、肝機能細胞の表層マーカーの同定、そのリガンドの利用、分化関連遺伝子の探索を行い、分化成熟化因子を同

定し、肝細胞への分化・成熟化に関わる分子機序に関する検討を実施した。また、アルブミン分泌量、薬物代謝酵素活性および薬物輸送能の測定により成熟度を評価した。

#### (2) ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞分化を促進する遺伝子発現制御技術の開発

肝臓の発生に重要であると報告されている遺伝子をアデノウイルスベクターを用いてヒト iPS 細胞から分化誘導した内胚葉系細胞に導入することにより、alpha-fetoprotein(AFP)陽性の肝幹細胞の分化が促進されることを既に確認済みである。また、この肝幹細胞が薬物代謝活性および薬剤応答性を有する肝細胞へと分化可能であるという結果も得た。本研究では、既に開発済みの分化誘導技術に加え、三次元培養技術を駆使してヒト iPS 細胞 内胚葉系細胞 肝幹細胞 成熟肝細胞の分化過程における遺伝子発現変化(メッセンジャーRNA あるいはマイクロ RNA 等の non-coding RNA )を網羅的に解析した。

#### (3) 遺伝子導入によるヒト iPS 細胞の肝細胞分化促進基盤技術の開発)

肝幹細胞誘導促進技術を基に、肝臓の発生に重要な既知の遺伝子を導入することで、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化・成熟化が促進されるか否かを検討した。

#### (4) ヒト iPS 細胞の肝細胞分化・成熟化過程における網羅的遺伝子発現解析

遺伝子導入あるいは三次元培養に伴う遺伝子発現変化を解析した。メッセンジャーRNA の発現解析に加え、発生・分化等の過程に多大な影響を及ぼすことが明

らかとなりつつある二十数塩基のマイクロ RNA の発現解析等を行うことで、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化・成熟化を促進する新規遺伝子群の同定を実施した。

#### (5) 遺伝子導入によるヒト iPS 細胞の肝細胞分化促進技術の改良

ウイルスベクターを用いた遺伝子発現制御技術(強制発現およびノックダウン技術)を駆使することにより、同定した新規遺伝子群の肝細胞分化過程における役割を検証した。

#### (6) ヒト iPS 細胞分化傾向性に関するプロトタイピング

今回樹立した iPS 細胞株に対して特定細胞系への分化傾向性のプロトタイピング(iPS 細胞スクリーニング)を胚様体作製による分化マーカーの定量 RT-PCR 法により行い、最適なヒト iPS 細胞の樹立を実施した。すでに保持している特定細胞への分化傾向性を検定するために、bFGF 無添加培地によるグローバル分化誘導法にて行った。

#### 4. 研究成果

未だ確立されていない肝細胞の機能維持培養、保存法を開発することにより、様々な肝疾患に対する移植細胞の保存や、基礎研究の材料としての機能維持肝細胞の確立に貢献できた。臨床応用に向けた安定性の高い、安全なヒト多能性幹細胞由来肝細胞様細胞の新しい分化誘導系を構築し、機能的な肝細胞が分化誘導可能になれば、in vitro 毒性評価系の開発成果として実用性・汎用性の高い新規毒性評価系が構築に貢献できた。将来的にはそれを基に医薬品医療機器等法の新薬承認審査に反映させる毒性ガイドライン作成及

び世界の主要な新薬開発国が参加する ICH のグローバル・スタンダードへ発展へも応用出来る。また、モデル細胞を用いた毒性安全性試験を行うことで、「種差の壁」の限界を有する動物実験に代わる評価システムが構築され、医薬品開発の早いステージで候補薬を正確に絞り込むことができる。医薬品の開発に関する時間およびコスト低減のために最も有効な方法である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

儀間愛子 (YOSHIMA, AIKO)

国立研究開発法人 国立成育医療研究  
センター 細胞医療研究部 研究員

研究者番号 : 10727613

(2)研究分担者

梅澤明弘 (UMEZAWA, AKIHIRO)

国立研究開発法人 国立成育医療研究  
センター 再生医療センター センター  
長

研究者番号 : 70213486