

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390028

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞の肝細胞及び胆管上皮細胞への分化と創薬研究への応用

研究課題名（英文） Differentiation of human iPS cells into hepatocytes and bile duct epithelial cells and application to drug development study

研究代表者

大森 栄 (OHMORI SHIGERU)

信州大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70169069

研究成果の概要（和文）：ヒト肝細胞は創薬研究において薬物動態学的試験に有用である。しかし、ヒト初代肝細胞はロット差が極めて大きいことが問題である。また、小腸は肝臓と同様薬物動態において重要な臓器であるが、ヒト腸管上皮細胞は入手が極めて困難である。そのため、Caco-2 細胞や MDCK 細胞などががん細胞であり、小腸以外の細胞が用いられている。本研究において、ヒト iPS 細胞から薬物代謝酵素活性を有する肝細胞様細胞及び腸管上皮細胞様細胞を得ることができた。また、目的とする細胞は低分子化合物を添加することで効率良く得られた。以上の結果より、低分子化合物を用いて分化誘導されたヒト iPS 細胞由来肝細胞及び腸管上皮細胞は薬物動態試験に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Human hepatocytes are useful for pharmacokinetic examinations. However, considerable donor-dependent variations are problematic. The small intestine, as well as liver, plays an important role in all aspects of pharmacokinetics. At present, human intestinal epithelial cells are difficult to obtain, and there is no appreciate model cells. Instead, other tissue cell-derived cell lines, including Caco-2 cells and MDCK cells, were used as intestinal model in a drug absorption study. Human iPS cells apparently differentiate into various types of mature cells, and are thereby an attractive source for routine access to large numbers of cells that can be used for the pharmacokinetic examinations replacing primary cells. In this study, we investigated the effects of small-molecule compounds for differentiation of human iPS cells into hepatocytes and enterocytes available in pharmacokinetic study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発初期の探索動態試験には、一般

的に実験動物が用いられるが、種差がありヒトへの外挿は容易ではない。一方、ヒト肝細

胞は予測が容易である反面、個体差が大きいう上に、高価で、新鮮な細胞は入手が困難である。胚性幹細胞 (ES 細胞) は増殖能力に優れ、成体を構成する全ての細胞に分化可能である。そのため、ES 細胞の創薬研究への応用が期待されている。しかし、我が国のヒト ES 細胞研究に関する規制が使用研究に限っても極めて厳しかったことから、研究を行っている研究機関は少なく、特に肝細胞への分化に関しては信州大学の他に岡山大学、熊本大学、京都大学など限られた研究機関のみである。一方、京都大学の山中らは 2007 年 ES 細胞と同じ特性を持つ人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) をヒト体細胞から樹立した (*Cell* **131**:861-872, 2007)。ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞に比べ倫理的な問題が少ないことから、創薬研究への応用に対しても期待が大きく、世界的に競争が始まったばかりである。ヒト ES 細胞から肝細胞系譜への分化誘導の研究は、2003 年の Rambhatla ら (*Cell Transplant* **12**: 1-11, 2003.) の報告が最初であるが、現在までに数多くの報告がなされている。しかし、薬物動態試験への応用を目指した薬物代謝活性など機能面まで評価した報告はこれまでほとんどない。一方、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化に関しては、2009 年 9 月に Song らによって報告 (*Cell Res.* 2009 Sep 8. オンラインジャーナル) されたのが最初であるため、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化とその機能評価はこれからである。また、肝芽細胞の肝細胞への分化と成熟に肝特異的転写因子である C/EBP $\alpha$  が必須であるが、本因子は胆管上皮細胞の分化過程では発現抑制されることで胆管形成遺伝子 Hnf6 や Hnf1b を高発現し腺管構造を発生することが知られている (Yamasaki *et al.*, *Development* **133**:4233-4243, 2006)。

申請者らは、これまでマウス、サル及びヒト ES 細胞の肝細胞への分化と薬物動態試験への応用に関する研究を行い、十分な技術と肝細胞への分化手法を確立してきた。国内外の研究とこれまでの申請者の研究成果を踏まえて、ヒト iPS 細胞より分化した肝細胞を薬物動態試験に応用する上で解決すべき問題点が 3 つ挙げられる。

- (1) 申請者も同様であるが、アルファフェトプロテイン等未熟な肝細胞に発現する遺伝子が高発現しており、十分成熟した肝細胞に分化していないことが示唆される (Agarwal *et al.*, *Stem Cells* **26**: 1117-1127, 2008; Hay *et al.*, *Stem Cells* **26**: 894-902, 2008.)。
- (2) 薬物動態や薬物性肝障害の研究を行うためには、薬物本体あるいは代謝物を排泄する胆管上皮細胞を肝細胞と同時に分化させ、生体に近い組織を構成することが重要と考えられるが、分化の方向性が両細胞で

異なるため同時に分化させる研究はほとんど行われていない。

- (3) ヒト多能性幹細胞研究は未分化の維持に特殊な技術の習得が必要な上に、肝細胞の分化には 30 日程度日数が必要なため、ヒト初代肝細胞のように容易に使用することが困難である。

したがって、上記の問題点を解決することがヒト iPS 細胞を創薬研究の薬物動態試験に使用するためには重要である。

## 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞を成熟した肝細胞及び胆管上皮細胞に分化し、創薬研究における探索動態試験に利用可能なモデル系を構築することを目的とする。

- (1) ヒト iPS 細胞を成熟した肝細胞及び胆管上皮細胞に効率良く分化する系を確立し、薬物動態学的評価を行う。
- (2) ヒト iPS 細胞由来肝細胞及び胆管上皮細胞を立体培養することで、成体により近い組織を構成できるか組織工学的な検討を行うとともに、薬物動態モデル系の構築を試みる。
- (3) 分化の段階で凍結保存し、再度培養することで分化が継続可能な条件を開発する。
- (4) 薬物代謝酵素の遺伝子多型を持つヒト細胞より iPS 細胞を樹立し、分化した系を用いて薬物動態解析を行い、多型の影響を検証する。

## 3. 研究の方法

培養ディッシュに対し、ヒト iPS 細胞の未分化コロニーの占める割合が約 70%になった時点でヒト iPS 細胞の肝細胞あるいは腸管上皮細胞への分化を開始した。まず、アクチビン A にて内胚葉に分化させた。次に、DMSO にて肝芽細胞に分化させた。最後に、肝細胞増殖因子 (HGF)、オンコスタチン M、デキサメタゾンを含む培地で培養することで肝細胞へ分化させた。腸管上皮細胞への分化は、肝細胞と同様にアクチビン A にて内胚葉分化し、次に線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2) にて腸管幹細胞に分化した。最終的には、上皮細胞増殖因子 (EGF) にて腸管上皮細胞に分化させた。低分子化合物は、培地に添加した。薬物代謝酵素の誘導剤処理は回収前 48 時間培養することで行った。また、酵素活性は基質を培地に添加後、基質に含まれる代謝物を LC-MS/MS にて解析することで測定した。mRNA の発現は、リアルタイム PCR 法にて解析した。

## 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導に増殖因子等の液性因子が用いられているが、不安定であるため取り扱いが困難な上に非常に高価である。また、核内転写因子の遺伝子

導入法も報告されているが組換え遺伝子の取り扱いの問題がある。本研究は、安価で取り扱いの容易な低分子化合物がヒト iPS 細胞から肝細胞及び腸管上皮細胞への分化誘導に与える影響を明らかにすることを目的とした。肝細胞への分化誘導は、iPS 細胞をアクチビン A 処理することで内胚葉に、続いて DMSO にて肝芽細胞に分化させ、OSM、DEX、HGF によって成熟させる方法にて行った。腸管上皮細胞は、アクチビン A 処理で内胚葉に、続いて FGF2 にて腸管系譜細胞に分化させ、EGF によって腸管上皮細胞に分化誘導した。また、分化の際に低分子化合物を添加し、肝細胞及び腸管上皮幹細胞への分化に及ぼす影響について検討した。

肝細胞への分化後の細胞において、形態学的に特徴的な多核の細胞が観察され、肝細胞マーカーの発現が認められた。また、ALB、PXR、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 及び UGT1A1 に関して、これらの mRNA 発現は低分子化合物 A の添加により増加した。CYP3A4 のリファンピシンによる誘導は低分子化合物 A を添加することで、さらに増加した。また、ALB 免疫蛍光染色を行ったところ、ほぼ全ての細胞で陽性を示した。腸管上皮細胞への分化においては、マーカーである sucrase-isomaltase の陽性細胞が腸管特異的なペプチドトランスporter 機能を有していることを明らかにした。また、低分子化合物 B 及び C を分化の過程で処理することにより、腸管上皮幹細胞マーカーの LGR5 及び EphB2 の発現上昇が認められた。以上の結果より、本研究で用いた低分子化合物はヒト iPS 細胞からの肝細胞あるいは腸管上皮細胞への分化を促進することが明らかとなった。

当初の計画では、C/EBP $\alpha$  の遺伝子発現量が調節可能なヒト iPS 細胞 (Tet-On 及び Tet-Off 細胞) をクローン化することで、肝実質細胞と胆管上皮細胞に分化するとしていた。しかし、研究を開始後遺伝子導入よりもより有効な手段として肝実質細胞への分化を促進する低分子化合物を見出すことができた。胆管上皮細胞への分化に関しては検討はできなかったが、創薬研究の薬物動態試験において重要な腸管上皮細胞への分化法を開発することができた。これらの方法は、分化における低コスト化にも大きな意味があると共に、再生医療においても極めて大きな意味を持つものと思われる。

## 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 8 件)

1 Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Matsunaga T,

Ohmori S, Nagata K: Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2013 Jan 1. [Epub ahead of print]. in press.

DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-132.

査読有

2 Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T: Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab Pharmacokinet*, **28**:38-43 2013.

DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-12-RV-089.

査読有

3 Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S: Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analyses of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. *Biol Pharm Bull*, **36**:292-298, 2013.

DOI; 10.1248/bpb.b12-00866. 査読有

4 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 Metabol. Pharmacokinet*, **27**: 598-604, 2012.

DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-017.

査読有

5 Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S: Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug Metabol Pharmacokinet*, **27**: 653-657, 2012.

DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-12-NT-018.

査読有

6 Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S: Lower expression of HNF4 $\alpha$  and PGC1 $\alpha$  might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells. *Drug Metabol Pharmacokinet*, **27**:430-438, 2012.

DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-126.

査読有

7 Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S: Effects of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  chemical stabilizer, CoCl<sub>2</sub> and hypoxia on gene

expression of CYP3As in human fetal liver cells. *Drug Metabol Pharmacokinet*, **27**:398-404, 2012.

DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-074.

査読有

- 8 Maezawa K, **Matsunaga T**, Takezawa T, Kanai M, Ohira S, **Ohmori S**: CYP3As gene expression and testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity in human fetal membranes and placenta at full term. *Biol Pharm Bull*, **33**:249-254, 2010. DOI: 10.1248/bpb.33.249. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 三森佳代, 近藤祐樹, 吉橋幸美, 荻原留理, 岩尾岳洋, **松永民秀**: ヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離・凍結保存法の検討第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 - 14 日 (福岡).
- ② 吉橋幸美, 近藤祐樹, 三森佳代, 杉山留理, 岩尾岳洋, 金濱吉範, 牧与志幸, **松永民秀**: ヒト人工多能性幹細胞の肝細胞への分化における変法 L-15 培地及び血清の効果. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 - 14 日 (福岡).
- ③ **松永民秀**: 疾患及び創薬研究の新規材料として期待されるヒト iPS 細胞. 桜山ウイルス研究会 (特別講演). 2012 年 11 月 28 日 (名古屋).
- ④ 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 吉橋幸美, 三森佳代, 杉山留理, 佐々木崇光, 永田 清, 黒瀬光一, 丹羽卓朗, **山折 大**, **大森 栄**, **中村克徳**, **松永民秀**: Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from human induced pluripotent stem cells (低分子化合物はヒト人工多能性幹細胞から肝細胞への分化を促進する). 日本薬物動態学会第 27 回年会, 2012 年 11 月 20 日 - 22 日 (千葉).
- ⑤ 岩尾岳洋, **中村克徳**, 永田 清, **松永民秀**: Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function (ペプチド輸送機能を有するヒト iPS 細胞由来腸管細胞の作製). 日本薬物動態学会第 27 回年会, 2012 年 11 月 20 日 - 22 日 (千葉).
- ⑥ Takahiro Iwao, Kiyoshi Nagata, **Tamihide Matsunaga**: Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 19th Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 12th European Regional International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting, Jun. 17 - 21, 2012 (Noordwijk aan Zee, The Netherlands).
- ⑦ 近藤祐樹, 三森佳代, 吉橋幸美, 杉山留理,

岩尾岳洋, 黒瀬光一, **松永民秀**. ヒト人工多能性幹細胞から肝細胞への分化に対する低分子化合物の効果. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011 年 12 月 13 日 (横浜).

- ⑧ 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 斎藤昌良, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 永田 清, **松永民秀**. ヒト人工多能性幹細胞の肝細胞への分化に与えるクエルセチンの効果. 日本薬物動態学会第 26 回年会. 2011 年 11 月 16 日 (広島).
- ⑨ **松永民秀**. ヒト ES 及び iPS 細胞の肝細胞への分化と薬物動態試験への応用. 第 15 回薬物動態談話会セミナー, 2011 年 8 月 25 日 (大阪).
- ⑩ 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 三森佳代, 吉橋幸美, **大森 栄**, **松永民秀**. ヒト人工多能性幹細胞からの肝細胞への効率的な分化方法の検討. 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会. 2011 年 7 月 9 日 (名古屋).
- ⑪ **松永民秀**, 近藤祐樹, 岩尾岳洋, **大森 栄**. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化と薬物代謝酵素の発現. 日本法中毒学会第 30 年会. 2011 年 6 月 11 日 (長崎).
- ⑫ 近藤祐樹, 鎌田 昇, 坂本 栄, **松永民秀**, **大森 栄**. ヒト人工多能性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝酵素の発現解析. 日本薬学会第 131 年会. 2011 年 3 月 30 日 (静岡).
- ⑬ 青沼安希子, 鈴木英二, **中村克徳**, **松永民秀**, **大森 栄**. 正常ヒト胎児肝細胞の CYP3A 発現に及ぼす擬似低酸素誘導化合物デフェロキサミンの影響. 日本薬学会第 131 年会. 2011 年 3 月 30 日 (静岡).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大森 栄 (OHMORI SHIGERU)  
信州大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 70169069

### (2) 研究分担者

松永 民秀 (MATSUNAGA TAMIHIDE)  
名古屋市立大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 40209581

中村 克徳 (NAKAMURA KATSUNORI)  
名古屋市立大学・薬学研究科・准教授  
研究者番号: 20361363

山折 大 (YAMAORI SATOSHI)  
信州大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 40360218