

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2012 ～ 2013

課題番号：23790193

研究課題名（和文）iPS 細胞を用いた肝幹細胞の単離及び成人型肝細胞への効率的な分化手法の確立

研究課題名（英文）Efficient generation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells and isolation of hepatic progenitor cells

研究代表者

佐々木 崇光 (SASAKI TAKAMITSU)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20382674

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いて既に確立した肝分化誘導法に対し、化学物質及び遺伝子導入の両面から改良を加え、成人型肝細胞に匹敵する肝分化 iPS 細胞を作製することを目的に検討を行った。肝特異的転写因子群の中でも、HNF6 遺伝子を iPS 細胞の肝分化誘導過程に導入することで、肝分化 iPS 細胞の成熟性が向上する可能性を見出した。また、ヒト成人肝細胞において主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 が、HNF6 遺伝子の導入で著しく上昇し、その発現量は酵素活性が認められるレベルに達した。本研究は、iPS 細胞の肝分化誘導法の改良に加え、これまでに報告されていない HNF6 による CYP3A4 の発現調節機構が存在する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to establish the generation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). It revealed that the hepatic differentiation method using human HNF6-expressing adenovirus contributed to the efficient development of hepatocytes from iPSCs. HNF6 was introduced into the iPSCs, *CYP3A4* expression dramatically increased and the cells had the capability to metabolize testosterone. Our study proved for the first time that HNF6 transactivates the *CYP3A4* gene in hepatocyte-like cells differentiated from iPSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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・iPS 細胞・肝分化誘導法・CYP・肝特異的転写因子・HNF

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の肝分化誘導研究は、肝細胞の発生学的観点からの検証により、成熟した肝細胞の作製法が模索されている。しかし、樹立された肝分化 ES あるいは iPS 細胞は、肝細胞の性質は有するものの、薬物代謝酵素の発現量がヒト肝初代培養細胞に比べて著しく低く、薬物動態研究への応用は難しい状況にある。

申請者は、これまでに 4 クローンヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いた肝細胞への分化実験より、肝分化誘導手法の確立に成功している。しかしながら、CYP3A4 等がヒト肝臓に匹敵する発現量に達していないことから、まだ成熟肝まで分化していない（胎児レベルの肝細胞）と考えられた。本肝分化 iPS 細胞は、肝の成熟段階に関与し、多くの肝特異的な遺伝子発現に関連している「HNF6 及び c/EBP α 」の発現量がヒト成熟肝細胞と比較

して著しく低く、これが成熟肝まで分化していない要因の一つと考えられた。

2. 研究の目的

本研究においては、申請者が確立している肝分化誘導法を基盤として、分化に用いる化学物質による分化誘導因子の再検討(1)並びに申請者が同定した不足因子(HNF6及びc/EBP α)の遺伝子導入による肝分化iPS細胞の成熟性の改善(2)を行う。また、未分化iPS細胞からの分化誘導では25日程度かかるため、より肝分化誘導の効率化を目的に、一定期間分化誘導を行なったiPS細胞のストック作製法(3)を樹立させる。

3. 研究の方法

化学物質による誘導法の改良(1)については、特に「内胚葉系細胞への分化」及び「肝細胞の成熟」に重点を置き、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤/酪酸ナトリウム(NaB)、DMSO、マトリゲル及び変法ランフォード培地成分について検討を行った。遺伝子導入による誘導法の改良(2)は、肝特異的転写因子群(HNF6及びc/EBP α 等)のアデノウイルス発現系を構築し、分化誘導の効率化及び肝分化iPS細胞の成熟性向上を検討した。作製した肝分化iPS細胞については、リアルタイムPCRによる発現量解析及びHPLCやP450-Glo Assayを用いた酵素機能解析を行った。また、分化誘導過程における肝幹細胞ストックの作製(3)については、剥離液(トリプシン及びアクターゼ等)の検討やストックのタイミングについて検討した。

4. 研究成果

(1) 化学物質による誘導法の改良

「内胚葉系細胞への分化」におけるNaBの効果は、種々の条件検討の結果、最終的な薬物代謝酵素発現量に大きな差は認められなかったが、分化誘導開始5日目に行う継代において、0.5 mM NaBの5日間処理が最も内胚葉系細胞の生存率が高かった。また、「肝細胞への誘導」におけるマトリゲルは、30倍希釈に設定した。

「肝細胞の成熟」段階における、1%DMSO添加変法ランフォード培地の効果を検討した結果、通常、この段階で使用するHGF/OSM/DEX添加変法ランフォード培地(分化成熟培地)に匹敵する肝分化マーカーmRNA発現量の上昇が認められ、発現誘導効果があることが明らかとなった。(図1)。また、CYP、トランスポーター及び転写因子のmRNA発現に対するDMSOの効果についても同様の検討を行った。その結果、特に、MRP6やNTCPのmRNA発現量の上昇が確認された(図2)。CYPについては、CYP2C9及びCYP2C19において、発現の上昇は認められたが、トランスポーターほどの上昇

は確認されなかった。次に、変法ランフォード培地成分のうち、肝臓細胞増殖因子とエタノールアミンについて検討を行ったが、DMSOほどの効果は認められなかった。

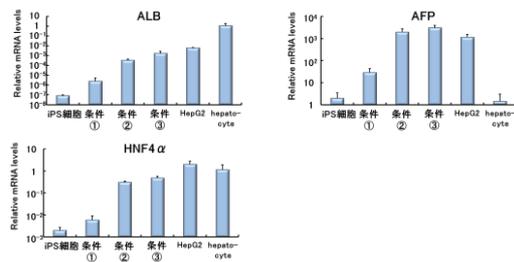


図1. 肝分化マーカー発現に対するDMSOの影響 条件①; 変法ランフォード培地、条件②; 1%DMSO添加変法ランフォード培地、③; HGF/OSM/DEX添加変法ランフォード培地 *発現量は、hepatocyteを1.0とした相対値

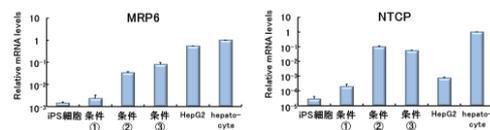


図2. トランスポーター発現に対するDMSOの影響 (図1と同様) *発現量は、hepatocyteを1.0とした相対値

現在、iPS細胞の肝分化誘導法にはHGFやOSMのような高価な試薬を使用する必要がある。そのため、分化効率の向上に加え、コストの削減は大きな課題となっている。今回、DMSOが、肝分化マーカーや薬物動態関連遺伝子発現量の上昇に寄与し、HGF/OSM/DEXに匹敵する肝分化効率を見出したことは非常に有益な成果が得られたと考える。

(2) 遺伝子導入による誘導法の改良

① 肝特異的転写因子群の導入

遺伝子導入による肝分化誘導法の改良は、iPS細胞の肝分化誘導過程にHNF6発現アデノウイルス(AdHNF6)を用いて検討を行った。肝分化誘導過程(25日間)のうち、①15日→18日、②19日→22日、③22日→25日、④19日→25日について感染時期を検討した結果、④の条件において、CYP3A4 mRNA発現量は、約1400倍の上昇が認められ、ヒト成人肝細胞におけるCYP3A4発現量の約1/10程度に達した(図3A)。さらに、HNF6遺伝子導入前には認められなかったテストステロンの6 β -水酸化活性を有することも確認された(図3B)。他のCYP分子種についてもmRNA発現量の測定を行ったところ、CYP1A2及びCYP3A7においてmRNA発現量の上昇が確認された(図4)。次に、c/EBP α 等の他の肝特異的転写因子についても検討を行ったが、HNF6遺伝子導

入ほどの効果が認められる遺伝子は、本研究期間内に同定されなかった。

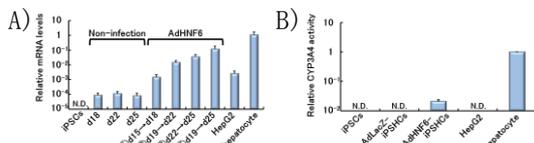


図 3. CYP3A4 mRNA 発現量 (A) 及び活性 (B) に対する HNF6 の影響
*発現量及び活性は、hepatocyte を 1.0 とした相対値

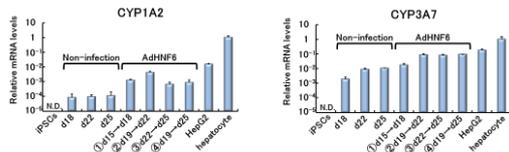


図 4. CYP 発現に対する HNF6 の影響
*発現量は、hepatocyte を 1.0 とした相対値

②マイクロ RNA の導入

胎児肝細胞と比較して成人肝細胞において発現量が高いことが報告されているマイクロ RNA (miRNA) について検討を行った。10 種類の miRNA を対象として、肝分化誘導過程に導入した結果、let-7c において、CYP3A4 mRNA 発現量の約 30 倍の上昇が認められた (図 5)。また、miR-99a、miR-125b、miR-192 についても CYP3A4 mRNA 発現量の上昇が確認された (図 5)。

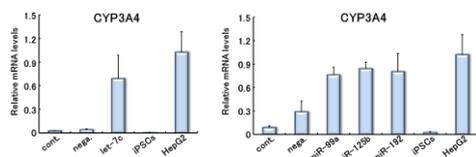


図 5. CYP 発現に対するマイクロ RNA の影響
cont. ; 肝分化 iPS 細胞、nega. ; ネガティブコントロール用 miR 導入肝分化 iPS 細胞
*発現量は、HepG2 細胞を 1.0 とした相対値

現在、種々の分化誘導法が報告されているが、酵素活性が測定可能なレベルまで薬物代謝酵素の発現量が増大した例は少ない。今回、HNF6 遺伝子導入によりヒト成人肝細胞において発現量が高い CYP3A4 の酵素活性が確認できたことは大きな成果であると言える。さらに、マイクロ RNA が iPS 細胞の肝分化誘導において新たな分化誘導因子なりうる可能性を明らかにしたことも本研究における成果であるとする。

(3) 分化誘導過程における肝幹細胞ストックの作製

「肝細胞への誘導」期間において、ROCK 阻

害剤の前処理後、トリプシン、アクターゼ、EDTA 等の剥離液を用いて、種々の条件下で剥離を行った。しかしながら、細胞生存率が低く、適切な剥離条件の設定が本研究期間内に確立できなかった。今後も本研究で得られた結果を基盤として、検討を進めていく予定である。

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 5 件)

(1) Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, 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., 28, 2013, 査読有

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

(2) Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S., Effects of hypoxia-inducible factor-1 α chemical stabilizer, CoCl₂(2) and hypoxia on gene expression of CYP3As in human fetal liver cells., Drug Metab. Pharmacokinet., 27, 2012, 398 - 404, 査読有

DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-074

(3) Kumagai T, Suzuki H, Sasaki T, Sakaguchi S, Miyairi S, Yamazoe Y, Nagata K., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Activate CYP3A4 Gene Transcription through Human Pregnane X Receptor., Drug Metab. Pharmacokinet., 27, 2012, 200 - 206, 査読有

DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-094

(4) Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M., Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan., Drug Metab. Pharmacokinet., 26, 2011, 516 - 522, 査読有

DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-046

(5) Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K., Progression of alcoholic and non-alcoholic

steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress., Drug Metab. Pharmacokinet., 26, 2011, 30 - 46, 査読有
DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-087

〔学会発表〕(計 16 件)

① Sasaki T、Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development、International Symposium for Neurosciences、2013年2月26日、仙台

② Sasaki T、MicroRNA enhances the expression of CYP genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、27th, JSSX annual meeting、2012年11月20日～22日、千葉

③ Kondo Y、Small Molecule Compounds Enhance Differentiation to Hepatocytes from induced Pluripotent Stem Cells、27th, JSSX annual meeting、2012年11月20日～22日、千葉

④ Numata Y、Identification of a novel transactivation mechanism of the MRP3 gene、27th, JSSX annual meeting、2012年11月20日～22日、千葉

⑤ 菅野 高弘、microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012年10月7日、青森

⑥ 沼田 喜弘、HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012年10月7日、青森

⑦ 齋藤 詩奈子、健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012年10月7日、青森

⑧ 小西 麻美子、健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2012年7月14日～15日、福岡

⑨ Takahashi S、Enhanced expression of cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、19th International Symposium on MDO/12th European regional

ISSX meeting、2012年6月17日～21日、Noordwijk aan Zee, The Netherlands

⑩ 佐々木 崇光、肝特異的転写因子 HNF-6 による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化 iPS 細胞樹立への応用、第 1 回東北薬科大学創薬研究センターシンポジウム、2012年5月19日、仙台

⑪ Sasaki T、Identification of a novel transactivation region of the MRP3 gene、International Symposium on PPF Molecular Pharmacokinetics、2012年1月17日、東京

⑫ Kumagai T、Indirubin, a component of Ban-Lan-Gen, activates CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor、26th, JSSX annual meeting、2011年11月16日～18日、広島

⑬ Sasaki T、Hepatocyte nuclear factor-6 enhances expression of CYP3A4 in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、26th, JSSX annual meeting、2011年11月16日～18日、広島

⑭ 安藤 寛美、凍結 P450 発現アデノウイルス感染細胞を用いた薬物代謝評価系の構築、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台

⑮ 菅原 亮輔、板藍根による CYP3A4 活性誘導の検討、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台

⑯ 山田 健太、iPS 細胞を用いた肝分化誘導法の検討、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 崇光 (SASAKI TAKAMITSU)
東北薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20382674