

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08341

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝細胞の極性形成誘導と薬物性肝障害モデルの構築

研究課題名(英文) Polarity formation of human iPS cell-derived hepatocytes and development of a system to evaluate drug-induced liver injury

研究代表者

鶴谷 康太 (Tsuruya, Kota)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00725377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性肝障害は様々な薬剤で発症することがある病態で、肝不全に至る例もあり、基礎疾患の治療の妨げとなる。本研究では、ヒトiPS細胞から高機能で適切な細胞極性を持つ肝細胞を誘導し、肝毒性評価系を構築した。肝機能を特に細胞極性を誘導する因子としてKLF15を発見し、KLF15の強制発現により、肝臓の代謝酵素(TAT、CPS1、CYP)の発現を強く誘導できた。さらに、3次元培養により薬物トランスポーター(MRP3、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3)の発現を大きく増加させた。このiPS細胞を用いた技術はDILI予測システムの基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、薬物性肝障害の予測と評価のための技術基盤を目的とする。高機能な肝細胞をヒトiPS細胞から誘導し、肝毒性評価システムを構築することで、医薬品開発の初期段階でのDILIリスクをより正確に予測可能となる。本研究では、ヒトiPS細胞へのKLF15の強制発現により、肝細胞の機能的成熟を促進する新たなアプローチを示した。この技術は、医薬品開発や再生医療や肝疾患の治療にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced liver injury (DILI) is a condition that can be induced by various drugs, leading to liver failure and hindering the treatment of underlying diseases. In this study, we induced high-functioning hepatocytes with appropriate cellular polarity from human induced pluripotent stem (iPS) cells and developed a system for hepatotoxicity assessment. We identified KLF15 as a factor capable of inducing liver function and cellular polarity. Forced expression of KLF15 significantly increased the expression of liver metabolic enzymes (TAT, CPS1, CYP). Additionally, differentiation induction in 3D culture using extracellular matrix significantly increased the expression of drug transporters (MRP3, OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3). This iPS cell-based technology contributes to the development of a system capable of predicting DILI.

研究分野：消化器内科学

キーワード：薬物性肝障害 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物性肝障害 (drug-induced liver injury; DILI) は様々な薬剤で発症し得る病態で、肝不全などを誘発し基礎疾患の治療の妨げになる。また医薬品開発中断の主要因の一つであり、in vitro で DILI 発症を正確に予測できれば医薬品開発のための費用は大幅に削減される。肝臓は類洞や毛細胆管を介した物質輸送と代謝の場であり、肝細胞が類洞に面した basolateral 側と毛細胆管に面した apical 側の細胞極性を有することが薬物代謝において必須の条件である。このような極性環境を再現した培養系の構築が求められている。

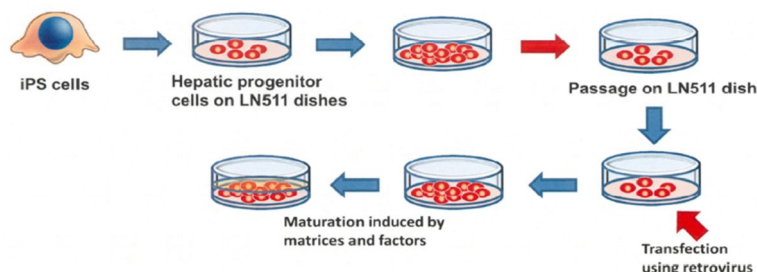
### 2. 研究の目的

細胞には極性があり、Apical 側の細胞膜は毛細胆管を形成し、Basolateral 側の類洞血管との指向性輸送を制御している。このような極性化や特定のトランスポーターの局在は、肝細胞の機能の成熟化と考えられている。胆汁うっ滞型の DILI は、薬物によるトランスポーターの活性阻害により発症し、細胞膜上に存在する様々な薬物・胆汁酸トランスポーターの発現量や局在などによって制御されている。ヒト臨床研究を行う前段階で外来薬物の肝障害活性を判別する目的で、ヒト肝培養細胞や初代肝細胞培養系等を用いた薬物動態・肝毒性解析が用いられている。しかし、ヒト肝培養細胞では薬物代謝酵素や薬物・胆汁酸トランスポーターの発現が低く、生体内の肝細胞の薬物代謝経路を十分に反映していない、またヒト初代肝細胞は移植ドナー肝臓の一部から採取するなど量が限られている、といった問題点がある。そこで、肝細胞の機能に加えてトランスポーターの極性などを再現できる系の開発が求められている。

また、薬物代謝においては代謝酵素の発現量の違いなど、個人差が大きいことが分かっている。個体差を反映した DILI 評価系の確立するため、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて、極性を有する培養系の確立、及び DILI 予測可能なシステムの構築を目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞を肝前駆細胞への分化は、Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System (タカラバイオ) を使用した。また、肝前駆細胞はラミニン 511 上で長期培養維持し、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞にレトロウイルスベクターを用いて KLF15 を過剰発現させ、解析を行った。



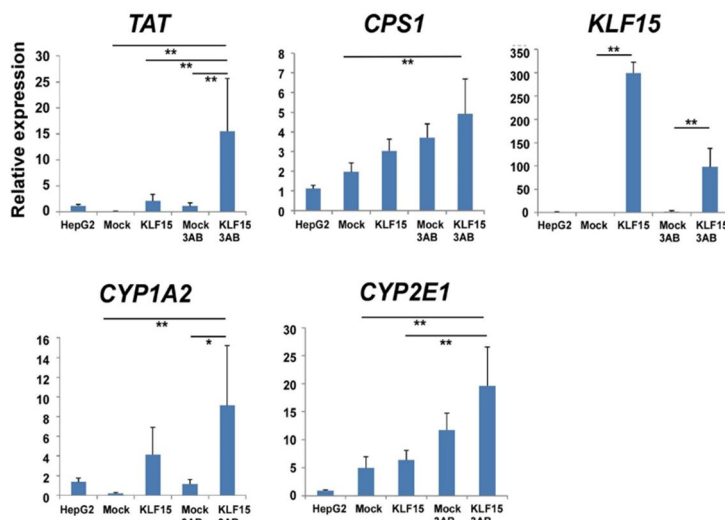
また、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞を細胞外マトリクス重層培養で分化させた後に低吸着培養皿上で 3 次元培養し凝集体を形成させることで、各種薬物トランスポーターの発現を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) KLF15 による肝機能の成熟化

KLF15 をレトロウイルスベクターを用いて過剰発現させ、Hepatocyte Maturation Medium (3AB, タカラバイオ) で肝成熟を誘導した。肝細胞マーカー遺伝子である ALB および HNF4 の mRNA の発現は、KLF15 の過剰発現の有無にかかわらず、肝成熟化によって顕著に誘導された。

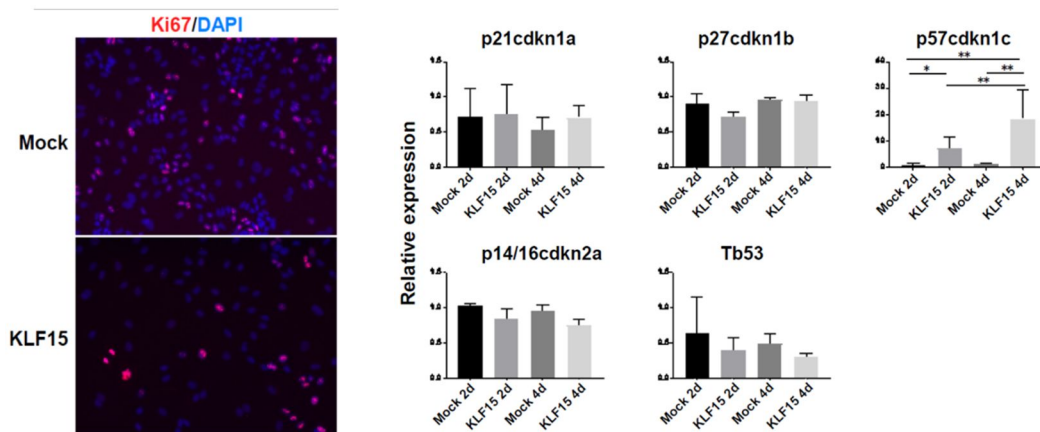
次に、TAT、CPS1、CYP1A2、および CYP2E1 の発現を分析した。KLF15 の過剰発現と肝成熟化により、肝細胞マーカーの発現がより高く誘導された。特に、TAT および CYP1A2 の発現は、肝成熟化単独と比較して KLF15 を誘導することによって顕著に増加した。したがって、これらの遺伝子は KLF15 によってより効率的に調節される可能性がある。これらの結果は、KLF15 がヒト肝細胞の分化誘導において重要な役割を果たすことを明らか



にした。

## (2) KLF15 の肝成熟のメカニズム

KLF15 を過剰発現したヒト iPS 由来肝前駆細胞の細胞増殖能を Ki67 の発現によって定量した。KLF15 はヒト iPS 由来肝前駆細胞の増殖を抑制した。細胞周期を制御する Cdk 阻害剤の発現変化を解析すると、KLF15 を過剰発現した肝芽細胞では、p57cdkn1c の発現が増加していた。KLF15 による前駆細胞の高い増殖能の抑制は、細胞の分化を誘導する重要な因子である可能性が示唆された。

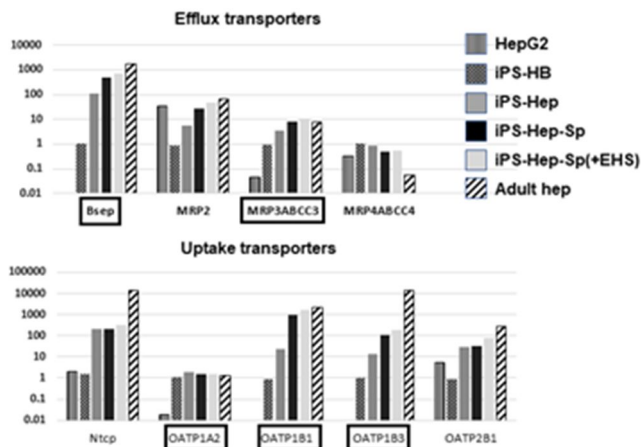


## (3) 3次元培養による肝トランスポーターの発現上昇

肝毒性に影響を与える種々の薬物・胆汁酸トランスポーターの一部は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 ではほとんど発現が見られない。

ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞を肝細胞系への成熟分化誘導 (iPS-Hep) によりトランスポーターの発現が大きく上昇した。

さらに、細胞外マトリクスを用いて 3 次元培養 (iPS-Hep-Sp) を行うことで、肝トランスポーターの発現を強く誘導することが可能であった。一方で、Ntcp などヒト初代肝細胞に比較し低発現のトランスポーターも存在した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Atsushi, Tsuji Keiji, Komiyama Yasuyuki, Tsuruya Kota, Kakisaka Keisuke, Tsutsui Akemi, Ichimoto Keiko, Ueno Masayuki, Okazaki Yuki, Kamimura Hiroteru, Takai Atsushi, Yamashiki Noriyo, Ito Takanori, Watanabe Masaaki, Abe Masanori, Harada Ken ichi, Kagawa Tatehiro	4. 巻 -
2. 論文標題 RECAM J 2023-Validation and development of the Japanese version of RECAM for the diagnosis of drug induced liver injury	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.14046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuruya Kota, Nishizaki Yasuhiro, Tatemichi Masayuki, Mishima Yusuke, Shimma Yoshimasa, Arase Yoshitaka, Hirose Shunji, Shiraiishi Koichi, Kagawa Tatehiro	4. 巻 12
2. 論文標題 The prevalence and natural history of hepatic cysts examined by ultrasound: a health checkup population retrospective cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16875-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Anzai Kazuya, Tsuruya Kota, Ida Kinuyo, Kagawa Tatehiro, Inagaki Yutaka, Kamiya Akihide	4. 巻 11
2. 論文標題 Kruppel-like factor 15 induces the development of mature hepatocyte-like cells from hepatoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97937-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鶴谷 康太, 紙谷 聡英, 加川 建弘
2. 発表標題 ヒト型胆汁酸組成を持つ進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) モデルマウス作成の試み
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴谷 康太, 滝川 一, 加川 建弘
2. 発表標題 薬物性肝障害発症リスクと薬物の用量、脂溶性の関係の解析
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴谷 康太, 荒瀬 吉孝, 加川 建弘
2. 発表標題 新しく提唱されたRECAMによる薬物性肝障害の評価
3. 学会等名 JDDW 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kota Tsuruya, Akihide Kamiya, Yusuke Mishima, Yoshitaka Arase, Akira Honda, Tatehiro Kagawa
2. 発表標題 Establishment of PFIC 3 mouse model carrying human-like bile acid composition by in vivo liver-specific gene deletion using adeno-associated virus and CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 AASLD The liver meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kota Tsuruya, Akihide Kamiya, Tatehiro Kagawa
2. 発表標題 Kruppel-like Factor 15 Induces the Development of Mature-type Hepatocytes from Progenitor Cells
3. 学会等名 APASL STC Osaka 2021 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------