

Title	新規創薬モデルの構築を目指したヒトES/iPS細胞由来肝細胞の創出基盤技術の開発
Author(s)	高山, 和雄
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/52249">https://hdl.handle.net/11094/52249</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 高山 和雄 )

## 論文題名

新規創薬モデルの構築を目指したヒトES/iPS細胞由来肝細胞の創出基盤技術の開発

## 論文内容の要旨

肝臓は薬物を代謝する主要な臓器であり、肝毒性の判明は薬物の開発中止・市場撤退の主たる原因のひとつである。1998年から2008年の間に毒性の判明により市場撤退となった薬物のうち、約30%が肝毒性を生じたことが報告されている。創薬後期や市販後において薬物の肝毒性が顕在化することで、膨大な開発費と時間が失われるだけでなく、多数の死者が出る危険性がある。多くの製薬企業では、ヒト初代培養肝細胞 (primary human hepatocyte ; PHH) を用いて候補薬物の毒性スクリーニングを実施することによって、肝毒性を起しうる候補薬物の同定を試みている。しかしながら、PHHはほとんど増殖能を持たず、ロット差や同一ロットの入手に制限があり、非常に高価であることから、大量の均質な細胞が必要となる大規模毒性スクリーニングに利用するのは難しい。そこで、ほぼ無限の増殖能と多分化能を有するヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cell ; human ES cell) およびヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell ; human iPS cell) からPHHと類似した機能を有する肝細胞を作製できれば、毒性スクリーニングにおいて非常に貴重なツールとなりうる。ヒトES/iPS細胞は中内胚葉細胞、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を経て分化誘導肝細胞へ分化する。各分化段階に適した液性因子を作用させることにより、ヒトES/iPS細胞から分化誘導肝細胞を選択的に分化誘導できる。しかしながら、近年の分化誘導肝細胞の詳細な解析を通して、分化誘導肝細胞は一部の肝機能を獲得しているものの、創薬応用するために重要な指標となる薬物代謝酵素シトクロムP450 (CYP) の活性等がPHHよりも大きく劣るという課題が露呈した。分化誘導肝細胞の有用性を高めるためには、薬物代謝能を始めとした各種肝機能をよりPHHに近づけることが急務となっている。本研究では、PHHに近い機能を有する分化誘導肝細胞をヒトES/iPS細胞から作製するために、遺伝子導入技術と三次元培養技術を駆使し、肝細胞への分化誘導法の改良を試みた。次に、大量の細胞が必要となる創薬応用を見据えて、分化誘導肝細胞の前駆細胞である肝幹前駆細胞を複製する技術の開発を行った。最後に、分化誘導肝細胞を用いてPHHの薬物代謝能・薬物応答能の個人差を反映した分化誘導肝細胞パネルの構築を試みた。

高い薬物代謝能を有する分化誘導肝細胞の作製するために、ヒトES/iPS細胞から分化誘導肝細胞へと分化途中の細胞に対して遺伝子導入効率に優れたアデノウイルスベクターを用いて肝関連転写因子を導入し、肝分化の促進を試みた(1-3)。ヒトES/iPS細胞から分化誘導肝細胞の分化過程において7種類の肝関連転写因子 (SOX17、FOXA2、HEX、HNF1 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ 、HNF4 $\alpha$ 、HNF6遺伝子) をそれぞれ導入し、薬物代謝能などの肝機能を最も向上できる転写因子を探索した。検討した7種類の肝関連転写因子のうち、FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を組み合わせることで導入することにより、最も薬物代謝能の高い分化誘導肝細胞が作製できることが明らかとなった。作製した分化誘導肝細胞における各種CYP遺伝子発現はPHHに匹敵することが確認できた。以上のことから、FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することにより、分化誘導肝細胞における薬物代謝能を向上できることが示唆された。

上述のように、ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化途中の細胞に対してFOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することで肝機能を向上できたが、より広範なin vitro毒性評価系への応用には、より一層高い肝機能を有した分化誘導肝細胞の作製技術の開発が必要となる。そこで、ナノピラープレート (日立ハイテクノロジーズ社) を用いて三次元培養を行うことで、より高い肝機能を持つ分化誘導肝細胞の作製を試みた(4)。ヒトES/iPS細胞由来の肝幹前駆細胞をナノピラープレートに播種し、スフェロイドを形成させたのち培養し、CYP2C9、3A4活性を測定した。また、肝毒性を示す化合物を分化誘導肝細胞に作用させ、細胞毒性を生じるか調べた。単層培養した分化誘導肝細胞と比較し、三次元培養した分化誘導肝細胞は、CYP2C9、3A4活性がそれぞれ1.6倍、1.3倍程度上昇した。ベンゾプロマロンやアフラトキシンなどの肝毒性を引き起こす化合物を作用させたところ、三次元培養した分化誘導肝細胞は平面培養した分化誘導肝細胞よりも感度良く細胞毒性を示した。以上の結果から、ナノピラープレート上で分化誘導肝細胞は平面培養した分化誘導肝細胞よりも薬物代謝能が高く、毒性スクリーニングに応用できる可能性が高いことが示唆された。

分化誘導肝細胞を毒性スクリーニングなどの創薬に応用するためには、細胞を大量に供給できるシステムの構築が必須である。現在の肝細胞分化誘導法では、ヒトES/iPS細胞から肝細胞を分化誘導するためには複数のステップ（通常3ステップ以上）を経て、長期間（通常3週間以上）分化誘導する必要がある。肝幹前駆細胞を複製する技術が開発されれば、1ステップ、短時間で分化誘導肝細胞を調製できるようになる。そこで、我々はヒトES/iPS細胞由来の肝幹前駆細胞の複製に適した細胞外基質の探索を行った(5)。種々のラミニンアイソフォーム上で肝幹前駆細胞を培養した結果、ラミニン111 (LN111) を用いることによってalpha-1-fetoprotein陽性の肝幹前駆細胞を増殖・維持できることを発見した。作製した肝幹前駆細胞はLN111上で15回継代可能であり、細胞数にして10<sup>10</sup>倍まで増加可能であった。また、作製された肝幹前駆細胞はalbumin陽性の肝細胞、CK19陽性の胆管上皮細胞へと分化する能力を有していた。さらに、肝幹前駆細胞を四塩化炭素投与した免疫不全マウスに移植したところ、マウス肝臓において分化誘導肝細胞の生着が確認された。以上の結果より、LN111を用いることによって、ヒトES/iPS細胞から2分化能および自己複製能を有する肝幹前駆細胞を複製できることが示唆された。本技術を用いることによって、大量の分化誘導肝細胞を迅速に調製可能になると考えられる。

肝細胞における薬物代謝酵素活性の個人差は、個々人における薬効や副作用の有無（程度）に大きな影響を及ぼす。肝細胞における薬物代謝の中心を担うCYPには遺伝的な多型が存在しており、一部の多型では完全にそのCYPの活性が消失することが知られている。従来の血液細胞を用いた患者のCYPの一塩基多型（SNP）解析では既知のSNPの判定は可能であるが、患者の肝細胞における薬物代謝能や薬物応答能を正確に把握することはできない。ヒトiPS細胞から作製した肝細胞を用いて薬物代謝能や薬物応答能の個人差を予測できるのではないかと考えられているが、実際にそれを証明した報告はない。そこで、我々は12ドナーのPHHからiPS細胞を介して分化誘導肝細胞を作製し、PHHと分化誘導肝細胞の間で薬物代謝能と薬物応答能を比較することで、分化誘導肝細胞が元の個人の情報を反映した肝機能を有するかどうか調べた(6)。また、CYP2D6活性がほぼ消失するSNPを有する個人（poor metabolizer ; PM）のPHHからiPS細胞を経由して分化誘導肝細胞を作製し、分化誘導肝細胞においてPMの表現型がin vitroで再現できるか検討した。PHHの薬物代謝能と分化誘導肝細胞の薬物代謝能の間で強い相関を示していたことから、分化誘導肝細胞は元の個人のPHHの薬物代謝能の個性を保持していることが示唆された。また、PMから作製した分化誘導肝細胞は、PM由来のPHHと同様にほぼCYP2D6活性が消失していた。したがって、分化誘導肝細胞においてPMの表現型がin vitroで再現できることが示唆された。以上のことから、我々は薬物代謝能・薬物応答能の個人差を反映した分化誘導肝細胞パネルを作製できた。

本研究により、ヒトES/iPS細胞から肝細胞へのより良い分化誘導技術が開発でき、PHHに近い肝機能を有した分化誘導肝細胞を作製することが可能になった。ヒトiPS細胞はあらゆる個人（患者）から樹立可能であるため、他の評価系（肝がん由来細胞株やPHHなど）にはない多大なる可能性を秘めている。今後、ヒトiPS細胞技術を用いた創薬応用研究がさらに加速し、革新的な医薬品を患者に届けられる日が一日でも早く訪れることを期待する。

#### 参考文献

1. Takayama K, *et al.* (2011) Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One* 6(7):e21780.
2. Takayama K, *et al.* (2012) Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. *Mol Ther* 20(1):127-137.
3. Takayama K, *et al.* (2012) Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1alpha transduction. *J Hepatol* 57(3):628-636.
4. Takayama K, *et al.* (2013) 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 34(7):1781-1789.
5. Takayama K, *et al.* (2013) Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. *Stem Cell Reports* 1(4):322-335.
6. Takayama K, *et al.* (2014) Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(47):16772-16777.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 高山和雄 )	
(職)	氏 名
主 査	教 授 水口 裕之
副 査	教 授 土井 健史
副 査	教 授 橋本 均

## 論文審査の結果の要旨

肝臓は薬物を代謝する主要な臓器であり、肝毒性の判明は薬物の開発中止・市場撤退の主たる原因のひとつである。創薬後期や市販後において薬物の肝毒性が顕在化することで、膨大な開発費と時間が失われるだけでなく、多数の死者が出る危険性がある。そのため、多くの製薬企業では、ヒト初代培養肝細胞（primary human hepatocyte ; PHH）を用いて候補薬物の毒性スクリーニングを実施することによって、肝毒性を起こしうる候補薬物の同定を試みている。しかしながら、PHHはほとんど増殖能を持たず、ロット差や同一ロットの入手に制限があり、非常に高価であることから、大量の均質な細胞が必要となる大規模毒性スクリーニングに利用するのは難しい。そこで、ほぼ無限の増殖能と多分化能を有するヒトES/iPS細胞からPHHと類似した機能を有する肝細胞を作製できれば、毒性スクリーニングにおいて非常に貴重なツールとなりうる。しかしながら、近年の分化誘導肝細胞の詳細な解析を通して、分化誘導肝細胞は一部の肝機能を獲得しているものの、創薬応用するために重要な指標となる薬物代謝酵素シトクロムP450（CYP）の活性等がPHHよりも大きく劣るという課題が露呈した。分化誘導肝細胞の有用性を高めるためには、薬物代謝能を始めとした各種肝機能をよりPHHに近づけることが急務となっている。そこで、申請者は肝細胞分化誘導技術の改良とその応用法の開発に取り組み、以下の結果を得た。

（1）本研究では、PHHに近い機能を有する分化誘導肝細胞をヒトES/iPS細胞から作製するために、遺伝子導入技術と三次元培養技術を駆使し、肝細胞への分化誘導法の改良を試みた。FOXA2、HNF1α 遺伝子を分化途中の細胞に遺伝子導入し、ナノピラープレートを用いて三次元培養することによって、PHHに類似した薬物代謝酵素遺伝子の発現量を有する分化誘導肝細胞を作製できるようになった。

（2）大量の細胞が必要となる創薬応用を見据えて、分化誘導肝細胞の前駆細胞である肝幹前駆細胞を複製する技術の開発を行った。LN111を用いることによって、ヒトES/iPS細胞から2分化能（肝細胞・胆管上皮細胞への分化能）および自己複製能を有する肝幹前駆細胞を複製できることを見出した。

（3）分化誘導肝細胞を用いてPHHの薬物代謝能の個人差を反映した分化誘導肝細胞パネルの構築を試みた。PHHの薬物代謝能と分化誘導肝細胞の薬物代謝能の間で強い相関を示していたことから、分化誘導肝細胞は元の個人のPHHの薬物代謝能の個性を保持していることが示唆された。したがって、薬物代謝能の個人差を反映した分化誘導肝細胞パネルを作製できる可能性が示された。

本研究により、ヒトES/iPS細胞から肝細胞へのより良い分化誘導技術が開発でき、PHHに近い肝機能を有した分化誘導肝細胞を作製することが可能になった。今後、医薬品開発のためのヒトiPS細胞技術を用いた新規薬物評価系の創出に大きく貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。