

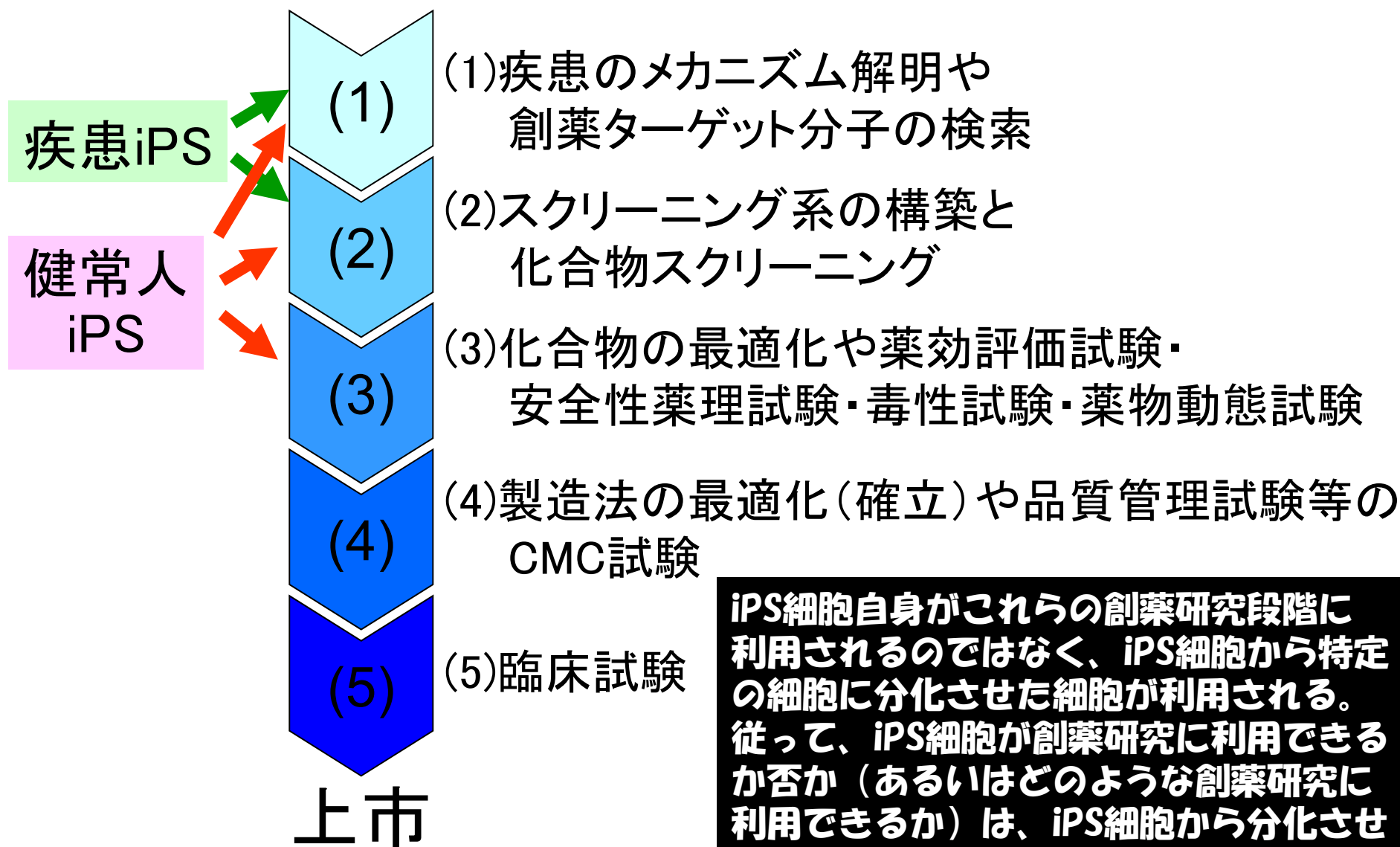
ヒト iPS細胞由来肝細胞の創出と 肝毒性・薬物動態評価系への応用

大阪大学大学院薬学研究科
分子生物学分野
附属創薬研究センター-創薬基盤技術開発
iPS肝毒性・代謝ユニット

水口 裕之

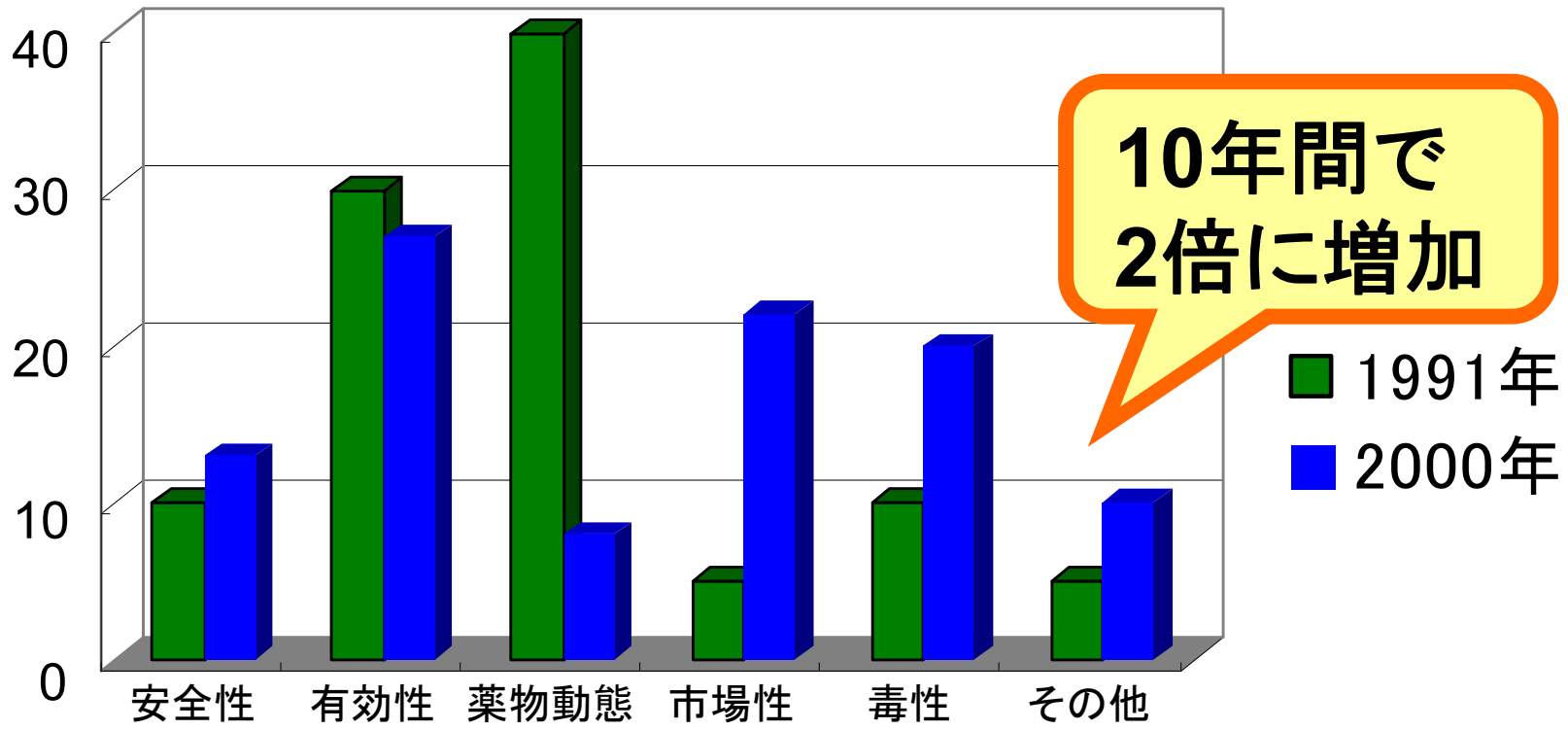
- ① **イントロダクションと遺伝子導入技術を用いた
ヒトiPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法**
- ② **3次元スフェロイド培養技術との組み合わせと薬物毒性評価**
- ③ **さらに高機能なiPS細胞由来分化誘導肝細胞の作製を目指して
—肝細胞由来iPS細胞の利用—**
- ④ **iPS細胞由来分化誘導肝細胞の大量増幅に向けて
—肝幹前駆細胞の維持・増幅—**

医薬品開発の流れとiPS細胞技術



iPS細胞自身がこれらの創薬研究段階に利用されるのではなく、iPS細胞から特定の細胞に分化させた細胞が利用される。従って、iPS細胞が創薬研究に利用できるか否か(あるいはどのような創薬研究に利用できるか)は、iPS細胞から分化させた細胞の“**分化度**”に大きく依存!

創薬プロセスにおける開発中止理由



Nature Reviews Drug Discovery (2004)

Phase II failures: 2008-2010.

The 108 failures are divided according to reason for failure when reported (87 drugs).

- Efficacy 51%
- Strategic 29%
- Safety 19%**
- PK/PD 1%

Nature Reviews Drug Discovery (2011)

ヒト肝細胞を用いた毒性評価の現状と問題点

<背景>



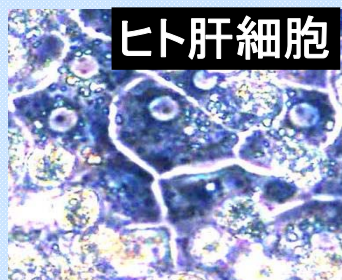
多くの薬物(95%以上)は肝臓で代謝

(薬剤によっては)肝障害を示す危険性あり
医薬品の開発中止、販売中止に至る主要原因

<現状>

ヒトでの薬効や副作用
ならびに薬物相互作用を
予測することが可能

ヒト肝細胞を用いた
毒性評価は多くの
製薬企業で実施



ヒト肝細胞

医薬品開発の初期に
ヒト肝細胞を利用

初代培養ヒト肝細胞を用いた毒性評価の問題点

- (1) 高価 (数千万～一億円以上? /年/会社)
- (2) ロット間のバラツキ (再現性のある評価が困難)
- (3) 培養中の機能低下 (薬物代謝酵素等)

iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた毒性評価の可能性

均一なロット・機能を有した肝細胞を
安定に、大量に、比較的安価に
調製できる

ヒトiPS細胞から肝細胞への
効率の良い分化誘導技術の開発が必須!

薬物代謝酵素と肝毒性



薬物代謝酵素には種差が存在
↓
ヒト肝細胞での評価が必須！

親化合物が毒性を持つかもしれない？

■■■ A化合物

代謝産物が毒性を持つかもしれない？

■■■ B化合物

C化合物

排泄

第一相薬物代謝酵素
(Cytochrome P450; CYP)
(代謝)

第二相薬物代謝酵素
(抱合系)

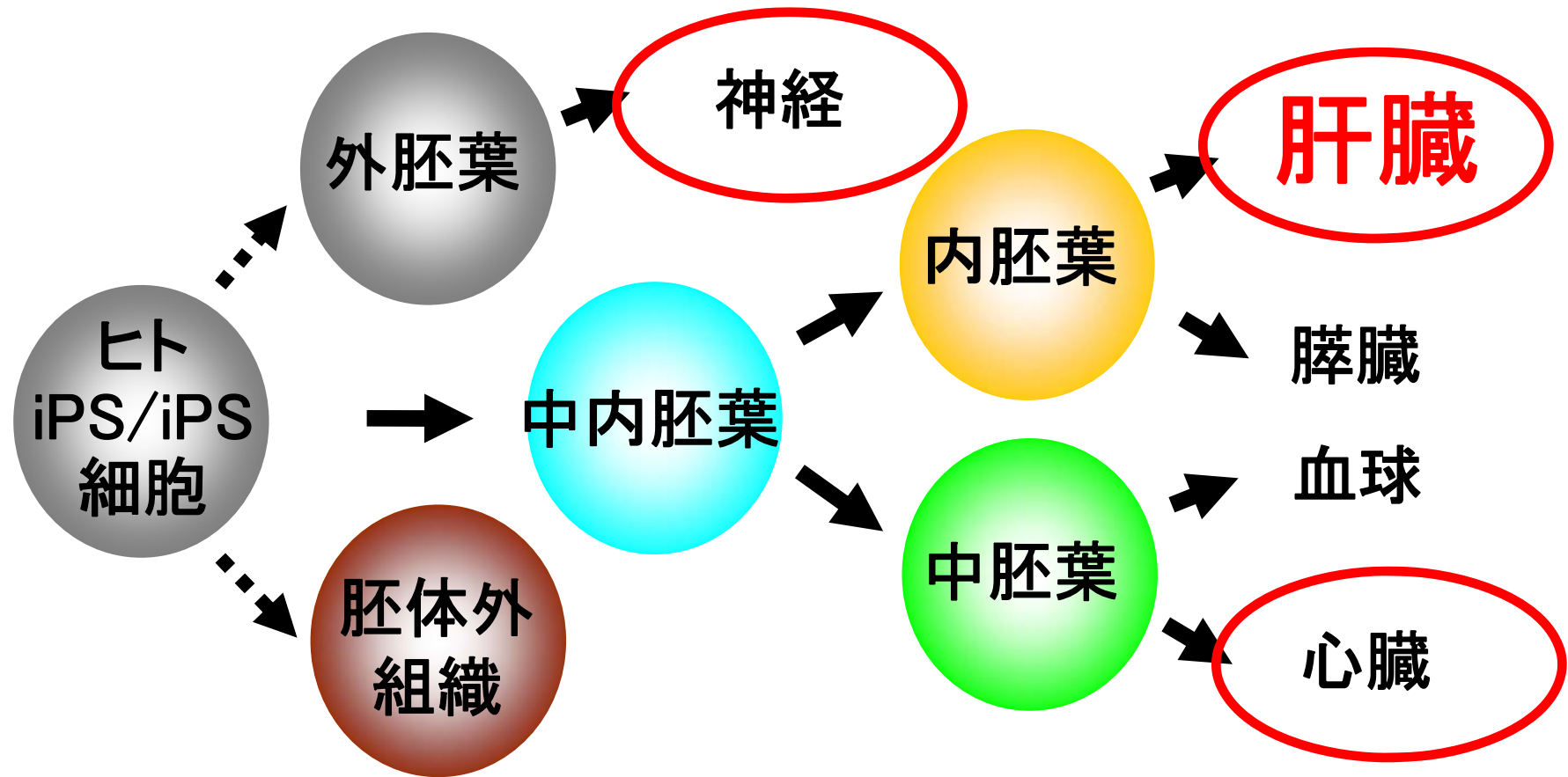
第三相薬物代謝酵素
(トランスポーター)



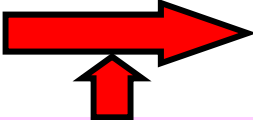
薬物代謝酵素の活性を誘導したり、
阻害したりする薬剤の開発を避けたい
↓
特に酵素誘導評価系の開発が望まれている



ヒトiPS細胞から肝臓、心臓、神経細胞への分化誘導



分化誘導効率

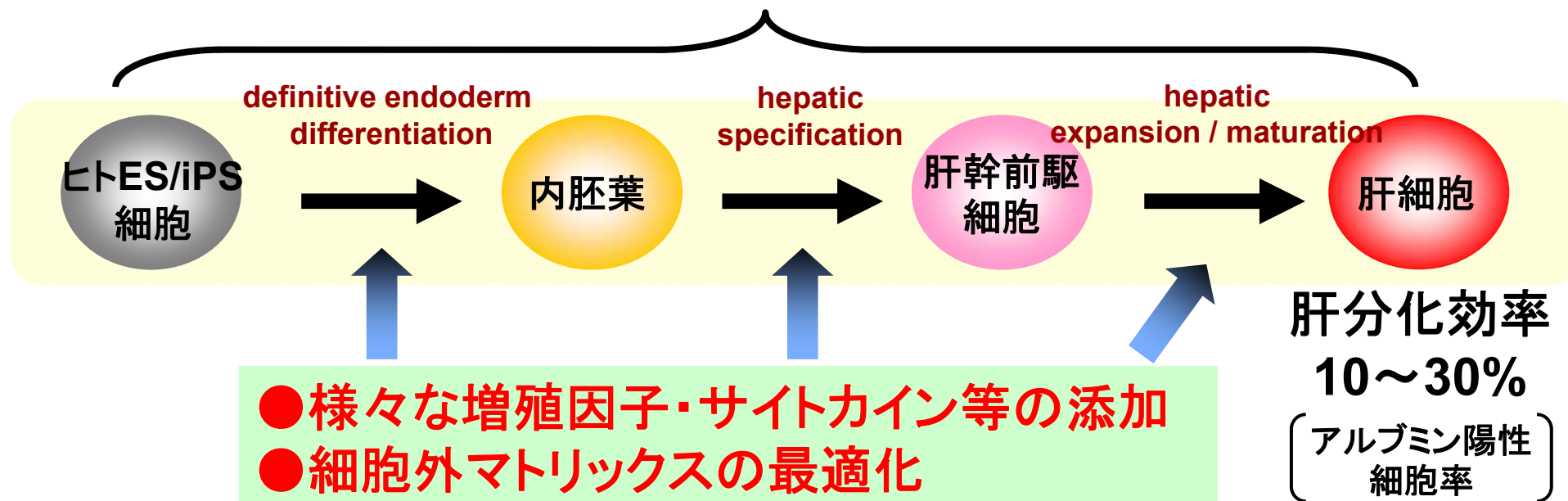
従来 10~30%  70~90%

- ・新たな細胞分化誘導技術
- ・最適なiPS細胞クローンの選択

ヒトES細胞やヒトiPS細胞から 肝細胞への分化誘導の問題点

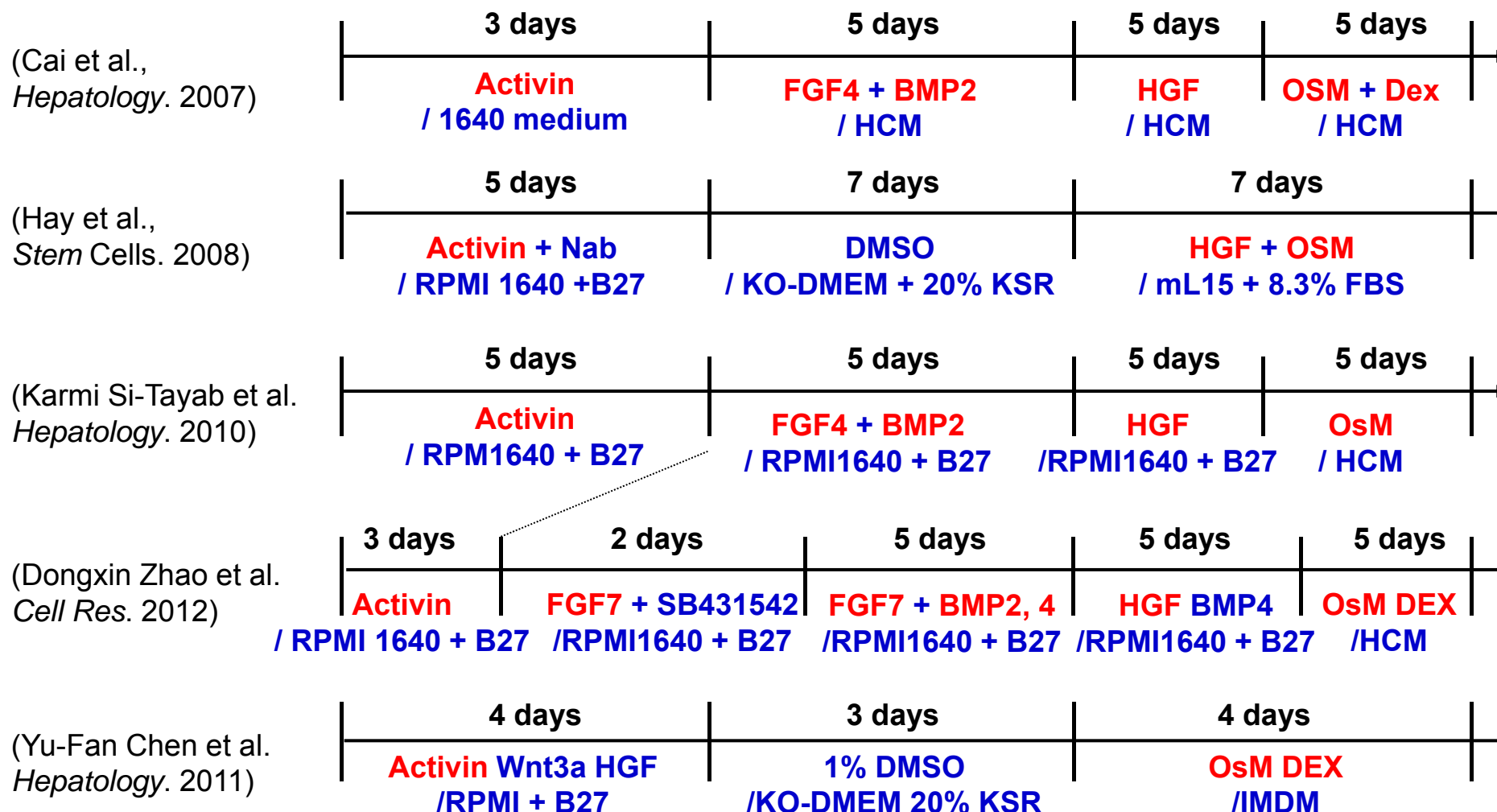
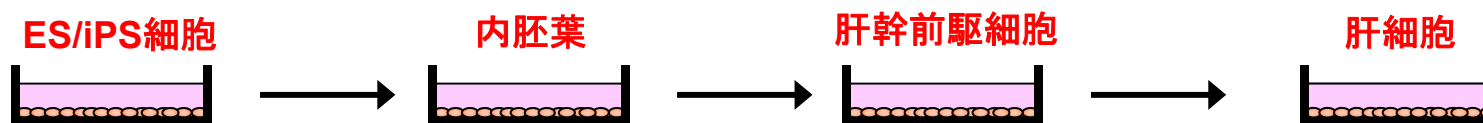
- ・分化効率が低い
- ・分化誘導肝細胞の薬物代謝能がヒト肝細胞と比べて大きく劣る
- ・分化誘導肝細胞が胎児型の性質を有したままである

3週間から5-6週間



分化機構の解明および分化効率の改善を試みる

代表的な肝細胞への分化誘導法



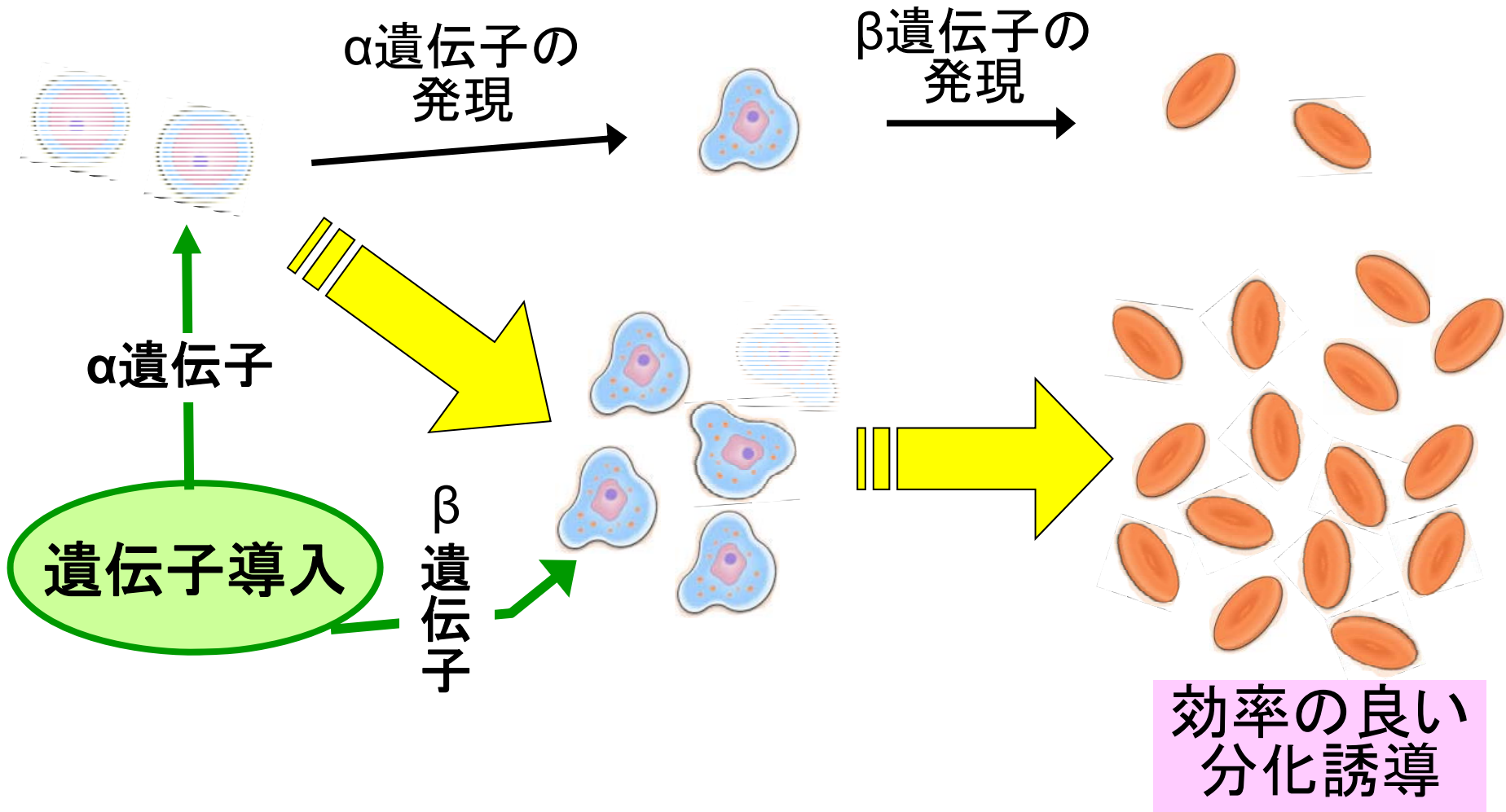
* HCM: 組成不明な初代培養肝細胞向け培地 B27: 血清代替物

機能遺伝子の導入による高効率分化誘導

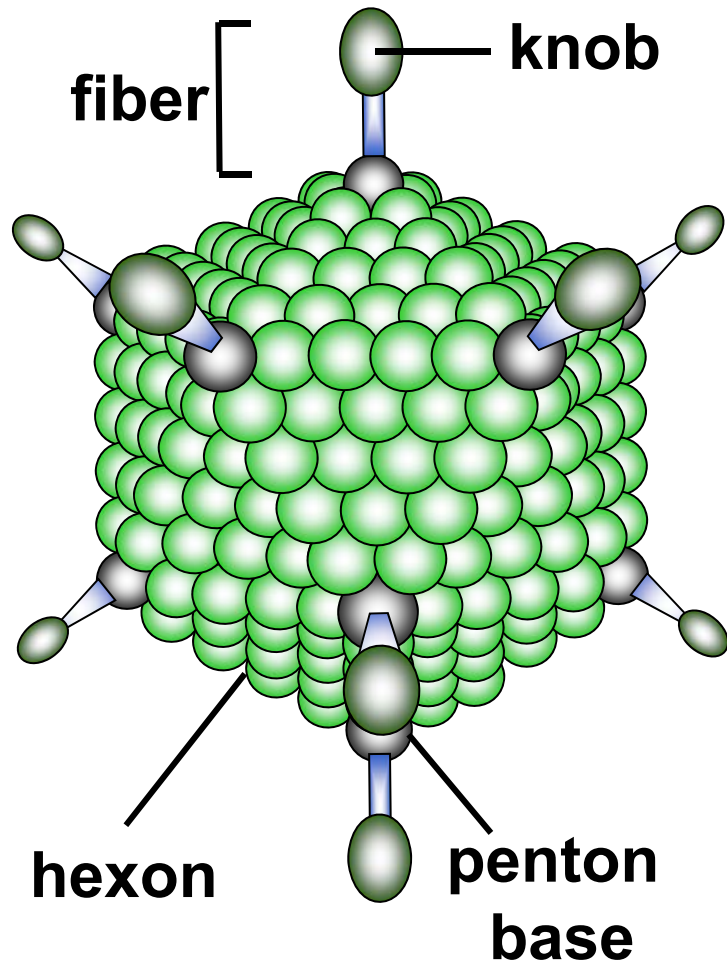
幹細胞

前駆細胞

分化した細胞

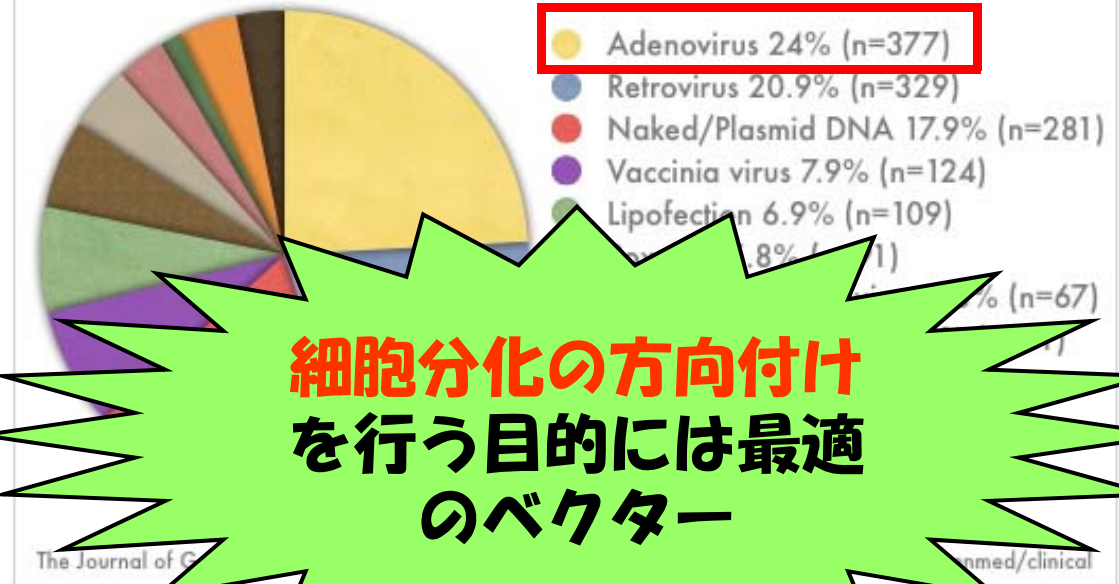


アデノウイルスベクター



直径 ; 80-90 nm

遺伝子治療臨床研究で用いられているベクター



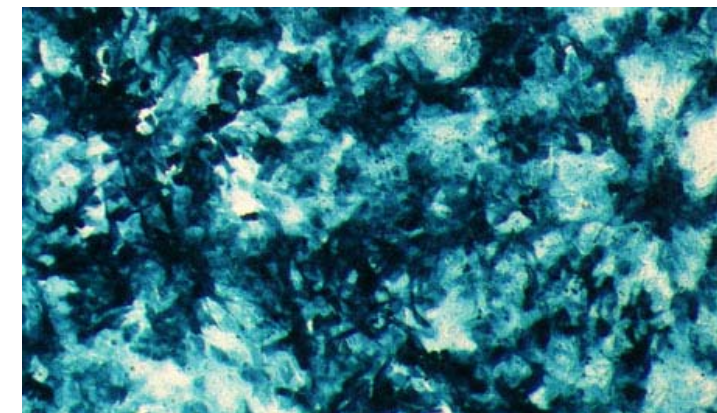
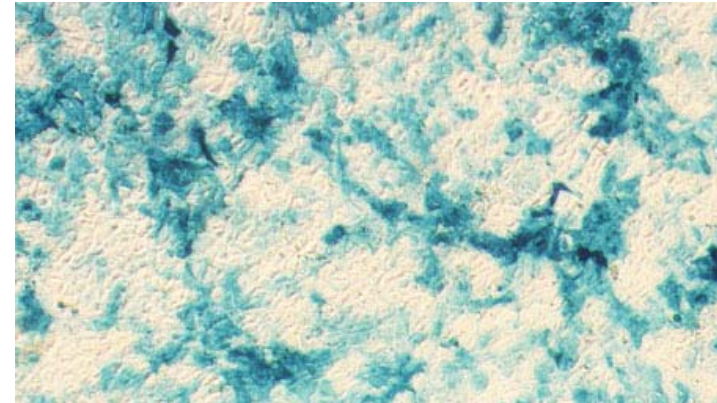
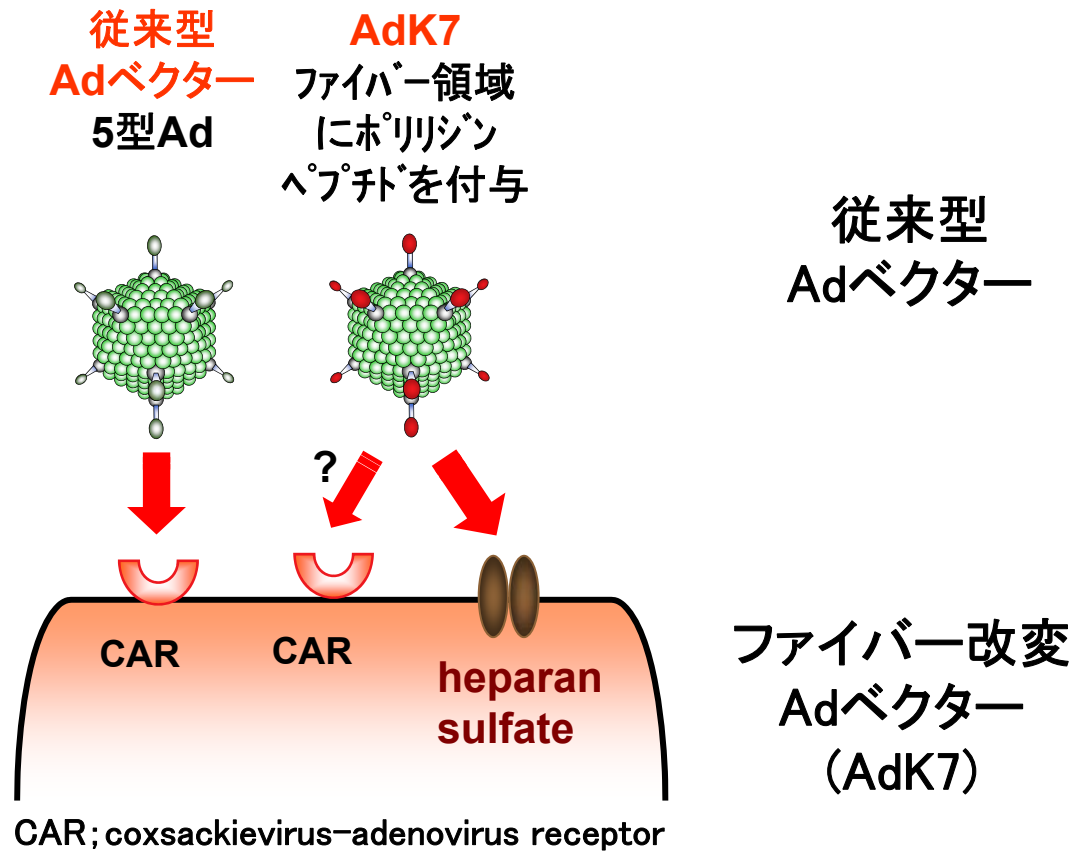
細胞分化の方向付け
を行う目的には最適
のベクター

長所

- 1) 既存のベクターの中では最も高い遺伝子導入効率を示す。
- 2) 高タイトルのベクターが得られる(他のウイルスベクターに比べ1000倍以上の収量)。
- 3) 遺伝子毒性(染色体への遺伝子挿入に伴う癌化など)を示さず、一過性の遺伝子発現を示す。

改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入

ヒトiPS細胞由来内胚葉への高効率遺伝子導入



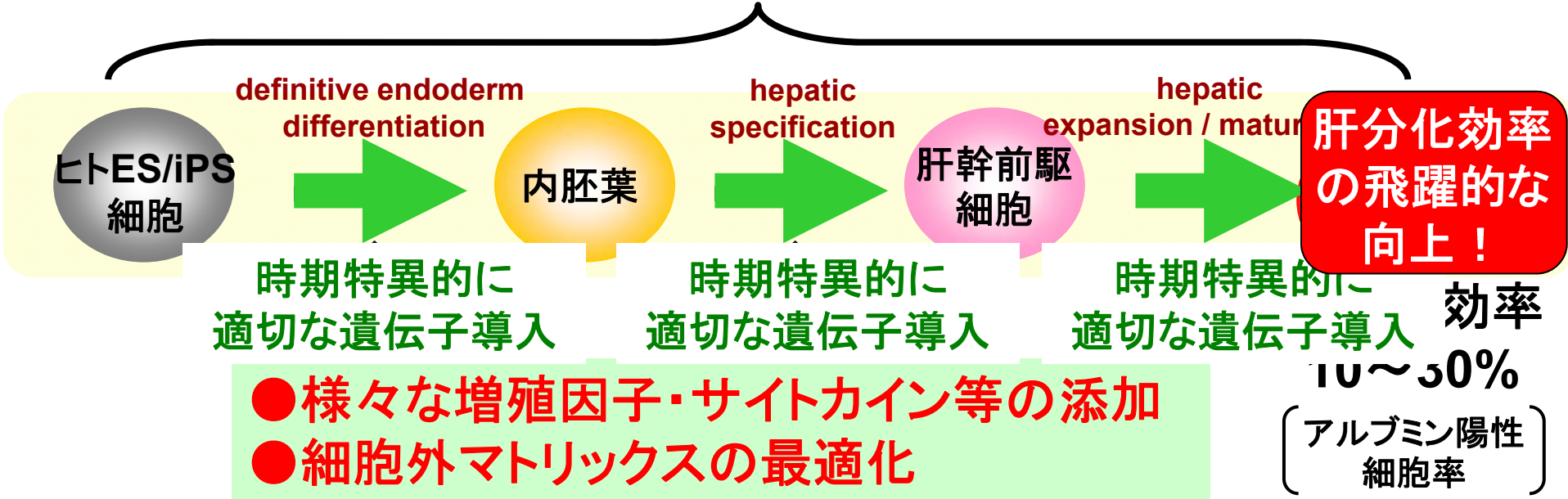
ファイバー領域にポリリジン(K7)ペプチドを遺伝子工学的に付与したファイバー改変Adベクターを用いることで、ほぼ全てのヒトES/iPS由来細胞に高効率な遺伝子導入が可能

ヒトES細胞やヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導の問題点

- ・分化効率が低い
- ・分化誘導肝細胞の薬物代謝能がヒト肝細胞と比べ低い
- ・分化誘導肝細胞が胎児型の性質を有したままである

発生段階の細胞分化で発現する遺伝子を順次導入することが可能に！

3週間から5-6週間



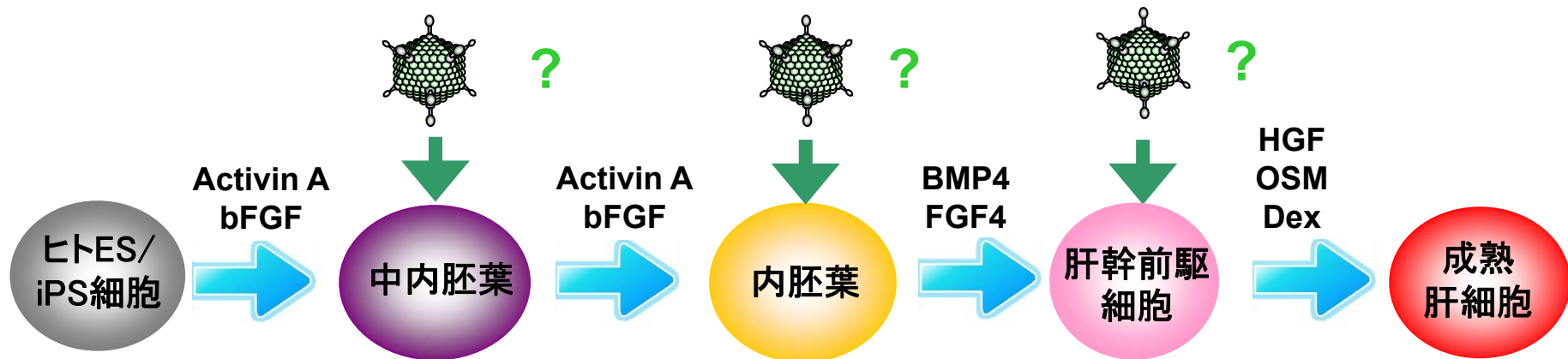
分化機構の解明および分化効率の改善を試みる

肝分化に関連する転写因子のスクリーニング

質の高い(薬剤代謝能が高い・酵素誘導能が高い)
肝細胞をヒトES/iPS細胞から作製する



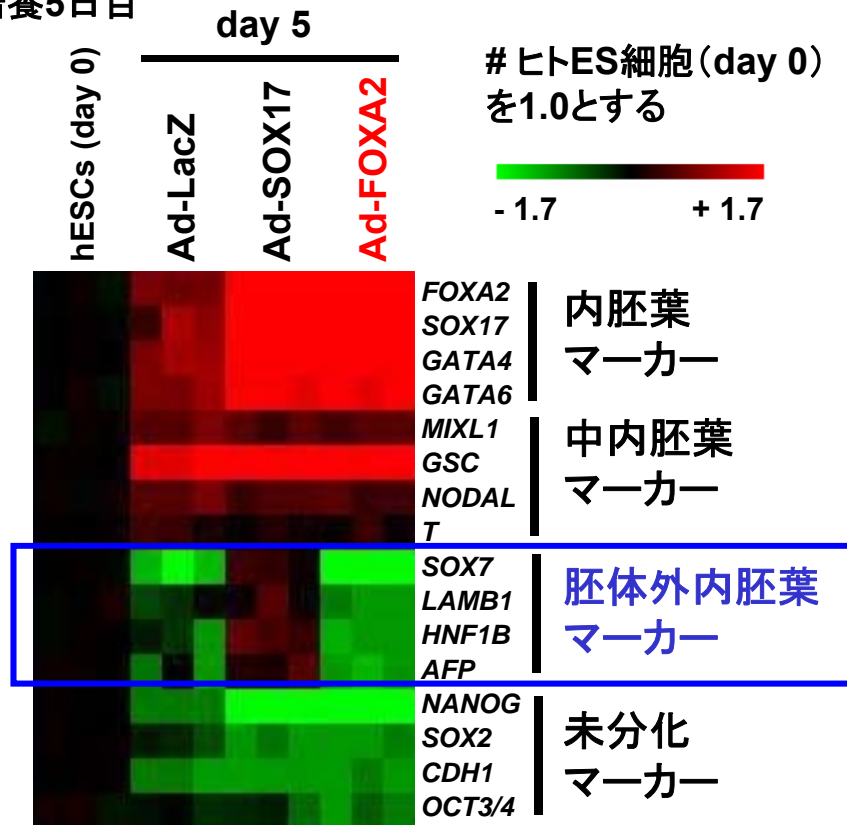
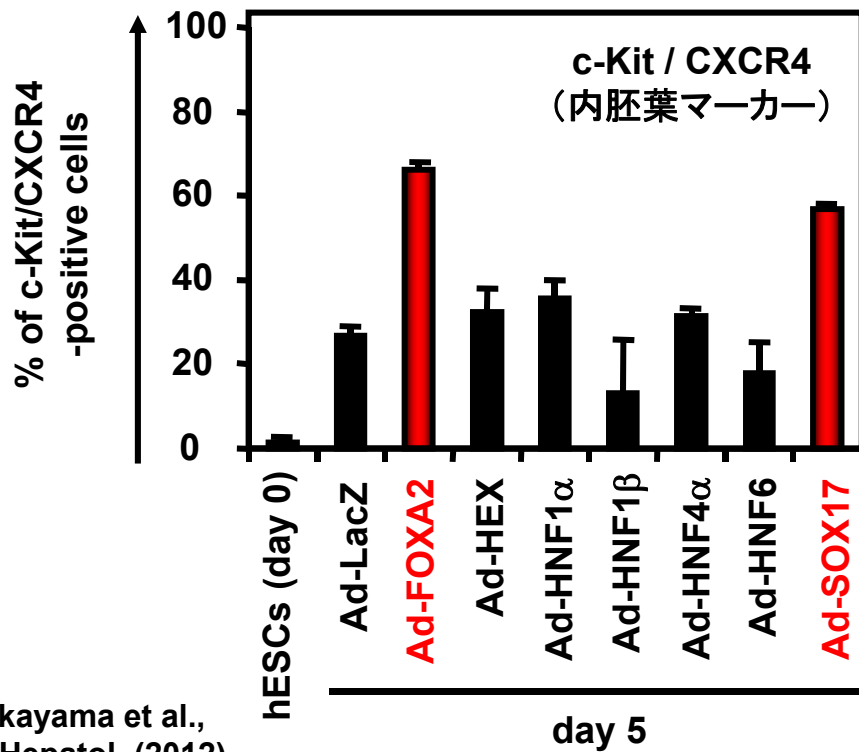
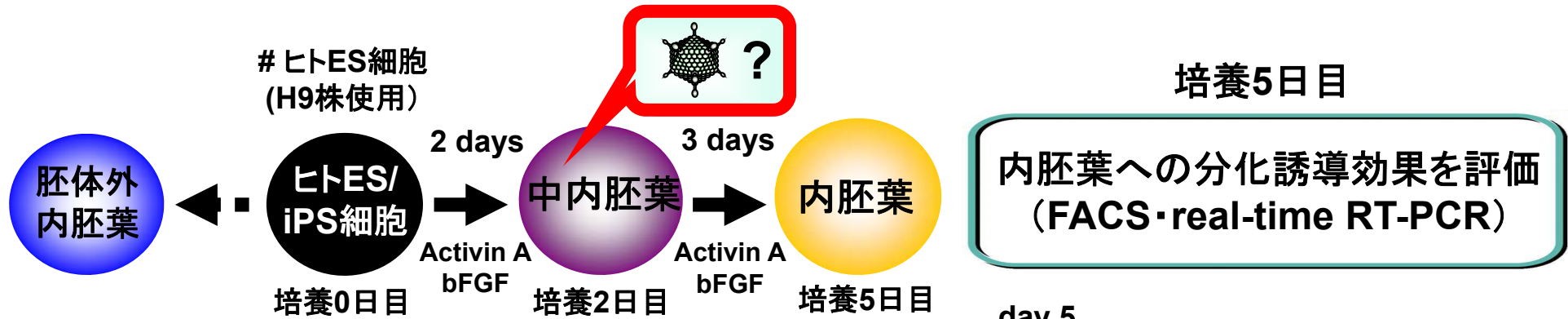
肝分化を促進可能な転写因子を
スクリーニングにより探索する



候補遺伝子(7種類)

FOXA2, SOX17, HEX, HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , HNF6

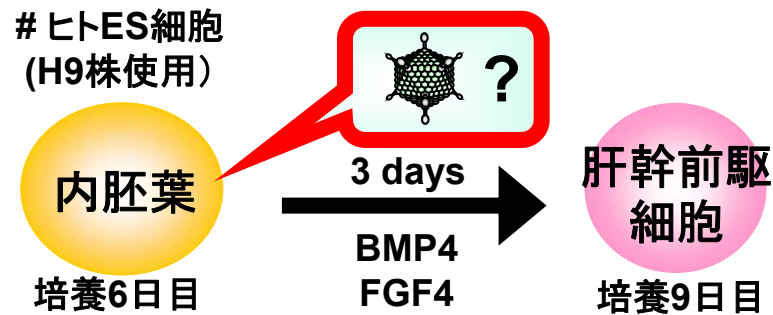
内胚葉分化を促進する転写因子の探索



Takayama et al.,
J. Hepatol. (2012)

FOXA2遺伝子導入により、最も効率良く内胚葉分化を促進可能であった

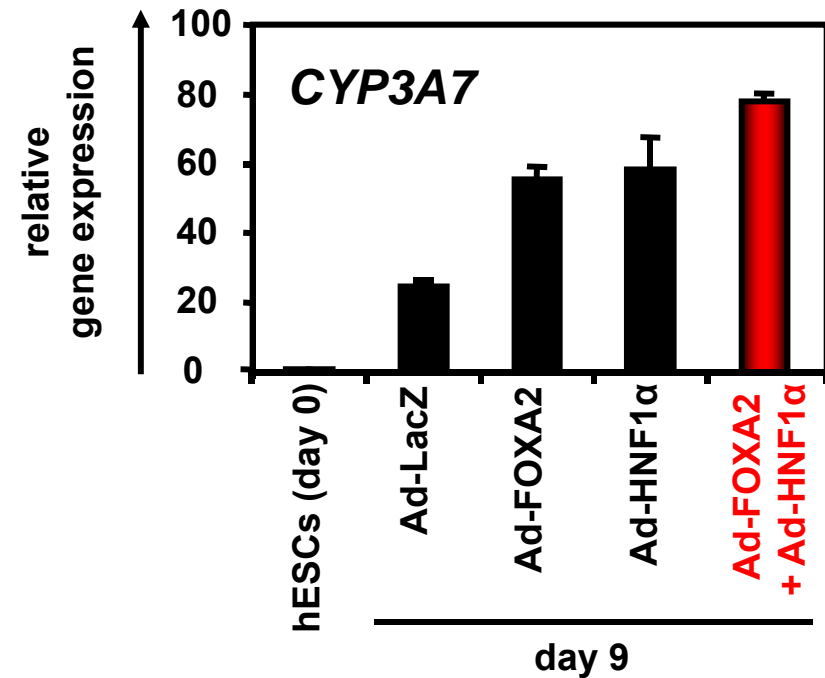
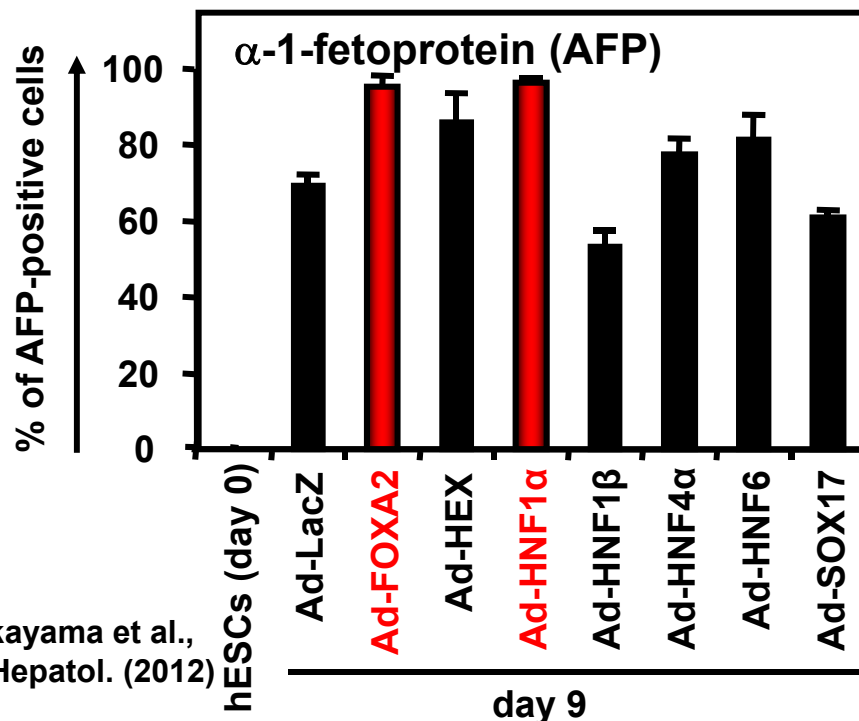
肝幹前駆細胞への分化を促進する 転写因子の探索



培養9日目

肝幹前駆細胞への分化誘導効果を評価
(FACS · real-time RT-PCR)

AFP、CYP3A7はいずれも肝幹前駆細胞マーカー
ヒトES細胞 (day 0) を1.0とする



Takayama et al.,
J. Hepatol. (2012)

FOXA2、HNF1α遺伝子を導入することにより、
さらに効率良く肝幹前駆細胞への分化を促進可能であった

肝成熟化を促進する転写因子の探索

ヒトES細胞
(H9株使用)



肝幹前駆
細胞

培養9日目

11 days

HGF
OSM
Dex

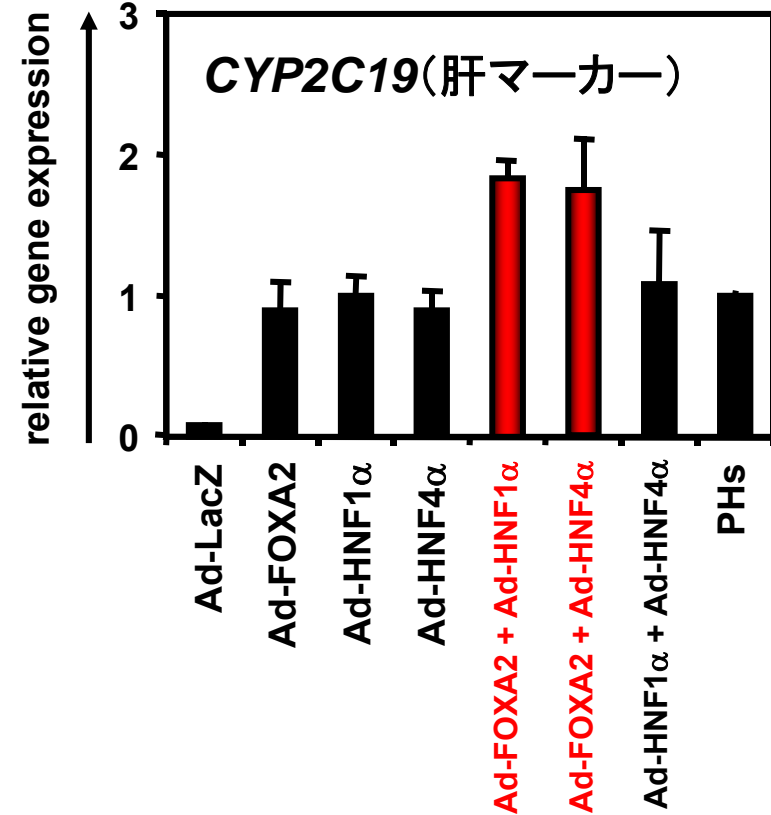
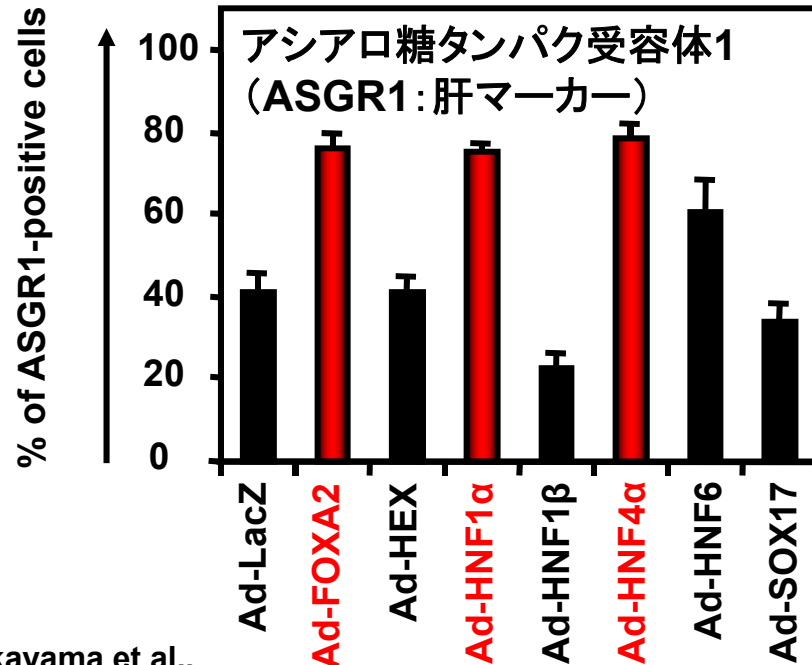
成熟
肝細胞

培養20日目

培養20日目

肝細胞への分化誘導効果を評価
(FACS · real-time RT-PCR)

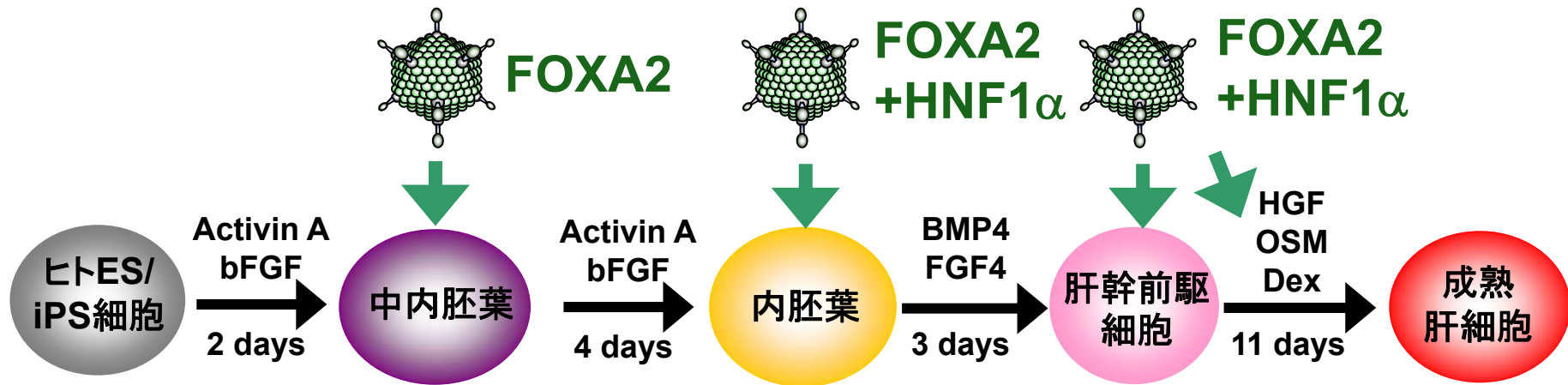
48時間培養したヒト初代培養肝細胞
(primary human hepatocytes : PHs)を1.0とする



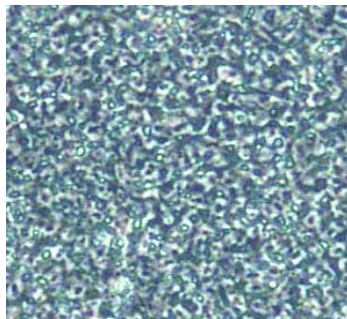
Takayama et al.,
J. Hepatol. (2012)

FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することにより、
効率良く肝成熟化を促進可能であった

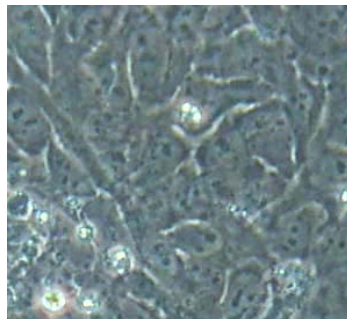
プロトコールのまとめと細胞の形状



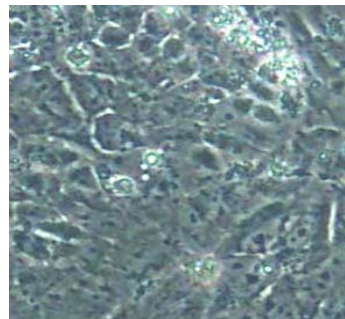
培養0日目



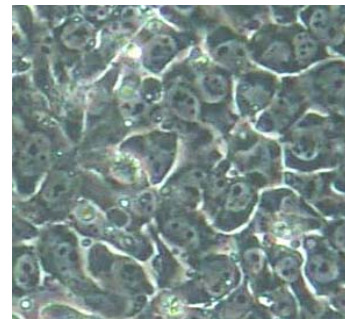
培養6日目



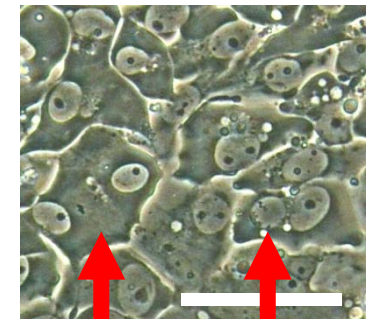
培養9日目



培養15日目



培養20日目

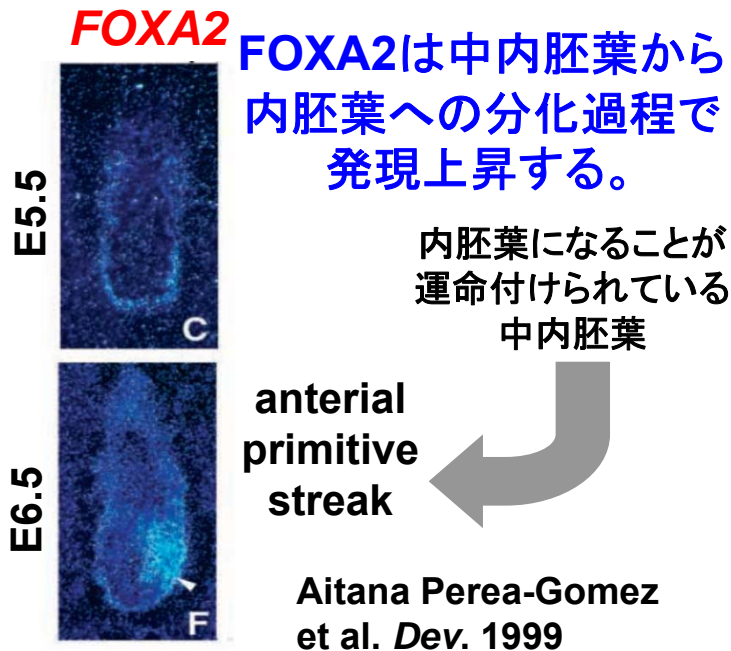


2核の細胞

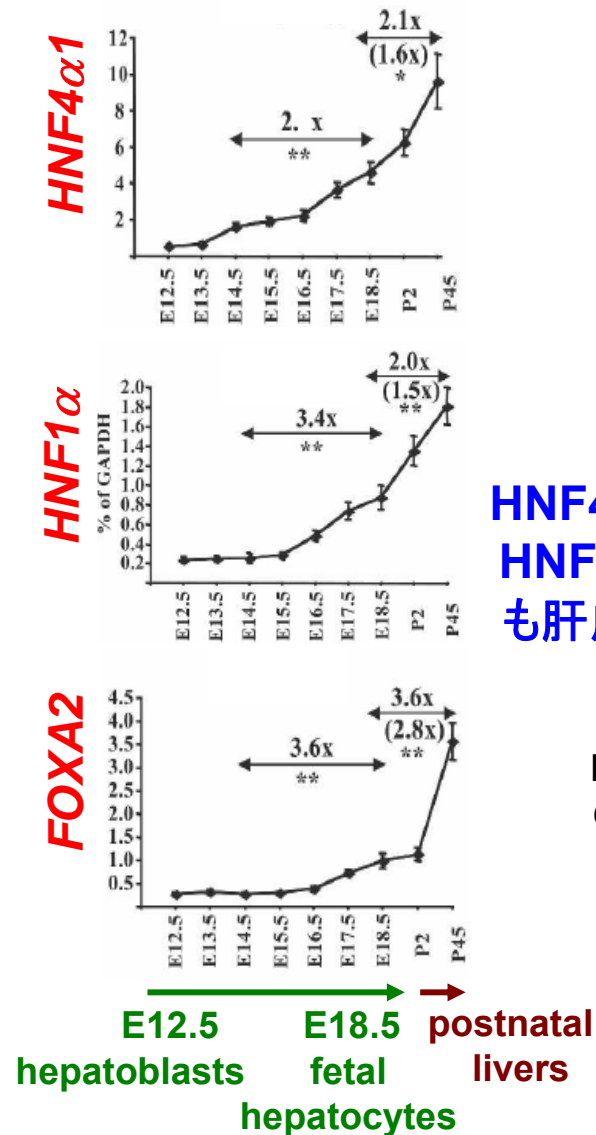
Takayama et al., J. Hepatol. (2012)

FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することによって、
形態的にも肝細胞に類似した細胞が分化誘導された

肝発生過程におけるFOXA2、HNF1 α の発現パターン



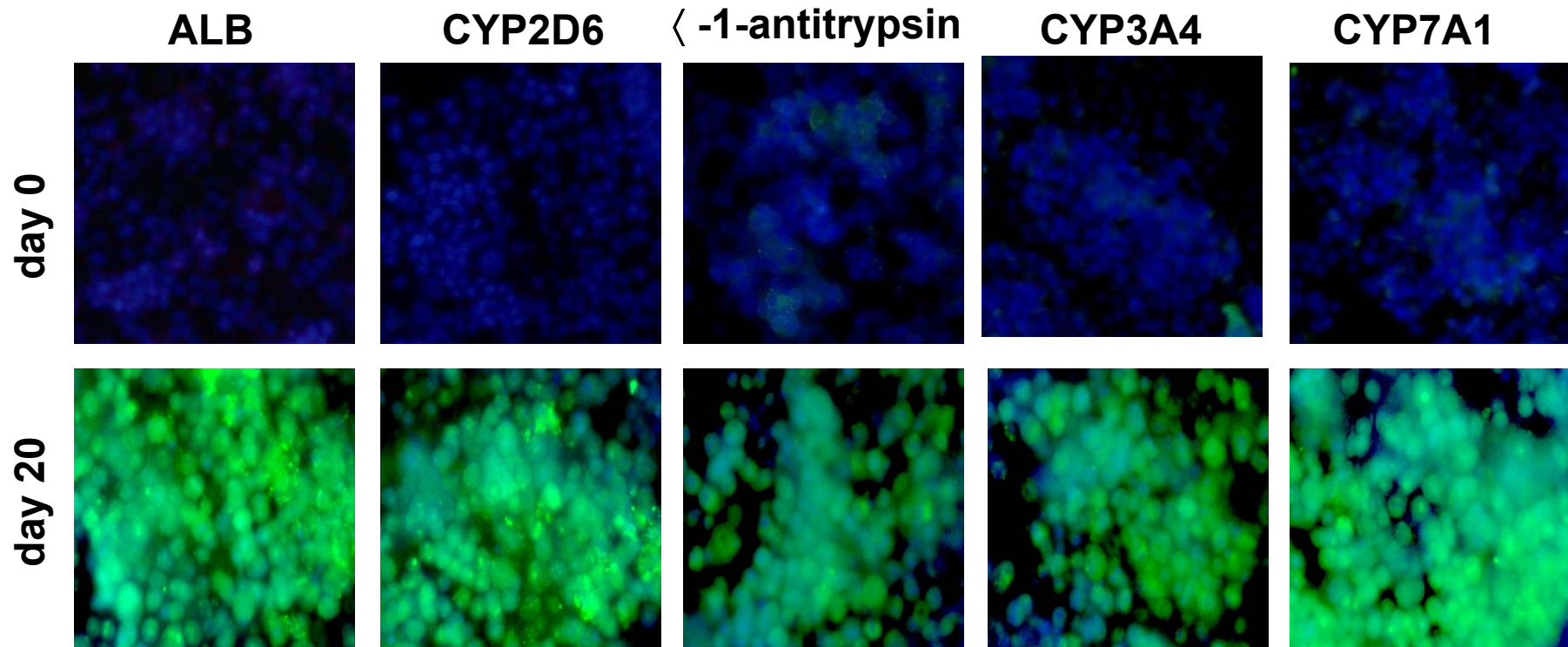
*in vitro*だけでなく、*in vivo*の発生過程においてもFOXA2、HNF1 α は肝発生に必須である



HNF4 α 遺伝子と同様に、HNF1 α 、FOXA2遺伝子も肝成熟化とともに発現上昇する。

Irene Kyrmizi et al. Gene. Dev. 2006

分化誘導肝細胞の肝細胞マーカーの発現



ヒトES細胞 (H9株使用)

Takayama et al., J. Hepatol. (2012)

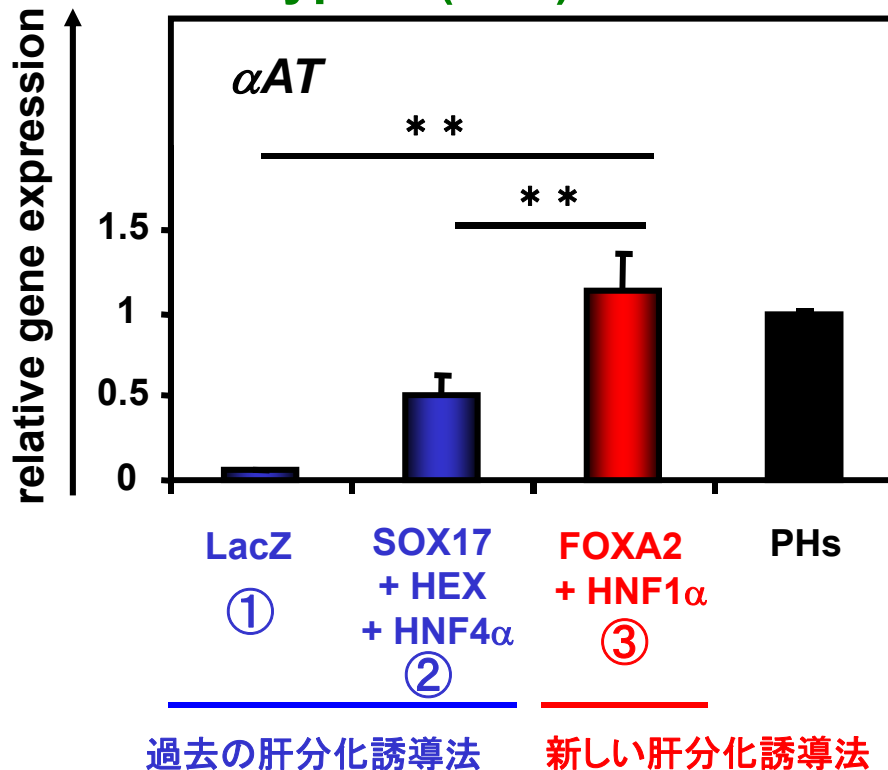
ほとんどの分化誘導肝細胞が各種肝細胞マーカー陽性である

これまでの肝分化誘導法との比較

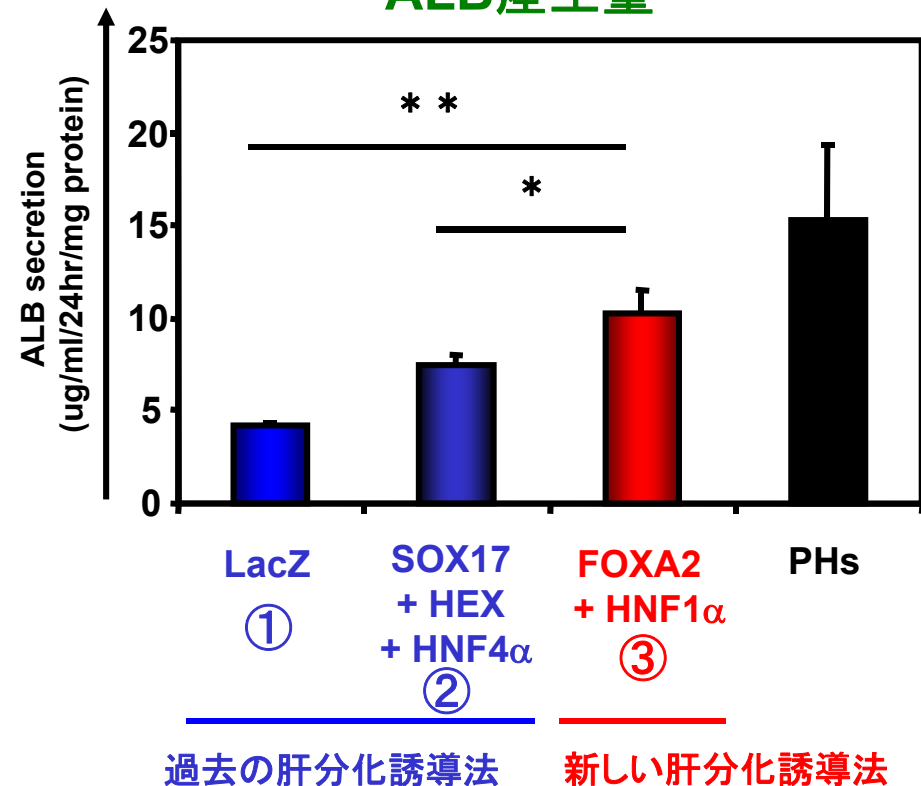
- ① LacZ (機能遺伝子導入なし、液性因子のみで分化誘導)
- ② SOX17+HEX+HNF4 α (これまでの当研究室の分化誘導方法)
- ③ FOXA2+HNF1 α (新しいプロトコール)

hESCs (H9)使用
 # PHs = 48時間培養した
 ヒト初代培養肝細胞
 # *, p<0.05 **, p<0.01

α -1-antitrypsin (α AT)遺伝子発現量



ALB産生量



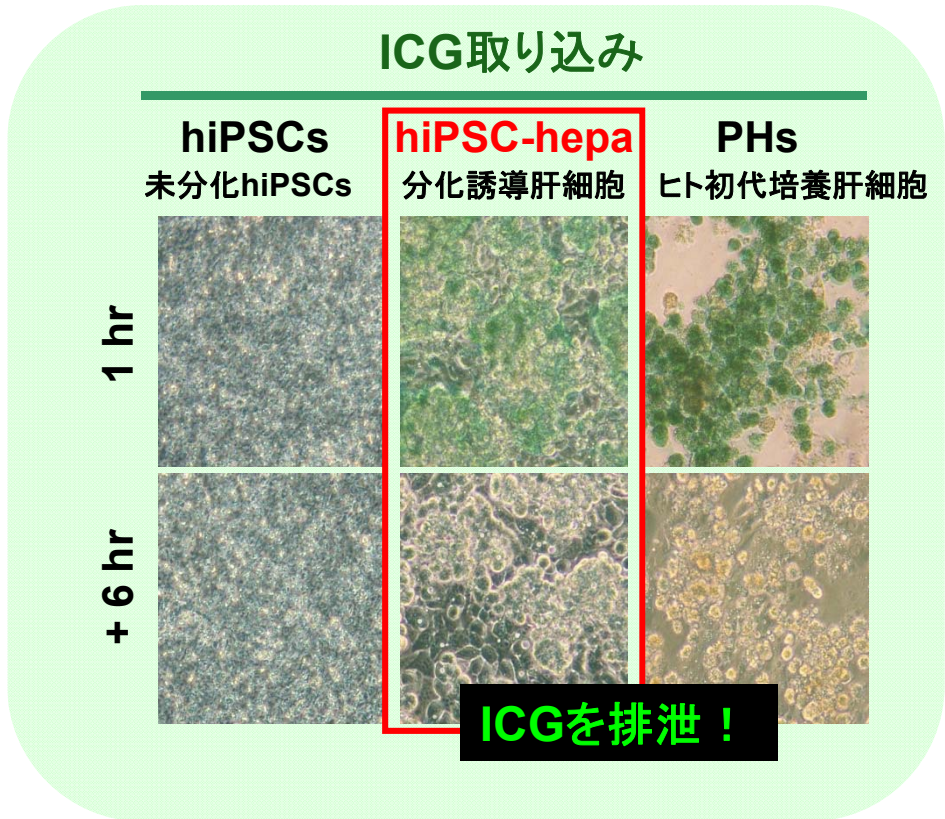
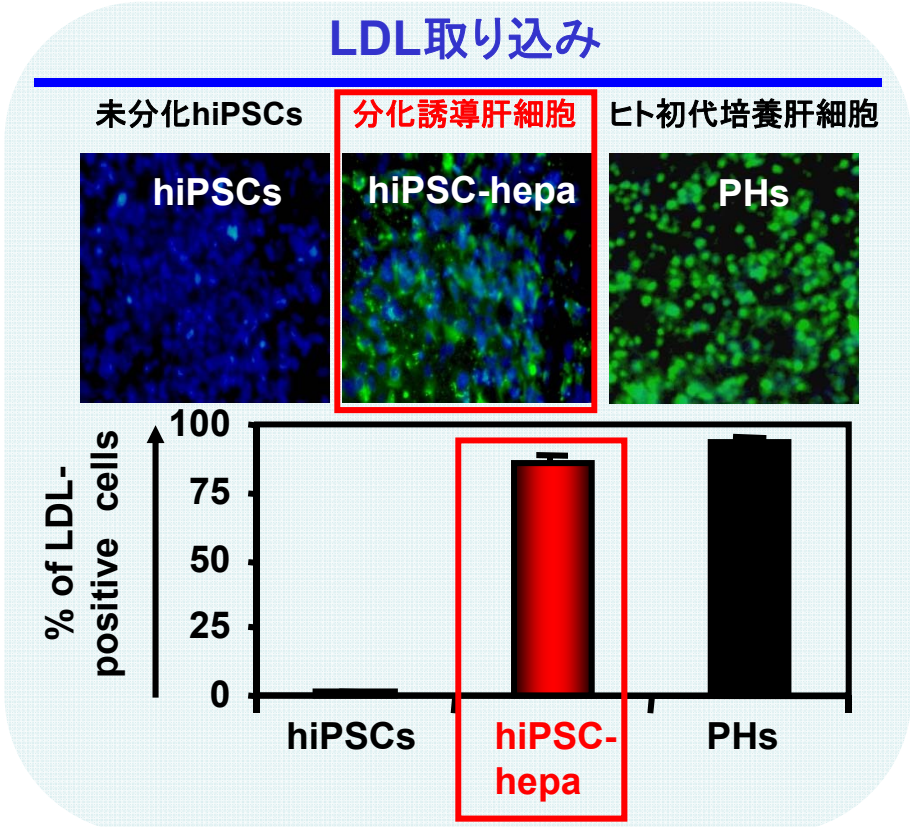
FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することによって、過去の肝分化誘導法よりも成熟した肝細胞を分化誘導できる。CYP1A2, 3A4, 2C9も同様の結果。Takayama et al., J. Hepatol. (2012)

分化誘導肝細胞の肝機能評価

培養20日目の分化誘導肝細胞の
トランスポーターが機能するかLDL
およびICGの取り込み能で評価する

LDL取り込み = 肝細胞はlow density lipoprotein (LDL)を細胞内に取り込む

ICG取り込み = 肝細胞はインドシアニンググリーン(ICG)を細胞内に取り込む

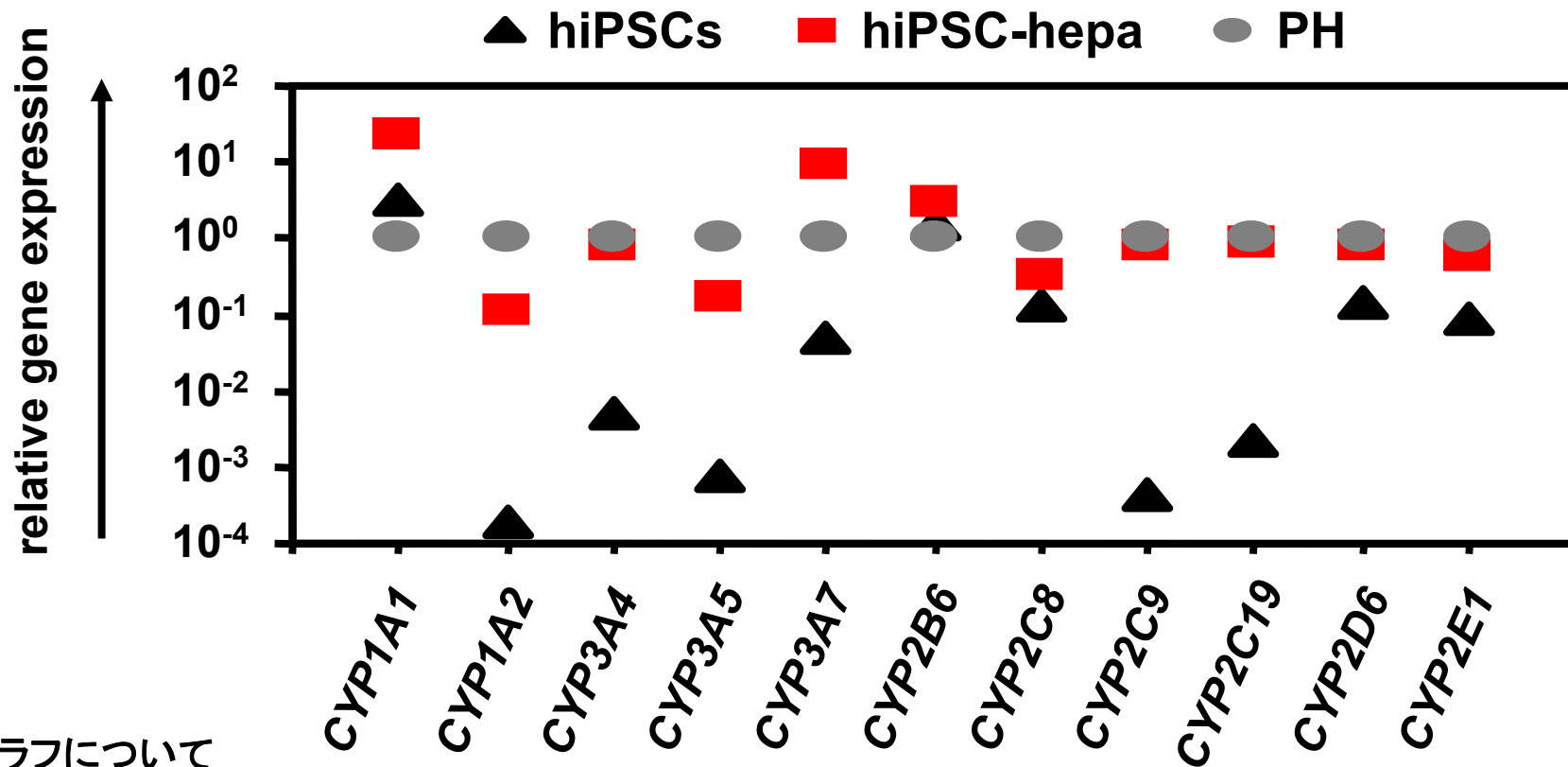


hiPSC-hepa = Dotcom由来の分化誘導肝細胞 # hiPSCs = 未分化hiPSCs (Dotcom)
PHs = 培養48時間後のヒト初代培養肝細胞

Takayama et al.,
J. Hepatol. (2012)

分化誘導肝細胞はヒト初代培養肝細胞と同様に
LDL、ICGの取り込み能を有する

分化誘導肝細胞とヒト初代培養肝細胞との比較① (CYP遺伝子の発現)



グラフについて

・hiPS細胞(Dotcom)使用

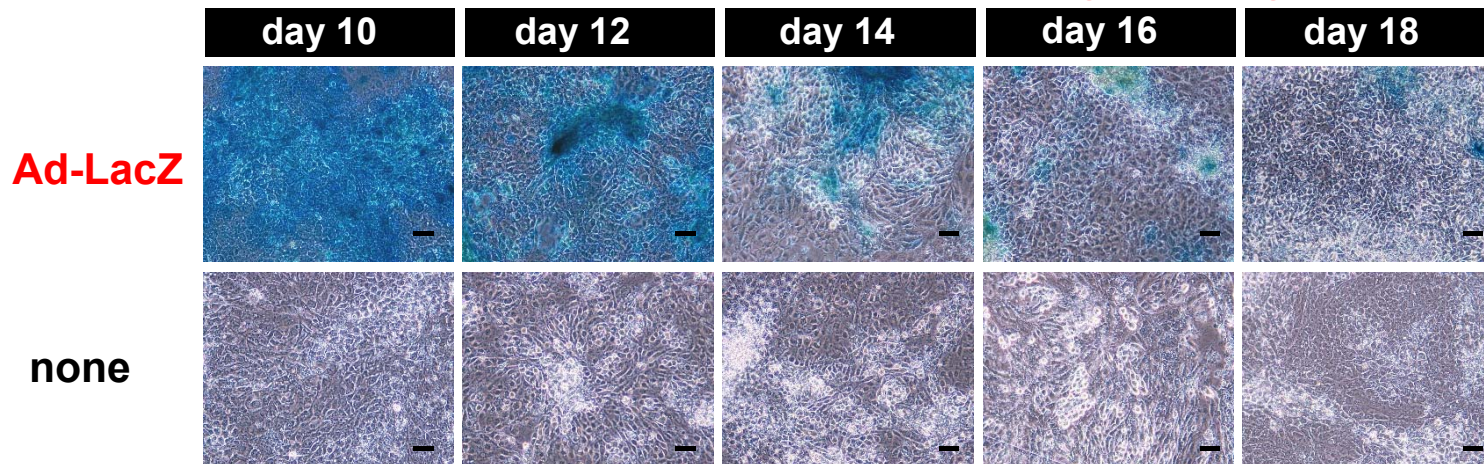
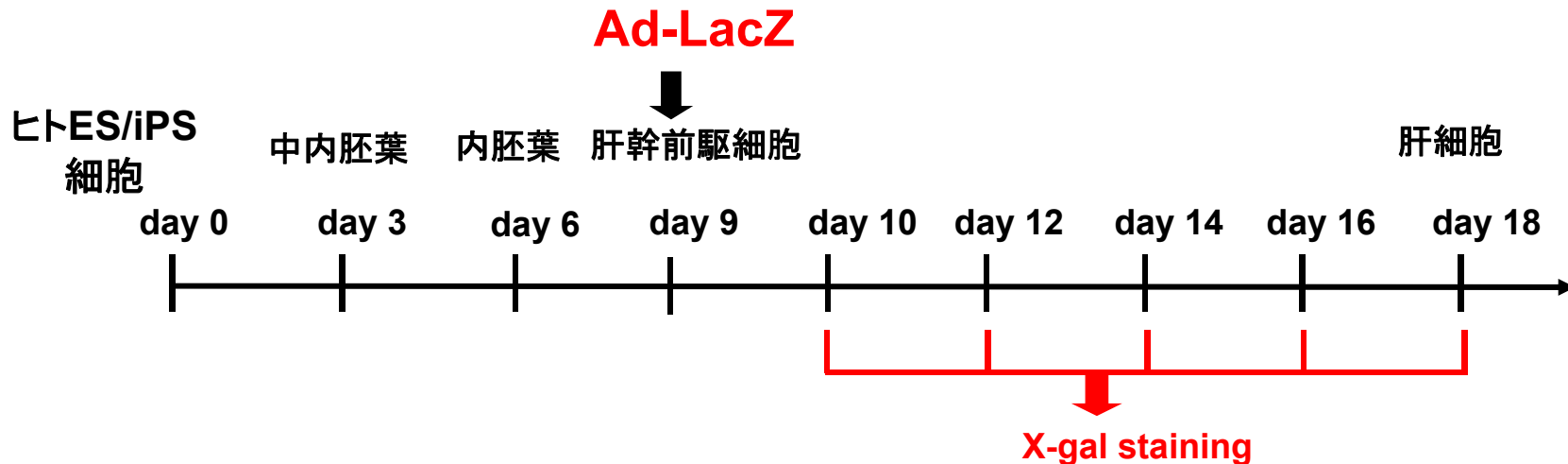
・PH = 初代培養ヒト(凍結)肝細胞

・PH (3 lots平均値)を1.0としている

Takayama et al.,
J. Hepatol. (2012)

多くのCYP酵素の遺伝子発現は
ヒト初代培養肝細胞とほぼ同レベルであった

アデノウイルスベクター-遺伝子導入細胞の遺伝子発現期間



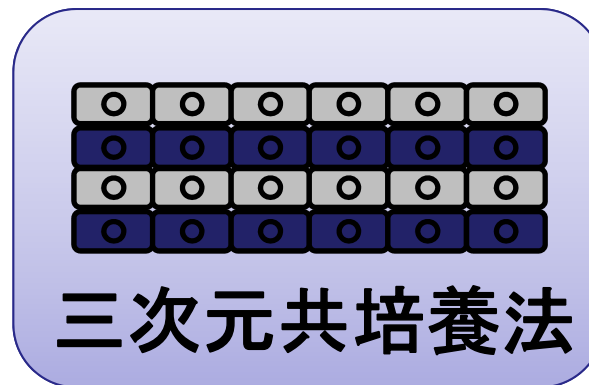
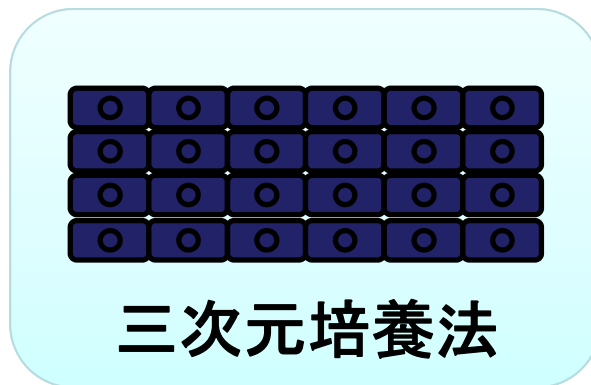
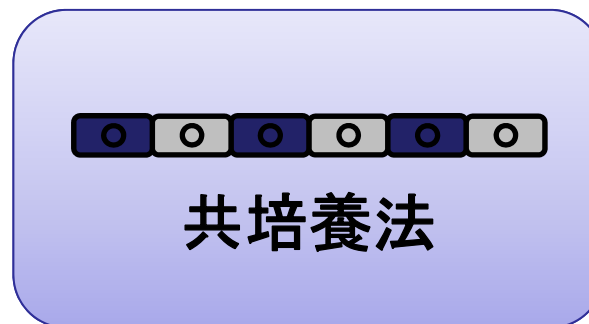
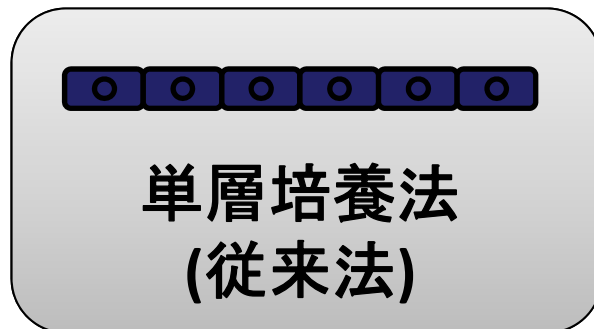
Takayama et al.,
Mol Ther. (2012)

外来遺伝子の発現が直接CYP等の遺伝子発現上昇に寄与しているのではなく、細胞全体の分化度が向上したと考えられる。

- ① イントロダクションと遺伝子導入技術を用いた
ヒトiPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法
- ② **3次元スフェロイド培養技術との組み合わせと薬物毒性評価**
- ③ さらに高機能なiPS細胞由来分化誘導肝細胞の作製を目指して
—肝細胞由来iPS細胞の利用—
- ④ iPS細胞由来分化誘導肝細胞の大量増幅に向けて
—肝幹前駆細胞の維持・増幅—

培養法の工夫による肝細胞の機能維持

ヒト初代培養(凍結)肝細胞は、培養法の工夫により、薬物代謝酵素等の機能が比較的維持される(機能低下の速度が鈍る)ことが知られている。



● : 肝細胞

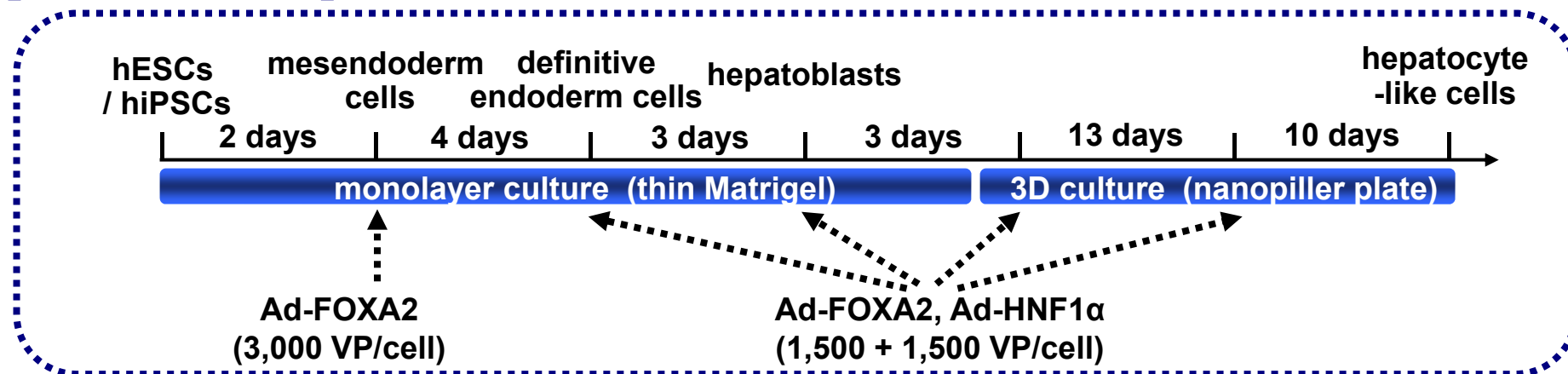
○ : その他の細胞
(繊維芽細胞など)

創薬研究への応用を考えると、スループット性の確保が可能な三次元(共)培養法の開発が求められる

三次元培養法によるさらなる肝成熟化

遺伝子導入法に加えて三次元培養法を併用すること
によって、さらなる肝成熟化を試みる

【分化プロトコール】



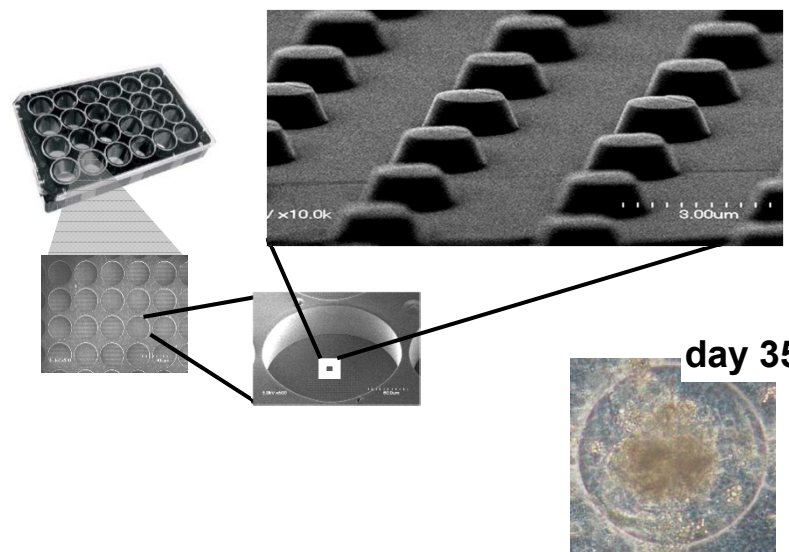
■ ナノプリント技術により、 $XX\mu\text{m}$ ホールの底面に直径 $XX\mu\text{m}$ のナノピラーを配置 (右図)

■ ホール構造内に適度なサイズの均一な形状のスフェロイドを形成できる

■ ラット肝細胞を用いた実験により、肝細胞の肝機能向上および維持に有用であることが既に証明されている

(Takahashi et al. *Tissue Engineering*. 2010)

株式会社 日立ハイテクノロジーズ

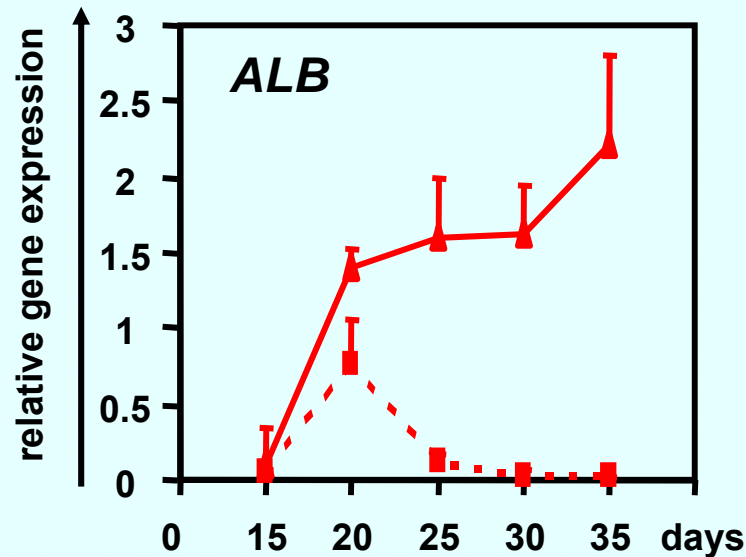


ナピラプレートを用いた三次元培養による肝成熟化①

ナピラプレートを用いた三次元培養により分化誘導肝細胞の成熟化が促進されるか検討した

継時的にALB遺伝子発現を解析
(real-time RT-PCR法)

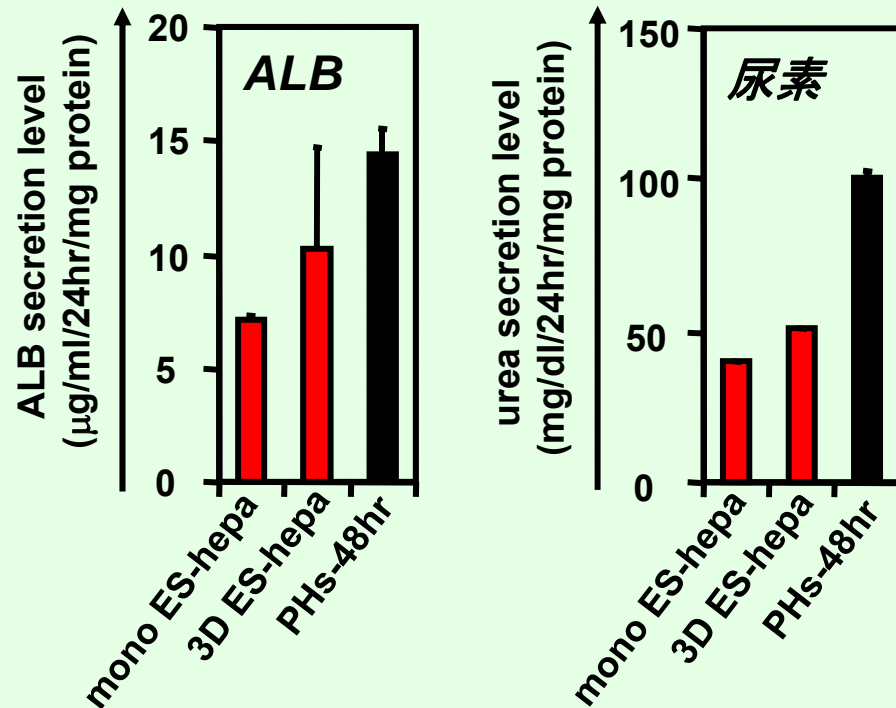
- mono ES-hepa (平面培養)
- ▲ 3D ES-hepa (ナピラプレートを利用)



平面培養では20日目以降はALB発現維持
ができないが、ナピラプレート上では
35日間はALB発現が維持可能

ALBおよび尿素産生能を評価

- # mono ES-hepa (平面培養20日目細胞)
- # 3D ES-hepa (ナピラプレート上培養35日目細胞)
- # PHs-48hr(播種後48時間のヒト肝細胞) 3 lots



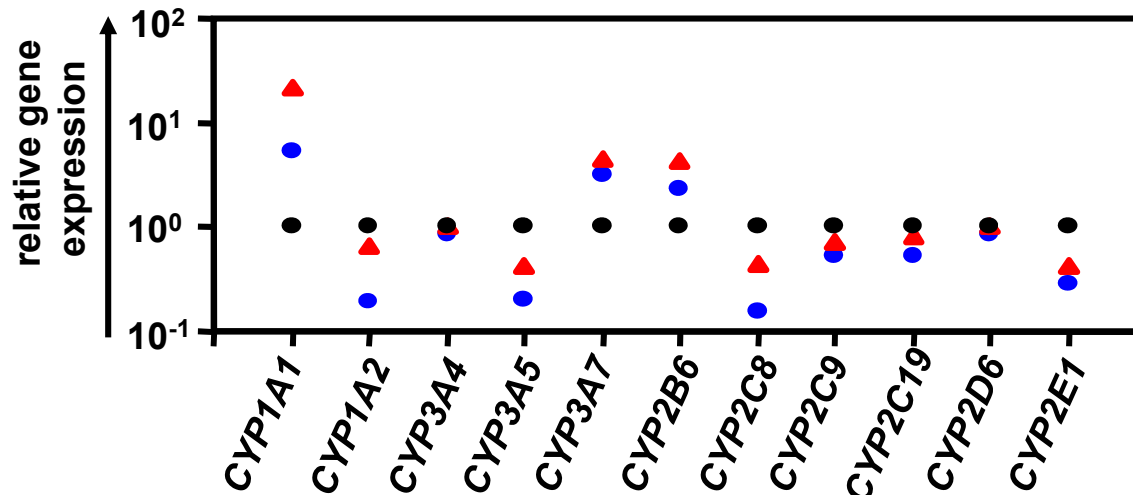
ナピラプレートを用いて三次元培養を行うことにより、
ALBおよび尿素産生能が向上

ナピラープレートを用いた三次元培養による肝成熟化②

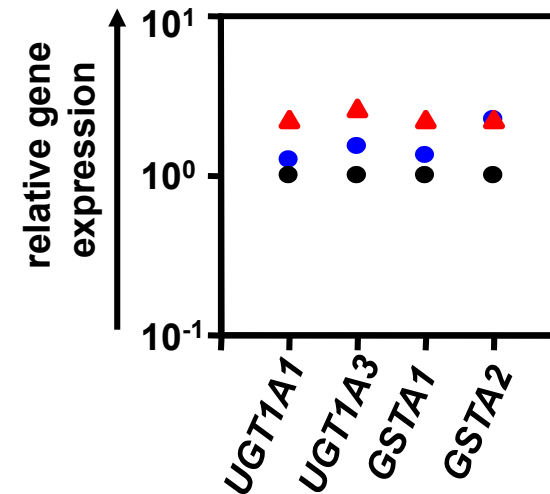
三次元共培養した分化誘導肝細胞の肝関連遺伝子発現を評価した

- PHs-48hr
- mono ES-hepa
- ▲ 3D ES-hepa

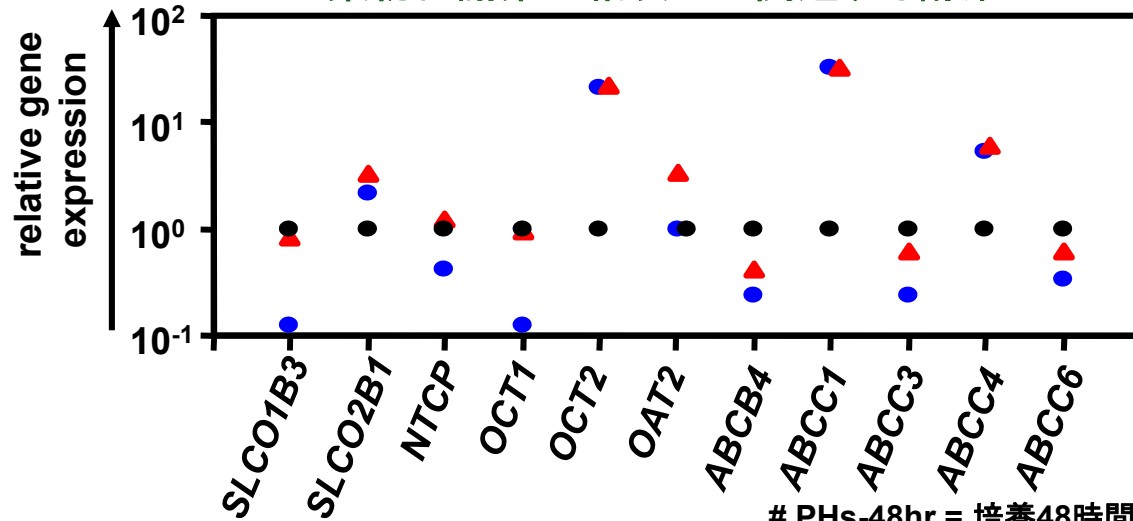
薬物代謝第一相反応に関連する酵素



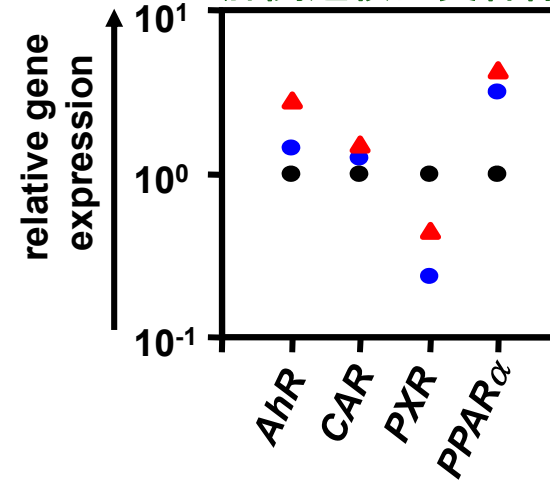
薬物代謝第二相反応に関連する酵素



薬物代謝第三相反応に関連する酵素



肝関連核内受容体



PHs-48hr = 培養48時間後のヒト肝細胞 # PHs (3 lots) 平均値を1.0とする

mono ES-hepa = H9由来の分化誘導肝細胞(day 20) # 3D ES-hepa = ナピラー上のH9由来の分化誘導肝細胞(day 35)

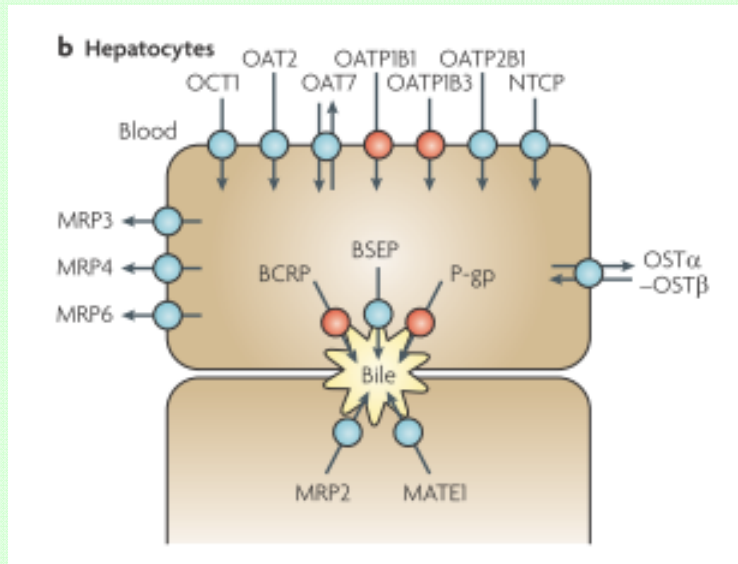
ナピラープレート上で培養することにより、肝関連遺伝子発現量が上昇

ナピラープレートを用いた三次元培養による肝成熟化③

三次元培養により微細胆管構造の形成が促進されたかどうか評価した

■ ヒト肝細胞をコラーゲン、マトリゲル重層化や三次元培養することによって、微細胆管構造の形成が確認される

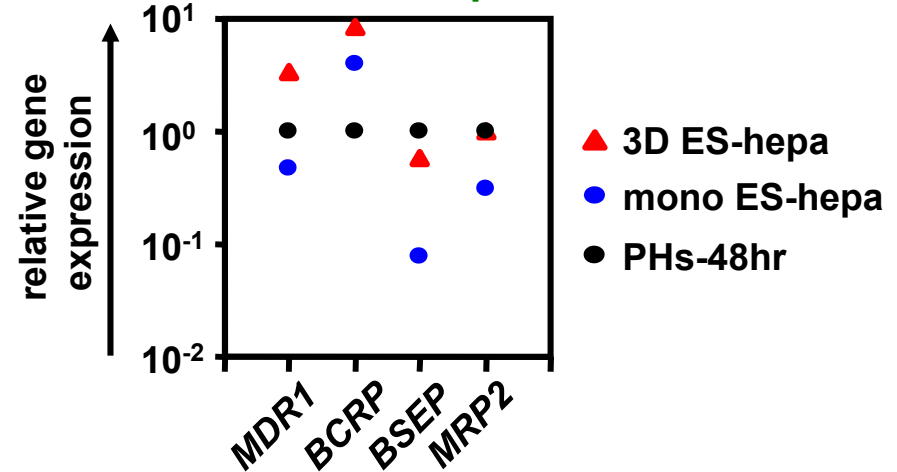
■ 微細胆管構造を可視化できるCLFを作用させて微細胆管構造の形成を確認した



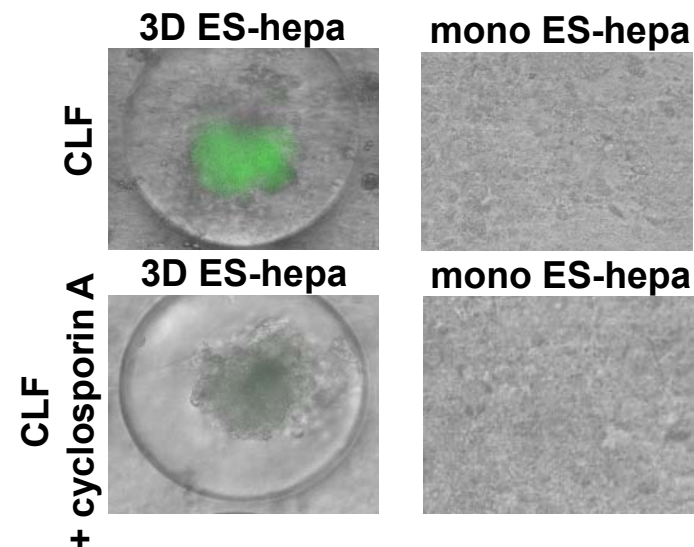
Nat Rev Drug Discov. 2010 Mar;9(3):215-36.

- # PHs-48hr = 培養48時間後のヒト肝細胞
- # PHs (3 lots) 平均値を1.0とする
- # mono ES-hepa = 平面培養の分化誘導肝細胞(day 20)
- # 3D ES-hepa = ナピラー上の分化誘導肝細胞(day 35)

bile canalicular transporterの遺伝子発現



微細胆管構造を可視化して評価

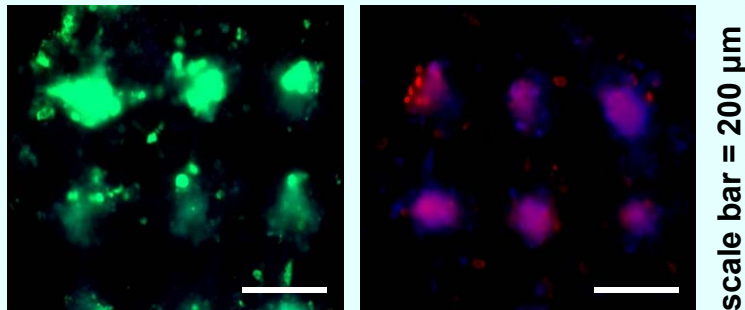


ナピラープレート上で培養することにより、微細胆管構造の形成が促進

ナピラープレートを用いた三次元培養による肝成熟化④

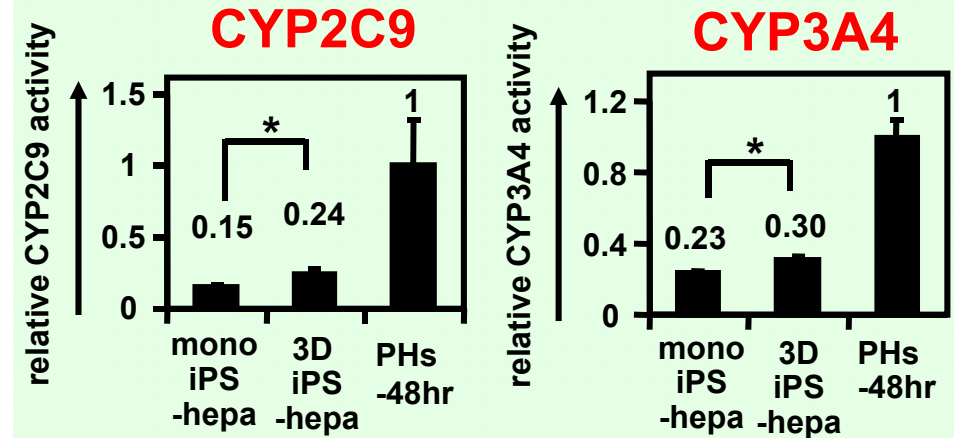
ALBおよびCYP3A4の免疫抗体染色

ALB / DAPI CYP3A4 / DAPI



スフェロイドはALB陽性、
CYP3A4陽性である

CYP2C9およびCYP3A4の活性



ナピラープレート上で培養することにより、
CYP活性が上昇 * , $p < 0.05$

PHs-48hr = 培養48時間後のヒト肝細胞

PHs (3 lots)平均値を1.0とする

mono iPS(Dotcom)-hepa = 平面培養の分化誘導肝細胞(day 20)

3D iPS(Dotcom)-hepa = ナピラー上の分化誘導肝細胞(day 35)

Takayama et al., Biomaterials (2013)

スフェロイド培養により、CYP代謝能は上昇した。しかし、分化誘導肝細胞のCYP活性は、初代培養ヒト肝細胞に比べ低く、更なる改良が必要である。

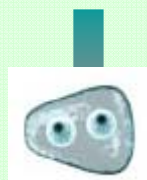
分化誘導肝細胞を用いた薬剤スクリーニングへの応用①

ナピラープレート上で作製した分化誘導肝細胞が薬剤スクリーニングに応用できるどうか評価した

肝毒性を示す化合物に対して細胞毒性を高い感度で検出できれば、薬剤スクリーニングへの応用が期待できる



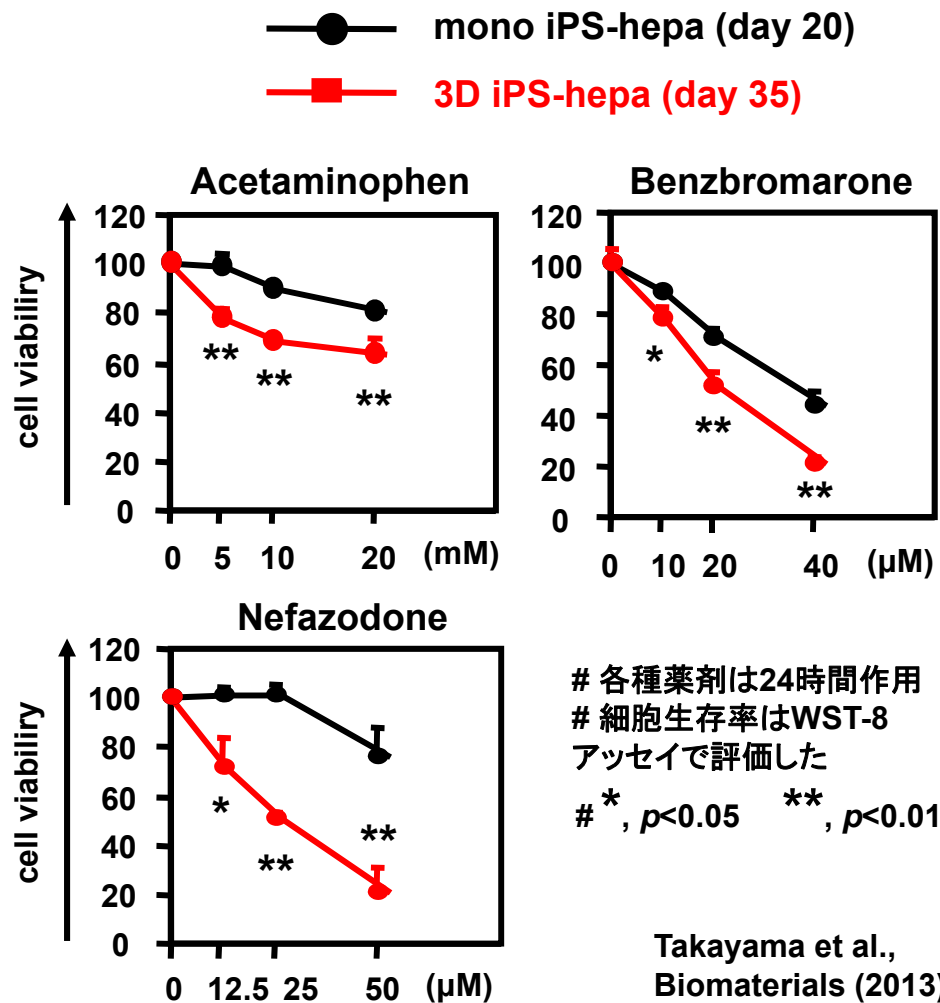
肝臓において代謝されて毒性を示す化合物
(肝毒性により販売中止になった薬など)



分化誘導
肝細胞

肝毒性を示す
(細胞毒性で評価)

平面培養で分化誘導した肝細胞と
ナピラープレート上で分化誘導した肝細胞の
肝毒性を示す化合物への応答能を比較した



ナピラープレート上で分化誘導することによって、平面培養で分化誘導よりも高感度に肝毒性(細胞毒性)を検出可能になる

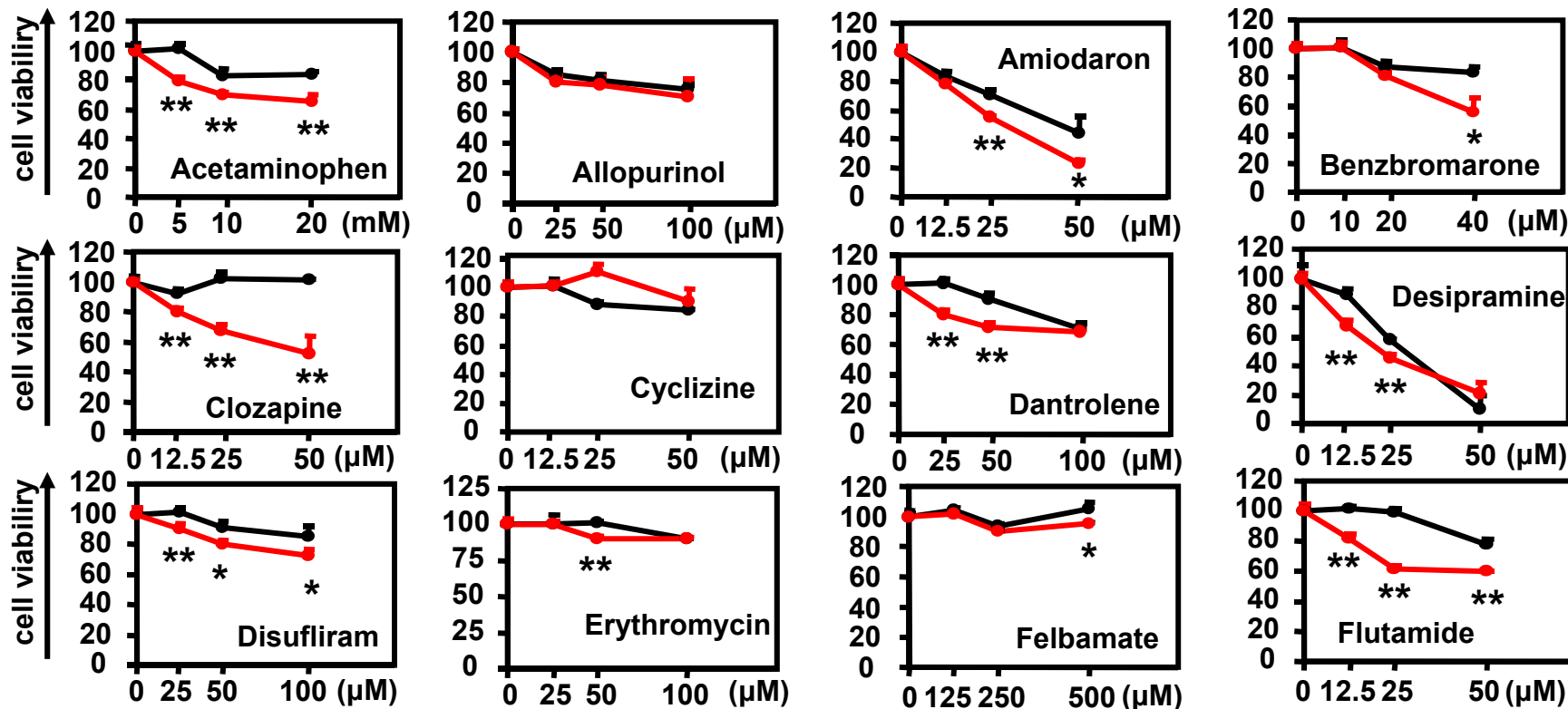
分化誘導肝細胞を用いた薬剤スクリーニングへの応用②

HepG2細胞は特定のCYPなどを過剰発現させて薬剤スクリーニングに応用しようとする試みがされている細胞株である

分化誘導肝細胞がHepG2細胞よりも薬剤スクリーニングに適した細胞であるかどうか確かめるために、肝毒性を示す薬剤を作用させた

各種薬剤は24時間作用
 # 細胞生存率はWST-8アッセイで評価した
 # HepG2細胞はナピラープレート上で5日間培養
 # *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$

● 3D HepG2
 ■ 3D iPS-hepa



#他にも12種類の薬剤を作用させた。24剤中、9剤において、細胞生存率が50%以下(各薬剤における最高濃度のときの値)となった。

ナピラープレート上で分化誘導した肝細胞はHepG2細胞よりも高感度に肝毒性(細胞毒性)を検出可能であった

Takayama et al.,
 Biomaterials (2013)

分化誘導肝細胞を用いた 薬剤スクリーニングのまとめ

(1) 検定化合物 31種

細胞毒性を示した化合物24種

(2) 20／24で分化誘導肝細胞がHepG2より毒性が
高く検出された（両細胞ともスフェロイド培養での検討）

4／24は両細胞で有意差なし（あまり毒性が認められなかった）

(3) 9／24でID50以下まで毒性が認められた

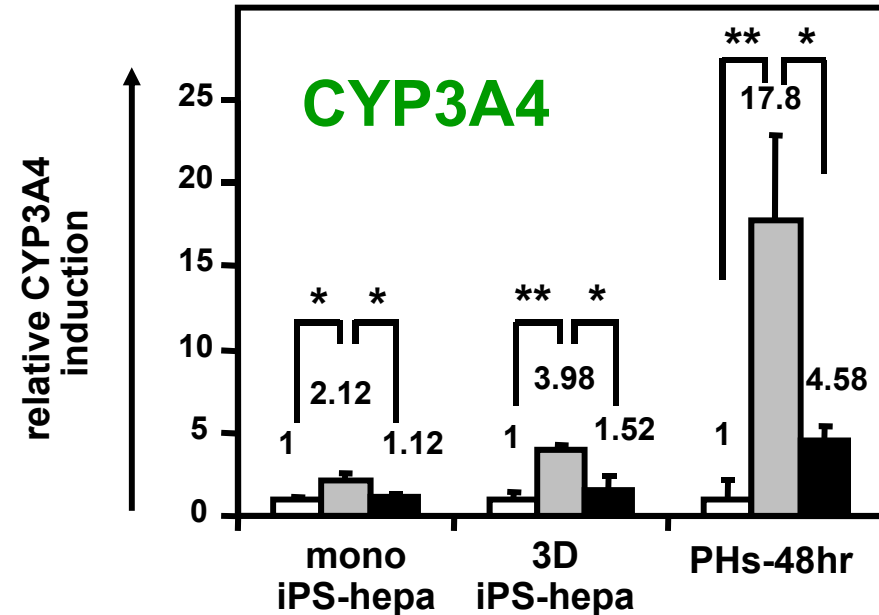
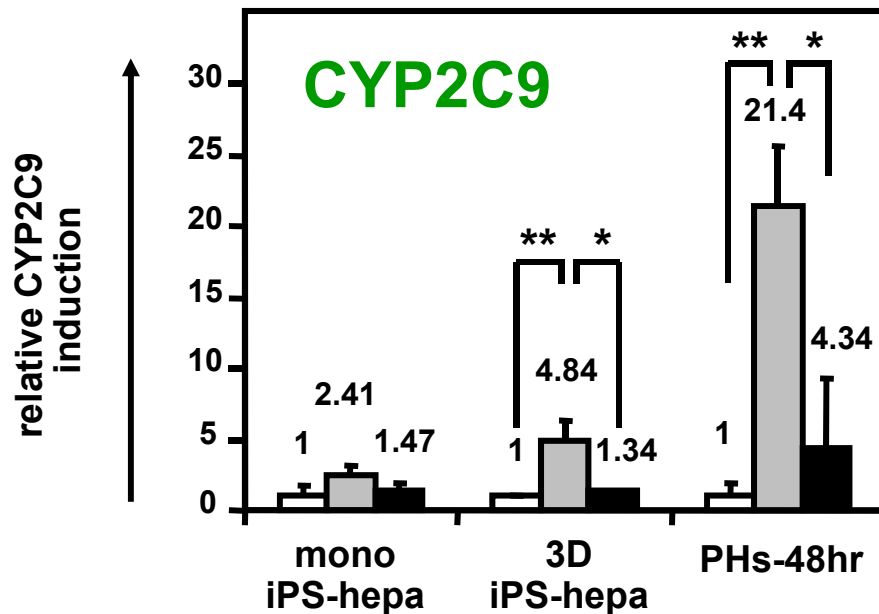
酵素誘導能の評価

CYP2C9およびCYP3A4の酵素誘導能

- ・RifampicinはCYP2C9, 3A4の誘導剤
- ・SulfaphenazoleはCYP2C9阻害剤、KetoconazoleはCYP3A4阻害剤

solvent only
 Rifampicin
 Rifampicin + Sulfaphenazole

solvent only
 Rifampicin
 Rifampicin + Ketoconazole



- # PHs-48hr = 培養48時間後のヒト肝細胞
- # 酵素誘導前のCYP活性を1.0とする
- # mono iPS(Dotcom)-hepa = 平面培養の分化誘導肝細胞(day 20)
- # 3D iPS(Dotcom)-hepa = ナビラー上の分化誘導肝細胞(day 35)

*, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$

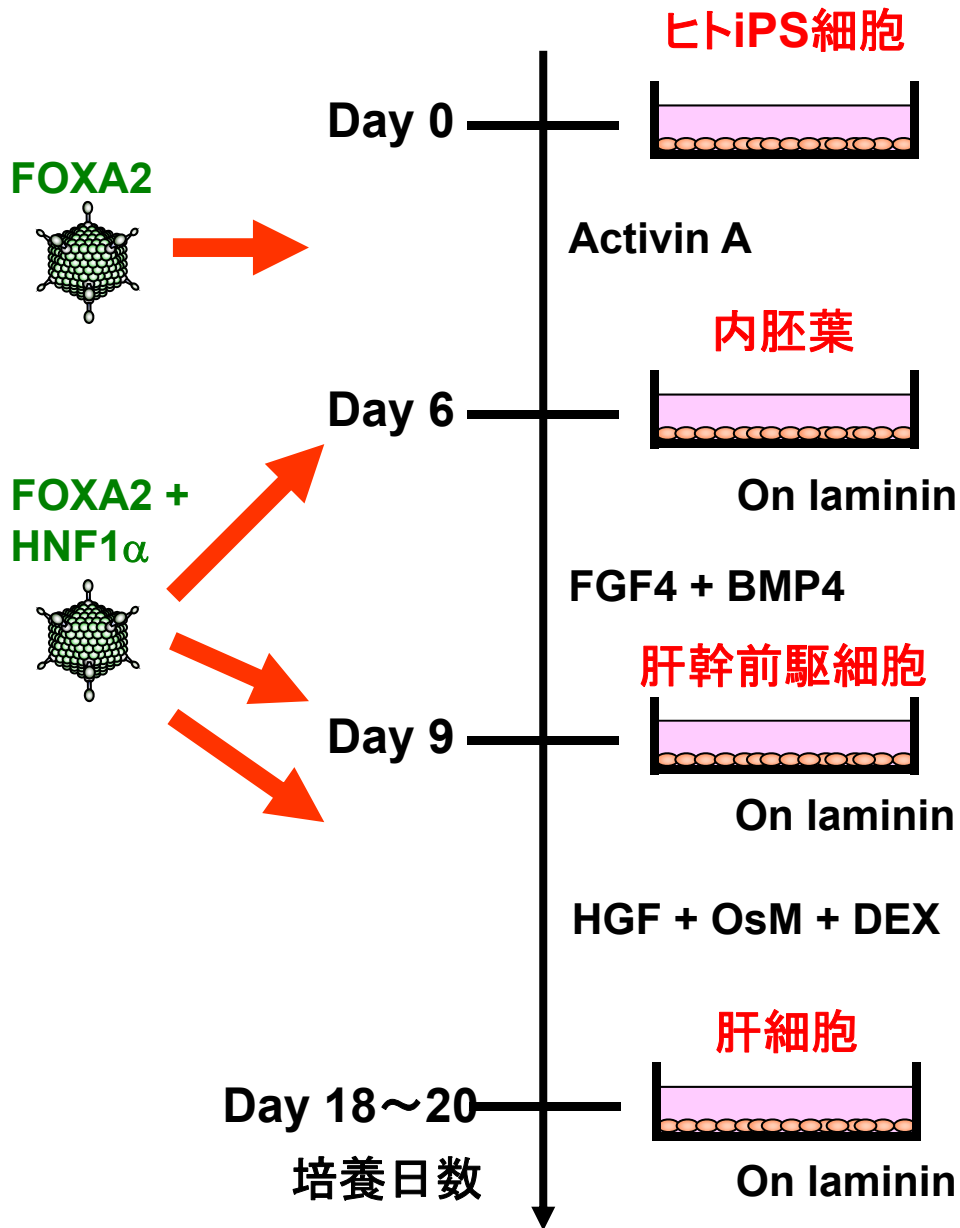
Takayama et al.,
Biomaterials (2013)

ナビラープレート上で培養することにより、CYP誘導能が上昇

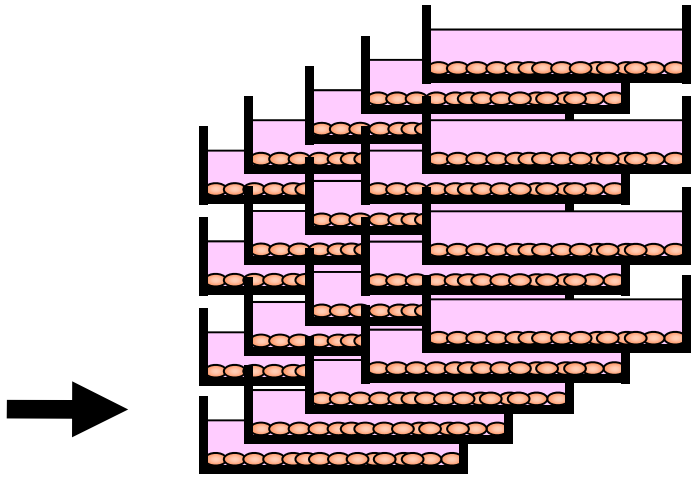
- ① イントロダクションと遺伝子導入技術を用いた
ヒトiPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法
- ② 3次元スフェロイド培養技術との組み合わせと薬物毒性評価
- ③ さらに高機能なiPS細胞由来分化誘導肝細胞の作製を目指して
—肝細胞由来iPS細胞の利用—
- ④ iPS細胞由来分化誘導肝細胞の大量増幅に向けて
—肝幹前駆細胞の維持・増幅—

- ① **イントロダクションと遺伝子導入技術を用いた
ヒトiPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法**
- ② **3次元スフェロイド培養技術との組み合わせと薬物毒性評価**
- ③ **さらに高機能なiPS細胞由来分化誘導肝細胞の作製を目指して
—肝細胞由来iPS細胞の利用—**
- ④ **iPS細胞由来分化誘導肝細胞の大量増幅に向けて
—肝幹前駆細胞の維持・増幅—**

肝幹前駆細胞の増幅・維持培養

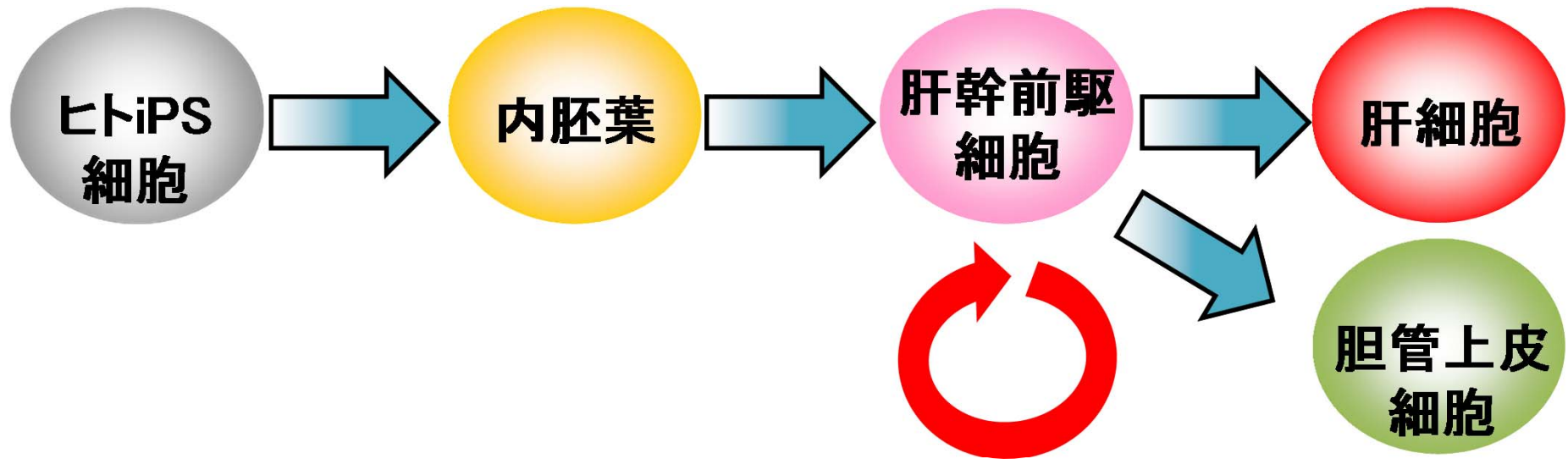


- 【利点】**
- ・肝細胞の大量供給・低コスト化が可能
 - ・肝細胞への分化がone stepになる
 - ・未分化細胞の除去が可能になる



レンチウイルスベクター等の安定発現ベクターを用いた場合、細胞分化が進んでしまい、安定に継代することができない

増幅した肝幹前駆細胞の 2方向性分化能の評価





**リプロセル社が
我々の技術を利用して作製した
ヒト iPS細胞由来肝細胞を
2012年5月から販売開始（世界初）！**