

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 薬物代謝酵素 CYP2C19 等を欠損したヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と創薬応用
(英語) Generation of CYP2C19-knockout human iPS cell-derived hepatocyte-like cells for pharmaceutical research

研究開発実施期間: 2018年7月20日～2021年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高山和雄
(英語) Kazuo Takayama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所・講師
(英語) Junior Associate Professor, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

II 研究開発の概要

薬物誘発性肝障害は、医薬品の開発中止に至る主要な有害事象であり、ヒト人工多能性幹（iPS）細胞由来肝細胞は、毒性試験をはじめとする創薬研究でのニーズが極めて高い。ヒト初代培養肝細胞が毒性試験に汎用されているものの、薬物代謝酵素 Cytochrome P450 2C19（CYP2C19）などの活性の個人差が大きいことが正確に肝毒性を評価することの難しさの一因となっている。種々の薬物代謝酵素のうち CYP2C19 の poor metabolizer（PM）は、日本人では 20% の頻度で確認されるが、ヒト初代培養肝細胞の入手源となる欧米人では数% 以下の頻度でしか確認されておらず、CYP2C19 の poor metabolizer の医薬品評価系が存在していない。そこで本研究課題では、従来のゲノム編集技術ではノックアウトが困難であった薬物代謝酵素遺伝子 CYP2C19 等を、我々が独自に改良したゲノム編集技術を駆使してノックアウトさせたヒト iPS 細胞由来肝細胞（poor metabolizer 由来の肝細胞に相当する）を作製し、特異な薬物代謝酵素活性を有した肝細胞の安定供給を可能とすることで、きめの細やかな毒性試験が可能な技術開発を行った。

1. CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞の樹立

ヒト iPS 細胞の CYP2C19 遺伝子座において高効率に相同組換えを行うために、ドナープラスミドだけでなく、CYP2C19 遺伝子のエキソン 1 付近を標的として 2 本鎖切断を誘導できる short guide RNA 及び Cas9 共発現プラスミドと RAD51 遺伝子発現プラスミドを用いた。これら 3 種類のプラスミドをエレクトロポレーション法によりヒト iPS 細胞に導入した。ピューロマイシンでセレクションした後、シングルセル由来のヒト iPS 細胞コロニーを 24 個単離した。単離した 24 株のうち幾つかのクローンの CYP2C19 遺伝子座において、両アリルで相同組換えが起こっていた。CYP2C19 遺伝子の開始コドン消失したヒト iPS 細胞株（CYP2C19-KO iPS 細胞）の樹立に成功した。

2. CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞の未分化性の確認

CYP2C19 遺伝子の欠損がヒト iPS 細胞の未分化性に影響するかを確認した。野生型（WT）iPS 細胞と CYP2C19-KO iPS 細胞に形態的な違いは見られなかった。WT iPS 細胞と CYP2C19-KO iPS 細胞における未分化マーカー（OCT3/4、NANOG、SOX2）の遺伝子発現量を real-time RT-PCR 法により解析した。WT iPS 細胞と CYP2C19-KO iPS 細胞において、未分化マーカーの遺伝子発現量はほぼ同等であった。さらに、免疫染色においても、未分化マーカー（OCT3/4、SOX2）の発現の差は両細胞間で見られなかった。以上のことから、CYP2C19 遺伝子の欠損はヒト iPS 細胞の未分化性に影響を及ぼさないことが示唆された。

3. CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞の肝分化能の評価

WT iPS 細胞および CYP2C19-KO iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導したのち、CYP2C19-KO iPS 細胞が WT iPS 細胞と同等の肝分化能を有しているか確認するために、肝細胞マーカーの遺伝子発現量を解析した。肝細胞で特異的に発現している遺伝子の発現量について、WT iPS 細胞由来肝細胞（WT 肝細胞）と CYP2C19-KO iPS 細胞由来肝細胞（CYP2C19-KO 肝細胞）の間ではほぼ同等であった。また、培養上清中に分泌されたアルブミン量を計測したところ、各肝細胞ではほぼ同等のアルブミン産生量（約 10 μ g/ml/24hr/mg protein）を示した。さらに、肝マーカーであるアルブミンと α -1 アンチトリプシンについて免疫染色を行ったところ、各肝細胞の間でその発現量に差は見られなかった。以上のことから、CYP2C19 遺伝子の欠損は、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化能に影響しないことが示唆された。より詳細に WT iPS 細胞および CYP2C19-KO iPS 細胞の肝分化能を評価するために、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。CYP2C19-KO 肝細胞における CYP2C19 遺伝子発現はほぼ消失していることが確認できた。また、99% 以上の遺伝子については、WT 肝細胞および CYP2C19-KO 肝細胞

の間で 1/3 倍～3 倍以下の差しかないことが分かった。したがって、CYP2C19 遺伝子の欠損により変動する遺伝子はほとんどないことが示された。

4. CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物代謝能の評価

作製した CYP2C19-KO iPS 細胞由来肝細胞において、CYP2C19 の代謝能が消失しているかどうか評価した。WT 肝細胞と CYP2C19-KO 肝細胞に CYP2C19 の基質である S-メフェニトインを作用させ、培養上清中に含まれる代謝物 4'-水酸化メフェニトインを定量した。WT 肝細胞では 4408.4 pg/mL/min/mg protein の代謝物 4'-水酸化メフェニトインが検出されたが、CYP2C19-KO 肝細胞では検出限界以下であった。以上より、CYP2C19-KO 肝細胞では、CYP2C19 の薬物代謝活性が消失していることが確認された。

5. CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞由来肝細胞の薬物応答能

血小板凝集抑制剤であるクロピドグレルは、主に CYP2C19 により代謝されて活性型となるプロドラッグであり、肝障害を生じた例も報告されている。そこで、WT 肝細胞と CYP2C19-KO 肝細胞の間で、クロピドグレルの代謝能および応答能に差が生じるか確認した。WT 肝細胞と CYP2C19-KO 肝細胞にクロピドグレルを作用し、細胞生存率を計測した。しかし、各細胞で細胞生存率に有意な差がなかった。したがって、クロピドグレルにより誘発される肝毒性には、CYP2C19 以外の薬物代謝酵素の関与も示唆された。クロピドグレルの代謝活性化には、CYP2C19 だけではなく、CYP3A4 も関与することが知られている。そこで、WT 肝細胞と CYP2C19-KO 肝細胞に CYP3A4 阻害剤であるケトコナゾールを作用させ、クロピドグレルに対する応答能を調べた。WT 肝細胞ではケトコナゾールの有無による細胞生存率の差は見られなかったが、CYP2C19-KO 肝細胞ではケトコナゾールを作用することにより、有意に細胞生存率が上昇した（クロピドグレル 100 μM 作用で細胞生存率が 30 %、300 μM 作用で細胞生存率が 60 %上昇）。よって、樹立した CYP2C19-KO 肝細胞が医薬品の *in vitro* 肝毒性予測試験へ応用可能であることが示唆された。

本研究課題では、独自開発の高効率のゲノム編集技術を用いて CYP2C19-KO iPS 細胞を作製した。樹立した CYP2C19-KO iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導し、CYP2C19-PM の有用なモデル細胞としての応用を試みた。一般的に、クロピドグレルは経口投与され、そのうち約 85%は腸管でカルボキシエステラーゼ 1 (CES1) による加水分解を受けて不活性型となるが、残りの約 15%が肝臓で CYP による代謝を受けて活性型となり薬効を発揮する。このようにクロピドグレルをはじめとする経口投与薬の薬物動態をより詳細に検討するには、肝細胞モデルだけではなく、小腸と肝臓の両方を組み合わせた共培養系の開発が今後必要になると予想される。今回樹立した CYP2C19-KO iPS 細胞から CYP2C19-KO 小腸細胞と CYP2C19-KO 肝細胞を作製し、共培養システムを構築することで、共通の遺伝的背景を持つ小腸と肝臓の一体型モデルが構築できるため、CYP2C19-PM における経口投与薬のバイオアベイラビリティの予測が将来的には可能になると想定される。このようなモデルが構築できれば、個別化医療に資する技術になると期待できる。さらに、PM の存在が報告されている CYP には CYP2C19 以外にも CYP2C9 や CYP2D6 などがある。これらの CYP 分子種についても同様に、ゲノム編集により標的の CYP を欠損させ、CYP-KO 肝細胞を作製すれば、医薬品の *in vitro* 毒性評価試験のための肝細胞パネルの構築に繋がると考えられる。本研究課題では、CYP2C19-PM のモデル肝細胞を作製し、創薬応用できることを示唆した。今後、同様の研究が発展し、PM を考慮した医薬品が開発され、従来よりも安全な医薬品が創出されることを願う。

なお、本研究課題の成果の一部は、下記の学術論文にて公表した。

Deguchi S., Yamashita T., Igai K., Harada K., Toba Y., Hirata K., Takayama K., Mizuguchi H., Modeling of hepatic drug metabolism and responses in CYP2C19 poor metabolizer using genetically manipulated human iPS cells, *Drug Metab Dispos.*, 2019 Jun;47(6):632-638.

The liver plays an essential role in drug metabolism. Drugs are metabolized in the liver, and transformed into active (or inactive) metabolites. Some drugs and their metabolites can cause hepatocellular toxicity, compelling pharmaceutical companies to discontinue development of these drugs or withdraw them from the market. Therefore, establishment of the highly specific in vitro systems for the evaluation of drug metabolism and toxicity is a pressing issue. Poor metabolizers (PMs) are individuals who lack of metabolic capacity of a specific drug metabolizing enzyme. Therefore, the plasma drug concentrations and frequency of side effects differ greatly between PMs and non-PMs. Because cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19 (CYP2C19) largely contributes to the phase I reaction of drug metabolism, there is a concern that the PMs of CYP2C19 (CYP2C19-PMs) would suffer from the unexpected changes of pharmacokinetics and toxicity of CYP2C19 substrate drugs. For these reasons, to ensure the safety of drugs on the international market, we must develop a drug metabolism and toxicity evaluation system which considers CYP2C19-PMs and its ethnic differences. However, the available sources of primary human hepatocytes (PHHs), which are widely used in hepatocellular toxicity evaluation tests, are almost entirely limited to Caucasians, making it difficult to perform drug screening for CYP2C19-PMs.

In recent years, genome editing technologies using human induced pluripotent stem (iPS) cells have progressed rapidly. If we could use these technologies to establish CYP2C19-knockout human iPS cell-derived hepatocyte like cells (CYP2C19-KO HLCs), these cells could be used to reproduce the drug metabolism in CYP2C19-PMs. However, the genome editing efficiency depends on the target genes—that is, most of the transcriptionally inactive heterochromatic genes in undifferentiated iPS cells, including CYP2C19, can scarcely be edited. Therefore, we have optimized the conditions of the genome editing strategy and successfully enhanced the biallelic-targeting efficiency to more than 15 % by using RAD51-expressing plasmid and valproic acid. Moreover, we have developed an efficient hepatic differentiation protocol from human iPS cells. From the above, in this project, we aimed to knockout the CYP2C19 gene using our unique genome editing technology in human iPS cells, and to differentiate the cells into HLCs so as to develop a cell culture system imitating CYP2C19-PMs.

In this project, using human iPS cells and our highly efficient genome editing and hepatocyte differentiation technologies, we generated CYP2C19-knockout human iPS cell-derived hepatocyte-like cells (CYP2C19-KO HLCs) as a novel CYP2C19 PM model for drug development and research. The gene expression levels of hepatocyte markers were similar between WT HLCs and CYP2C19-KO HLCs, suggesting that CYP2C19 deficiency did not affect the hepatic differentiation potency. We also examined CYP2C19 metabolic activity by measuring S-mephenytoin metabolites using LC-MS. The CYP2C19 metabolic activity was almost eliminated by CYP2C19 knockout. Additionally, we evaluated whether clopidogrel (CYP2C19 substrate)-induced liver toxicity could be predicted using our model. Unexpectedly, there was no significant difference in cell viability between clopidogrel-treated WT HLCs and CYP2C19-KO HLCs. However, the cell viability in clopidogrel- and ketoconazole (CYP3A4 inhibitor)-treated CYP2C19-KO HLCs was significantly enhanced as compared with that in clopidogrel- and DMSO-treated CYP2C19-KO HLCs. This result suggests that CYP2C19-KO HLCs can predict the clopidogrel-induced liver toxicity. We succeeded in generating CYP2C19 PM model cells using human iPS cells and genome editing technologies for pharmaceutical research.