

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

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ゲノム編集を施したヒト iPS 細胞由来肝細胞による肝細胞パネルの構築と創薬
応用

(英語) Generation of hepatocyte panel by genome-edited human iPS cells for
pharmaceutical research

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 鳥羽 由希子

(英語) Yukiko Toba

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 大阪大学・大学院薬学研究科・助教

(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, assistant professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文:

薬物誘発性肝障害は、医薬品の開発中止や市販後警告、販売中止に至る主要な有害事象であり、医薬品の有効性・安全性確保における薬事上の重要な論点の1つである。したがって、新薬開発過程では肝臓における薬物の動態特性を正確に評価する必要がある。一般に、被験薬が多酵素系により代謝・抱合されることが予想される場合、各酵素の選択的阻害剤を添加して各酵素の寄与を評価する。このような評価は、動態解明を通して、毒性や薬物相互作用の発現予測に重要な知見をもたらす。しかし、阻害剤の特異性や阻害効率、ヒト肝癌由来細胞株のヒト肝外挿性、ヒト初代肝細胞培養系の利便性の低さ等が課題となっており、薬物誘発性肝障害に係る有効性・安全性確保に資する *in vitro* 試験系の確立は立ち遅れている。

これまでに、研究代表者らはヒト iPS 細胞由来肝細胞作製法の改良を行ってきた (Toba *et al.*, *Sci Rep*, 2019; Toba *et al.*, *PLoS One*, 2020 等)。さらに、ヘテロクロマチン領域内の遺伝子において効率良く両アリのゲノム編集が可能な基盤技術の開発にも成功してきた。

そこで、本研究は、創薬研究に汎用される *in vitro* 試験および阻害剤の弱点を補完すべく、特異性、ヒト肝外挿性、利便性を兼ね備えた *in vitro* 薬物動態評価系の確立を目的とする。上述した研究代表者らの研究成果および研究資源を有効活用し、ゲノム編集技術により特定の薬物代謝・抱合酵素を欠損させたヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製する。その上で、既に樹立した薬物代謝酵素等の欠損ヒト iPS 細胞株お

よび野生型 iPS 細胞株を加えた、ヒト iPS 細胞由来肝細胞パネルについて *in vitro* 薬物動態評価系としての妥当性を検証する。本研究期間では、薬物動態や毒性予測が可能な肝細胞パネルの基盤確立を達成目標とした。具体的な研究成果は以下のとおりである。

(1) 薬物代謝・抱合酵素の欠損ヒト iPS 細胞株の樹立

まず、肝臓において薬物動態の予測に重要とされる代謝・抱合酵素を欠損したヒト iPS 細胞株を樹立した。選択した分子とその理由を以下に記す。なお、すでに肝細胞での薬物動態や毒性発現に重要な分子（4 種類）を欠損したヒト iPS 細胞株を樹立済みであり、薬物動態・毒性発現で重要な残る分子種の欠損株を作製した。

- A) CYP1A2 欠損 iPS 細胞株：肝疾患や加齢により、CYP1A2 の活性が低下することが知られている。実際に、高齢者では CYP1A2 の基質薬物の肝クリアランスが低下する事例がある。したがって、被験薬の主要消失経路における CYP1A2 の寄与率を正確に評価することは、肝疾患の罹患者や高齢者における副作用および薬物相互作用を回避するために重要である。
- B) CYP2E1 欠損 iPS 細胞株：CYP2E1 の発現量は、医薬品や食品、アルコールなどの誘導を受けやすい。また、アセトアミノフェンの肝毒性は、CYP2E1 および CYP3A4 による代謝反応物に起因する。このように、生活習慣により発現が変動しやすく有害事象への関与も報告されているため、CYP2E1 の寄与率を正確に評価する必要がある。
- C) UGT1A1 欠損 iPS 細胞株：CYP 代謝安定性を指標に選択された化合物は、non-CYP による動態予測が必須である。UGT（UDP-グルクロン酸転移酵素）分子種は non-CYP の代表的な第 II 相酵素であるが、分子種の寄与率推定のための標準的な試験方法は確立されていない。そこで、non-CYP による動態予測系確立の一端として、UGT の中で最も薬物代謝への寄与が大きい UGT1A1 欠損を試みる。

各薬物代謝酵素遺伝子のゲノム編集は、独自に開発した効率の良いゲノム編集技術（Takayama K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2017）やその改良版により実施した。いずれの分子も、開始コドン付近を標的とし、CRISPR/Cas9 システムにより変異を導入した。CRISPR/Cas9 により二本鎖切断され直鎖状になったドナープラスミドが、非相同末端結合（NHEJ）により標的とする塩基配列に挿入されるよう、ヒト iPS 細胞にゲノム編集実験を行った。その後、Puromycin によるポジティブセレクションを行い、それぞれの標的遺伝子に対して、10 個から 18 個のヒト iPS 細胞のコロニーを取得した。次に、取得したヒト iPS 細胞のコロニーの標的遺伝子座に目的の配列が挿入されているか確認するために、ジェノタイプピングを行った。標的配列付近が増幅されるように設計したプライマーを用いて、PCR により変異アレルの増幅を確認した。多くのクローンにおいて、片アレルにドナープラスミドが挿入されたヒト iPS 細胞クローンであることが分かった。そこで、野生型アレルをサンガー法により塩基配列解析を行い、標的とした塩基配列付近に、数塩基の挿入あるいは欠失が認められた。これらの解析により、CYP1A2、CYP2E1、UGT1A1 をそれぞれ欠損したヒト iPS 細胞株の樹立に成功した。

続いて、目的のゲノム編集がヒト iPS 細胞の未分化性に影響を及ぼしていないか評価した。野生型株と、CYP1A2 欠損株、CYP2E1 欠損株、UGT1A1 欠損株は、いずれもヒト iPS 細胞に特有のコロニー状の形態を示した。次に、未分化細胞マーカー（*OCT3/4*, *SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2)*, *NANOG*) の遺伝子発現量を Real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、いずれの欠損株における未分化細胞マーカー遺伝子の発現量は野生型株と同程度であり、有意な差は認められなかった。また、*NANOG* および *SOX2* のタンパク質発現を免疫染色法により観察した結果、いずれの細胞においても染色像に差はなかった。以上の結果より、CYP1A2、CYP2E1、UGT1A1 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。

(2) 薬物代謝・抱合酵素欠損のヒト iPS 細胞由来肝細胞の創薬応用

本研究ではヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた各分子の特異的な動態・毒性評価系を目指している。そこで、まず CYP1A2、CYP2E1、UGT1A1 の欠損がヒト iPS 細胞の肝分化能に及ぼす影響を解析するために、それぞれのヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導し、以下の検討を行った。野生型ヒト iPS 細胞および CYP1A2 欠損ヒト iPS 細胞、CYP2E1 欠損ヒト iPS 細胞、UGT1A1 欠損ヒト iPS 細胞を肝細胞へと分化誘導した（野生型肝細胞、CYP1A2-KO 肝細胞、CYP2E1-KO 肝細胞、UGT1A1-KO 肝細胞）とする。次に、肝細胞マーカー (*albumin (ALB)*、*alpha-1 antitrypsin (AAT)*、*hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A)*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP3A4*) の遺伝子発現量を Real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、いずれの肝細胞における肝細胞マーカーの遺伝子発現量も野生型肝細胞と同程度であり、有意な差は認められなかった。また、標的遺伝子の遺伝子発現量の低下が認められた。以上のことから、ゲノム編集により標的遺伝子の消失が示唆され、ゲノム編集操作はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化能に影響を与えないことが示唆された。

さらに、UGT1A1-KO 肝細胞について、より詳細な解析を行なった。創薬過程の実装には、作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞が薬物代謝酵素の活性を有していることが必須の条件である。そこで、野生型肝細胞および UGT1A1-KO 肝細胞における CYP3A4 活性および UGT1A1 の発現と活性を評価した。まず、簡易的な CYP3A4 活性測定キットを用いて CYP3A4 活性を測定した結果、野生型および UGT1A1-KO 肝細胞の間で有意な差はなかった。次に、UGT1A1 のタンパク質発現を確認するため、Western Blotting を行った。その結果、野生型肝細胞および UGT1A1-KO 肝細胞ともに UGT1A1 を示すバンドが検出されなかった。さらに、UGT1A1 の代謝活性を測定するため、野生型肝細胞および UGT1A1-KO 肝細胞に UGT1A1 の基質である SN-38 を作用させ、未変化体量 (SN-38) およびその代謝物 (SN-38G) の産生量を UPLC-MS/MS を用いて測定した。その結果、野生型肝細胞および UGT1A1-KO 肝細胞において未変化体量に差はなく、いずれの肝細胞においても産生された代謝物は検出限界以下であった。これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は CYP 活性の評価系としては有用であるが、UGT1A1 の評価系としては活性が不十分であることが示唆された。そこで、オルガノイド培養技術の導入を試みた。肝オルガノイド培養技術は、生体肝に近い構造や機能を持つ肝細胞の培養を可能にする技術として開発され、疾患病態の研究や薬物動態研究への応用が期待されている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞から、肝オルガノイドを樹立し、UGT1A1-KO 肝細胞として評価可能か検討を行なった。その結果、野生型肝オルガノイドにおける *UGT1A1* の遺伝子発現量は、オルガノイド樹立前の野生型肝細胞と比較して、約 100 倍まで増加した。なお、UGT1A1-KO 肝オルガノイドにおける *UGT1A1* 遺伝子の発現量は、このような増加を認めなかった。次に、野生型および UGT1A1-KO 肝オルガノイドからタンパク質を回収し、Western Blotting を行った。野生型肝オルガノイドにおいて UGT1A1 を示すバンドが検出され、UGT1A1-KO 肝オルガノイドにおいては検出されなかった。さらに、UGT1A1 の活性が消失しているか評価するために、野生型および UGT1A1-KO 肝オルガノイドに UGT1A1 基質である SN-38 を作用させ、未変化体量 (SN-38) およびその代謝物 (SN-38G) の産生量を UPLC-MS/MS を用いて測定した。その結果、UGT1A1-KO 肝オルガノイドは野生型肝オルガノイドと比較して未変化体量が有意に上昇しており、その代謝物は検出限界以下であった。また、野生型肝オルガノイドはヒト初代培養肝細胞 (Primary human hepatocyte (PHH)) と比較して、代謝物の産生量が高い傾向を示した。以上の結果より、野生型肝オルガノイドは UGT1A1 の活性を有しており、UGT1A1 の評価系として有用であることが示唆された。また、UGT1A1 の欠損により UGT1A1 の代謝活性が消失したことが示唆された。最後に、UGT1A1-KO 肝オルガノイドを用いて肝毒性評価試験が実施可能か検討した。UGT1A1 によるグルクロン酸抱合が毒性発現に関与するとされている薬剤や内因性物質を、野生型肝オルガノイドおよ

びUGT1A1-KO 肝オルガノイドに作用させ、細胞生存率を測定した。その結果、UGT1A1-KO 肝細胞に SN38 やアセトアミノフェン、ビリルビンを作用させるとその濃度依存的に細胞生存率が低下し、野生型肝オルガノイドと比較して有意に低い値を示した。これらの結果より、UGT1A1-KO 肝オルガノイドが UGT1A1 代謝を介した肝毒性を予測可能であることが示唆された (Shintani T. *et al.*, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2023)。

英文：

The liver plays an essential role in drug metabolism and detoxification. Some drugs produce highly reactive metabolites that may lead to hepatotoxicity. Drug-induced hepatotoxicity is the most frequently cited reason for abandoning compounds early in development or withdrawing them from the market after approval.¹ Therefore, it is essential for pharmaceutical research to accurately evaluate the kinetic characteristics and toxicity of drugs in the liver.

Human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived hepatocyte-like cells (HLCs) and human iPS cell-derived hepatic organoids are expected to be used for pharmaceutical research. We have been developing a method for the differentiation of hepatocytes from human iPS cells with high efficiency. Previously, we have succeeded in generating CYP2C19 poor metabolizer's model using CYP2C19-knockout (KO) human iPS cell-derived HLCs by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 system. We also generated CYP3A4-KO iPS cell-derived HLCs for the evaluation of CYP3A4-mediated drug-induced toxicity. Human iPS cell-derived hepatocyte models with knockout of pharmacokinetic-related enzymes would be a powerful tool to evaluate the contributions of specific pharmacokinetic-related enzymes.

In this study, we established CYP1A2-KO iPS cells, CYP2E1-KO iPS cells and UGT1A1-KO iPS cells using the CRISPR-Cas9 system. To establish CYP1A2-KO iPS cells, CYP2E1-KO iPS cells and UGT1A1-KO iPS cells, genome editing targeting exon 1 of the CYP1A2 gene, CYP2E1 gene or UGT1A1 gene was performed using the CRISPR-Cas9 system. The donor plasmid containing the puromycin-resistance gene was linearized by CRISPR-Cas9-induced double-strand breaks, and then it was inserted into the targeted nucleotide sequence on human iPS cells by non-homologous end-joining (NHEJ). After positive selection with puromycin, we obtained human iPS cell colonies. To examine whether the transgene cassette was inserted at the target locus, genotyping was performed using the primer designed near the targeting sequence. As a result, a band was detected in KO iPS cells but no band was detected in WT iPS cells. From these results, we succeeded in establishing CYP1A2-KO iPS cells, CYP2E1-KO iPS cells and UGT1A1-KO iPS cells. We showed that knockout of CYP1A2, CYP2E1 or UGT1A1 did not affect the pluripotent state of human iPS cells by real-time RT-PCR and immunostaining analysis.

WT iPS cells, CYP1A2-KO iPS cells, CYP2E1-KO iPS cells and UGT1A1-KO iPS cells were differentiated into HLCs, in order to examine whether the hepatic differentiation capacity of these KO iPS cells was similar to that of WT iPS cells. The gene expression levels of hepatocyte markers (*albumin* [*ALB*], *alpha-1 antitrypsin* [*AAT*], *hepatocyte nuclear factor 4 alpha* [*HNF4A*], *CYP2C9*, *CYP2C19*, and *CYP3A4*) in these KO iPS-HLCs were similar to those in WT iPS-HLCs. These results suggested that knockout of CYP1A2, CYP2E1 or UGT1A1 did not affect the differentiation to hepatocytes.

We then differentiated UGT1A1-KO iPS cells into HLCs and established hepatic organoids from HLCs. To investigate whether these cells can predict UGT1A1-related drug metabolism and hepatotoxicity, metabolic and toxicity tests were conducted using a variety of representative drugs. To our knowledge, no prior study has reported the establishment of a UGT1A1-KO human iPS cell line. We considered that UGT1A1-KO hepatic organoids would be useful as a highly specific assay for the evaluation of UGT1A1-mediated kinetics and toxicity.