

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：種々のバリエーションを有したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製と毒性評価系への応用
2. 研究開発代表者：水口裕之（国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 肝細胞分化誘導プロジェクト 招へいプロジェクトリーダー）
3. 研究開発の成果

薬物誘発性肝障害（肝毒性）は、医薬品の開発中止や市販後の警告、販売中止に至る主要な有害事象である。ヒト組織の利用により毒性評価の向上が見込まれるものの、我が国においては入手が困難であり、安定供給、継続性の観点から実現は困難である。さらに、薬物代謝酵素の活性に個人差（10倍～1000倍以上）が大きいことが正確に肝毒性を評価することが困難な原因となっている。そこで本研究では、iPS 細胞技術を駆使することで個人差を反映した薬剤の肝毒性評価系の開発を行った。

具体的には以下の4項目について研究を推進した。

① ヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を創出する技術開発の改良

これまでに我々は FOXA2、HNF1 α 遺伝子を導入することにより、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進できることを報告してきた（J Hepatol. 2012）。その際に、これらの遺伝子を別々のアデノウイルス（Ad）ベクターに搭載して遺伝子導入していたが、遺伝子導入による分化促進効果をさらに強めるために、FOXA2、HNF1 α を共搭載した Ad ベクターを作製したところ、肝分化促進効果の増強に成功した。また、更なる肝分化増強が可能な転写因子の探索を行い、ATF5、c/EBP α 、PROX1 遺伝子を導入することによって、肝分化を促進できることを見出した（BBRC. 2016）。さらに、肝細胞の培養上清を用いることにより、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の肝機能を向上できることも確認した。

② 平均的な薬物代謝酵素活性を有したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の他に、薬物代謝酵素の活性が個人差の下限レベルである肝細胞や、上限レベルである肝細胞の作製

平均的な薬物代謝活性を有するヒト初代培養肝細胞（PHH）および、薬物代謝活性が上限・下限である PHH（計 12 ドナー）からヒト iPS 細胞を作製した。上述で開発した分化誘導技術を用いて、肝細胞へと分化誘導させたのち、CYP1A2、2C9、3A4 活性を測定した。PHH 由来 iPS 細胞から作製した分化誘導肝細胞における薬物代謝酵素活性は、PHH の薬物代謝酵素活性の個人差を反映していた。従って、薬物代謝酵素活性の個人差を反映したヒト iPS 細胞由来肝細胞が作製可能であることが示された（PNAS. 2014）。

③ 薬物が主病因となって発症した劇症患者由来 iPS 細胞を用いて肝細胞を分化誘導し、極めて稀な薬物代謝酵素の遺伝子多型を有する評価細胞の作製

2名の小児劇症肝炎患者から iPS 細胞を樹立し、肝細胞への分化誘導を行った。小児劇症肝炎患者由来 iPS 細胞は未分化能を保持していること、従来のヒト iPS 細胞とほぼ同等の肝細胞への分化能を保持していることを確認した。さらに、ゲノム DNA のエキソン領域解析により、遺伝子多型解析も実施した。

④ これらの毒性評価細胞パネルを用いた毒性評価や、酵素誘導の評価系の確立

上記②で作製したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞パネルを用いて、毒性評価試験への応用を試みた。ベンゾブロマロン、ペルヘキシリン、タモキシフェン等の薬物を用いて、元の個人の肝細胞における薬物の感受性を、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いて再現できることを確認した。さらに、分化誘導肝細胞において、オメプラゾール、フェノバルビタール、リファンピシン作用により、それぞれ CYP1A2、2B6、3A4 が誘導されることから、本細胞が酵素誘導の評価系として使用できることが示唆された。

以上の成果により、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた個人差を反映した薬物の肝毒性評価系は、PHH を用いた試験より正確できめの細やかな肝毒性予測ができる可能性があることが示唆された。将来的には、本評価系を新薬承認申請のガイドライン（案）に反映することを目指す。