

# 代謝性疾患モデリングにも最適な 高機能ヒト iPS 細胞由来肝細胞

- 成熟肝細胞様マーカーを発現
- 代謝性疾患のモデリングに最適なインスリン依存的グルコース調節と脂質代謝機能を保持
- 脂肪肝誘導条件下でのトリグリセリド蓄積と TNFα の分泌を示し、進行性 NAFLD の疾患モデ リングにも有効

#### 原文はこちら >>

https://www.takarabio.com/learning-centers/stem-cell-research/stem-cell-technical-notes/hepatocytes-for-disease-modeling

この TECHNICAL NOTE は上記 Web サイトに掲載されている情報を日本語訳として編集したものです。本文書に含まれる ライセンス、著作権、および商標に関する情報は www.takarabio.com をご参照ください。

# 序文

肝臓は、脂質代謝や血糖調節など、500を超える重要な機能を果たしている。その一方で、肝臓の機能 障害と関連のある非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、 肥満といった代謝障害は、エピデミックの域に達している。これらの代謝障害は、お互いに密接に関連 しており(図1)、例えば、NAFLDは2型糖尿病発症のリスク因子であり、逆に、2型糖尿病は肝臓の 進行性炎症[非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)]の主な寄与因子となっている。また、メタボリッ クシンドロームは肥満と関連があり、2型糖尿病や心血管疾患の発症リスクを伴う。さらに、家族性高 コレステロール血症、α1-アンチトリプシン欠損症、糖原病などの遺伝性代謝障害には、代謝酵素欠損 症や肝機能障害を引き起こす欠陥遺伝子が関与している。



#### 図1. 代謝性疾患と肝機能障害の関係

肝臓の機能障害は、相互に関連した代謝障害につながる可能性がある。メタボリックシンドロームは、腹部肥満に加えて 血圧、血糖値、血清トリグリセリドの上昇、または高比重リポ蛋白の低値がみられる状態と定義され、肝機能障害によっ て引き起こされる可能性があり、また2型糖尿病の原因となる場合がある。肝臓の機能障害は非アルコール性脂肪性肝疾 患(NAFLD)の原因となる可能性もある。NAFLDは、アルコール摂取ではなく代謝機能不全が原因で脂肪が肝臓に沈着 した場合(脂肪肝)に生じる。NAFLDは進行して非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)となり、最終的に肝硬変に至る可 能性がある。NAFLD患者はしばしばインスリン抵抗性を発現し、糖尿病患者は NASH を発症することから、相互に関連 したこれらの代謝性疾患間の複雑な相互作用を媒介するうえでの肝臓の明白な役割が実証されている(Tilg, Moschen, and Roden 2016)。





肝臓における代謝性疾患進行の分子機構は十分に解明されておらず、その解析には in vitro 疾患モデルが 不可欠となっている。in vitro 疾患モデルを構築するための細胞には、肝臓のインスリン抵抗性、脂質代 謝、および遊離脂肪酸の蓄積に関連した代謝特性が求められるため、これまでは初代肝細胞が最も一般 的に用いられてきた。しかしながら、初代肝細胞についてはドナー間のばらつきが大きく、また、各ド ナーから採取可能な細胞の数に限りがあるなどの制約が指摘されてきた。

一方、ヒト iPS(hiPS)細胞から分化誘導により作製した肝細胞(hiPS 肝細胞)は、上記の制約がな く、患者や健常人から非侵襲的に取得した体細胞を初期化した hiPS 細胞より無限に供給することが可 能である。また、hiPS 肝細胞を用いた疾患モデリングでは、遺伝子改変技術を適用し易いしという利点 も挙げられる。すなわち、ゲノム編集などの遺伝子改変技術を用いた特定の疾患関連変異を有する hiPS 肝細胞の作製が容易となることから、肝臓の代謝性疾患の原因と進行をより詳細に解析できることが期 待されている。ただし、有効な疾患モデリングの構築には、肝細胞の重要な機能を再現できる hiPS 肝 細胞の確保が極めて重要である。

最近まで、hiPS 肝細胞の機能は代謝機能のモデリングには不十分であった。これらの問題に対処するた め、我々は、複数の hiPS 細胞株でロット間差が少ない、高度に安定した分化パターンを示す (Ghosheh et al. 2016) Robust な(=頑健性が高い) 肝細胞分化プロトコールと、hiPS 細胞由来肝細 胞の長期培養を可能にする新しい維持培地を開発した。また、これらの技術を応用し、異なるドナーに 由来する3種類の hiPS 細胞株(ChiPSC12、ChiPSC18、ChiPSC22; C12、C18、C22と略記)より作 製した Cellartis Enhanced hiPS-HEP のいずれか一つと、維持培地などを含むオールインワンキットを 発売した。遺伝的背景が異なり、かつ安定した性能を維持した3種類の hiPS 肝細胞をラインナップす ることで、ドナーに由来する変動を反映し、バッチ間のばらつきが少ない信頼性の高い解析結果の取得 が可能である。また、Cellartis Enhanced hiPS-HEP は成熟肝細胞の特徴を示すとともに、十分な薬物代 謝機能(drug-metabolizing functionality)を有したまま2週間維持できる。

以下では、Cellartis Enhanced hiPS-HEP の3種の hiPS 肝細胞が、肝細胞の代謝性疾患モデリングに適した性能を有することを検証した各種データについて示した。

### 結果

#### Enhanced hiPS-HEP は肝細胞マーカーを発現し、成熟肝細胞の機能的特性を示す

肝発生および肝臓特異的遺伝子の発現の調節に必要な転写因子である Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ )は、複数の重要な代謝経路と関連しており(Gonzalez 2008)、我々の分化プロトコールで作 製した肝細胞の 90%以上が HNF4 $\alpha$  を発現することが、免疫染色で確認されている(Asplund et al. 2016)。Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGPR1)も肝臓特異的細胞表面タンパク質であり、成熟した肝細胞のマーカーである(Takayama et al. 2014; Peters et al. 2016)。我々の検討では、3 つの hiPS 細胞 株のいずれに由来する Enhanced hiPS-HEP でも HNF4 $\alpha$  と ASGPR1 の両方が高発現していることが (**図**2)、HNF4 $\alpha$  については核免疫染色により、ASGPR1 については膜免疫染色により確認されてい る。また、注目すべきこととして、Enhanced hiPS-HEP の解凍後 12 日目における *HNF4\alpha* と *ASGPR1* の mRNA 発現レベルは、凍結保存したヒト初代肝細胞(hphep)の解凍後 1 日目のレベルと同程度であ った。これは、Enhanced hiPS-HEP がより長期間に渡って、これらの肝細胞マーカーを高いレベルで 発現することを示している。







 $\vec{R}$   $\vec{R}$ 

- 図 2. Enhanced hiPS-HEP は成熟肝細胞マーカーを発現する。
- パネルA: HNF4αの染色を、3つの異なる hiPS 細胞株(C12、C18、C22)に由来する Enhanced hiPS-HEP について 解凍後12日目に行い、凍結保存したヒト初代肝細胞(hphep)について解凍後1日目に行った。
- パネルB: 同様に、ASGPR1の染色を、C18に由来する Enhanced hiPS-HEP については解凍後 12 日目に行い、hphep については解凍後 1 日目に行った。スケールバー = 50 μm。
- パネルC: HNF4α と ASGPR1 についての mRNA 発現解析を、トランスクリプトーム解析により定量化した。C12、C18、C22 由来の Enhanced hiPS-HEP については、解凍後 13 日目(各細胞株につき n = 2 バッチ)、hphep については解 凍後 1 日目に行った(n = ドナー3 名)。データは平均値±標準偏差として示す。

成熟した肝細胞が in vivo で果たす多数の機能のうち、肝細胞 in vitro モデルの評価に一般的に用いられる のはアルブミンと尿素の合成と分泌である。アルブミンには血液の膠質浸透圧を調節する機能があり、 血清アルブミン低値は肝硬変や慢性肝炎の指標となっている。また、尿素は肝臓によるタンパク分解経 路における代謝産物の一つであり、尿素合成障害や肝機能障害の指標として知られている。肝細胞モデ ルの評価に用いられる他の特性として、肝臓で産生されるプロテアーゼインヒビターである α1-アンチト リプシン (α1AT) があり、α1AT 欠損症は慢性組織破壊および肝損傷に関連している。

3種の hiPS 細胞株に由来する Enhanced hiPS-HEP について、アルブミンと α1AT が高発現しているこ とが(図3、パネルA、B、C)、免疫染色および mRNA 発現解析により確認された。また、注目すべき ことに、Enhanced hiPS-HEP と hphep の両者で、アルブミンの強い免疫陽性を示すのは一部の細胞のみ であることが確認されたが、これは、肝臓組織の薄膜切片でも観察された metabolic zonation と一致して いた(Jungermann and Kietzmann 2000) (図3、パネルA)。

また、Enhanced hiPS-HEP は、尿素サイクルに関与する遺伝子を hphep 細胞と同レベルで発現し(**図** 3、パネル D)、アルブミンおよび尿素を分泌した(**図3、パネルEおよびF**)。Enhanced hiPS-HEP の 解凍後4日目、6日目、12日目、20日目のアルブミン分泌は、hphep の解凍後1日目のレベルと同等 か、それ以上であった。また、解凍後13日目と20日目の尿素分泌は、hphep の解凍後1日目のレベル より低く、経時的に増加した。







#### 図 3. Enhanced hiPS-HEP の有する成熟肝細胞様機能

- アルブミンの染色(パネル A) と α1AT の染色(パネル B) を、凍結保存したヒト初代肝細胞(hphep)の解凍後1日目に、C18に由来する Enhanced hiPS-HEP の解凍後12 日目に行い、アルブミンの染色のみヒト肝臓薄膜切片でも行った。 スケールバー = 50 μm。
- パネルC: ALB と α1AT の mRNA 発現解析を、トランスクリプトーム解析により定量化して、C12、C18、C22 由来 Enhanced hiPS-HEP について解凍後 13 日目に行い(各細胞株につき n = 2 バッチ)、解凍後1 日目の hphep (n = ドナー 3 名)と比較した。
- パネル D : 尿素サイクル酵素の mRNA 発現解析を、トランスクリプトーム解析により定量化して、C12、C18、C22 に由来する Enhanced hiPS-HEP について解凍後 13 日目に行い(各細胞株につき n = 2 バッチ)、解凍後 1 日目の hphep (n = ドナー3 名)と比較した。
   略語: CPS1 = カルバモイルリン酸シンターゼ; OTC = オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ; ASS1 = アルギ

略語: CPS1= カルバモイルリン酸シンターゼ; OTC= オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ; ASS1= アルギ ノコハク酸シンターゼ; ASL= アルギニノコハク酸リアーゼ; ARG1= アルギナーゼ-1。

- パネルE: C12、C18、C22 由来 Enhanced hiPS-HEP(各細胞株につき 2 つの technical replicate) からのアルブミン分 泌を、解凍後 4 日目、6 日目、12 日目、20 日目に、hphep(n = ドナー3 名)については解凍後 1 日目に、ELISA で測 定した。
- パネルF: C12、C18、C22 由来 Enhanced hiPS-HEP(各細胞株につき 2 つの technical replicate)からの尿素分泌を、 解凍後 13 日目と 20 日目に、hphep(n = ドナー3 名)については解凍後 1 日目に、ELISA で測定した。 パネル C~Fに示す実験のデータは平均値±標準偏差として示す。





#### Enhanced hiPS-HEP は機能的グルコース調節を示す

肝細胞は、グルコース産生を調節することによってエネルギー代謝を行う。血糖値が高いとき、肝細胞 はインスリンに応答し、グリコーゲン貯蔵を増加させ、糖新生とグリコーゲン分解を減少させる。また 逆に、血糖値が低いときには、グルカゴンおよびグルココルチコイドに応答し、グリコーゲン貯蔵の減 少と、糖新生とグリコーゲン分解によるグルコース産生を行う。一方、NAFLD やメタボリックシンドロ ーム、2 型糖尿病では、肝細胞はインスリン抵抗性となり、血中グルコース濃度が増加する。

肝臓代謝性疾患を適切に反映したモデル細胞では、正常なインスリン反応とグルコース調節機能を有す る必要がある。Enhanced hiPS-HEP については、低インスリン濃度でプロテインキナーゼ B-α (Akt) の リン酸化によりインスリンに反応し (図4、パネルEおよびパネルF)、グリコーゲン代謝、糖新生、お よびインスリンシグナル伝達に関与する遺伝子の発現レベルは hphep と同程度であることが確認された (図4、パネルB、C、D)。さらに、Enhanced hiPS-HEP は、グリコーゲン貯蔵能を保持していること が示された (図4、パネルA)。また興味深い点として、hphep でも Enhanced hiPS-HEP 培養でも、グ リコーゲン貯蔵に関して強く染色されるのは肝細胞の一部のみであり、これも、肝葉で観察される metabolic zonation と一致していた (図3、パネルA)。







**TakaRa** 

Clontech TakaRa cellortis www.takarabio.com





- 図 4. Enhanced hiPS-HEP の有するグルコース調節機能とインスリン反応能
- パネルA: C18 由来 Enhanced hiPS-HEP について解凍後 12 日目に、hphep について解凍後 1 日目に、過ヨウ素酸シッフ(PAS) 染色によりグリコーゲン貯蔵を可視化した。スケールバー = 50 μm。
- パネル B~D: グリコーゲン代謝(パネル B)、糖新生(パネル C)、インスリンシグナル伝達(パネル D)に関与す る遺伝子の mRNA 発現解析を、解凍後12日目の C12、C18、C22 由来 Enhanced hiPS-HEP について行い(各細胞株に つき n = 2 バッチ)、解凍後1日目の hphep (n = ドナー3名)を用いた結果と比較した。
   略語: AGL = グリコーゲン脱分枝酵素; GSK3A/B = グリコーゲンシンターゼキナーゼ3α/β; GYS2 = グリコーゲンシンターゼ2; PYGL = グリコーゲンホスホリラーゼ、肝臓型; PCK1/2 = ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナー ゼ1/2; FBP1/2 = フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ1/2; G6PC = グルコース-6-ホスファターゼ; G6PD = グルコ
- ース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼ; GLUT-2= グルコーストランスポーター2; INSR= インスリン受容体; IRS1/2= イ ンスリン受容体基質 1/2; PIK3CA/B/D = PI3-キナーゼサブユニット α/β/δ; AKT1 = プロテインキナーゼ Β-α。
- パネル E : 解凍後 12 日目の C18 由来 Enhanced hiPS-HEP における Akt タンパク質のリン酸化に対するインスリンの 影響を、ウエスタンブロットを用いて解析した([+]条件 n = 3; [-]対照 n = 1)。
- パネルF: 解凍後6日目のC18 由来 Enhanced hiPS-HEP 中の pS473 による Akt リン酸化を、ELISA を用いて測定した(各処理濃度でn=1)。0 nM および2 nM のインスリン処理条件を試験したが、測定可能な Akt リン酸化は得られなかった。パネル B~E に示す実験のデータは平均値±標準偏差として示す。

#### Enhanced hiPS-HEP は機能的脂質代謝を示す

健常人では、肝臓は摂食と空腹に反応して、脂肪酸、ステロール、リポタンパク質を肝臓内や肝臓外へ 輸送する。様々な疾患状態ではこのような代謝過程が機能せず、肝臓はこれらの物質を蓄積する。また 通常、肝臓は低密度リポタンパク質(LDL)を取り込んで超低密度リポタンパク質(VLDL)と高密度リ ポタンパク質(HDL)を分泌し、血液中のリポタンパク質によって組織から組織へ運搬されることでコ レステロールのレベルを調節する。プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型(PCSK9) は、LDL 受容体(LDLR)との相互作用により血漿中コレステロールの恒常性を調節する酵素である。 (コレステロールを運ぶ)LDL 粒子は、LDLR に結合すると肝細胞内に輸送され、PCSK9 はこの受容体 をリソソーム分解の標的とする。PCSK9 が阻害されると、LDLR は再び細胞膜に戻り、細胞外液からさ らに LDL 粒子を除去することができる。このように、PCSK9 は血中 LDL 濃度を下げ、したがってコレ ステロール値を下げる臨床阻害薬の優れた標的となっている。実際、これを標的とした2つの異なる医 薬品が 2015 年に米国食品医薬品局(FDA)の承認を受けている。

Enhanced hiPS-HEP では、脂肪酸の取り込み、合成、β酸化に関与する脂質代謝にとって重要な複数の 遺伝子が hphep と同程度のレベルで発現することが示された(図5、パネルC)。さらに、Enhanced hiPS-HEP は高レベルの LDLR を発現することで(図5、パネルB)、蛍光標識された LDL を取り込むこ とが確認された(図5、パネルA)。血中コレステロールレベルの調節に関連するその他の遺伝子とし て、アポリポタンパク質 B (APOB)、アポリポタンパク質 A1 (APOA1)、PCSK9、ステロール調節エ レメント結合タンパク質 1 および 2 (SREBP-1 および SREBP-2)、リポタンパク質中のトリグリセリド を遊離脂肪酸とグリセロールに加水分解するリポタンパク質リパーゼ(LPL)が、Enhanced hiPS-HEP に高発現されていた(図5、パネルB)。













- 図 5. Enhanced hiPS-HEP の LDL 取込み能とコレステロール調節、脂質代謝関連遺伝子発現
- パネルA: 解凍後6日目のC12、C18由来 Enhanced hiPS-HEPを、固定の直前にLDL-DyLightとともに3時間または24時間インキュベートした。スケールバー = 25 μm。その他の固定時点(解凍後4日目および12日目)でも同様のLDL 取り込みが認められた(データは示していない)。
- パネルBおよびパネルC: 血中コレステロール調節および脂肪酸代謝に関与する遺伝子のmRNA発現を、解凍後12日目のC12、C18、C22由来Enhanced hiPS-HEP(各細胞株につきn=2バッチ)と、解凍後1日目のhphep(n=ドナー3名)について解析し比較した。データは平均値±標準偏差として示す。略語:LDLR=LDL 受容体;APOB/A1=アポリポタンパク質B-100/A1;PCSK9=プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型;SREBP-1/2=ステロール調節エレメント結合タンパク質1/2;LPL=リポタンパク質リパーゼ;FATP2/4/5=脂肪酸輸送タンパク質2/4/5;FASN=脂肪酸シンターゼ;SCD5=ステアロイルCoAデサチュラーゼ5;ACADL=アシルCoAデヒドロゲナーゼ;L-FABP=肝臓型脂肪酸結合タンパク質;CPT1A=カルニチンO-パルミトイルトランスフェラーゼ1。

#### 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)のモデリング

NAFLD は、肝細胞中の脂質の取り込みと除去のバランスが取れていない状態であり、トリグリセリドの 異常蓄積を生じることで脂肪肝の原因となることが注目されている。NAFLD の後期段階では炎症が発生 し、これは非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)と呼ばれる。これまでにさまざまな NASH 細胞モデル が開発され、メチオニンーコリン欠乏培地(MCD 培地)は脂肪肝を誘導し(Sahai et al. 2006)、炎症 や線維症のマーカーである TNFα の発現を誘導することがわかっている。これは、進行性 NAFLD におけ る脂肪肝発生の生理学的反応と同様である。

Enhanced hiPS-HEP は、高濃度のオレイン酸で 24 時間処理すると、脂肪滴にトリグリセリドを蓄積することが示された(**図6、パネルA**)。重要なこととして、脂肪肝を誘導する MCD 培地で処理すると、 Enhanced hiPS-HEP は *TNF*α mRNA の発現増加を示した(**図6、パネルB**)。



図 6. 脂肪肝誘導時のトリグリセリドの蓄積および炎症マーカーTNFαのレベル上昇。

- パネルA: 解凍後6日目のC12、C18、C22 由来 Enhanced hiPS-HEP を、600 µM のオレイン酸を添加した BSA また は対照のBSA 溶媒とともに24時間インキュベートした。固定した細胞をOil Red O で染色したところ、細胞中の脂肪 滴が赤く染色された。なお、本実験に使用した BSA には脂肪酸が含有されていたため、BSA のみで処理した細胞にも ある程度の脂肪滴は認められた。スケールバー = 50 µm。その他の固定時点(解凍後4日目および12日目)でも同様 のレベルのOil Red O 染色が認められた(データは示していない)。
- パネルB: C18 由来の Enhanced hiPS-HEP を、脂肪肝を誘導する MCD 培地 [メチオニン・コリン欠乏 Williams E 培地 (WME)] で 24 時間刺激した。qPCR による測定で、*TNFa*の mRNA 発現は対照(WME)と比較して MCD 培地 (MCD) に反応して増加した。各処理条件で n = 3 であり、データは平均値±標準偏差として示す。





### 結論

我々が開発した Robust な hiPS 肝細胞の分化プロトコールと高機能を維持する新規維持培地により、機能的肝細胞を安定的に供給できることが確認された。また、これを用いて作成された hiPS 肝細胞による *in vitro* モデルを利用して、NAFLD/NASH、2型糖尿病、メタボリックシンドロームといった、肝代謝の機能障害に関連した疾患の解析が可能であることが示唆された。Cellartis Enhanced hiPS-HEP は、ヒト初代肝細胞と同様に、*HNF4a、ASGPR1、a1AT*の発現、アルブミンと尿素の分泌、グルコースおよび脂質の機能的調節の主要な特徴など、成熟肝細胞の重要な特性を示す。さらに、Enhanced hiPS-HEP を用いて、脂肪肝を誘発する条件において、進行性 NAFLD を模倣した炎症反応を生じることが確認できた。Enhanced hiPS-HEP では、異なる健常人由来の3種の iPS 肝細胞が用意されているが、これらとは異なる hiPS 細胞株からの hiPS 肝細胞についても、肝細胞分化の受託サービスによりご提供が可能である。

# 方法

#### 細胞培養

3 種のヒト iPS 細胞株 ChiPSC12、ChiPSC18、ChiPSC22(C12、C18、C22 と略記)由来の凍結 Enhanced hiPS-HEP を、Cellartis Enhanced hiPS-HEP v2 kit のユーザーマニュアルに従って解凍後、プ レーティングし、維持培養した。細胞は、2 日または3 日ごとに培地を交換し、最長で解凍後 21 日間維 持した。凍結ヒト初代肝細胞(BioreclamationIVT)については、メーカーの標準プロトコールに従って 解凍し、プレーティングした。

#### トランスクリプトーム解析

解凍後 13 日目の C12、C18、C22 由来 Cellartis Enhanced hiPS-HEP(各細胞株につき n = 2 バッチ)よ り、total RNA を GenElute RNA/DNA/Protein Plus Purification Kit(Sigma-Aldrich)を用いて抽出した。 また、解凍後 1 日目の hphep (n = ドナー3 名)の total RNA についても同様に抽出した。トランスクリ プトームの解析は、Affymetrix Gene 2.0 ST Array を用いて行った。マイクロアレイの生データを R ソフ トウェアにインポートし、oligo package(Carvalho and Irizarry 2010)で Robust Multichip Average 法に よりシグナル強度を正規化した。マイクロアレイのプローブ ID を、biomaRt package(Yates et al. 2016; Durinck et al. 2009)を用いて、Ensembl BioMart (release 90, assembly GRCh38) により HGNC 遺伝子記号に変換した。

#### 免疫細胞化学

細胞の染色は先述の通り行った(Ulvestad et al. 2013)。Cellartis Enhanced hiPS-HEP は解凍後 12 日目に、hphep は解凍後 1 日目に、4%ホルムアルデヒドとともに 15 分間インキュベートして固定した。細胞の染色は以下の一次および二次抗体で行った:ウサギ抗 α1AT(1:200);ウサギ抗 HNF4α(1:300);ウサギ抗アルブミン(1:1,000);マウス抗 ASGPR(1:50);ロバ抗ウサギ IgG、Alexa Fluor 594(1:1,000);またはヤギ抗マウス、Alexa Fluor 488(1:1,000)。得られた免疫染色の画像データは、Image J ソフトウェアを用いてそれぞれの DAPI 染色の画像とマージした。

#### タンパク質定量

細胞を PBS で 1 回洗浄し、0.02 mM NaOH で 4°C で 16 時間溶解させた後、解析まで-20°C で保存し た。Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて、メーカーのプロトコールに従っ てタンパク質レベルを定量化した。





#### 過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色

固定した Enhanced hiPS-HEP(C18、解凍後 12 日目)および hphep(解凍後 1 日目)の PAS 染色により、グリコーゲン貯蔵を可視化した。細胞の染色は Glycogen Assay Kit(Sigma-Aldrich)により、メーカーのプロトコールに従って行った。

#### LDL 取り込み

解凍後4日目、6日目、12日目の Enhanced hiPS-HEP(C12、C18、C22 由来)における低密度リポタ ンパク質(LDL)の取り込みを評価するため、細胞を LDL-DyLight(1:100)とともに3時間または24時 間インキュベートした。細胞を PBS で1回洗浄し、免疫蛍光を記録した。

#### Oil Red O 染色

Enhanced hiPS-HEP を、300 µM BSA(Sigma-Aldrich)を含む 600 µM オレイン酸(Sigma-Aldrich)と ともに、または 300 µM BSA のみ(溶媒対照)とともに 24 時間インキュベートした(解凍後 4 日目、6 日目、12 日目)。固定した細胞(免疫細胞化学の項を参照)を、Oil Red O(0.005 g ORO/ml 2-プロパ ノールを蒸留水で 3:2 に希釈)で 30 分間染色した。

#### ウエスタンブロット

Enhanced hiPS-HEP(C18 由来、解凍後 12 日目)をインスリン不含培地で 3 時間インキュベートした 後、0 nM または 100 nM のインスリンで 10 分間処理した。リン酸化 Akt(Cell Signaling)および総 Akt (Cell Signaling)をウエスタンブロット(NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels, Thermo Fisher Scientific)により定量化した。

#### アルブミン分泌

Enhanced hiPS-HEP(C12、C18、C22 由来)からのアルブミン分泌を解凍後 4 日目、6 日目、12 日 目、20 日目に解析し、hphep からのアルブミン分泌を解凍の 24 時間後に解析した。培地中アルブミン 含有量を Albuwell kit(Exocell)を用いて、メーカーの標準プロトコールに従って解析した。アルブミン 含有量を、1 ウェルあたりのタンパク質の総量で正規化した。

#### 尿素分泌

解凍後 13 日目と 20 日目に、Enhanced hiPS-HEP を 5 mM 塩化アンモニウムとともに 24 時間インキュ ベートした。24 時間後に培地を回収し、QuantiChrom Urea Assay Kit(BioAssay Systems)で尿素分泌 を解析した。尿素含有量を、1 ウェルあたりのタンパク質の総量で正規化した。

#### インスリン反応

解凍後 12 日目に、C18 由来 Enhanced hiPS-HEP をインスリン不含培地で 3 時間インキュベートた後、 0 nM(-)または 100 nM(+)のインスリンで 10 分間処理した。インスリン処理細胞(+)および非処理 の対照(-)中のリン酸化 Akt および総 Akt を、ウエスタンブロット解析により定量化した。

pS473 での Akt リン酸化も ELISA(Thermo Fisher Scientific)で測定した。解凍後 6 日目に、C18 由来 Enhanced hiPS-HEP をインスリン不含培地で 3 時間インキュベートし、その後、0~100 nM の範囲の濃 度のインスリン濃度で 10 分間処理した。

#### 炎症反応の刺激

解凍後7日目に、C18 由来 Enhanced hiPS-HEP を、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を添加した
 Williams E 培地(WME)で24時間飢餓状態にした。次に、細胞をメチオニンーコリン欠乏培地(MCD 培地;コリン、メチオニン、またはグルタミン不含、0.1% BSA 含有の WME 培地)で24時間刺激するか、または対照培地(0.1% BSA を添加した WME 培地)で培養した。次に、細胞を回収し、*TNFα* の mRNA 発現を qRT-PCR を用いて解析した。





# 謝辞

Akt タンパク質のウエスタンブロット解析、MCD 培地でインキュベーションした細胞の qRT-PCR 解析 については、Ann Hammarstedt(Department of Molecular and Clinical Medicine, Gothenburg University, Sweden)よりデータを提供していただいた。

トランスクリプトーム解析データのバイオインフォマティクス解析は、Jane Synnergren と Benjamin Ulfenborg (School of Bioscience, System Biology Research Center, University of Skövde, Sweden) に実 施していただいた。

# 参考文献

Asplund, A. *et al.* One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Reports* **12**, 90–104 (2016).

Carvalho, B. S. & Irizarry, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**, 2363–2367 (2010).

Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**, 1184–91 (2009).

Ghosheh, N. *et al.* Highly Synchronized Expression of Lineage-Specific Genes during *In Vitro*Hepatic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem Cells Int.* **2016**, 1–22 (2016).

Gonzalez, F. J. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **23**, 2–7 (2008).

Jungermann, K. & Kietzmann, T. Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* **31**, 255–260 (2000).

Peters, D. T. *et al.* Asialoglycoprotein receptor 1 is a specific cell-surface marker for isolating hepatocytes derived from human pluripotent stem cells. *Development* **143**, 1475–81 (2016).

Sahai, A. *et al.* Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and osteopontin in steatosis and aminotransferase release by hepatocytes treated with methionine-choline-deficient medium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291**, G55-62 (2006).

Takayama, K. *et al.* Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSderived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** 16772–7 (2014).

Tilg, H., Moschen, A. R. & Roden, M. NAFLD and diabetes mellitus. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 14, 32-42 (2016).

Ulvestad, M. *et al.* Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 691–702 (2013).

Yates, A. et al. Ensembl 2016. Nucleic Acids Res. 44, D710–D716 (2016).

