iPS 細胞技術とゲノム編集技術を用いた肝疾患に対する創薬研究

高山 和雄^{a,b,c}

Pharmaceutical Research on Liver Diseases Using iPS Cell and Genome Editing Technologies

Kazuo Takayama^{a,b,c}

^aLaboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ^bLaboratory of Hepatocyte Regulation, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition; 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; and ^cPRESTO, Japan Science and Technology Agency; 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan.

(Received May 27, 2019)

The liver is a major organ responsible for maintaining the body's homeostasis and xenobiotic metabolism. Liver transplantation is essential for the alleviation of many severe liver diseases. However, there are many patients who cannot receive liver transplants because of donor shortage. Therefore development of effective therapeutic drugs that can replace the need for liver transplantation is desired. To this end, model cells that faithfully reproduce hepatic functions are essential. It is expected that human induced pluripotent stem cell (iPS)-derived hepatocyte-like cells, which faithfully reproduce hepatic functions, would be a valuable tool for drug discovery. Hepatic differentiation from human iPS cells has been performed using growth factors, but the hepatic differentiation efficiency was quite low and liver functions of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells were lower than those of primary human hepatocytes. Therefore we tried to improve the hepatic differentiation technology using gene transfer, genome editing, three-dimensional culture, and extracellular matrix technologies. As a result, the purity of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells was improved into 90% or more, and the liver functions of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells were improved to a level comparable to primary human hepatocytes. In this article, we introduce the research results we have acquired over the last decade.

Key words—hepatocyte; human induced pluripotent stem cells; genome editing; adenovirus vector; drug screening

はじめに

肝臓は生体の恒常性維持や異物代謝を担う主要な臓器であり、重度の遺伝性肝疾患や肝硬変、肝臓がん、薬物誘発性肝障害の根治的治療には生体肝移植が必須であることが多い。しかし、生体肝移植のドナーが絶対的に不足しているために、生体肝移植を受けられずに亡くなる患者は毎年2万人以上であると推定されている。そのため、生体肝移植に代わる有効な新規医薬品の開発が望まれている。種々の重篤な肝疾患の治療薬を開発するためには、ヒト肝臓を忠実に再現できるモデル細胞が不可欠である。現

在は、ヒト初代培養肝細胞がモデル細胞として汎用されている。しかし、ヒト初代培養肝細胞は増殖能を欠き、非常に高価であり、同一ロットの供給量に制限があるために、大規模な創薬スクリーニングなどへの応用は困難である。無限の増殖能を持つヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem) 細胞 (ヒト iPS 細胞) からヒト初代培養肝細胞に匹敵する肝機能を持つ肝細胞を作製できれば、ヒト初代培養肝細胞に代わる創薬における貴重なツールとなり得る。¹⁾ これまでに増殖因子などを用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導が行われてきたが、分化効率が低く、ヒト初代培養肝細胞よりも肝機能が大きく劣ることが問題であった。そこで、筆者らは遺伝子導入技術²⁻⁷⁾や三次元培養技術⁸⁻¹⁰⁾細胞外マトリックス^{11,12)}低分子化合物^{13,14)}などを駆使して、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術を改良し、高純度かつ高機能なヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と産業応用を試みた。

^a大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6), ^b医薬基盤・健康・栄養研究所肝細胞分化誘導プロジェクト (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 6-8), ^cJST さきがけ (〒332-0012 埼玉県川口市本町 4 丁目 1-8)

e-mail: takayama@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は 2019 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Efficient Hepatic Differentiation Using Gene Transfer Technology

Human iPS cells differentiate into hepatocyte-like cells *via* definitive endoderm cells and hepatoblast-like cells. To promote the hepatic differentiation, human iPS cells and its derivatives were transduced with liver-enriched transcription factors-expressing adenovirus vectors.

1. 遺伝子導入技術と三次元培養技術を用いた肝細胞分化誘導法の開発

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導効率を向上させるために、肝発生に必須の転写因子を未分化ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に遺伝子導入することを試みた。筆者らは、遺伝子導入効率に優れた独自開発のファイバー改変型アデノウイルス (Ad) ベクターを保有しており、本 Ad ベクターを用いることによって、ヒト iPS 細胞及びその分化細胞に対してほぼ 100% の効率で遺伝子導入可能である。^{2,5,15)} 本検討では、Ad ベクターのファイバー領域にポリリジン配列を挿入した AdK7 ベクターを使用している。ヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化途中の細胞に肝発生関連転写因子である *SRY-box 17* (*SOX17*), *hematopoietically expressed homeobox* (*HEX*), *hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (*HNF4α*) の 3 遺伝子⁵⁾あるいは *forkhead box A2* (*FOXA2*) と *HNF1 homeobox A* (*HNF1α*) の 2 遺伝子⁶⁾を導入することにより、肝細胞分化誘導は約 40% から約 90% にまで向上した (Fig. 1)。続いて、筆者らは、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を様々な細胞培養機材を用いて三次元培養することによって、更なる肝機能の改善を試みた。⁸⁻¹⁰⁾ 例えば、均一な大きさの細胞凝集体を形成可能なナノピラープレート (日立ハイテクノロジーズ社) を用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞を三次元培養条件下で成熟化させることにより、albumin (ALB) 産生量や薬物代謝酵素 cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4 (*CYP3A4*) の活性が向上することを報告した。⁹⁾ 以上のことから、遺伝子導入技術と三次元培養技術を併用することによって、機能的なヒト iPS 細胞由来肝細胞を高効率に作製できることが示された。さらに、遺伝子導入技術を用いた肝細胞分化誘

導法に関する筆者らの技術を用いて、2012 年にリプロセル社から世界初のヒト iPS 細胞由来肝細胞の製品化に成功した (製品名: ReproHepato)。

2. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の安定製造法の開発

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を産業応用するためには、大量の肝細胞を安定的に製造・供給する必要がある。最終段階まで分化したヒト iPS 細胞由来肝細胞は増殖能をほとんど持たない。そこで筆者らは、肝細胞の前駆細胞である肝幹前駆細胞の複製技術を開発することによって、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を大量供給できるシステムの構築を試みた。¹²⁾ 種々の細胞外基質のスクリーニングを実施したところ、ラミニン 111 を用いることにより肝幹前駆細胞を複製できることを見出した。一方で、ラミニン 511 やラミニン 411 は肝幹前駆細胞の複製には適さないものの、胆管上皮細胞への分化を促進した。¹⁶⁾ ラミニン 111 を用いることによって、肝幹前駆細胞は約 15 回継代可能であり、細胞数にして 10^{10} 倍まで増殖した。また、ラミニン 111 を用いた肝幹前駆細胞の純化を行うことにより、ヒト iPS 細胞株間の肝分化指向性のばらつきが矯正され、ヒト iPS 細胞の株によらず安定的に均質な ALB 陽性の肝細胞を作製可能であることを明らかにした。¹⁷⁾ 以上のことから、ラミニン 111 を用いることにより、肝幹前駆細胞を複製可能であり、高純度なヒト iPS 細胞由来肝細胞を大量供給できることを示した (Fig.

高山和雄

2015 年 3 月に大阪大学大学院薬学研究科にて学位取得 (薬科学博士)。2015 年 4 月-2018 年 1 月の間、同研究科・特任助教として勤務。2018 年 2 月から現在まで、同研究科・助教として勤務。2015 年 11 月-2017 年 3 月は、K-CON-NEX に所属し、2016 年 10 月-現在まで、JST さきがけを兼任。

Fig. 2. Hepatoblast Maintenance and Hepatic Differentiation Using Laminin

Long-term self-renewal of human iPS cell-derived hepatoblast-like cells can be performed on human laminin 111-coated dishes. In addition, highly efficient hepatocyte differentiation can be performed under a feeder-free condition using human recombinant laminin 111, laminin 511, and type IV collagen.

2).

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を産業応用するためには、品質の保証された肝細胞をロット差なく安定的に供給する必要がある。しかし、従来の肝細胞の分化誘導法では、組成が明らかでない試薬（血清やマトリゲル、フィーダー細胞など）を使用するため、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の品質のばらつきが問題となっていた。そこで筆者らは、組成が明らかな条件で肝細胞を作製する方法の開発に取り組んだ。¹¹⁾ ヒト iPS 細胞から肝幹前駆細胞のプロセスでは、マトリゲルの代わりにラミニン 111 とラミニン 511 の混合マトリックスを使用し、肝幹前駆細胞から肝細胞のプロセスでは、マトリゲルの代わりにラミニン 111 と type IV コラーゲンを使用することにより、組成が明らかな条件で肝細胞を作製する方法を開発した (Fig. 2)。¹¹⁾ 組成が明らかな条件で肝細胞を分化誘導することによって、実験間のばらつきが有意に小さくなり、安定的にヒト iPS 細胞由来肝細胞を製造できることが確認できた。¹¹⁾ また、開発した分化誘導法で作製した肝細胞において、ほとんど未分化細胞の混入がみられず、ゲノム安定性も高かったことから、創薬だけでなく再生医療にも適した分化誘導法であることが示唆された。

3. 遺伝性肝疾患研究や肝炎研究への応用

遺伝性疾患は遺伝子変異によって発症する疾患であるが、発症頻度が低い場合は患者検体が入手困難であるため、病態解明研究及び治療薬開発に適した疾患モデルが存在しない場合が多い。しかし、遺伝

性疾患患者から樹立したヒト iPS 細胞であれば、患者数にかかわらず創薬用の疾患モデル細胞を安定的に大量供給できる。¹⁸⁾ そこで筆者らは、希少な遺伝性疾患である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型 (progressive familial intrahepatic cholestasis type 2; PFIC2) 患者より樹立したヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞を用いた病態再現及び薬効評価を実施した。¹⁹⁾ PFIC2 患者由来のヒト iPS 細胞由来肝細胞 (PFIC2-iPS 細胞由来肝細胞) は胆汁酸排泄異常など PFIC2 特有の病態を示した (Fig. 3)。PFIC2 の治療に有効であることが報告されているフェニル酪酸²⁰⁾ を作用させると PFIC2-iPS 細胞由来肝細胞の胆汁酸排泄異常が改善した。¹⁹⁾ 以上から、疾患特異的ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いることにより、PFIC2 のみならずあらゆる希少な遺伝性肝疾患における発症機序の解明や適切な治療薬選択が可能であることが示唆された。

B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) や C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) などの肝炎ウイルスの感染は、肝硬変や肝がんなどの重篤な肝疾患の原因となり得る。しかし、HBV 及び HCV はヒトなどの一部の霊長類の肝細胞のみにおいて感染・複製するという「種特異性」と「臓器特異性」を有するため、感染モデルの構築が難しく、抗肝炎ウイルス薬開発の障壁である。そこで筆者らは、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HBV 及び HCV の新たな評価系になり得るか検証した。ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HBV 感染患者由来の HBV を作用

Fig. 3. PFIC2 Patient-derived iPS Cell-derived Hepatocyte-like Cells

Human iPS cells were generated from PFIC2 patients, and were differentiated into hepatocyte-like cells. In the PFIC2 iPS cell-derived hepatocyte-like cells, BSEP was not expressed on the cell surface and the biliary excretion capacity was significantly impaired.

させると、培養上清中に HBV 表面抗原の産生が認められるなど、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HBV の感染・複製能を有することを実証した。²¹⁾ また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は HCV の感染・複製も評価できることを確認した。²²⁾ さらに、ヒト肝がん由来細胞株である HuH-7 細胞などでは再現できなかった HCV 感染に対する自然免疫応答などを再現できることを示した。²³⁾ 以上のことから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は HBV 及び HCV の新規感染モデルとなり得ることを示した。

4. 薬物誘発性肝障害への応用

薬物誘発性肝障害は、薬物自体の毒性だけでなく薬物の代謝産物の毒性によることも多い。そのため、薬物誘発性肝障害の予測系に用いる肝細胞は、十分な薬物代謝能を有していることが必須である。筆者らがこれまでに作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞は、HepG2 細胞などの肝がん由来細胞株よりもヒト初代培養肝細胞に近い薬物代謝関連遺伝子発現プロファイルを示し、HepG2 細胞よりも高感度に薬物の肝細胞毒性を検出できることを見い出している。⁹⁾ これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は肝毒性を予測する *in vitro* 評価系として利用できることが示唆された。今後、ヒト初代培養肝細胞では難しい同一ロットの細胞による医薬品開発初期の大規模な肝毒性スクリーニングや慢性肝毒性試験への応用が期待される。最近、筆者らは肝臓の zonation 情報を反映した肝細胞の作製にも成功しているため、zone 特異的な薬物誘発性肝障害を予測することも将来的には可能になると考えている。³⁾

肝臓の薬物代謝能は個人差が大きい。その要因の 1 つに肝細胞にて発現する薬物代謝酵素の一塩基多型の存在がある。CYP2C19 や CYP2D6 などの薬物代謝酵素は、特定の一塩基多型の存在によりその活性がほぼ消失することがある。このような表現型を呈する個人を (poor metabolizer; PM) という。PM では薬物の代謝遅延により、予期せぬ副作用が出現する危険性がある。しかし、PM の原因となる一塩基多型を有するヒト初代培養肝細胞の入手には限界があり、PM 特異的な肝毒性の出現をヒト初代培養肝細胞で予測することはほぼ不可能である。そこで筆者らは、CYP2D6 の PM となる一塩基多型を有するヒト初代培養肝細胞からヒト iPS 細胞 (CYP2D6 PM-iPS 細胞と命名) を樹立し、肝細胞へと分化誘導後、CYP2D6 の活性等を測定した。¹⁷⁾ その結果、CYP2D6 PM-iPS 細胞由来肝細胞は、野生型の一塩基多型を有するヒト iPS 細胞由来肝細胞と比べて CYP2D6 の活性が著しく低く、リプログラミング前のヒト初代培養肝細胞の CYP2D6 PM としての表現型を反映していた。¹⁷⁾ また、CYP2D6 PM-iPS 細胞由来肝細胞では CYP2D6 によって解毒される desipramine の毒性がより低濃度で検出された。¹⁷⁾ この報告から、ヒト iPS 細胞技術により、CYP2D6 の PM の性質を有した肝細胞を作製可能であることが示された。今後、特異な薬物代謝酵素プロファイルを有するヒト iPS 細胞由来肝細胞のパネルが構築されれば、個人差を反映した精密な肝毒性評価が可能になると期待される。

5. ゲノム編集技術によるヒト iPS 細胞由来肝細胞の更なる応用

近年、ヒト iPS 細胞研究において CRISPR-Cas9 システムなどのゲノム編集技術の応用が期待されている。しかし、その効率は標的遺伝子の種類に大きく依存しており、未分化ヒト iPS 細胞で転写活性が低い遺伝子座 (薬物代謝酵素遺伝子を含む) における両アリルへのノックイン効率は約 1% 程度である。^{24,25)} そこで筆者らは、網羅的な遺伝子発現解析や化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。その結果、相同組換えのキー遺伝子である RAD51 recombinase (RAD51) とクロマチン構造の修飾に関与するバルプロ酸を作用させることで、ヒト iPS 細胞におけるノックイン効率を飛躍的に向上させることに成功した。²⁶⁾ 例えば、未分化 iPS

Fig. 4. Highly Efficient Biallelic Genome Editing of Human iPS Cells Using a CRISPR/Cas9 or TALEN System

To enhance the biallelic homologous recombination efficiency in human iPS cells, we performed screenings of accessory genes and compounds. We found that RAD51 overexpression and valproic acid treatment enhanced biallelic-targeting efficiency in human iPS cells regardless of the transcriptional activity of the targeted locus.

細胞では全く発現せず、肝細胞特異的な発現を示す HNF4 α 遺伝子などの両アリルへのノックインを 15% 以上の効率で実施できることを明らかにした (Fig. 4).²⁶⁾ また、本技術は肝特異的な薬物代謝酵素の遺伝子座 (CYP3A4 や CYP2C19 等) にも適用可能である。^{27,28)} RAD51 及びバルプロ酸を用いたとしても、ヒト iPS 細胞の未分化性に悪影響はなく、CRISPR-Cas9 システムの off-target 効果を高めることもないことを確認している。²⁶⁾ なお、上述で開発したゲノム編集技術は CRISPR-Cas9 システムだけでなく、TALEN システムにも適用可能である。本技術により、ヒト iPS 細胞におけるレポーター細胞の作製やノックアウト細胞の作製がより平易になることを期待する。

上述で開発したヒト iPS 細胞におけるゲノム編集技術の応用として、CYP2C19 の PM のモデル細胞の構築を行った。種々の薬物代謝酵素のうち CYP2C19 の 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供給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 PM の医薬品評価系が存在していない。そこで筆者らは、上述で開発したゲノム編集技術を用いて、CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞を樹立した。²⁸⁾ その後、肝細胞 (poor metabolizer 由来の肝細胞に相当する) を分化誘導し、CYP2C19 代謝能や薬物応答能を評価したところ、CYP2C19 PM としての性質を保持していることを確認した。²⁸⁾ したがって、CYP2C19 欠損ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、

CYP2C19 の PM のモデル細胞として活用できることが示唆された。

おわりに

筆者らは、2007 年にヒト iPS 細胞の樹立が報告された²⁹⁾ 直後から約 10 数年に渡ってヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発と応用を進めてきた。その結果、高効率に機能的な肝細胞を作製可能となった。作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞は、薬物誘発性肝障害の予測や肝炎ウイルス研究、遺伝性肝疾患のモデル構築などに応用可能であった。また、本稿では言及しなかったが、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導系は、内胚葉形成及び初期肝発生メカニズムの解明研究にも応用できることも示してきた。³⁰⁻³²⁾ さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が急性肝障害や慢性肝障害、血友病などの治療に応用可能であることを示唆する成果も得ている。^{11,33-35)} 2012 年に開発された CRISPR-Cas9 システム³⁶⁾ の導入により、レポーター細胞やノックアウト細胞が自在に作製可能となり、ますます応用研究が加速している。筆者らは最近、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製にも成功しており、³⁷⁻³⁹⁾ ヒト iPS 細胞由来肝細胞と腸管上皮細胞を連結したシステムを開発することにより、腸肝循環を *in vitro* で再現できる可能性がある。今後、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製技術及びその応用がさらに発展することにより、従来の医薬品開発プロセスの技術的課題を克服し、新薬開発をさらに加速化できるシステムが整備されていくことを期待する。

謝辞 本研究は大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野にて行ったものである。本研究の遂行に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜りました同分野教授・水口裕之博士に心より感謝致します。また、本研究をあらゆる角度からサポートして頂いた同分野教員及び技術補佐員、卒業生、学生、秘書の皆様並びに多くの共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Takayama K., Mizuguchi H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **32**, 12-20 (2017).
- 2) Inamura M., Kawabata K., Takayama K.,

- Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **19**, 400–407 (2011).
- 3) Mitani S., Takayama K., Nagamoto Y., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **25**, 1420–1433 (2017).
- 4) Nakamori D., Takayama K., Nagamoto Y., Mitani S., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **469**, 424–429 (2016).
- 5) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **20**, 127–137 (2012).
- 6) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *J. Hepatol.*, **57**, 628–636 (2012).
- 7) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *PLoS One*, **6**, e21780 (2011).
- 8) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Biomaterials*, **33**, 4526–4534 (2012).
- 9) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Biomaterials*, **34**, 1781–1789 (2013).
- 10) Yamashita T., Takayama K., Sakurai F., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 1269–1275 (2018).
- 11) Takayama K., Akita N., Mimura N., Akahira R., Taniguchi Y., Ikeda M., Sakurai F., Ohara O., Morio T., Sekiguchi K., Mizuguchi H., *Hepatol. Commun.*, **1**, 1058–1069 (2017).
- 12) Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H., *Stem Cell Reports*, **1**, 322–335 (2013).
- 13) Nakamae S., Toba Y., Takayama K., Sakurai F., Mizuguchi H., *Stem Cells Dev.*, **27**, 405–414 (2018).
- 14) Toba Y., Kiso A., Nakamae S., Sakurai F., Takayama K., Mizuguchi H., *Sci. Rep.*, **9**, 3713 (2019).
- 15) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Cell. Reprogram.*, **12**, 501–507 (2010).
- 16) Takayama K., Mitani S., Nagamoto Y., Sakurai F., Tachibana M., Taniguchi Y., Sekiguchi K., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **474**, 91–96 (2016).
- 17) Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., Mizuguchi H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16772–16777 (2014).
- 18) Yamashita T., Takayama K., Hori M., Harada-Shiba M., Mizuguchi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 312–318 (2019).
- 19) Imagawa K., Takayama K., Isoyama S., Tanikawa K., Shinkai M., Harada K., Tachibana M., Sakurai F., Noguchi E., Hirata K., Kage M., Kawabata K., Sumazaki R., Mizuguchi H., *Sci. Rep.*, **7**, 41806 (2017).
- 20) Hayashi H., Sugiyama Y., *Hepatology*, **45**, 1506–1516 (2007).
- 21) Sakurai F., Mitani S., Yamamoto T., Takayama K., Tachibana M., Watashi K., Wakita T., Iijima S., Tanaka Y., Mizuguchi H., *Sci. Rep.*, **7**, 45698 (2017).
- 22) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416**, 119–124 (2011).
- 23) Sakurai F., Kunito T., Takayama K., Hashimoto R., Tachibana M., Sakamoto N., Wakita T., Mizuguchi H., *Virus Res.*, **242**, 7–15 (2017).
- 24) Hockemeyer D., Soldner F., Beard C., Gao Q., Mitalipova M., DeKever R. C., Katibah G. E., Amora R., Boydston E. A., Zeitler B., Meng X., Miller J. C., Zhang L., Rebar E. J.,

- Gregory P. D., Urnov F. D., Jaenisch R., *Nat. Biotechnol.*, **27**, 851–857 (2009).
- 25) Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C. S., Gao Q., Cassady J. P., Cost G. J., Zhang L., Santiago Y., Miller J. C., Zeitler B., Cherone J. M., Meng X., Hinkley S. J., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Jaenisch R., *Nat. Biotechnol.*, **29**, 731–734 (2011).
- 26) Takayama K., Igai K., Hagihara Y., Hashimoto R., Hanawa M., Sakuma T., Tachibana M., Sakurai F., Yamamoto T., Mizuguchi H., *Nucleic Acids Res.*, **45**, 5198–5207 (2017).
- 27) Takayama K., Hagihara Y., Toba Y., Sekiguchi K., Sakurai F., Mizuguchi H., *Biomaterials*, **161**, 24–32 (2018).
- 28) Deguchi S., Yamashita T., Igai K., Harada K., Toba Y., Hirata K., Takayama K., Mizuguchi H., *Drug Metab. Dispos.*, **47**, 632–638 (2019).
- 29) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., *Cell*, **131**, 861–872 (2007).
- 30) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Inamura M., Ohashi K., Okuno H., Yamaguchi T., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Okano T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Development*, **141**, 91–100 (2014).
- 31) Watanabe H., Takayama K., Inamura M., Tachibana M., Mimura N., Katayama K., Tashiro K., Nagamoto Y., Sakurai F., Kawabata K., Furue M. K., Mizuguchi H., *PLoS One*, **9**, e90791 (2014).
- 32) Hanawa M., Takayama K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H., *Stem Cell Rev.*, **13**, 542–551 (2017).
- 33) Okamoto R., Takayama K., Akita N., Nagamoto Y., Hosokawa D., Iizuka S., Sakurai F., Suemizu H., Ohashi K., Mizuguchi H., *Cell Transplant.*, **27**, 299–309 (2018).
- 34) Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Okamoto R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H., *J. Hepatol.*, **64**, 1068–1075 (2016).
- 35) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tatenos C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H., *Cell Transplant.*, **24**, 1127–1138 (2015).
- 36) Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E., *Science*, **337**, 816–821 (2012).
- 37) Ozawa T., Takayama K., Okamoto R., Negoro R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H., *Sci. Rep.*, **5**, 16479 (2015).
- 38) Negoro R., Takayama K., Nagamoto Y., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **472**, 631–636 (2016).
- 39) Negoro R., Takayama K., Kawai K., Harada K., Sakurai F., Hirata K., Mizuguchi H., *Stem Cell Reports*, **11**, 1539–1550 (2018).