

200933032A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

(H21 - 肝炎 - 一般 - 008)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 一雄

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

(H21 - 肝炎 - 一般 - 008)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 一雄

平成22年(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

池田 一雄 —————3

II. 分担研究報告

マウス iPS 細胞からの肝細胞系譜分化誘導に関する研究

河田 則文 —————9

新しいヒト肝炎ウイルス感染実験モデル系の開発研究

吉里 勝利 —————11

ヒト肝細胞キメラマウス肝臓における薬物代謝酵素のドナー年齢別発現量比較

立野 知世 —————18

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

寺岡 弘文 —————24

肝炎ウイルス感染モデルの構築

田中 靖人 —————27

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

中西 真 —————30

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 —————32

IV. 研究成果の刊行物・別刷 —————39

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

研究代表者 池田 一雄 名古屋市立大学教授

本研究は、日本人の細胞から iPS 細胞を作製してヒト肝細胞へと分化誘導させ、これを移植して得たキメラマウスを利用し、肝炎ウイルス感染に関わる宿主要因を日本人肝細胞で検討できるモデルを開発することを目的とするものである。本年度は日本人線維芽細胞由来の iPS 細胞作製のため、レトロウイルスベクターを使用し、数個の iPS 細胞様コロニーを樹立した。そして、ヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化誘導実験では、内胚葉系細胞マーカーの Sox17, Pdx1, 肝芽細胞マーカーの Afp は、分化誘導開始 15 日目、20 日目に発現し、Afp では分化誘導に伴い遺伝子発現量が増加していた。成熟肝細胞マーカーの Alb は、分化誘導開始 20 日目で強い発現が確認された。未熟なヒト肝細胞が uPA/SCID マウス内でヒト成熟肝細胞へ分化することも確認できたため、次年度には iPS 細胞から分化誘導させたヒト肝細胞の uPA/SCID マウスへの移植を行う。

A. 研究目的

本研究は、日本人の細胞から iPS 細胞を作製してヒト肝細胞へと分化誘導させ、これを移植して得たキメラマウスを利用し、肝炎ウイルス感染に関わる宿主要因を日本人肝細胞で検討できるモデルを開発することを目的とする。ヒト肝臓病の研究は齧歯類を用いた疾患モデルや培養細胞を用いて行われてきたが、齧歯類の肝細胞の代謝動態や炎症免疫反応がヒトとは異なるため、得られたデータが必ずしもヒト病態を反映しないことがこれまで問題であった。また、培養で増殖性肝細胞を作製できるが、主要な分化肝細胞機能は培養により消失し、ヒト肝細胞に感染させうる肝炎ウイルスも JFH-1 株のみである。また、in vitro 肝炎ウイルス感染実験は霊長類が利用されてきたが、動物保護問題に加え、コストや感染効率面で問題がある。このような現状の中、研究分担者の吉里らは uPA/SCID マウスに

ヒト肝細胞を移植して高度にヒト型肝細胞に置換した肝臓を持つマウスを作製する技術を開発したのであるが、このキメラマウスは生体内でヒト肝細胞がアルブミン合成能や薬物代謝能を保有しながら増殖でき、しかも肝炎ウイルス感染が可能である。しかしながら、現在移植に用いているヒト肝細胞は米国から購入した脳死小児コーカシアン由来のものであり、必ずしも日本人の肝細胞機能を反映しているとは言い難い。これを克服するためにも日本人の肝細胞に由来するキメラマウスの作製が不可欠である。本邦における倫理的問題、生命観、移植医療の現状を鑑みると日本人肝細胞を安定供給することは不可能に近い。そこで、近年報告された細胞の iPS 化技術を用いてヒト肝細胞を作製し、これをキメラマウスモデルに利用しようとするものである。

B. 研究方法

日本人の線維芽細胞からの iPS 細胞作成
日本人線維芽細胞由来の iPS 細胞作製の
ため、レトロウイルスベクターを使用し
た。

東京大学 iPS 細胞研究拠点、大津真博士
との共同研究で、山中 4 因子 (KLF4, SOX2,
OCT3/4, C-MYC) をそれぞれ発現する
293GPG パッケージ細胞 (tet off に
よりレトロウイルスが産生される) の上
清を遠心濃縮してレトロウイルスを回収
し、ヒト線維芽細胞に感染させ、iPS 細胞
を樹立させる。あるいは、高効率高発現
遺伝子導入用レトロウイルスベクタープ
ラスミドである pDON-5DNA に OCT3/4,
SOX2, KLF4, LIN28, NANOG の 5 因子が単
一の mRNA として転写され、翻訳時に
Thosea asigna virus の 2A 配列を介して
5 つの蛋白が生成されるウイルスベクタ
ーをヒト線維芽細胞に感染させ、iPS 細胞
を樹立させる。

肝細胞への分化誘導

MitomycinC 処理を施した MEF を
gelatin でコートした 12-well plate、
24-well plate、8-well plate に播種した。
翌日、その MEF 上に適切な数のヒト iPS
細胞を播種し、ヒト ES 細胞用培地 (1%
non-essential amino acid、200mM
L-glutamine、20% KSR、0.1M
2-mercaptoethanol、bFGF (5ng/ml) を含
む DMEM-F12 培地) で 7 日間培養した。そ
の後、B27 supplement を含む RPMI に
100ng/ml の activin A を添加し 5 日間培
養を行い、ヒト iPS 細胞から内胚葉系細
胞への分化誘導を行った。次に、低酸素
条件下 (4%O₂) で BMP-4 (20ng/ml)、bFGF

(10ng/ml) を添加して 5 日間培養を行っ
た後、HGF (20ng/ml) を添加してさらに 5
日間培養を行い、肝芽細胞への分化誘導
を促した。そして、成熟肝細胞への分化
誘導として酸素条件を元に戻し (20% O₂)、
培地を Hepatocyte Culture Medium (EGF
を除き、ascorbic acid、BSA-FAF、
hydrocortisone、transferrin、insulin、
GA-1000 を含む HBM 培地) に交換して
OncostatinM (20ng/ml) を添加し 5 日間
培養を行った。RT-PCR 法及び Western
blot 法による様々な肝細胞マーカー遺伝
子の発現やタンパク質発現を指標に肝細
胞系譜への分化誘導を検討した。

C. 研究結果

ゼラチン固定化シャーレにマイトマイ
シンC処理したフィーダー細胞を播種し、
レトロウイルスで遺伝子導入した細胞を
霊長類 ES 細胞様培地にて培養し、約一ヶ
月培養を継続することで ES 細胞様形態を
示すコロニーをピックアップした。

ヒト iPS 細胞 (未分化状態)、分化誘導
を開始して 15 日目 (HGF (20ng/ml) を添
加した 5 日後) の細胞及び分化誘導を開
始して 20 日目 (OncostatinM (20ng/ml)
を添加した 5 日後) の細胞を用いた
RT-PCR 法により肝細胞マーカー遺伝子の
発現を比較することで、ヒト iPS 細胞か
ら肝細胞系譜への分化段階の評価を行っ
た。その結果、内胚葉系細胞マーカー遺
伝子の Sox17、Pdx1、肝芽細胞マーカー遺
伝子の Afp は、分化誘導開始 15 日目、20
日目に発現し、Afp では分化誘導に伴い遺
伝子発現量が増加していた。また、成熟

肝細胞マーカー遺伝子の Alb は、分化誘導開始 20 日目で強い発現が確認された。未分化マーカー遺伝子である Nanog は、分化誘導を開始してからも発現が確認され、薬物代謝系マーカー Cyp7a1、Cyp3a1 の遺伝子発現は確認されなかった。Western blot 法により、内胚葉系細胞マーカー FOXA2、肝芽細胞マーカー AFP、HNF4 α タンパク質は、分化誘導開始 15 日目に発現が確認され、分化誘導開始 20 日目には成熟肝細胞マーカー ALB、胆管上皮細胞マーカー CK18 タンパク質の発現が確認された。また、肝芽細胞マーカー AFP や成熟肝細胞マーカー ALB は分化誘導に伴いタンパク質発現量が増加していた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞が内胚葉、肝芽細胞を経て肝実質細胞へと分化誘導していることが明らかになった。

D. 考察

国内最大の感染症（約 350 万人）である肝炎ウイルス感染に伴う肝疾患の病態解析と新検査法や治療法開発は、疾患の終末像である肝癌予防の観点からも厚生労働行政上大きな課題である。近年、ウイルス肝疾患治療はインターフェロン製剤の改良や抗ウイルス剤の開発により飛躍的に向上したが、C 型肝炎ウイルスの排除率は未だ 50%ほどであり、治療抵抗性かつ導入不可の高齢患者が今後増加することが想定される。従って、治療効率の向上と副作用軽減のために日本人肝細胞内でのウイルスライフサイクルと細胞応答を解明し、それに立脚した日本人用新規薬剤を開発する必要がある。本研究では、日本人 iPS 細胞を肝細胞に分化させ、こ

れをキメラマウス作製に利用する。現時点では、日本人線維芽細胞由来の iPS 細胞作製のため、レトロウイルスベクターを使用し、数個の iPS 細胞様コロニーを樹立した。そして、ヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化誘導実験では、内胚葉系細胞マーカー遺伝子の Sox17、Pdx1、肝芽細胞マーカー遺伝子の Afp は、分化誘導開始 15 日目、20 日目に発現し、Afp では分化誘導に伴い遺伝子発現量が増加していた。成熟肝細胞マーカー遺伝子の Alb は、分化誘導開始 20 日目で強い発現が確認された。未分化マーカー遺伝子である Nanog は、分化誘導を開始してからも発現が確認されているため、今後ファクスソーティングを利用して未分化のまま残る細胞を除き、分化誘導を進め、キメラマウスへの移植をスタートさせる。未熟な若年ドナー肝細胞をキメラマウス肝臓内に生着・増殖させた実験ではマウス肝内で、細胞が成熟し、成人ヒト肝臓と同レベルの分化形質を示すことが明らかとなり、このことより iPS 細胞から分化させたヒト肝細胞が未熟であった場合でも、キメラマウスに移植することにより成熟ヒト肝細胞に分化する可能性が高いことも解った。

このモデル動物を開発して、人種間の 1) ジェノタイプ別の感染・複製効率、2) インターフェロン感受性、日本人肝疾患、特にウイルス性肝疾患の宿主要因での病態解明、診断法や治療薬の開発へ是非繋げていきたい。

E. 結論

日本人線維芽細胞由来の iPS 細胞作製の

ため、レトロウイルスベクターを使用し、
数個の iPS 細胞様コロニーを樹立した。
ヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化誘導
では、内胚葉系細胞マーカー遺伝子の
Sox17, Pdx1, 肝芽細胞マーカー遺伝子の
Afp は、分化誘導開始 15 日から 20 日目に
発現し、Afp では分化誘導に伴い遺伝子発
現量が増加していた。成熟肝細胞マーカー
遺伝子の Alb は、分化誘導開始 20 日目
で強い発現が確認された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami
K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi
E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y.
Negligible contribution of bone
marrow-derived cells to collagen
production during hepatic fibrogenesis
in mice.

Gastroenterology. 2009, 137(4):1459-14
66

学会発表

陳輝 池田一雄 他 9 名 肝星細胞活性
化におけるマイクロRNAの関与につい
ての検討 第23回肝臓洞壁細胞研究会
大阪, 平成21年12月12日

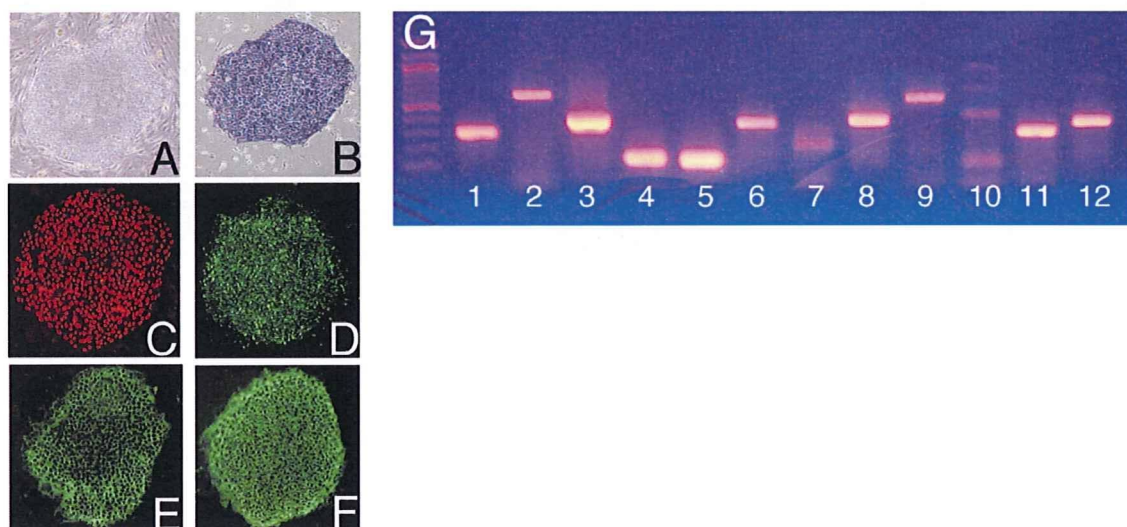


図1:ヒト iPS 細胞 ; 免疫染色と RT-PCR による未分化マーカーの確認
 A; phase contrast, B; Alkaline phosphatase 染色
 C; NAGOG, D; SSEA-4, E; TRA-1-60, F; TRA-1-81
 G; RT-PCR; 1; REX1, 2; GDF3, 3;NANOG, 4; SOX2
 5; OCT3/4, 6; FGF4, 7; ESG1, 8; DRRA4, 9; DPPA2
 10; hTERT, 11; c-MYC, 12; KLF4

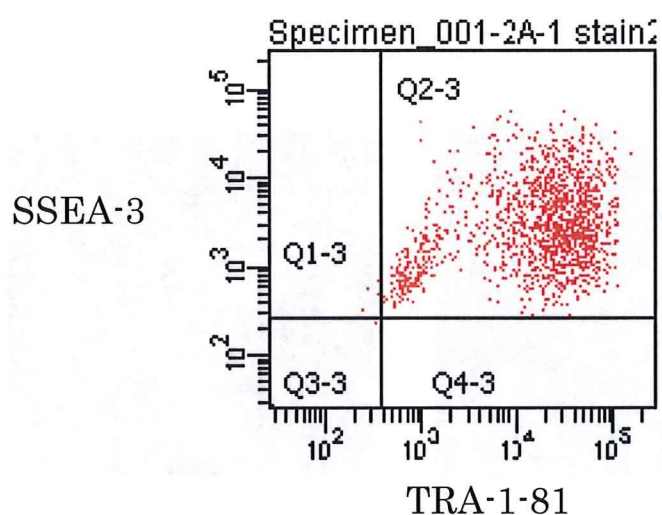


図2：日本人の細胞に由来する iPS 細胞のファックス解析による未分化マーカーの確認

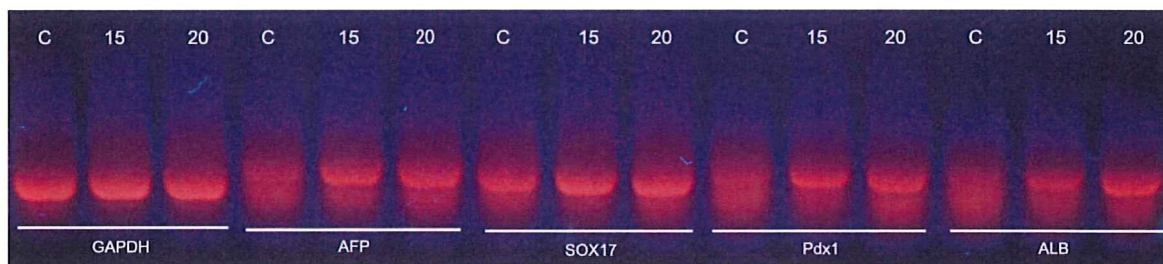


図 3 iPS 細胞から肝細胞への分化誘導：RT-PCR による分化マーカーの確認

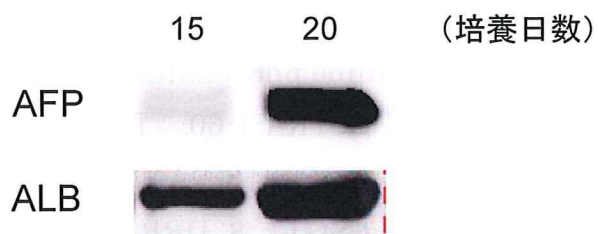


図 4 iPS 細胞から肝細胞への分化誘導：WB による分化マーカーの確認

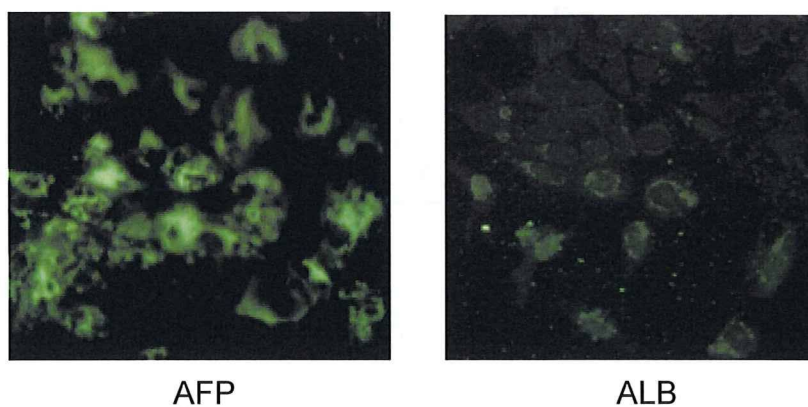


図 5 iPS 細胞から肝細胞への分化誘導：免疫染色による分化マーカーの確認

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

分担研究報告書

マウスiPS細胞からの肝細胞系譜分化誘導に関する研究

分担研究者 河田 則文 大阪市立大学大学院医学研究科
肝胆膵病態内科学 教授

研究要旨：マウスiPS細胞から、接着培養での分化誘導によりアルブミン蛋白を発現する肝細胞系譜を取得した。現在までのところ効率が低く本条件では細胞の濃縮へとは進められていない。

A. 研究目的

マウスiPS細胞の分化誘導により、uPA/SCIDマウスに移植するに足る肝細胞（系譜）を取得する。

B. 研究方法

マウス iPS 細胞（iPS-MEF-Ng-20D-17細胞；理研）を用いた。内胚葉への分化誘導は、胚様体（EB）の形成または接着培養を用い、Gouon-Evans らの培地条件（Gouon-Evans V et al. Nat Biotechnol. 2006; 24: 1402）に従った。EB形成は、まず 1×10^4 cells/mLにて無血清培地（ $0.5 \times N2$ およびB27、0.05% bovine serum albumin、2 mM glutamine、0.5 mM ascorbic acidおよび 4.5×10^{-4} M MTGを含む75% Iscove's modified Dulbecco's mediumおよび25% Ham's F12培地：SFD）中で浮遊培養し、2日目にactivin A（10 ng/ml）を添加した。Gelatinまたはmatrigelを基質とした接着培養は 2×10^3 cells/cm²にて、培養開始からactivin Aを添加した。肝細胞系譜への分化誘導は、gelatin

上の接着培養による内胚葉分化誘導に引き続き、培地をhepatic plating培地（ascorbic acidとMTGを除き、EGF（10 ng/ml）、bFGF（10 ng/ml）、HGF（20 ng/ml）、TGF α （20 ng/ml）、VEGF（10 ng/ml）およびdexamethasone（ 10^{-7} M）を含むSFD培地）に交換することで行った。マーカー遺伝子の発現はGAPDHの発現量にて補正した定量PCR法にて、アルブミン（ALB）蛋白の発現はウサギ抗ALB抗体を用いた蛍光免疫染色法にて確認した。

C. 研究結果

Gelatin 接着培養における内胚葉分化誘導において、内胚葉マーカー（Sox17、Gsc、CXCR4）の遺伝子発現は5日目でEB形成の4日目（Gouon-Evans らの条件）とほぼ同程度であった。また、matrigelを基質とした場合、いずれのマーカーもgelatinの場合より発現は低かった（データ非提示）。

続いて肝細胞系譜への分化誘導を行

ったところ、ALB 蛋白を発現する肝細胞様の細胞を認めたが（図）、その数は少なかった（効率非算出）。

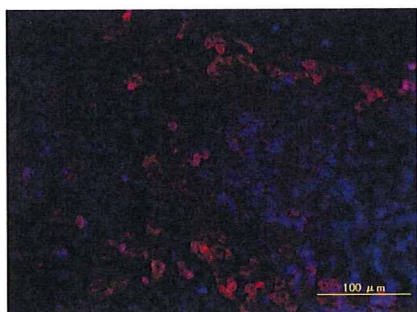


図 ALB たん白の蛍光免疫染色（day13）

5 日間の Gelatin 接着培養による内胚葉分化誘導に続き、8 日間の肝細胞系譜分化誘導を行った。赤：ALB、青：核、bar：100 μ m。

D. 考察

以前、EB形成の後に内胚葉マーカー（c-kitおよびCXCR4）陽性細胞をFACSにて濃縮し、肝細胞系譜への分化誘導を行ったが、細胞への負荷が強いためか得られたALB陽性細胞の割合は少なかった。今回、接着培養による分化誘導を試みたところ、一貫して細胞の増殖能は高い状態であったが、得られたALB陽性細胞の割合は低かった。その一因として、培養中に拍動する心筋細胞様の細胞が観察されたことから、内胚葉分化誘導時の中胚葉の割合が高いことが考えられた。今後細胞への負荷の少ない磁気ビーズを用いる方法にて内胚葉を濃縮し、肝細胞系譜へと分化誘導することで効率の向上を図りたい。

E. 結論

マウスiPS細胞から、接着培養での分化誘導によりアルブミン蛋白を発現する肝細胞系譜を取得したが、本条件では濃縮へと進められるだけの細胞数は得られなかった。

F. 研究発表

なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

（分担）研究報告書（平成 21 年度）

日本人の細胞に由来する iPS 細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いた
キメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

新しいヒト肝炎ウイルス感染実験モデル系の開発研究

研究分担者	吉里 勝利	株式会社フェニックスバイオ 学術顧問
研究参加者	鶴田 大輔	大阪市立大学大学院医学研究科
	大房 健	東和环境科学株式会社
	木村 昌一	深江化成株式会社
	稲松 睦	株式会社フェニックスバイオ
	高橋 利一	株式会社フェニックスバイオ

研究要旨：本研究は、より有効な新しい肝炎ウイルス感染実験モデル系の開発を目指すものであり、次の 2 つの目的を持っている。1. ヒト肝炎ウイルス感染症を再現するヒト肝細胞培養系の開発。2. ヒト肝臓を有するキメラマウスの作成法の開発。研究目的 1 では、細胞を従来の平面培養ではなく 3 次元培養で培養し、この培養体に新鮮培養液を血流速度に似せて通液させる方法を開発する研究を行った。ヒト線維細胞をコラーゲンゲル中に培養し、培養液を 1 mL/24 hr の速度で送液した。通液しない場合に比べて、通液細胞はゲル収縮力、細胞増殖能、及びゲルの再構築力のいずれに於いても優れていることが分かった。研究目的 2 では、肝細胞も含めて肝臓構成細胞の全てがヒト化されている“ヒト肝臓キメラマウス”の作製法の開発を目指す。この研究では、肝不全マウスの胚に正常 ES 細胞を移植して成長させる技術が必須である。この実験をするのにどれくらいの数のマウスが必要であるか推定するための実験を行ない、およそ 10 匹いれば可能であるとの結論を得ることができた。

A. 研究目的

肝炎ウイルス感染症の予防と治療は、社会的に大きな課題である。その予防と治療に大きな努力が続けられているが、完全とは言えず、更に有効な方法の開発が求められている。効果ある方法の開発に当たって、最も必要とされるのは、肝炎ウイルスの感染、増殖、及びウイルス症の発症を可能な限り再現できるモデル実験系である。これまでに、細胞培養系や動物モデル等、多くのモデルが開発されているが一長一短がある。これらのモデル系が抱える共通の問題は、ヒト肝炎ウイルスが、

培養肝細胞やマウスやラットなどの実験動物には基本的に感染及び増殖しないこと、また、たとえこれらを誘導することが出来たとしても、感染症病態を引き起こせないことである。

これまで開発されたヒト肝炎ウイルス感染実験モデル系のなかで、ヒト肝細胞で構成された肝臓を持つマウス（ヒト肝細胞キメラマウス）は、人体に於ける肝炎ウイルスの感染を比較的良く反映していると評価されている。私達は、社会のニーズに対応できる量のヒト肝細胞置換率 90% 以上のキメラマ

ウスを、安定的に生産できる体制を構築することに成功し（文献1）、特に、C型肝炎ウイルスの感染機構に関する研究および感染抑制剤の開発研究の推進に貢献してきた（文献2, 3）。

本研究は、ヒト肝細胞置換キメラマウス開発に関する私達のこれまでの実績を踏まえて、より有効な肝炎ウイルス感染実験モデル系の開発を目指すものである。次の2つの目的を持っている。

1. ヒト肝炎ウイルス感染症を再現するヒト肝細胞培養系の開発
2. ヒト肝臓を有するキメラマウスの作成法の開発

以下、二つの研究目的毎に研究方法、研究結果、及び考察を述べ、最後に、研究全体の研究結果と総合考察を述べる。

A-1 研究目的 1. ヒト肝炎ウイルス感染症を再現するヒト肝細胞培養系の開発研究

言うまでもなく、ヒト肝炎ウイルスは、人体内 (*in vivo*) では、特異性の高い認識機構でヒト肝細胞膜受容体と結合し、細胞内に侵入し、そこで宿主細胞の構成物を利用して増殖し、細胞に障害を与えるとともに、細胞外に脱出し近隣肝細胞に取り付いてこれら細胞に同様な障害を与えて、ウイルス感染症状を惹起する。このウイルス-宿主細胞間の“利益/不利益相互作用”を、人体を離れて試験管の中 (*in vitro*) で再現できれば、この相互作用の化学的、生化学的、及び分子生物学的仕組みの詳細の解明を利することは疑いがない。これまでこのような*in vitro*モデル系の開発が多く研究者によって試みられたにも拘らず、実用に堪えうる系の成功例は報告されていない。

*in vitro*モデル系開発不成功の最大の原因は、宿主細胞（肝細胞）を取り巻く*in vitro*培養環境と人体の*in vivo*環境との乖離が大きいことであると思われる。人体の*in vivo*環境を可能な限り模倣した培養法の開発を行い、この培養法で人体内での肝炎ウイルスとヒ

ト肝細胞間の“利益/不利益相互作用”と限りなく近い相互作用を再現させることを目指す。

本年度は、次の二つの観点から新しい培養法の開発研究実験を実施した。

1. 培養状態を従来の平面培養ではなく、3次元培養で行う。
2. 従来の培養法では、細胞への酸素と栄養物の供給と分泌される老廃物を含む代謝産物の除去は、主として培養液を一定の間隔で新鮮なものと交換することによってなされて来た。酸素・栄養物の供給と代謝産物の除去をより効率よく行わせるため、3次元培養体に新鮮培養液を血流速度に似せて通液させる方法を開発する。

培養対象細胞は、ヒト肝細胞であるが、入手が容易で培養法が簡便であるヒト線維芽細胞を当面の培養対象細胞とした。

本年度は次の方針で研究を行った。

1. 3次元培養法は種々あるが、私達が研究実績（文献4）を持っているコラーゲンゲル内培養法を採用する。
2. 通液は以下の方法で行なう。バレルに一定量の培養液を入れた BAS 社製のシリンジ送液ポンプの針先をコラーゲンゲル内に突き刺し、ポンプで一定速度の培養液を押し出し、針先からゲル内に注入する。

B-1. 研究方法

新生児包皮由来ヒト線維芽細胞（クラボウ社・Lot. 511458）を、高研社製コラーゲンを含む培養液（DMEM + 10% FBS）ゾル中に 5.0×10^5 個/ml の濃度で懸濁した。このゾル 2.5 ml を 3.5 cm 直径の培養ウェルに入れた。ウェル当りの細胞数は 1.3×10^6 個となる。ウェルを 37 °C および 5% CO₂ にセットされたインキュベーターに入れ、細胞をコラーゲンゲル中に立体培養した。培養液は 1 mL/24 hr の速度で送液した。送液によってウェル内に溜った液は毎日ピペットによって吸引除去した。対照実験として通液を行わず培養した。非通液培養での培養液交換は、毎日一回、その間に通液培養で走液された容量の培養液で置換することによって行なった。培養後、1, 3, 7 日目にゲルを回収し組織切片を作成した。ヘマトキシリンエオジン染色し、細

胞の状態を観察して、立体通液培養体（3D-flo-culture）と非通液培養体（3D-nonflow-culture）と比較した。

C-1. 研究結果

1. 培養後一日目で、既に、3D-flo-culture の死細胞数が 3D-nonflow-culture のそれよりも少なかった。この傾向は培養期間を通じて見られた。
2. ゲル収縮力は、3D-flo-culture の方が 3D-nonflow-culture より強かった。
3. 3D-flo-culture の方が 3D-nonflow-culture より細胞増殖が活発であるらしい。
4. 3D-flo-culture の細胞はコラーゲンを新たに合成してゲルを再構築していることを示唆している組織像（図1）が得られた。

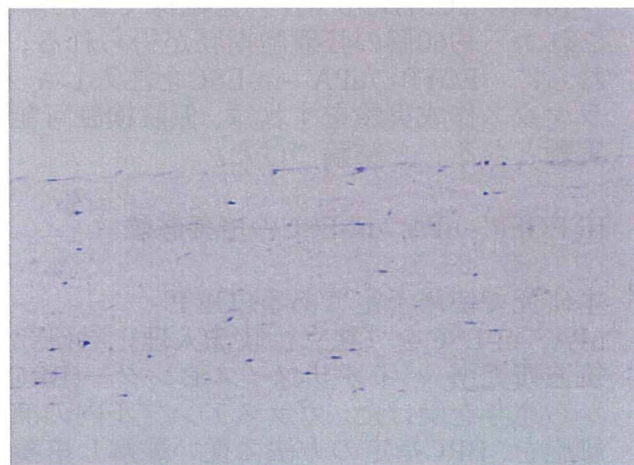
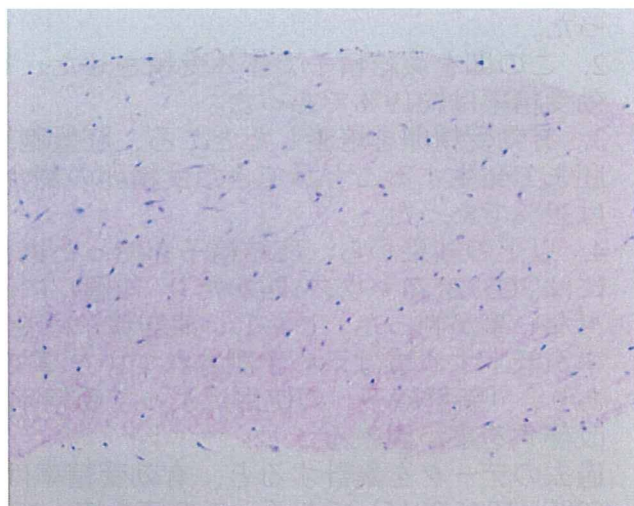


図1 培養1週間目の組織像。上、通液立体培養。 下、非通液立体培養。 倍率、100倍

以上の観察結果は、期待通り、3D-flo-culture は、3D-nonflow-culture より良い培養環境を細胞に与えていることを示唆している。また、私達の方法によって、かなり長期間、細胞を 3D-flo-culture できる可能性が出て来た。

D-1. 考察

本年度の研究によって、私達が、当初、期待していた「3D-flo-culture は、2D-nonflow-culture より良い培養環境を細胞に与えている」ことを支持する結果が得られた。本年度は形態学的評価だけ実施した。今後、生化学や分子生物学の手法で、二つの培養法の良否をさらに厳密に判定する必要がある。また、本年度使用した 3D-flo-culture 装置は、最小限度の必要性を取り入れたもので、実験中に種々の改良すべき事柄が出て来た。この経験を踏まえて、装置の改良も行なっていきたい。

A-2 研究目的2. ヒト肝臓を有するキメラマウスの作成法の開発

背景の項で述べたように、私達は、既に、2004年にヒト肝細胞をマウス肝臓に高率に生着、増殖させ、ホスト肝細胞と置換させる方法を確立し（文献1）、この方法によって得られたキメラマウスが実際にB型及びC型肝炎ウイルスに曝されるとこれに感染し、感染したこれらウイルスが、その後、ヒト肝細胞内で増殖し、増殖子孫が血液中に浸出することを示した（文献それぞれ、5, 6）。その後の研究によってこのキメラマウスヒト肝細胞が、*in vivo*で人体内肝細胞と近似した性質を示し、様々な観点からのヒト肝細胞研究に貢献することが分かって来た（文献2, 3）。

しかしながら、このキメラマウスは、5種類ある肝臓細胞の中でも、肝細胞のみがヒト化したものである。実際の肝臓の機能は、存在する各種肝臓細胞の相互作用による共同作業で果たされている。この意味で、現在のキメラマウスは、ヒト肝臓の理想的なモデルにはなり得ていない。本研究では、肝細胞も含めて肝臓構成細胞の全てがヒト化されて

いる“ヒト肝臓キメラマウス”の作製法の開発を目指す。

アルブミンプロモーター下にウロキナーゼプラスミノージェンアクチベーター遺伝子(uPA)を連結した遺伝子を生殖細胞に導入して得られた遺伝子導入マウス(uPA^{+/+}-Tgマウス)の肝臓は、この遺伝子が常時発現しているため、障害を受けた状態にある。この肝障害マウスの胚盤胞期胚にヒトES細胞(h-ESC)を注入し、得られた胚盤胞(h-ESC-BC)を偽妊娠メスマウス(仮親)に移植し発生成長させると、その肝臓が高率にヒト由来細胞によって構成されることが期待される。この仮説を検証するため、本年度は入手と実験操作が容易であるマウスES細胞(m-ESC)を使用して実験を行った。また、ホストとして使用するuPA-Tgマウスは、ヘテロ個体(uPA^{+/+}-Tgマウス)で充分である可能性もあるので、本年度はヘテロ個体で研究する。ヘテロ個体では肝障害程度が穏やかで本研究の目的に利用できないことが明らかになった場合は、ホモ個体(uPA^{+/+}-Tgマウス)を使用して実験する予定である。

B-2. 研究方法

1. ♀C57BL/6から卵子を採取し、これをuPA^{+/+}-Tgマウスから得た凍結精子と体外受精させる。
2. 受精卵を培養し胚盤胞期胚まで発生させる。得られた胚盤胞期胚をuPA^{+/+}-m-BCと呼ぶ。
3. uPA^{+/+}-m-BCに野生型マウスから樹立されたEGFPで標識されたm-ESC(EGFP⁺-uPA^{+/+}-m-ESCと呼ぶ)を注入する。得られたm-BCをキメラm-BCと呼ぶ。
4. キメラm-BCを偽妊娠♀マウスに移植し、胚発生させる。
5. 胚発生の適切な段階の胚および出産子(生後1週間以内)の各組織に於けるEGFP⁺-細胞の分布を実体蛍光顕微鏡で概観する。
6. 実験項目5の各胚および出産子の各組織から組織切片標本作製し、EGFP⁺-細胞細胞の割合を組織毎に算出し、各組織のキメラ率とする。
7. 肝臓のキメラ率と他の各組織のキメラ率に有為な差があるかどうかを判定する。

8. 肝臓のキメラ率が他の組織と比較した場合、有為に高率であると判定された場合仮説は正しいと結論づける。

この検証実験から有意な結論を得るためには、私達の経験上、最低でも50個のuPA^{+/+}-m-BCが必要と思われる。本年はこの数のuPA^{+/+}-m-BCを得るために必要な♀C57BL/6マウスの数を算出するための実験を、uPA^{+/+}-Tgマウスの凍結精子を用いて行なった。

C-2. 研究結果

I. 本実験で確保すべき♀C57BL/6マウスの匹数の推定のための体外受精実験

1. 6匹の♀C57BL/6マウスから得られた卵数から一匹当たり29個の卵子を得ることが分かった。
 2. この卵を凍結精子で体外受精させた。有効受精率は約19%であった。
 3. 有効受精卵を培養したところ、胚盤胞期胚まで発生することができた受精卵の割合は32%であった。
 4. 以上の結果から、凍結精子を使った場合には♀C57BL/6マウス1匹あたり「2個」に過ぎない事が判った。しかし、凍結精子は受精率が低下する事は予め予測されていた事であり、「新鮮精子」の使用によって受精率を改善する事が出来る。
- 過去のデータを集計すると、有効受精率は69%(1946/2815)である。この値を使って、「10匹の♀C57BL/6マウスを確保できれば、これから約60個の胚盤胞期胚が得られる。これらにEGFP⁺-uPA^{+/+}-m-ESCを注入しキメラマウス作成実験をすれば、仮説検証可能な実験となる」と結論づけた。

II. EGFP⁺-uPA^{+/+}-m-ESCの培養試験

本研究で使用予定であるEGFP⁺-uPA^{+/+}-m-ESCを「独立行政法人理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター(BRC)から恵与を受けた。ガラスアンプル内の凍結細胞を、BRC指定の方法に従い融解し培養を行った。7 x 10⁻⁵ (アンプル内の約1/3)の細胞を60-mm dishに蒔種し、標準化された培養

環境下でコロニーを増幅させた。培養2日後、コロニーの形態は良好で、我々が使用している129由来の細胞株に近い印象を受けた。即ちドームの様な隆起が見られ、輪郭もはっきりしているものである。我々が樹立したB6由来の細胞は、やや扁平で細長い形態を示す。増殖速度は通常の129/B6由来のそれよりも遅い印象を受けたが、これは継代数の問題や使用する培地に含まれる血清などの因子に左右されているかもしれない。

培養2日後のコロニーを405nm付近波長下で観察したところ、コロニーから緑色蛍光が観察する事ができた(図2)。

ES cell (B6G-2) expand test

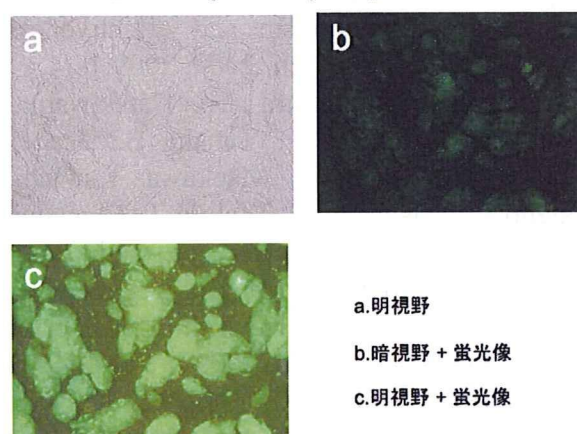


図2. EGFP⁺-B6G-2 マウス由来のES細胞の培養

ES細胞が形成したコロニーを培養2日目で、明視野(a)、暗視野と蛍光視野(b)、及び明視野と蛍光視野(c)で観察した。倍率200倍。

D-2. 考察

本研究によって、10匹の♀C57BL/6マウスから約60個の胚盤胞期胚が得られ、これらにEGFP⁺/uPA⁺-m-ESCを注入しキメラマウス作成実験をすれば、私達が目指している移植ESCによって肝臓を特異的に置換されたマウス作成が可能かどうかの結論が得られると期待される。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、

実験動物の生理、生態や習性等を理解し、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

B. 研究方法

研究目的A-1とA-2のそれぞれの項でB-1、B-2として述べた。

C. 研究結果

研究目的A-1とA-2のそれぞれの項でC-1、C-2として述べた。

D. 考察

研究目的A-1とA-2のそれぞれの項でD-1、D-2として述べた。

E. 結論

本研究は、より有効な新しい肝炎ウイルス感染実験モデル系の開発を目指すものであり、次の2つの目的を持っている。1. ヒト肝炎ウイルス感染症を再現するヒト肝細胞培養系の開発。2. ヒト肝臓を有するキメラマウスの作成法の開発。研究目的1では、細胞を従来の平面培養ではなく3次元培養で培養し、この培養体に新鮮培養液を血流速度に似せて通液させる方法を開発する研究を行った。ヒト線維細胞をコラーゲンゲル中に培養し、培養液を1 mL/24 hrの速度で送液した。通液しない場合に比べて、通液細胞はゲル収縮力、細胞増殖能、及びゲルの再構築力のいずれに於いても優れていることが分かった。研究目的2では、肝細胞も含めて肝臓構成細胞の全てがヒト化されている“ヒト肝臓キメラマウス”の作製法の開発を目指す。この研究では、肝不全マウスの胚に正常ES細胞を移植して成長させる技術が必須である。この実験をするのにどれくらいの数のマウスが必要であるか推定するための実験を行ない、およそ10匹いれば可能であるとの結論を得ることができた。

私達の考え方で肝臓全体がヒト化されたマウスが作成できれば、より人体に近いヒト肝臓研究のモデル動物の出現であり、肝炎ウイルス研究にとって新局面を拓くものと期待される。本年度の研究によって、この私達の考え方の当否を検証するための実験の基

本的な条件を決定することができた。

本研究で目指している通液性立体培養法及びヒト肝臓キメラマウス作製法の技術開発に成功すれば、これらの方法をヒト iPS 細胞に適応することによって、従来とは全く異なる肝炎実験モデルができる可能性がある。

A-E での引用文献

1. Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004;165:901-912.
2. Yoshizato K, Tateno C. A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans. *PPAR Research.* 2009, 2009:1-11
3. Yoshizato K, Tateno C. In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5(11):1435-1446.
4. Yoshizato K, Taira T, Yamamoto N. Growth inhibition of human fibroblasts by reconstituted collagen fibrils. *Biomedical Res.* 1985; 6: 61-71.
5. Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology.* 2005; 42: 1046-1054.
6. Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 2009, 51(6):1046-54.

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kubo S, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumarl E, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N. In Vivo Stable Transduction of Humanized Liver Tissue in Chimeric Mice via High-capacity Adenovirus-Lentivirus Hybrid Vector. *Hum Gene Ther.* 2010, 21: 40-50.
2. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 391(1):316-21.
3. Yoshizato K, Tateno C. A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans. *PPAR Research.* 2009, 2009:1-11
4. Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 2009, 51(6):1046-54.
5. Nishie M, Tateno C, Utoh R, Kohashi T, Masumoto N, Kobayashi N, Itamoto T, Tanaka N, Asahara T, Yoshizato K. Hepatocytes from fibrotic liver possess high growth potential in vivo. *Cell Transplant.* 2009, 18 (5): 665-675.
6. Yoshizato K, Tateno C. In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5(11):1435-1446.
7. Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis.* 2009, 1;199 (11): 1599-1607.
8. Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, Yoshizato K, Nebert DW. CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice;

comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. Toxicol Appl Pharmacol. 2009, 15; 237 (1): 119-126.

9. Zion O, Genin O, Kawada N, Yoshizato K, Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Halevy O, Pines M. Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. Pancreas. 2009, 38 (4): 427-435.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成21年度）

ヒト肝細胞キメラマウス肝臓における薬物代謝酵素のドナー年齢別発現量比較

分担研究者 立野知世 株式会社フェニックスバイオ
大下浩樹 株式会社フェニックスバイオ

研究要旨：年齢の異なるドナー肝細胞を用いて作製したキメラマウス肝臓を用いて、成長の過程で発現量が変化するヒト薬物代謝酵素の遺伝子発現を定量リアルタイムRT-PCRにより調べた。その結果、年齢依存的な発現レベルの変化は観察されず、薬物代謝酵素の多くは、成人ヒト肝臓と同レベルの発現を示した。このことから、移植された未熟な若年ドナー肝細胞はマウス肝臓内に生着・増殖する過程で成熟し、成人ヒト肝臓と同レベルの分化形質を示すと考えられた。したがって、iPS細胞から分化させたヒト肝細胞が未熟であった場合でも、uPA/SCIDマウスに移植することにより成熟ヒト肝細胞に分化する可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

本研究では、iPS細胞から分化させたヒト肝細胞をuPA/SCIDマウスに移植することにより、ヒト肝細胞キメラマウスを作製する計画である。しかし、現在のところ、uPA/SCIDマウスの肝臓に移植した未熟なヒト肝細胞が、成熟ヒト肝細胞に分化するかどうか明らかにされていない。

我々はuPA/SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することによって肝臓の80%以上がヒト肝細胞に置き換えられたキメラマウスを作出している。このキメラマウス肝臓はヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターを発現し、薬物代謝酵素の誘導や阻害等の薬物相互作用試験などに用いることもできる。キメラマウス肝臓の遺伝子発現をマイクロアレイ解析により調べたところ、キメラマウス肝臓における約85%の遺伝子が、ヒト肝臓の遺伝子発現レベルの2倍の範囲内で発現していることを確認している。

シトクロームP450 (CYP) の活性の多くは新生児では成人の20～30%程度、グルクロン酸抱合能は新生児で成人の50～70%であり、生後3ヵ月で成人と同等の活性となる。一方、CYP3A7やFM01は胎児期の肝臓で高い活性を示すが、生後低下することが知られている。また、硫酸抱合、グリシン抱合能では新生児と成人の活性はほぼ同等である。このように、代謝酵素によって、年齢による活性の変化が異なることが知られている（文献1, 2, 3, 4）。

我々のこれまでの経験から、年齢の若いドナー由来の肝細胞を用いた方が、置換率

の高いキメラマウスを作製することができるため、ドナー細胞として子供の肝細胞を用いて来た。しかしながら、これまで子供の肝細胞を持つキメラマウス肝臓の薬物代謝酵素活性が、ドナーである子供肝臓の酵素活性を示すのか、成人肝臓の酵素活性を示すのか調べられていない。

そこで、本研究では、uPA/SCIDマウスの肝臓において未熟肝細胞が成熟肝細胞に分化するかを調べることを目的として、3ヶ月齢から22歳のドナー肝細胞を移植して作製したキメラマウス肝臓を用いて薬物代謝酵素の遺伝子発現レベルを調べた。今年度は、年齢の異なるドナー肝細胞を持つキメラマウス肝臓からtotal RNAを抽出し、年齢と共に発現量が変化することが知られているヒト薬物代謝酵素から9種類 [CYP2C8、CYP2C18、CYP3A7、glucuronosyltransferase (UGT) 1A1、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、flavin-containing monooxygenase (FM0)1、FM03] を選択し、mRNA発現量を定量リアルタイムRT-PCR法で測定した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスの作出

移植に用いた凍結ヒト肝細胞は以下の5ドナーである（ドナーA:3ヶ月齢/男性/白人、ドナーB:1歳/男性/白人、ドナーC:5歳/男性/アフリカ系アメリカ人、ドナーD:14歳/男性/白人、ドナーE:22歳/男性/アフリカ系アメリカ人）。

uPA^{+/+}/SCIDマウスへのヒト肝細胞の移植は、3週齢のマウスの脾臓に1匹あたり

0.75-1.05 ×10⁶個のヒト肝細胞を20 μLに懸濁し注入することにより行った。移植後3週目から週1回マウス血液を尾静脈から2 μL採取し、抗ヒトアルブミン抗体を結合させたラテックスビーズを用いた免疫比濁法によりマウス血中ヒトアルブミン濃度を測定し、濃度の推移をモニタリングした。生後12または14週(移植後9または11週目)にマウスを解剖し肝臓を採取した。肝臓各葉の凍結切片を作製し、ヒトサイトケラチン8/18抗体による免疫染色を行い、マウス肝臓におけるヒト肝細胞の置換率を求めた。

肝臓からの total RNA の調製

凍結した肝臓組織約30 mgからQIAGENのRNeasy Mini Kitを用いてRNAを抽出した。RNAの抽出方法はRNeasy Mini Kitのプロトコールに従って行った。得られたRNA溶液は分光光度計(BioPhotometer, eppendorf)にて260 nm及び280 nmの吸光度を測定することにより純度の確認及びRNA濃度の算出を行った。

定量性リアルタイム RT-PCR 法による代謝酵素発現量の定量

調製したtotal RNAから以下のようにcDNAを合成した。Total RNA 1 μg、dNTP (2.5 mM) 2 μL、ランダムプライマー 1 μLを混合し、全量13 μLを65℃で5分間変性させた後、氷冷した。この調製液に5× First-strand buffer 4 μL、100 mM DTT 1

μL、RNAasefree水 1 μL、SuperScript III RT逆転写酵素を加えて全量20 μLとした。この調製液を25℃で5分、55℃で60分、72℃で15分反応させた。得られたcDNA溶液は以下の方法によりPCRを行った。RNA 1 μgに対しforwardおよびreverse primerを5 mol/μL、CYBR Green PCR Mastermixが1倍量になるように加え、滅菌精製水で全量25 μLとした。それぞれの遺伝子について7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster CA)を用い、50℃で2分間を1回、95℃で10分間反応させた後に95℃、15秒間及び60℃、1分間を交互に40回反応させた。

本研究で使用したヒト代謝酵素

primer:CYP2C8、CYP2C18、CYP3A7、UGT1A1、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、FM01、FM03はOperon (Tokyo, Japan) に合成委託した。配列をTable 1に示す。これらのprimerはマウス肝臓のcDNAと交差反応しないことを確認した。

データ解析は7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster CA)で行った。コントロールとしてヒト Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を測定した。発現量は各遺伝子のサイクル数(Ct値)からヒトGAPDHのサイクル数を減じ(ΔCt)、2^{-(ΔCt)}として表し、目的のmRNAとGAPDHのmRNAの相対比として示した。キメラマウス肝臓の対照として成人5ドナーの肝組織プール由来のRNA(Total RNA-Human Adult Nomal Tissue 5

Table 1.Sequences of the primers used in the present study

Primer	Sequence	
	Forward primers(5'-3')	Reverse primers(5'-3')
CYP2C8	GGGACTTTATCGATTGCTTC	GGTGCTTGTTGTCTCTGTTC
CYP2C18	AGGACATGAGCAAATCCTTAACC	GCTTCATATCCATGCAACAC
CYP3A7	ATCATTTGGAGTGAGCATCG	TTGGGGTAAGGAATGGAAAG
UGT1A1	TTGATCCCACTGGATGGC	ATGCTCCGTCTCTGATGTACAAC
UGT1A6	ACACCCTGAACTTCTTTAAGGAG	GCTGAATGTATGCTCCAGG
UGT1A9	AGGAACATTTATTATGCCACCG	CAAAACAAAGTCCGTTTCG
UGT2B7	TGACATGAAGAAGTGGGATCAG	CAACATTTGGTAAGAGTGGATATGG
FM01	ATGGGAAATTCTGGCACAGAC	ACCATGTCCCATGGGTAGC
FM03	TGGCCCTTGTAGTCCCTACCAG	GGCTTCTGAAGTCTCCCGACC
GAPDH	GGAGTCAACGGATTTGGT	AAGATGGTGATGGGATTTCCA