

Table 2. The Chimeric mice used in the present study

| No. | Donor | Age   | hAlb(mg/mL) | RI(%) | 週齢 |
|-----|-------|-------|-------------|-------|----|
| M1  | A     | 3 mo  | 9.6(9.6)    | 79.0  | 14 |
| M2  | A     | 3 mo  | 7.9(9.6)    | 84.9  | 14 |
| M3  | A     | 3 mo  | 10.6(11.3)  | 84.5  | 14 |
| M4  | B     | 1 ye  | 8.9(9.7)    | 91.4  | 14 |
| M5  | B     | 1 ye  | 5.9(13.1)   | 79.5  | 12 |
| M6  | B     | 1 ye  | 5.0(7.7)    | 82.3  | 14 |
| M7  | C     | 5 ye  | 13.5(15.0)  | 93.8  | 14 |
| M8  | C     | 5 ye  | 17.8(20.4)  | 96.9  | 14 |
| M9  | C     | 5 ye  | 17.7(17.7)  | 93.0  | 14 |
| M10 | D     | 14 ye | 7.8(9.0)    | 86.6  | 14 |
| M11 | D     | 14 ye | 4.3(4.3)    | 72.6  | 14 |
| M12 | D     | 14 ye | 7.1(7.9)    | 82.9  | 14 |
| M13 | E     | 22 ye | 4.0(4.9)    | 68.9  | 14 |
| M14 | E     | 22 ye | 5.0(5.5)    | 70.3  | 14 |
| M15 | E     | 22 ye | 5.9(8.1)    | 77.8  | 14 |

hAlb: Human albumin concentration at sacrifice (Maximum human albumin concentration)  
RI: Replacement index (%)

#### Donor

A: 3 month/ Male/ Caucasian  
B: 1 year/ Male/ Caucasian  
C: 5 year/ Male/ African American  
D: 14 year/ Male/ Caucasian  
E: 22 year/ Male/ African American

Donor Pool: Liver, Biochain) から合成した cDNA を用いた。

#### (倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを経て加工され、販売されているものを (株) フェニックスバイオのヒト組織利用倫理委員会において承認を得た上で、購入して使用した。

ヒト肝細胞を持つキメラマウス作製実験に関しては、(株) フェニックスバイオの動物実験倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

#### C. 研究結果

##### キメラマウスのヒト置換率

本研究では5ドナーの肝細胞を用いて作製された15例のキメラマウスを使用した。使用したキメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度と置換率をTable 2に示した。

##### キメラマウス肝臓中代謝酵素の発現量

##### (1) CYP (CYP2C8, CYP2C18, CYP3C7)

CYP3C7は年齢の異なるドナーを用いて作

製したキメラマウス肝臓においてほぼ一定の発現が見られ、成人ヒト肝臓と同レベルであった。CYP2C18はドナー間でばらつきがみられたが、ドナー年齢依存性は見られなかった。CYP2C8は成人ヒト肝臓に比べて、いずれのドナーにおいても1/10程度の発現レベルであった (Fig. 1)。

##### (2) UGT (UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7)

UGT1A6, UGT1A9は年齢の異なるドナーを用いて作製したキメラマウス肝臓においてほぼ一定の発現が見られ、成人ヒト肝臓と同レベルであった。UGT1A1, UGT2B7はドナー間でばらつきがみられたが、ドナー年齢依存性は見られなかった (Fig. 2)。

##### (3) FMO (FMO1, FMO3)

FMO3は年齢の異なるドナーを用いて作製したキメラマウス肝臓においてほぼ一定の発現が見られ、成人ヒト肝臓と同レベルであった。FMO1はいずれのドナーのキメラマウスにおいても成人ヒト肝臓に比べて10倍以上の発現が見られた (Fig. 3)。

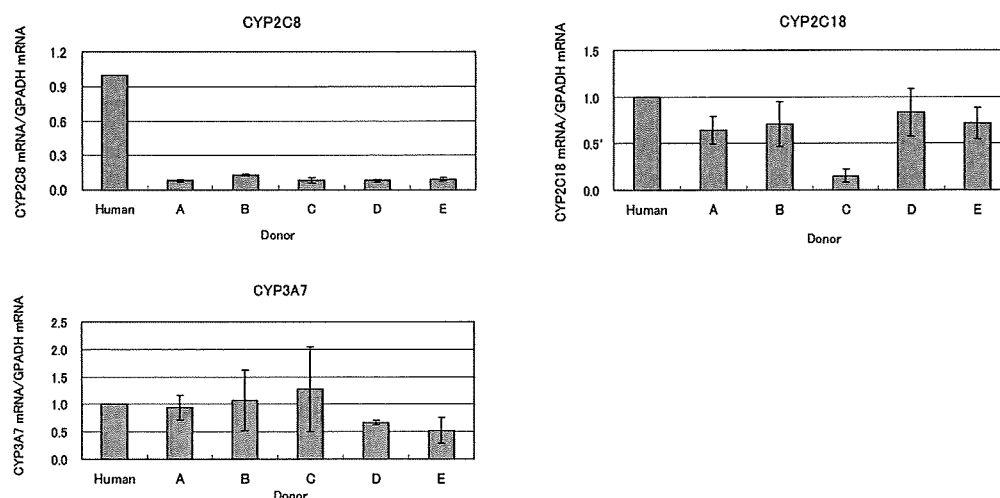


Fig.1. Human CYP expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human CYP mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

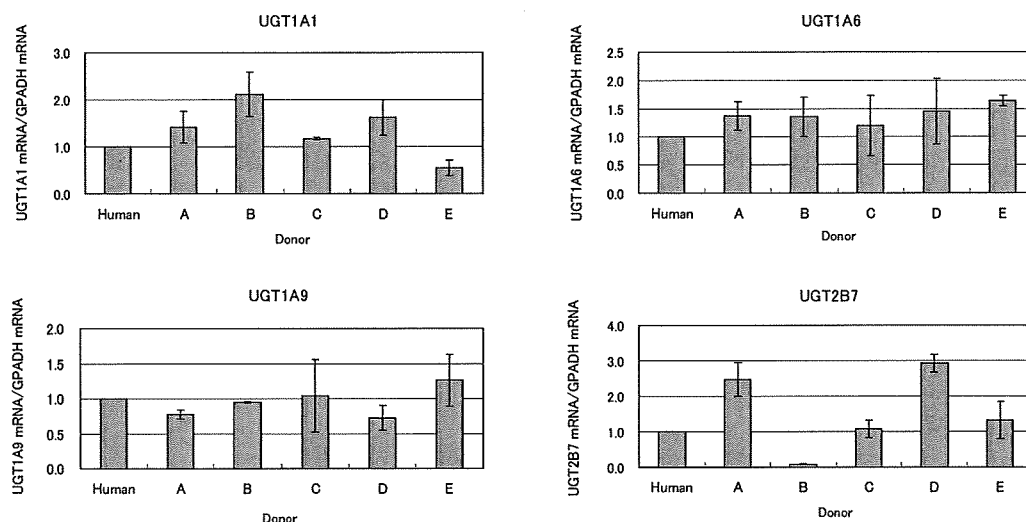


Fig.2. Human UGT expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human UGT mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

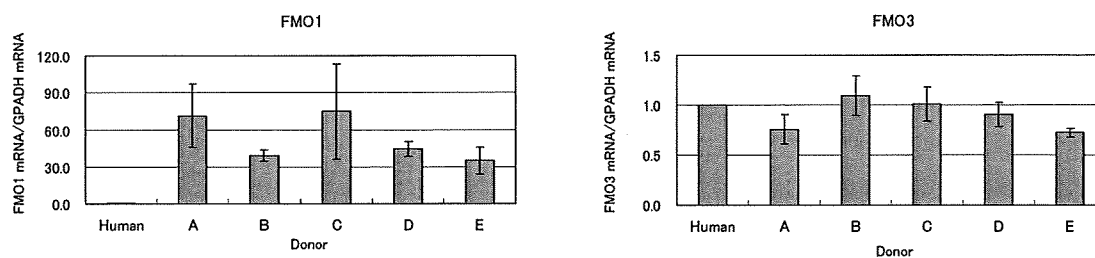


Fig.3. Human FMO expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human FMO mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

#### D. 考察

成長の過程で発現量が変化するヒト薬物代謝酵素から9種を選択し、遺伝子発現を定量性リアルタイムRT-PCRにより調べた。

CYP2C8、CYP2C18、UGT1A1、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、FM03は、年齢と共に発現が低下することが知られている。一方、CYP3A7、FM01は胎児期に発現量が高く、生後低下する(文献1-4)。これらの遺伝子のうち、CYP3A7、UGT1A6、UGT1A9、FM03は年齢の異なるドナーを用いて作製したキメラマウス肝臓においてほぼ一定の発現が見られ、ヒト成人肝臓と同等のレベルの発現であった。CYP2C18、UGT1A1、UGT2B7はドナー間でばらつきがみられたが、ドナー年齢依存性は見られなかった。CYP2C8はいずれのドナー由来のキメラマウス肝臓においても、成人ヒト肝臓のmRNAの発現レベルの1/10程度であった。しかし、これまでの報告においては、CYP2C8のmRNA、蛋白質発現、CYP2C8特異的基質Diclofenacを用いたDiclofenac

4'-hydroxylase activityは、ドナー肝臓またはドナー由来ミクロゾーム、プールドミクロゾームと同等レベルでの発現が確認されている(文献5)。このことから、CYP2C8に関しては再度検討する必要があると思われる。また、胎児肝臓ではFM01が発現しているが、生後急激に低下しFM01に代わってFM03の発現が上昇する(文献2)。FM01はいずれのドナーのキメラマウスにおいても成人ヒト肝臓に比べて10倍以上の発現が認められた。キメラマウス肝臓では、通常生後起っているFM01の発現を制御するメカニズムが働いていない可能性が考えられた。

以上のことから、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肝細胞に分化していると考えられた。

来年度は、今年度測定した薬物代謝酵素以外に、生後活性が変化することが知られている6種類の薬物代謝酵素を追加するとともに、2種類の成人ドナー肝細胞を用いて作製したキメラマウスの解析も実施する予定。

#### E. 結論

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。

本文中に引用した参考文献：

1. Yokoi T. Essentials for starting a pediatric clinical study(1): Pharmacokinetics in children. The Journal of Toxicological Sciences. 2009, 34:307-312
2. Koukouritaki S K, Simpson P, Yeung C K, Rittie A E, Hines R N. Human Hepatic Flavin-Containing Monooxygenase 1(FM01) and 3(FM03) Developmental Expression. PEDIATRIC RESEARCH. 2002, 51(2): 236-243
3. Johnson T N. The development of drug metabolizing enzymes and their influence on the susceptibility to adverse drug reactions in children. Toxicology. 2003, 192:37-48
4. Strassburg C P, Strassburg A, Kneip S, Barut A, Turkey R H, Rodeck B, Manns M P. Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. Gut. 2002, 50:259-265
5. Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno S, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K, Yokoi T. Expression of human cytochromes P450 in Chimeric mice with humanized liver. Drug Metabolism and Disposition. 2004, 32: 1402-1410

#### F. 健康危険情報

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-Kumar 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 Therapy 2010, 21: 40-50.
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. 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, 51:1046-54.

4. Yamasaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Tateno C, Nishikura Y, Oofusa K, Harada D, Naito S, Horie T, Ohta S: Approach for in vivo protein binding of 5-n-butyl-pyrazolo [1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Chemical research toxicology* 2009, 23:152-158

5. Yoshizato K, Tateno C. In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5:1435-1446.

6. 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.

7. 立野知世 総合臨床 第 59 巻:297-298

永井書店、2009 年

## 2. 学会発表

1. Tateno C., Tachibana A., Yoshizato K.: Repopulation of the immunosuppressed retrorsine-treated infant rat liver with human hepatocytes 第 10 回国際細胞移植学会 岡山 平成 21 年 4 月 20-21 日
2. 立野知世 ヒト肝臓保有モデル 第 56 回実験動物学会総会 大宮 平成 21 年 5 月 14-16 日
3. 立野知世 ヒト肝細胞遺伝子改変キメラマウスの開発 広島バイオクラスター研究成果発表フォーラム、広島、平成 21 年 10 月 29 日
4. 立野知世、山崎ちひろ、石田雄二、吉実康美、柳愛美 uPA/SCID マウスおよびヒト肝細胞キメラマウス肝臓における Kupffer 細胞の性状 第 23 回肝臓洞壁細胞研究会、大阪、平成 21 年 12 月 12-13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

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

研究分担者 寺岡 弘文 東京医科歯科大学難治疾患研究所教授

研究要旨：重篤な肝疾患に対する根治的治療法として脳死肝移植や生体肝移植が知られているが、深刻なドナー不足を筆頭に克服すべき課題も多い。そこで、肝移植に替わる、あるいはそれを補完するために、多能性幹細胞を含む非肝臓源の細胞から分化誘導させた肝細胞を用いた、細胞移植治療が注目されている。これまでにマウスやカニクイザルES細胞から、胚様体接着培養法を主に用いて、機能的な肝細胞様細胞への分化誘導に成功している。しかし、目的の細胞を高効率・高純度を得ることは一般的にも困難である。また、マウスES細胞の無血清・単層培養によって、肝芽細胞様細胞への分化誘導に成功している。現在、ヒトES細胞に比較して倫理面や免疫拒絶の面でも有利であるヒトiPS細胞の、再生医療分野や創薬分野への応用の期待が高まっている。そこでまず、マウスiPS細胞を用い、ES細胞との比較も含め、iPS細胞から胚性内胚葉－肝芽細胞を経由した肝実質細胞への分化誘導を検討した。iPS細胞由来胚様体の接着培養によって、ES細胞とほぼ類似した経時的変化で肝細胞系譜のマーカー遺伝子が発現したことから、用いたiPS細胞は、肝細胞系譜への分化能を有することが*in vitro*で確認できた。次に、細胞密度とactivin A濃度の条件設定を行って内胚葉系への分化誘導を、さらに肝細胞系譜への分化に関わるサイトカインを適宜添加し、肝芽細胞様細胞への分化を試みた。効率は低いものの、肝芽細胞様細胞への分化誘導が認められたが、この肝芽細胞様細胞は肝実質細胞への分化能を示さなかったことから、分化段階の低い肝芽細胞様細胞の可能性が示唆された。

A. 研究目的

iPS細胞はES細胞と同様に、自己複製能と分化多能性を有する一方で、免疫拒絶や倫理面などヒトES細胞で問題であった点をほぼクリアしている。そのため、再生医療分野ではES細胞に代わるソースとして、また創薬分野においても疾患発症メカニズムの解明や毒性試験等、多岐にわたる分野で有効なツールとして期待されている。そこで本研究は、細胞治療用ソース・創薬分野におけるツールの構築を目

指し、マウスiPS細胞から肝細胞系譜への分化誘導について検討を行なった。

B. 研究方法

ゼラチンコートした6-well plateに適切な数のiPS細胞を播種し、未分化培養条件で2日間培養後、B27 supplementを含むDMEM/F12に0-20 ng/ml activin Aを添加し、4日間培養した。その後、胚性内胚葉系細胞から肝芽細胞へ分化誘導する目的で、EGF(20 ng/ml), FGF2(20 ng/ml), HGF(10 ng/ml)を添加し、4日間培養を行なった。さらに、iPS細胞由来肝芽細胞が、肝細胞への分化能を有するかについて検討するため、Type I collagenでコートした6-well plateに、iPS細胞由来肝芽細胞を $1.7 \times 10^5$  cells/wellで播種した。10% FBS, 2 mM

L-Glnを含むWill

iam' s E mediumを基本培地とし、 $10^{-7}$  M dexamethasone (Dex), 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml HGFを添加し6日間培養した。その後、成熟肝細胞への誘導を促すため、基本培地に $10^{-6}$  M Dex, 10 ng/ml Oncostatin M (OSM)を添加し、8日間培養した。また、iPS細胞由来肝芽様細胞をuPA/SCIDマウスに経脾門注によって移植し、3-4週後に生着を検討した。

#### C. 研究結果

マウス iPS 細胞から胚性内胚葉系細胞への分化誘導に適した条件は、形態観察及び内胚葉系細胞マーカー遺伝子 (CXCR4, E-cadherin, Foxa2) の発現結果から、 $1 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で、5 ng/ml の activin A を添加した場合であることが示された。さらに、得られた胚性内胚葉系細胞に、20 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF2, 10ng/ml HGF を 4 日間添加した後、形態観察及び RT-PCR 法による肝芽細胞マーカー遺伝子の発現を指標に、肝芽細胞への分化を検討した。その結果、分化誘導後の細胞では、未分化マーカーである Oct-3/4 や Nanog の遺伝子発現量は、顕著に低下していた。後期肝芽細胞マーカー遺伝子の Alb 発現は確認されなかったものの、Afp, Dlk など初期肝芽細胞マーカー遺伝子の発現は確認され、その発現傾向は ED14.5 の胎仔肝と類似していた。形態観察では、敷石状の細胞が形成するクラスターが確認され、ES 細胞から肝芽細胞へ分化誘導した後に確認される形態と酷似していたことから、マウス iPS 細胞由来の胚性内胚葉系細胞が肝芽細胞へ分化誘導された可能性が考えられる。ま

た肝芽細胞は、肝細胞と胆管上皮細胞への二方向への分化能を有し、すでにマウス ES 細胞由来肝芽細胞様細胞では、胎仔肝と同様に *in vitro* でも二方向への分化能を示すことが報告されている。同条件にて、マウス iPS 細胞由来肝芽細胞様細胞が、肝細胞への分化能を有するかについて Alb, Cyp7a1 などの肝細胞マーカー遺伝子の発現及びALB免疫染色にて検討を行った。その結果、コントロールとして用いた成体肝では、これら遺伝子の発現が確認されたのに対し、肝芽細胞様細胞から分化させた細胞では確認できなかった。ALB 免疫染色では、局所的ではあるものの陽性細胞が認められた。

#### D. 考察

マウス iPS 細胞から胚性内胚葉系細胞を経た肝芽細胞様細胞への分化誘導が示唆された。また、肝芽細胞様細胞から肝細胞への分化能に関しては、局所的なALB陽性細胞は見られたものの、効率的な肝細胞分化には至らなかった。また、iPS細胞由来肝芽様細胞をuPA/SCIDマウスに経脾門注によって移植したが、脾臓に奇形腫が多発し、肝臓では生着はほとんど見られなかった。未分化細胞を除く必要がある。iPS細胞の実用化を考えた場合にも、FACSなどを用いて、安全でかつ品質の均一化した細胞を得ることが重要である。本研究においても、FACSによる目的細胞の分画を試みたが、一般的に用いられているマーカーの多くは、目的細胞以外の分化細胞あるいはがん細胞でも発現しているため、真の目的細胞とそれ以外の細胞とを区別することが困難であった。今後、さらに *in vivo* での肝芽細胞の微小環境を理解し *in vitro* に応用していくこと、

また肝芽細胞特異的なマーカーの探索と検出ツールの開発が重要になると考えている。ヒトiPS細胞からの肝細胞系譜への分化誘導や、ヒト末梢血球系細胞からの安全かつ効率的なiPS化も試みている。

#### E. 結論

マウスiPS細胞から効率は低いものの、肝芽細胞様細胞への分化誘導が認められた。

#### F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, Takagi M, Goto H, Inagaki M, Mizutani S, and Teraoka H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5(1), e8821 (2010)  
Masaki H, Nishida T, Sakasai R, and Teraoka H: DPPA4 modulates chromatin structure via association with core histone H3 and DNA in mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells* 15(4) in press (2010)

##### 2. 学会発表

Masaki H, Nishida T, Teraoka H: DPPA4 modulates chromatin structure via association with histone H3 and linker DNA in mouse embryonic stem cells. 7<sup>th</sup> Annual Meeting for the International Society for Stem

Cell Research (Barcelona, Spain, July 8-11, 2009), Thursday Poster Session Abstracts, p. 123.  
Nishida T, Masaki H, Yoshioka K, Teraoka H: Transcriptional regulation of ERas by Nanog and Klf family proteins in mouse embryonic stem cells. 7<sup>th</sup> Annual Meeting for the International Society for Stem Cell Research (Barcelona, Spain, July 8-11, 2009), Thursday Poster Session Abstracts, p. 129.

西田知弘, 正木久晴, 逆井 良, 寺岡 弘 文 : Transcriptional regulation of ERas gene in mouse embryonic stem cells, 第32回分子生物学会年会(横浜、2009年12月9-12日), プログラム p. 187.

只井祐美, 齊藤佳子, 鹿内弥磨, 西田知弘, 正木久晴, 逆井 良, 寺岡弘文, 山崎ちひろ, 立野知世, 吉里勝利. マウスiPS細胞から肝細胞系譜への分化誘導, 「口演5 iPS-1 O-05-3」 第9回再生医療学会総会(広島、2010年3月18-19日), 日本再生医療学会雑誌 Vol. 9 Suppl. p. 163.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (該当なし)

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メラマウス肝炎モデル開  
発とその前臨床応用

分担研究者：田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

分担研究課題：肝炎ウイルス感染モデルの構築

研究要旨：iPS細胞由来ヒト肝細胞を脾臓から注入し、正常な免疫機能を有するヒト肝細胞キメラマウスを作製することにより、患者本人の個体に近い状態を再現できる。さらには、疾患の発病前、感染源に暴露する前を解析することができ、肝炎発症の機序を継続して観察可能となる。感染初期動態の経時的な解析を実施し、感染長期での肝臓へ与える傷害性の違いとその機序について検討を行うことを目的としている。今年度は、HBV遺伝子型A-Jまでのクローン及び薬剤耐性変異を有するクローンを作製した。HCVに関してもJFH-1, J6/JFH-1クローン及びペグインターフェロン・リバビリン併用療法著効または無効となった複数の患者から血清を採取し、感染材料として準備した。

共同研究者氏名

杉山真也

名古屋市立大学大学院医学研究科  
細胞生化学

びインターフェロン(IFN)やリバビリン感受性試験などを行ってきた。

HBV, HCV に関して言えば、ヒト肝臓を用いた非常に有用性の高い感染モデル動物であるが、これまでの研究では免疫不全である点から実際の宿主で起こっている現象を再現できていない。また、人種によるホスト因子の影響が加味されていない。今回の研究班では、iPS細胞由来ヒト肝細胞を脾臓から注入し、正常な免疫機能を有するヒト肝細胞キメラマウスを作製することにより、患者本人の個体に近い状態を再現できる。さらには、疾患の発病前、感染源に暴露する前を解析することができ、肝炎発症の機序を継続して観察可能となる。感染初期動態の経時的な解析を実施し、感染長期での肝臓へ与える傷害性の違いとその機

#### A. 研究背景・目的

これまでに我々は、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いたHBV, HCVの感染実験を展開し、クローンによる感染・複製効率の違いや薬剤感受性の違いを検討してきた。1) HBV genotype やプレコア変異による感染・複製効率の違い、2) HBV genotype の感染による肝組織傷害性の違い：免疫不全状態において炎症を介さないHBVの直接的な肝傷害性を示している可能性が示唆された。3) HBV genotype によるインターフェロン(IFN)や核酸アナログの感受性の違い。4) HCV 感染実験及

序について検討を行うことを目的とした。

## B. 研究方法（計画）

### 1) HBV 感染初期の遺伝子プロファイルを経時的に確認する。

日本人由来のドナー細胞が均質化されることと背景がそろったマウスを利用することで HBV・HCV 感染初期の遺伝子プロファイルを多検体を用いて経時的に追う事が出来る。DNA チップもしくは次世代シーケンサーを用いた解析を行い、パスウェイ解析をかけることで今まで不明であった感染前から感染後さらには線維化進展へと至るパスウェイが明確に示され、各病態に進展のキーとなり、治療のターゲットとなる遺伝子を見出しうると考えられる。

### 2) 免疫学的側面からの肝炎研究の本格化

正常な免疫機能が備わった有用な肝炎ウイルスの動物モデルはこれまでに確立されていない。チンパンジーは肝炎ウイルスに感染可能であるものの、ヒト肝炎ウイルスに対する反応は芳しくなく、コスト的にも環境的にも飼育が困難であり、倫理的側面からも使用が難しい。そのため、これまでは慢性肝炎患者のように感染が成立し長期間経った患者検体を用いることがほとんどであり、肝炎研究では感染初期から経時的に詳細な免疫学的検討を行うことが難しかった。

上記の iPS 細胞由来キメラマウスを作製することで、これらの問題点を解決

できる可能性がある。それぞれの患者の感染前を再現できる可能性があり、感染前後で解析ができるため無症候性キャリアの成立機序や急性肝炎後に治癒するか慢性化するかといった予後を規定する因子を同定できる。

また、劇症肝炎を生じる原因とされているのは、HBV のプレコア変異株の新規感染であるが、この原因が直接検証されたことはない。この劇症肝炎の成立にはCTLなどの免疫反応が必須であり、発症機序の直接的な解明に有用であると考えられる。

### 3) 日本人特有の SNPs

日本人特有の SNPs は様々な遺伝子群で報告されている。薬物代謝に関連した CYP 遺伝子群の SNPs がその代表であるが、ホスト因子をターゲットにした薬剤感受性試験では、日本人由来の肝臓で実験を行うことが望ましい。日本人での治療効果や毒性試験にも適している。最近我々は、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果を規定する IL28B SNPs を同定しており、これらのホスト因子を加味した検討を予定している。

#### （倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。

## C. 研究結果

### 1) 各種 HBV クロンの準備；遺伝子型 A-J まですべてのクロンを作製した。

- 2) 核酸アナログ耐性株の作製
- 3) HCV クローンの準備、JFH-1 及び複製効率の高い J6/JFH-1 クローンの準備ができた。
- 4) HCV 患者からの感染材料の準備; ペグインターフェロン・リバビリン併用療法著効または無効となった複数の患者から血清を採取し、感染材料として準備した。

#### D. 考察

日本人由来の正常な免疫機能が備わった有用な肝炎ウイルスの動物モデルはこれまで望まれていた感染系である。この動物モデルを用いた肝炎ウイルス感染実験により、生体内で実際に起こっている事象を再現でき、病態解明に繋がる。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2010 Jan;40(1):14-30. PubMed PMID:20156297.
2. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to

new genotype J. *J Virol.* 2009 Oct;83(20):10538-47.

3. Khan A, Tanaka Y, Azam Z, et al. Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan. *J Med Virol.* 2009 Jul;81(7):1189-97. PubMed PMID:19475617.
4. Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. Genetic variability of hepatitis C virus in South Egypt and its possible clinical implication. *J Med Virol.* 2009 Jun;81(6):1015-23. PubMed PMID:19382263.

##### 2. その他の発表

1. 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史. ワークショップ4: B型肝炎の基礎と臨床. HBV遺伝子型間における細胞障害性の違い. 第45回日本肝臓学会総会. 平成21年6月4日-5日. 神戸. A72

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
（分担）研究報告書

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に関する研究

研究分担者 中西 真 名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨 日本人由来の iPS 細胞から分化誘導し、ヒト肝細胞を得て uPA/SCID マウスに移植することで、ヒト肝細胞保持キメラマウスを作製して日本人特異な肝炎ウイルス応答性を検討可能な系を確立することにある。本研究は、この目的達成のため、安定的かつ効率的な肝細胞の分化のための分子基盤の解明および技術の開発と、肝炎ウイルス応答性における宿主側の要因を解析する目的で行われた。

#### A 研究目的

平成 21 年度の研究目的は、安定的かつ効率的なヒト細胞 iPS 化技術の確立と、肝細胞分化後の分化維持のために必要となる遺伝子群のエピジェネティック制御解析のために、iPS 細胞におけるそれら遺伝子群のヒストン修飾および DNA メチル化解析の基盤を確立することにある。

#### B 研究方法

山中 4 因子を組み込んだレンチウイルス発現系を、理化学研究所三好博士より導入し、安定的にヒト細胞およびマウス細胞を iPS 化する系を確立した。確立したヒトおよびマウス iPS 細胞における細胞増殖関連遺伝子群のプロモーター領域のヒストン修飾を解析するために、各種ヒストン修飾特異抗体を用いた ChIP 法を確立した。

##### （倫理面への配慮）

ヒト細胞として平成 21 年度は既に株化されているヒト正常 2 倍体繊維芽細胞を用いたため、特に倫理面への配慮は必要ないと判断した。

#### C 研究結果

1. 安定的な長期 iPS 細胞維持のために、既に入手済みであるマウス iPS 細胞を用いて iPS 細胞の長期培養系を確立した。
2. 理化学研究所三好博士より供与されたマウス山中 4 因子発現レンチウイルスベクターを用いて、安定的なマウス細胞 iPS 化が可能となった。
3. マウス iPS 細胞、およびマウス初代繊維芽細胞のクロマチン画分を用いて、

細胞周期関連遺伝子、とりわけサイクリン B1, Cdk1, サイクリン A2, Cdk2 プロモーター領域のヒストン修飾について、ヒストン H3-K9 アセチル化、メチル化、H3-K4 アセチル化、メチル化、H3-K14 アセチル化、メチル化、および H3-S10, H3-T11 のリン酸化程度について解析を行った。結果として、iPS 細胞においては増殖関連ヒストン修飾（K9 アセチル化、K14 アセチル化、K4 メチル化、S10, T11 リン酸化）が線維芽細胞に比較して高いことが明らかとなり、iPS 細胞の高い増殖能を支持する結果となった。

4. 安定的なヒト iPS 細胞樹立のための技術を、理化学研究所三好博士の指導を あおぎ確立中である。

#### D 考察

本研究は日本人独自の肝炎ウイルス応答性と薬剤感受性解析法を確立することを最終目的としている。この研究において、日本人由来の iPS 細胞（将来的には患者由来の細胞を用いた iPS 細胞）を安定的かつ効率的に肝細胞に分化する系を確立することが最も困難でありかつ重要なポイントであると考えられる。本年度はこれを達成するための基盤整備として、1、iPS 細胞の長期維持技術の確立、2、マウスおよびヒト細胞 iPS 化のための技術確立、3、iPS 細胞を用いて、肝細胞分化誘導の分子基盤解明のための ChIP 法の確立を行い、予定通りの成果が得られたものとする。次年度以降、さらに細胞の iPS 化に伴うエピジェネティック制御、また iPS 細胞から肝細胞分化過程におけるエピジェネティック修飾と肝細胞

胞特異的遺伝子発現パターンの解析を行い、肝細胞分化の分子基盤を明らかにする予定である。

## E 結論

iPS 細胞から安定的かつ効率的な肝細胞分化誘導系確立のため、1、iPS 細胞の長期維持技術の確立、2、マウスおよびヒト細胞 iPS 化のための技術確立、3、iPS 細胞を用いて、肝細胞分化誘導の分子基盤解明のための ChIP 法の確立を行った。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Niida, H, Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H. Suzuki, H., Tashiro, S., and \*Nakanishi, M. Essential role of Tip60-depenedent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* 24, 333-338 (2010)
2. Shimada, M., Yamamoto, A., Murakami-Tonami, Y., Nakanishi, M., Yoshida, T., Aiba, H., and \*Murakami, H. Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating Mad2p in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 529-532 (2009)
3. Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D.H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F.,

and \*Nakanishi, M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3184-3189 (2009)

4. Zineldeen, D.H., Shimada, M., Niida, H., Katsuno, Y., and \*Nakanishi, M. Ptpcd-1 is a novel cell cycle related phosphatase that regulates centriole duplication and cytokinesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 460-466 (2009)
5. Nishizuka, M., Kishimoto, K., Kato, A., Ikawa, M., Okabe, M., Sato, R., Niida, H., Nakanishi, M., Osada, S., and \*Imagawa, M. Disruption of the novel gene fad14 causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration. *Exp. Cell Res.* 315, 809-819 (2009)

### 2. 学会発表

1. 第 68 回日本癌学会総会 シンポジウム **Mechanism of proper dNTPs supply at DNA damage sites** 中西 真、丹伊田浩行
2. 第 82 回日本生化学会 シンポジウム **DNA 損傷に反応した転写抑制は PP1 を介したヒストン H3-T11 の脱リン酸化により制御される** 中西 真、島田緑

## H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

池田一雄

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |       |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                   | 論文タイトル名                                                                                                          | 発表誌名             | 巻号     | ページ       | 出版年  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------|-----------|------|
| 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 | 137(4) | 1459-1466 | 2009 |

吉里勝利

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |       |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                   | 論文タイトル名                                                                                                                       | 発表誌名           | 巻号 | ページ   | 出版年  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----|-------|------|
| Kubo S, Kataoka M, Tatenos C, Yoshizato K, Kawasaka 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. | 21 | 40-50 | 2010 |

|                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                             |                                 |             |           |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|-----------|------|
| Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N                                                                                                   | Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.                                                                 | Biochem Biophys Res Commun      | 391(1)      | 316-21    | 2010 |
| <u>Yoshizato K</u> , Taten C.                                                                                                                                         | A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans.                                                   | PPAR Research                   | 2009        | 1-11      | 2009 |
| Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Taten C, <u>Yoshizato K</u> , 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                       | 51(6)       | 1046-54   | 2009 |
| Nishie M, Taten C, Utoh R, Kohashi T, Masumoto N, Kobayashi N, Itamoto T, Tanaka N, Asahara T, <u>Yoshizato K</u> .                                                   | Hepatocytes from fibrotic liver possess high growth potential in vivo.                                                                                      | Cell Transplant.                | 18 (5)      | 665-675   | 2009 |
| <u>Yoshizato K</u> , Taten C                                                                                                                                          | In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse.                                                                            | Expert Opin Drug Metab Toxicol. | 5(11)       | 1435-1446 | 2009 |
| Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Taten C, <u>Yoshizato K</u> , Chayama K.        | G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection.                                                 | J Infect Dis.                   | 1;199 (11)  | 1599-1607 | 2009 |
| Uno S, Endo K, Ishida Y, Taten C, Makishima M, <u>Yoshizato K</u> , Nebert DW.                                                                                        | CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and                                                     | Toxicol Appl Pharmacol.         | 15; 237 (1) | 119-126   | 2009 |

|                                                                                                    |                                                                                                                         |           |        |         |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|---------|------|
|                                                                                                    | mouse hepatoma-derived cell lines.                                                                                      |           |        |         |      |
| Zion O, Genin O, Kawada N, <u>Yoshizato K</u> , Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Hallevy O, Pines M. | Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. | Pancreas. | 38 (4) | 427-435 | 2009 |

立野知世

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |       |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                  | 論文タイトル名                                                                                                                       | 発表誌名               | 巻号   | ページ   | 出版年  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------|-------|------|
| Kubo S, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumar 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. | Human Gene Therapy | 21   | 40-50 | 2010 |
| Yoshizato K, Tateno C.                                                                                                 | A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans.                     | PPAR Research      | 2009 | 1-11  | 2009 |

|                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                       |                                           |     |           |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----|-----------|------|
| Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tate no 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                                 | 51  | 1046-1054 | 2009 |
| Yamasaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Tate no C, Nishikura Y, Oofusa K, Harada D, Naito S, Horie T, Ohta S                                                        | Approach for in vivo protein binding of 5-n-butyl-pyrazolo [1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry | Chemical research toxicology              | 23  | 152-158   | 2009 |
| Yoshizato K, Tateno C.                                                                                                                                          | In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse.                                                                                                                      | Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology | 5   | 1435-1446 | 2009 |
| 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                              | 199 | 1599-1607 | 2009 |
| 立野知世                                                                                                                                                            | ヒト肝細胞キメラマウス                                                                                                                                                                                           | 総合臨床                                      | 59  | 297- 298  | 2009 |

#### 河田則文

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|

|  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|

雑誌 なし

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|-------|---------|------|----|-----|-----|
|       |         |      |    |     |     |

寺岡弘文

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |       |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名              | 論文タイトル名                                                                                                        | 発表誌名           | 巻号    | ページ      | 出版年  |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------|----------|------|
| Ichijima Y, et al. | DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development               | PLoS ONE       | 5(1)  | e8821    | 2010 |
| Masaki H, et al.   | DPPA4 modulates chromatin structure via association with core histone H3 and DNA in mouse embryonic stem cells | Genes to Cells | 15(4) | in press | 2010 |

田中靖人

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |       |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻・号 | ページ | 出版年 |
|-------|---------|------|-----|-----|-----|
|-------|---------|------|-----|-----|-----|

|                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                      |              |        |              |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------|--------------|------|
| Kurbanov F, <u>Tanaka Y</u> , Mizokami M.                                                                                         | Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus.                                                                                                   | Hepatol Res  | 40(1)  | 14-30        | 2010 |
| Tatematsu K, <u>Tanaka Y</u> , Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, <u>Mizokami M</u> . | A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to a new genotype J. | J Virol.     | 83(20) | 10538-10547. | 2009 |
| Khan A, <u>Tanaka Y</u> , Azam Z, Abbas Z, Kurbanov F, Saleem U, Hamid S, Jaffri W, Mizokami M.                                   | Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan.                                             | J Med Virol. | 81(7)  | 1189-1197.   | 2009 |
| Elkady A, <u>Tanaka Y</u> , Kurbanov F, Sugauchi F, Sugiyama M, Khan A, Sayed D, Moustafa G, Abdel-Hameed AR, Mizokami M.         | Genetic variability of hepatitis C virus in South Egypt and its possible clinical implication.                                                                       | J Med Virol. | 81(6)  | 1015-1023.   | 2009 |

中西 真

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |       |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                                                                                  | 論文タイトル名                                                                                                                                   | 発表誌名                                    | 巻号  | ページ           | 出版年  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----|---------------|------|
| Niida, H.,<br>Katsuno, Y.,<br>Sengoku, M.,<br>Shimada, M.,<br>Yukawa M.,<br>Ikura, M., Ikura,<br>T., Kohno, K.,<br>Shima, H. Suzuki,<br>H., Tashiro, S.,<br>and * <u>Nakanishi, M.</u> | Essential role of Tip60-depenedent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase.             | <b><i>Genes Dev.</i></b>                | 24  | 333-338       | 2010 |
| Zineldeen, D.H.,<br>Shimada, M.,<br>Niida, H.,<br>Katsuno, Y., and<br>* <u>Nakanishi, M.</u>                                                                                           | Ptpcd-1 is a novel cell cycle related phosphatase that regulates centriole duplication and cytokinesis.                                   | Biochem.<br>Biophys.<br>Res.<br>Commun. | 380 | 460-466       | 2009 |
| Nishizuka, M.,<br>Kishimoto, K.,<br>Kato, A., Ikawa,<br>M., Okabe, M.,<br>Sato, R., Niida,<br>H., <u>Nakanishi, M.</u> ,<br>Osada, S.,<br>and *Imagawa,<br>M.                          | Disruption of the novel gene fad14 causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration. | Exp. Cell<br>Res.                       | 315 | 809-819       | 2009 |
| Shimada, M.,<br>Yamamoto, A.,<br>Murakami-Tonami, Y.,<br><u>Nakanishi, M.</u> ,<br>Yoshida, T.,<br>Aiba, H., and<br>*Murakami, H.                                                      | Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating Mad2p in fission yeast.                                    | Biochem.<br>Biophys.<br>Res.<br>Commun. | 388 | 529-532       | 2009 |
| Katsuno, Y.,<br>Suzuki, A.,<br>Sugimura, K.,<br>Okumura, K.,<br>Zineldeen, D.H.,<br>Shimada, M.,<br>Niida, H.,<br>Mizuno, T.,<br>Hanaoka, F., and<br>* <u>Nakanishi, M.</u>            | Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells.査読あり                                                                 | Proc. Natl.<br>Acad. Sci.               | 106 | 3184-<br>3189 | 2009 |

## Negligible Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Collagen Production During Hepatic Fibrogenesis in Mice

REIICHI HIGASHIYAMA,<sup>\*,‡</sup> TADASHI MORO,<sup>\*,‡,§</sup> SACHIE NAKAO,<sup>\*</sup> KENICHIRO MIKAMI,<sup>\*,‡</sup> HIROSHI FUKUMITSU,<sup>\*,‡,||</sup> YOSHITAKA UEDA,<sup>\*</sup> KAZUO IKEDA,<sup>||</sup> EIJIRO ADACHI,<sup>#</sup> GEORGE BOU-GHARIOS,<sup>\*\*</sup> ISAO OKAZAKI,<sup>‡‡</sup> and YUTAKA INAGAKI<sup>\*,‡</sup>

<sup>\*</sup>Research Unit for Tissue Remodeling and Regeneration, Tokai University School of Medicine, Isehara; <sup>†</sup>Institute of Medical Sciences, Isehara; <sup>§</sup>Research Laboratory, Minophagen Pharmaceutical Co Ltd, Zama; <sup>||</sup>Department of Surgery, Tokai University School of Medicine, Isehara; <sup>¶</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University, Nagoya; <sup>#</sup>Department of Molecular Morphology, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University, Sagami-hara, Japan; <sup>\*\*</sup>Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College London, London, United Kingdom; and <sup>‡‡</sup>Sanno Hospital, International University of Health and Welfare, Tokyo, Japan

See editorial on page 1218.

**BACKGROUND & AIMS:** Recent studies have reported that bone marrow (BM)-derived cells migrating into fibrotic liver tissue exhibit a myofibroblast-like phenotype and may participate in the progression of liver fibrosis. However, their contribution to collagen production has not been fully verified yet. We revisited this issue by using 2 mechanistically distinct liver fibrosis models introduced into transgenic collagen reporter mice and their BM recipients. **METHODS:** BM of wild-type mice was replaced by cells obtained from transgenic animals harboring tissue-specific enhancer/promoter sequences of  $\alpha 2(I)$  collagen gene (*COL1A2*) linked to *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) or firefly *luciferase* (LUC) gene. Liver fibrosis was introduced into those mice by repeated carbon tetrachloride injections or ligation of the common bile duct. Activation of *COL1A2* promoter was assessed by confocal microscopic examination detecting EGFP signals and luciferase assays of liver homogenates. **RESULTS:** The tissue-specific *COL1A2* enhancer/promoter was activated in hepatic stellate cells following a single carbon tetrachloride injection or during primary culture on plastic. A large number of EGFP-positive collagen-expressing cells were observed in liver tissue of transgenic *COL1A2*/EGFP mice in both liver fibrosis models. In contrast, there were few EGFP-positive BM-derived collagen-producing cells detected in fibrotic liver tissue of *COL1A2*/EGFP recipients. Luciferase assays of liver tissues from *COL1A2*/LUC-recipient mice further indicated that BM-derived cells produced little collagen in response to fibrogenic stimuli. **CONCLUSIONS:** By using a specific and sensitive experimental system, which detects exclusively BM-derived collagen-producing cells, we conclude an unexpectedly limited role of BM-derived cells in collagen production during hepatic fibrogenesis.

Collagen contents in tissue are under control of a dynamic balance between its production and degradation, and a disruption of this equilibrium results in either organ fibrosis or impaired tissue integrity. Irrespective of the etiologies of hepatic injury, liver fibrosis is caused commonly by a chronic and uncontrolled inflammatory/repair process leading to excessive deposition of collagen and other components of extracellular matrix in the liver. Hepatic stellate cells (HSC) are considered to be the main producers of both type I collagen<sup>1</sup> and matrix metalloproteinase (MMP)-13,<sup>2</sup> the major interstitial collagenase degrading type I collagen in rodents. In addition, it has been reported recently that bone marrow (BM)-derived cells participate in both the progression and regression of liver fibrosis by expressing collagen and MMPs, respectively.

We have shown that BM-derived stem/progenitor cells express MMP-13 and MMP-9 and contribute to the spontaneous regression of experimental liver fibrosis induced by repeated carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) injections.<sup>3</sup> In addition, enhanced mobilization and homing of BM-derived cells by a combination of granulocyte colony-stimulating factor and hepatocyte growth factor stimulated MMP-9 expression in the fibrotic liver tissue and accelerated the recovery from liver fibrosis.<sup>3</sup> Indeed, there have been an increasing number of clinical trials of autologous BM cell infusion therapy to treat patients with critical liver diseases including advanced cirrhosis.<sup>4–8</sup> On the other hand, several experimental and human studies using BM transplantation with sex-mismatched cells<sup>9,10</sup> or genetically marked cells with enhanced green fluorescent protein (EGFP)<sup>11–13</sup> have reported that BM-derived cells migrating into fibrotic liver tissue exhibit the features of collagen-producing cells such as HSC, myofibro-

**Abbreviations used in this paper:**  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; BM, bone marrow; CBD, common bile duct; EGFP, enhanced green fluorescent protein; FACS, fluorescence-activated cell-sorter scanner; HSC, hepatic stellate cell(s); MMP, matrix metalloproteinase.

© 2009 by the AGA Institute

0016-5085/09/\$36.00

doi:10.1053/j.gastro.2009.07.006