

201030019A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 一雄

平成23年(2011)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

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 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および酵素活性 の比較 立野 知世	16
----------------------------------------------------------	----

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	26
--------------------------------------------------------------------	----

肝炎ウイルス感染モデルの構築 田中 靖人	28
-------------------------	----

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 中西 真	31
-------------------------------------------------------------------------	----

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出 水口裕之	34
-------------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	45
-----------------	----

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 細胞より分化誘導させたヒト肝細胞を uPA/SCID マウスに移植することによりマウスの血中でのヒトアルブミンの産生を確認することができた。しかしながら、その濃度は低く、今後、ウイルス感染実験の使用に必要となるヒト肝細胞の生着率の改善をはかり、また、胎生期マウスへの細胞移植や肝細胞からの新たな iPS 細胞の作製についても検討する。

#### 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

##### ・ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導方法

ヒト iPS 細胞を、ActivinA を 100ng/ml となるよう添加した RPMI Medium 1690+B27 supplement 中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 5 日間培養した。次に、20ng/ml BMP4 と 10ng/ml FGF2 を添加した RPMI medium 1690+B27 supplement で 37°C、5%CO<sub>2</sub>、4%O<sub>2</sub> 条件下で 5 日間培養し、増殖因子を 20ng/ml HGF に変更し、引き続き低酸素条件下で 5 日間培養した。その後、20ng/ml OSM と HCM SingleQuots を添加した Hepatocyte Basal Medium で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 5 日間培養することにより、肝細胞へと分化誘導した。

##### ・ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の uPA/SCID マウスへの移植方法

上記の方法で分化誘導させた細胞を、uPA を



発現し肝障害を引き起こす uPA マウスと、免疫不全 SCID マウスを掛け合わせた uPA/SCID マウスに移植した。0.05% コラゲナーゼと 0.25% トリプシン-EDTA により、細胞を培養プレートから剥がし、DMEM/10%FCS 培地で、 $0.5 \times 10^5$  cells/ $20 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^5$  cells/ $20 \mu\text{l}$ 、 $2 \times 10^5$  cells/ $20 \mu\text{l}$  に調製し、計 11 匹の生後 3 週齢の uPA/SCID マウスの脾臓に細胞懸濁液を注入し、肝臓への細胞移植を行った。移植後は、一週間おきに血中ヒトアルブミン濃度を Human albumin ELIZA quantitation set により測定した。移植 32 日後、もしくは 38 日後に肝臓の一部をサンプリングし、切片を作成後、一次抗体として、抗ヒトアルブミン抗体、抗ヒト CK18 抗体 (DC-10)、二次抗体として、Alexa Fluor 488 抗ゴート IgG 抗体、Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体を用いた免疫組織化学を行い、移植細胞の生着率を算出した。

・ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞のマウス胎仔への移植方法

ヒト iPS 由来肝細胞を uPA/SCID マウスへの移植時と同様の方法により剥がし、 $5 \mu\text{M}$  CM-DiI で蛍光標識した。PBS にて  $2 \times 10^4$  cells/ $10 \mu\text{l}$  に調製した。E16.5 マウスを羊膜に包まれた状態で子宮外に出し、卵黄嚢静脈へ細胞懸濁液を注入した。細胞移植された胎仔は、E18.5 日に取り出し切片を作製し、解析した。

#### C. D. 研究結果と考察

・ヒト iPS 細胞の分化誘導

未分化状態のヒト iPS 細胞は、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81 陽性であり、アルカリフォスファターゼ活性を有している (図 1 a)。

ActivinA の作用により、内胚葉細胞へと分化させると、RT-PCR 解析により内胚葉マーカー GATA4 の mRNA を検出できるようになる。GATA4 タンパク質は、BMP4+FGF2 の誘導後にウエスタンブロット解析により確認できる。肝細胞マ-

ーカーの発現は、BMP4+FGF2 の刺激により、肝前駆細胞へと分化させることにより、肝細胞未成熟マーカー AFP、肝細胞成熟マーカー ALB の mRNA の転写が確認でき、分化誘導段階が進むにつれ、ウエスタンブロット解析においても検出可能となった (図 1 b, c)。OSM 刺激後の分化誘導細胞のおよそ 30%~40% が ALB 陽性の肝細胞様細胞に分化していた (図 1 d)。しかし、これらの細胞は、RT-PCR 解析やウエスタンブロット解析においても検出された AFP を発現する細胞であり、完全な成熟肝細胞への分化誘導はできなかった。また、RT-PCR 解析の結果から、OCT3/4 の mRNA が分化誘導後のサンプルにおいても検出されているため、ごく一部の細胞は、未分化な iPS 細胞として存在していると考えられる。

・ヒト iPS 由来肝細胞の uPA/SCID マウスへの移植

uPA/SCID マウスへ移植した結果、1 匹は移植後死んでしまった。残った 10 匹に関して、ELIZA によるヒトアルブミンの血中濃度測定は、1 匹が移植後 14 日で  $18.4 \text{ ng/ml}$  の値を測定できた。

移植後 32 日後、もしくは 38 日後に採取したサンプル切片において、ヒト CK18、ヒト ALB の免疫組織化学を行った結果、ELIZA では血中にヒトアルブミンをほとんど検出することは不可能であったが、ヒト CK18 陽性細胞、ヒト ALB 陽性細胞は、最大で 15% 程の割合で、生着していた (図 2)。

・ヒト iPS 由来肝細胞の E16.5 マウスへの移植

ヒト iPS から分化誘導した細胞を卵黄嚢静脈から移植した 90 分後のサンプルで、CM-DiI 標識した移植細胞の分布を観察した結果、肝臓だけでなく、心臓、肺、皮膚や胃など、全身に拡散していた (図 3 a)。移植 2 日後では、肝臓を取り出すと、移植細胞が血管に詰まったことが原因とおもわれる梗塞領域が観察された。切片を作製し観察すると CM-DiI で標識された移植細胞が生着している様子が観察できた (図 3 b)。

しかし、生着している細胞数は、uPA/SCID マウスへの移植と比較してもその割合は低く、生着率を上昇させることが今後の課題である。

立野らにより、uPA/SCID マウスに未熟ヒト肝細胞を移植することで、成熟ヒト肝細胞に分化することが明らかにされた。このことにより、今後胎生期マウスへの移植には、未成熟な肝芽細胞を用いることを検討する必要がある。

現時点で、水口によるアデノウイルスベクターを用いた分化誘導肝細胞を uPA/SCID に移植すると、ヒト肝細胞の生着、アルブミンの産生が確認できているが、ウイルス感染実験に使用するレベルに至っていない。肝炎ウイルス感染実験には、さらなる生着率の向上が必要となる。

また、最近の報告では、iPS 作製において、初期化が不完全なこともあり、逆先祖帰りする可能性がある。このことから、ヒト肝細胞からの iPS 作製も検討する予定であるが、肝細胞への分化誘導過程におけるエピジェネティックな分子基盤を解明することが重要課題であると考えている。

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

日本人の線維芽細胞より作製した iPS 細胞を肝細胞に分化誘導させ、uPA/SCID マウスに移植することにより、マウスでの血中でヒトアルブミンの産生を確認できた。しかし、その濃度は低く、生着率の改善をはかる必要がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Miyaki T, Nojiri S, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Iio E, Takahashi S, Yan G, Ikeda K and Joh T. Pitavastatin inhibits hepatic steatosis and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats. Hepatology research 2011, 41:375-385

##### 学会発表

1: 杉山良典、富谷智明、池田一雄、小池亨、塩尻信義マウス肝臓発生過程における syntaxin2 の発現と肝芽細胞の増殖・分化に対する影響 第17回肝細胞研究会 平成22年6月19日 秋田アトリオン

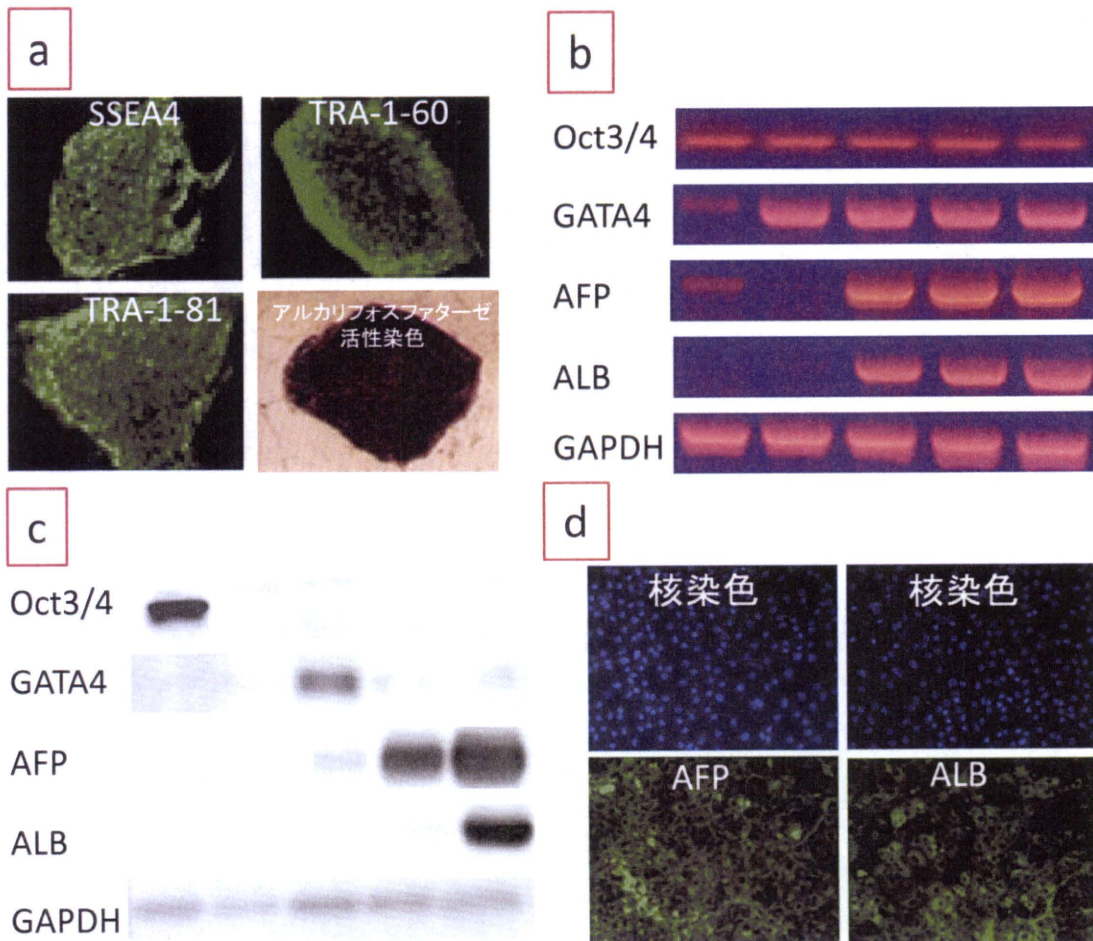


図1 ヒトiPS細胞の肝細胞への分化誘導

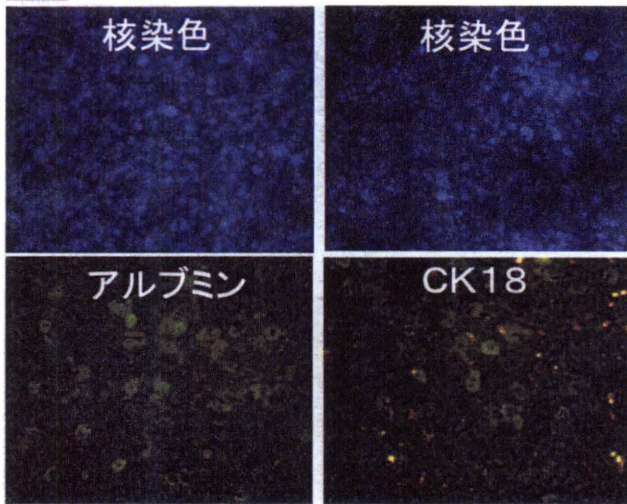
a 未分化状態のiPS細胞

b 各分化誘導段階のRT-PCR解析

c 各分化誘導段階のウエスタンブロット解析

d 分化誘導後の免疫染色

a



b

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
CK18	10.3%	12.8%	7.7%	13.1%	10.4%	12.7%	9.2%	15.3%	6.6%	4.5%
ALB	13.7%	11.0%	5.5%	12.5%	11.1%	10.4%	11.8%	22.3%	4.5%	5.1%

図2 ヒトiPS細胞由来肝細胞のuPA/SCIDマウスへの移植

a 移植32日後の免疫組織化学

b 移植32日後、38日後の移植細胞の生着率

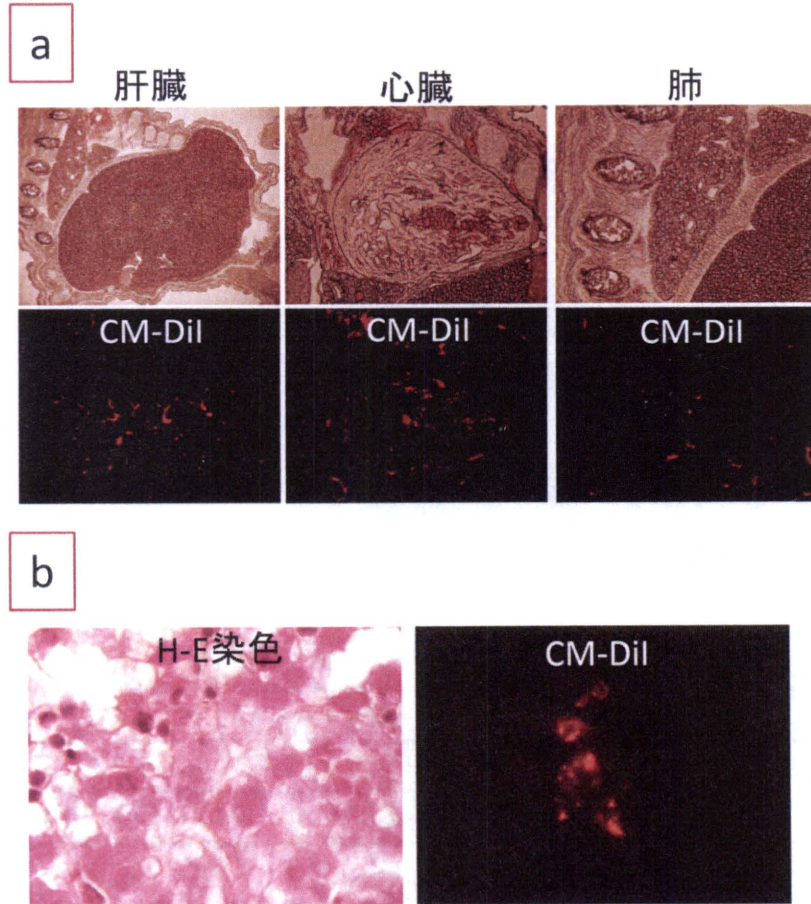


図3 ヒトiPS細胞由来肝細胞のE16.5マウスへの移植  
 a 移植90分後の移植細胞の分布  
 b 移植2日後の移植細胞の生着の様子



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 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：ヒト iPS 細胞から肝細胞系譜への分化誘導により、ヒト iPS 細胞は GATA4 遺伝子を発現する内胚葉系の細胞を経て、AFP、ALB 遺伝子を発現する肝細胞様細胞へと分化した。iPS 由来肝細胞様細胞では成熟肝細胞マーカーである alpha-antitrypsin (AAT) 遺伝子およびタンパク質が、ヒト初代培養肝細胞や肝がん細胞と同等またはより強く発現していた。未分化な iPS 細胞を除去する目的で、AAT プロモーター制御下に蛍光タンパクをレポーター分子として発現するベクターを構築したが、iPS 由来肝細胞様細胞へのベクター導入にはさらなる検討が必要である。

### A. 研究目的

ES、iPS 細胞などの幹細胞から目的とする細胞を分化誘導し利用しようとする場合、多能性を保持した未分化な細胞が残存すると奇形腫を生じ、目的達成に支障を来す可能性がある。そこで、本研究ではヒト iPS 細胞から肝細胞系譜への分化誘導の検討および、肝細胞特異的マーカーによる肝細胞様細胞の純化を試みた。

### B. 研究方法

Mitomycin C 処理した MEF 上で維持したヒト iPS 細胞を、マトリゲルでコートした 24-well plate または 6 cm dish に播種し、activin A (50 ng/ml) および Wnt3a (50 ng/ml) を含む B27/PRMI 培地で 3 日間、続いて activin A (50 ng/ml) を含む B27/PRMI 培地で 2 日間培養し胚体内胚葉への分化誘導を行った。次に、1% DMSO を含むヒト ES 細胞用培地 (1% NEAA, 1 mM L-glutamin、20% KSR、0.1 mM 2-mercaptoethanol を含む KO-DMEM/F12 培地) で 3 日間培養し、さらに肝細胞成熟用培地 (8.3% FBS、8.3% tryptose phosphate broth、10 μM hydrocortisone 21-hemisuccinate、1 μM insulin、2 mM L-glutamin、10 ng/mL HGF および 20 ng/mL oncostatin M を含む L-15 培地) で 6 日間培養し、肝細胞様細胞へと分化誘導を行った。RT-PCR 法および Western Blotting 法により、肝細胞系譜の各細胞マーカーの発現を検討した。

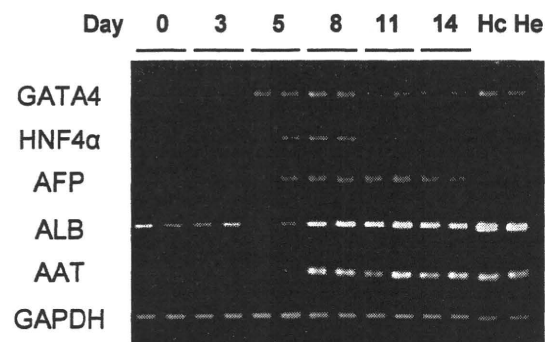
ヒト 14 番染色体の-1, 200 から+44 まで (Bam HI から Hinf I) をプロモーターレス蛍光タンパク質ベクター (pmCherry-1 Vector) に挿入し、ヒト alpha 1-antitrypsin (AAT) プロモーター活性によりレポーター分子として mCherry タンパク質が転写されるベクター (phAAT-mCherry) を構築した。ベクターのトランス

フェクションにはFuGENE HD試薬を用いた。

### C. 研究結果

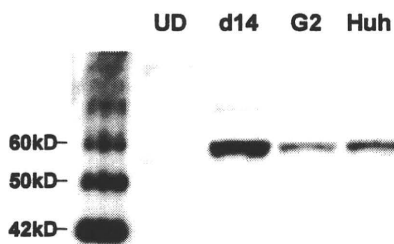
ヒト iPS 細胞の肝細胞系譜への分化誘導において、内胚葉マーカーである GATA4 および肝芽細胞マーカーである HNF4α 遺伝子発現は分化誘導 8 日目をピークに増加し、その後減少した。また、肝芽細胞マーカー AFP および成熟肝細胞マーカー ALB、AAT 遺伝子は分化誘導 8 日目に強く発現し、発現は分化終了 (14 日目) まで継続した。分化誘導 14 日目において、AAT 遺伝子発現はヒト初代培養肝細胞また肝がん細胞と同程度であった (図 1)。また、AAT タンパク質は 2 種の肝がん細胞より強く発現していた (図 2)。

AAT 陽性の細胞を純化するため、ヒト AAT プロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現するベクター (phAAT-mCherry) を構築した。phAAT-mCherry ベクターを肝がん細胞 Huh-7 に導入したところ蛍光が観察されたことから、同ベクターは AAT 陽性細胞の純化に利用可能であると判断した。しかしながら、分化誘導 14 日目の iPS 由来肝細胞用細胞では、陽性対照として用いた pCMV-EGFP ベクターによる蛍光も phAAT-mCherry ベクターによる蛍光も観察されなかったことから、ベクターを導入出来ていないと考えられた。



#### 図1 肝細胞系譜マーカー遺伝子発現

肝細胞系譜マーカー遺伝子の経時的発現変化を RT-PCR 法により検討した。Hc: Huh-7 細胞、He: ヒト初代培養肝細胞



#### 図2 Alpha 1-antitrypsin タンパク質発現

ヒト iPS 細胞から分化誘導 14 日目におけるヒト AAT タンパク質の発現を Western Blotting 法により検討した。左から、マーカー、未分化 iPS 細胞、分化誘導 14 日目 iPS 細胞、HepG2 細胞、Huh-7 細胞

#### D. 考察

ヒト iPS 細胞から肝細胞系譜への分化誘導過程において、内胚葉マーカー GATA4 遺伝子の一過性の発現増加と減少、また成熟肝細胞マーカー AAT 遺伝子およびタンパク質の発現などから、iPS 細胞は内胚葉系細胞を経て、肝細胞様細胞へと分化していることが示唆された。肝芽細胞マーカー AFP の発現は分化誘導 14 日目でも継続していることから、未成熟な肝芽細胞が混在していると考えられる。

分化誘導後の肝細胞様細胞では AAT タンパク質が肝がん細胞株よりも強く発現していたことから、AAT をマーカーとして成熟肝細胞を純化する方法は、未分化な iPS 細胞を除去するために適当であると考えられた。しかしながら、分化誘導後の iPS 由来肝細胞様細胞にベクターを導入することが出来ず、遺伝子導入が困難な細胞であることが解った。高効率、高生存率でベクターを導入できる方法の探索が必要である。また、適切な細胞表面マーカーを用いた細胞純化も検討の余地があると思われる。

#### E. 結論

ヒト iPS 細胞から肝細胞系譜への分化誘導において、ヒト iPS 細胞は内胚葉系の細胞を経て肝細胞様細胞へと分化していた。また、成熟肝細胞マーカーである AAT 陽性細胞の純化に有用なベクターを構築した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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 22 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 東和環境科学株式会社  
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。ヒト線維芽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、細胞増殖能の顕著な活性化が見られた。装置の改良を行い、6つの培養体を一度に培養できるようにし、また、液の排出を自動化した。研究目的2では、胚操作によって肝細胞を置換させ“ヒト肝細胞キメラマウス”を作製する開発を目指す。肝障害マウスの胚に正常のマウス ES 細胞を移植したが、肝臓でのドナー細胞の高置換は見られなかった。

A. 研究目的

肝炎ウイルス感染症の予防と治療は、社会的に関心が高く、そのための有効な方法の開発が求められている。これを達成するためには、人体における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がひつようである。モデル系構築を困難にしているのは、通常、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感染及び増殖しないことである。

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、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。

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、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。

A-1. ヒト肝炎ウイルス感染症を再現できるヒト肝細胞培養系の開発

A-2. 胚操作によるヒト肝細胞キメラマウスの新しい作成法の開発

以下、二つの研究目的毎に研究方法、研究結果、及び考察を述べる。

A-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

人体における肝炎ウイルスと宿主（肝臓）の

相互作用を、試験管の中 (*in vitro*) で再現できれば、相互作用に関与すると思われる因子や成分を単純化したかたちで実験することができるため、その生化学的及び分子生物学的仕組みを明らかにすることができる。私達は、“培養皮膚”の作成法として確立しているコラーゲンゲル培養法に注目し、この培養体に人体の血管を似せた液流を与えることで生体に近似な状態をある程度再現できないかの問題意識で研究を開始した。

本年度は、平成21年度と同様にヒト線維芽細胞を用いて次の二つの実験を行なった。  
① 平成21年度で得られた結果の再現性を調べた  
② 平成21年度で作成した装置を改良した。

### 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) ゼル中に  $5.0 \times 10^5$  個/ml の濃度で懸濁した。このゼル 2.5 ml を 3.5 cm 直径の培養ウエルに入れた。ウエル当りの細胞数は  $1.3 \times 10^6$  個となる。ウエルを 37 °C および 5% CO<sub>2</sub> 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的に培養した。培養液は 1 mL/24 hr の速度で送液した。送液によってウエ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送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、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、細胞の状態を調べて、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。

培養された細胞に関して次の評価を行なった。①細胞密度を調べた。②増殖細胞の特異抗原である Ki-67 の免疫染色を行なった。③TGF- $\beta$  1、NF- $\kappa$  B1A、COL1A1、COL3A1、及び HIF-1A 遺伝子の発現レベルを定量的 RT-PCR で測定した。

培養装置の改良を次の観点から行なった。①培養体に注入された培養液がゲルを出た後、自動的に排出されるようにする。②現行

の装置は一度に2個の培養体しか通液できない。これを6個の培養体に通液できるようにする。

### C-1. 研究結果

(1) 培養1週間目の培養体を、フロー及び静置培養で比較した。ゲルの直径と厚さにおいて両者に差はなかった。固定し H&E 染色を施し、特にゲルの中心部と端部に注目して観察した。いずれの部位でも静置培養に比較して細胞密度が顕著に高かった。正常な核の割合はいずれの培養法においてもおよそ70%で両者に差は無かった。固定切片上で、細胞密度、細胞総数、及び Ki-67 陽性細胞率を測定したところ、フロー培養の方が、それぞれ約2倍、3倍、及び4倍の高値を示した。TGF- $\beta$  1、NF- $\kappa$  B1A、COL1A1、COL3A1、及び HIF-1A 遺伝子の発現レベルを測定したところ、両者で有意な違いが見られた。いずれの遺伝子の発現レベルも、静置培養の方がフロー培養より3-5倍高い発現レベルを示した。

以上の観察結果は、3D-flo-culture 系での培養は、細胞の増殖を促進していること、及び細胞の表現型に影響を与えていることを示している。

(2) これまでの3D-flo-culture 系での培養では、最大で2個の培養体しか培養できなかったため、実験規模に限界があった。また、フローさせた培養液を自動的に排出させる仕組みを組み込んでいなかったために、必要に応じて手動で吸引除去していた。これらの欠点を改良して最大で6個の培養体を培養でき、ゲルを通った後の培養液を、自動的にシリンジで吸い取るができるようにした。

### D-1. 考察

昨年度の研究では、3D-flo-culture の方が3D-nonflow-culture よりゲルの収縮力や生細胞数の割合において優れているとの結果であったが、本年度の結果は両者に違いが見られなかった。この点に関しては、今後更に再現性テストを行い調べる必要がある。3D-flo-culture の方が3D-nonflow-culture より細胞に高い増殖を与えるという結論は両年度で共通であった。遺伝子発現レベルに関しては、得られた結果の再現性とその生物学的



意味付けに関する実験を今後行う予定である。

培養体を6個まで培養でき、培養廃液を自動的に除去できる新しい培養装置を作成することができた。今後、この新装置の性能テストを行った後、実際に細胞培養を行い、3D-flo-culture法の優位性を検証したい。

#### A-2. ヒト肝臓を有するキメラマウスの作成法の開発

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た。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。しかし、ホストが免疫不全マウスのため、肝炎ウイルス感染後のウイルスと宿主(肝臓)の相互作用を調べるモデルとはしては限界がある。そこで、正常免疫系を保持したマウスをホストとして使用できるようなキメラマウスの作成法を開発する。

作成製法の原理は以下の通りである。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ゲ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<sup>+/+</sup>-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、その肝臓の肝細胞は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。また、胎児期にヒト細胞に接触するためこのマウスはヒト細胞に免疫寛容を示すと考えられる。したがって、正常な免疫系を有する肝細胞キメラマウスを作成できる可能性ある。この仮説を検証するため、昨年度、h-ESCの代わりに入手と実験操作が容易であるマウスES細胞(m-ESC)を使用して実験を開始した。この時、ホストとして使用するuPA-Tgマウスは、ヘテロ個体(uPA<sup>+/+</sup>-Tgマウス)で充分である可能性もあるので、ヘテロ個体を使

用した。

#### B-2. 研究方法

平成21年度に次の実験を行った。

- ①♀C57BL/6マウス(Black)から卵子を採取し、これをuPA<sup>+/+</sup>-Tgマウス(Albino)から得た凍結精子と体外受精させた。(交雑によって得られた胚由来細胞のコートカラーはagouti)
- ②受精卵を培養し胚盤胞期胚まで発生させ、胚盤胞期胚(uPA<sup>+/+</sup>-m-BC)を得た。
- ③uPA<sup>+/+</sup>-m-BCにTgマウスから樹立されたEGFPで標識されたC57BL/6マウス(Black)由来ESC(EGFP<sup>+</sup>-m-ESCと呼ぶ)を注入し、m-BC(キメラm-BC)を得た。
- ④キメラm-BCを偽妊娠♀マウスに移植し、胚発生させ、出産仔(EGFP<sup>+</sup>-m-ESCマウス)を得た。

平成22年度は、平成21年度の実験で得られた出産仔について

- ①各組織に於けるEGFP<sup>+</sup>-細胞の分布を実体蛍光顕微鏡で調べた。
- ②各組織でのEGFPのmRNA発現レベルを定量的RT-PCRで測定し、それら組織におけるEGFP<sup>+</sup>-m-ESCの寄与率を調べた。

#### C-2. 研究結果

(1)EGFP<sup>+</sup>-m-ESCキメラマウスの作成  
uPA<sup>+/+</sup>及びuPAwt/wt(野生型)の♂マウスとC57BL/6の♀マウスからそれぞれ精子と卵を採取しこれらを人工授精させた。受精率はuPA<sup>+/+</sup>マウス及び野生型でそれぞれ94%及び88%であった。これらを培養し胚盤胞期胚まで発生させた。発生率はそれぞれ76及び90%であった。これらにEGFP<sup>+</sup>-m-ESCを移植し、仮親体内で発生させ、仔を得た。出生率はそれぞれ11及び18%であった。最終的に離乳仔をそれぞれ11及び10匹得た。前者のEGFP<sup>+</sup>-m-ESCマウス11匹の内、明らかに毛色キメラ(黄色と黒色キメラ)を示した個体は1匹のみであった。後者では毛色キメラ個体はいなかった。

(2)キメラマウスでのEGFP遺伝子発現  
得られたEGFP<sup>+</sup>-m-ESC/uPAヘテロマウスから4匹(うち1匹は体毛キメラ)、

EGFP<sup>+</sup>-m-ESC/野生型マウスから3匹を任意に選んだ。それらから、肝臓、心臓、腎臓、胃、小腸、及び皮膚を分取し、RNAを抽出した。これを鋳型として定量的RT-PCRによってEGFP遺伝子の発現レベルを測定し、分子レベルでのキメラ化率を調べた。毛色キメラ個体の各臓器の発現レベルは高値を示したが特に肝臓での発現が高いということではなく、調べた組織全てでほぼ同じレベルであった。毛色非キメラ個体でも高い発現を示すものが1匹いた。この発現レベルも各臓器でほぼ同じであった。EGFP<sup>+</sup>-m-ESC/野生型マウスでは1個体が低い発現を示した。この場合も肝臓で特に高い発現を示すということではなかった。

## D-2. 考察

本年度の研究の結果、uPA遺伝子誘導性肝障害マウス胚の胚盤胞に野生型ES細胞を移植しても、ホストの肝細胞が特異的に移植細胞由来の肝細胞で置換されるということではなかった。この理由として、uPAヘテロであったため、肝障害が弱かった可能性がある。また、uPA遺伝子の脱落の可能性も否定できない。今後、このような可能性を考慮に入れながら、私達のアイデアでマウス胚操作による正常免疫能を有するキメラマウスを作製できないか、さらに研究を展開する予定である。

## 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。ヒト線維芽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、細胞増殖が顕著に促進されることが分かった。さらに、一度に培養できる培養体の数を2個から6個に増やす、ゲルを通過した培養液を自動的に排出する仕組みを取り付ける等の装置の改良を行な

った。研究目的2では、前年度では「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」ことを目的とした。この最終目的は不変であるが、当面の目的として「正常な免疫系を保持したキメラマウスの作成技術の開発」とすることにした。肝不全マウスの胚に正常ES細胞を移植してその仔を得ることができた。しかし、得られたマウスの肝臓にES由来の肝細胞が高密度に存在するということではなく、置換率は他の組織と同程度であった。この原因が何であるか、引き続き調べて行きたい。

本研究で目指している通液性立体培養法及び新しいヒト肝細胞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

本研究に関係する文献は、平成21年度の報告書に記載したので本年度の報告書では割愛する。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. Hepatic hyperplasia associated with discordant xenogeneic parenchymal-nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice. *Am J Pathol.* 2010 Aug; 177 (2): 654-665.
2. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *Am J Pathol.* 2010 Jul; 177 (1): 153-165.
3. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A

protease inhibitor. *J Gen Virol.* 2010 Jul; 91(Pt 7): 1668-1677.

4. 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 Jan 1; 391 (1): 316-321.

5. 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 Ther.* 2010, 21: 40-50.

6. 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

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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22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および酵  
素活性の比較

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移植したキメラマウス肝臓において、成長の過程で発現量が変化するヒト薬物代謝酵素計15種の遺伝子発現および6種の薬物代謝活性を調べた。その結果、マウスに移植した未熟な若年ドナー肝細胞はマウス肝臓内に生着・増殖する過程で成人ドナーと同等の薬物代謝能を有することが判明した。このことから、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という昨年の研究データを補完した。

#### 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。しかしながら、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きた。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。

今年度は、昨年度の結果を補完する目的で移植するヒト肝細胞に22歳と35歳の2ドナーを加えて年齢の幅を広げた。また、リアルタイムRT-PCR法でmRNAの発現量を測定する薬物代謝酵素にCYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4, 2E1の6分子種を加えた。さらにキメラマウス肝臓からミクロソームを調製し、上と同じCYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1, 3A4の6分子種について高速液体クロマトグラフィーでキメラマウス肝臓における酵素活性を調べた。

#### B. 研究方法

##### ヒト肝細胞キメラマウスの作出

ヒト肝細胞キメラマウスの作出にあたり、移植には以下の7ドナーの凍結ヒト肝細胞を用いた（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、ドナーF:22歳/男性/アジア人、ドナーG:35歳/男性/白人）。

uPA<sup>+/+</sup>/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



0.75-1.05x10<sup>6</sup>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から14週(移植後9から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 1μg、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°Cで5分間変性させた後、氷冷した。この調製液に5xFirst-strand buffer 4 μL、100 mM DTT 1μL、RNAase free水 1μL、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°Cで5分、55°Cで60分、72°C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。逆転写反応液1 μL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°Cで2分間を1回、95°Cで10分間反応させた後に95°C、15秒間及び60°C、1分間を交互に40回反応させた。

本研究で発現量を測定するのに用いたヒト薬物代謝酵素プライマーは以下のものである。CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP3A7、CYP2E1、UGT1A1、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、FMO1、FMO3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<sup>-ΔCt</sup>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

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

Primer	Sequence	
	Forward primers(5'-3')	Reverse primers(5'-3')
CYP1A2	GCTTCTACATCCCAAGAAAT	ACCACTTGGCCAGGACT
CYP2C8	GGGACTTTATCJATTGCTTC	GGTGCTTGTTGTCTCTGTTT
CYP2C9	CCAGATCTGCAATAATTTTCTC	CAAGCTTCAATAGTAAATTGATG
CYP2C18	AGGACATGAGCAAATCCTTAACC	GCTTCATATCCATGCAACAC
CYP2C19	TGAATGAAAACATCAGGATTG	CAAGGTTTTTAAGTAATTTGTTAIGG
CYP2D6	CTTCCGACAAAACCGTGA	GACAGCATTACCAAGCTC
CYP2E1	GGCTGAAGTAAAAGAGTATGTGTC	TTTCCTTCTCCATTTCCAC
CYP3A4	ACTGCTTTTTTGGGAATA	GGCTGTTGACCATCATAAAAG
CYP3A7	ATGATTTGGAGTGGATGCTC	TTGGGGTAAAGAAATGGAAAG
UGT1A1	TTGATCCAGTGGATGGC	ATGCTCCCTCTCTGATGTACAAC
UGT1A6	ACACCCTGAACCTTCTTAAGGAG	GCTGAATGTATGCTCCAGG
UGT1A9	AGGAACATTTAATTATGCCACCG	CAAAACAAAGTCCGTTCCG
UGT2B7	TGACATGAAGAAGTGGGATCAG	CAACATTTGGTAAGAGTGGATATGG
FMO1	ATGGGAAATTCCTGCACAGAC	ACCATGTCCCATGGGTAGC
FMO3	TGGCCCTTGTAGTCCCTACCAG	GGCTTCTGAAGTCTCCCGACC
GAPDH	GGAGTCAACGCATTTGGT	AAGATGGTCATGGGATTTCCA

RNA (Total RNA-Human Adult Nomal Tissue 5 Donor Pool: Liver, Biochain) と妊娠 20 (STRATAGENE, single donor) および 24 週 (Cell applications, single donor) の胎児肝臓と妊娠 22-40 週 (Clonthech, pooled 63 donors) の 63 ドナーの胎児肝のプール Total RNA から合成した cDNA を用いた。

#### キメラマウス肝ミクロソームの調製

キメラマウスから採取した肝臓に 2 mL/g liver となるように Tris 緩衝液を加え、ホモジネートした。9,000xg, 20 min, 4°C で遠心した上清を 1.5 mL チューブに移し、105,000xg, 60 min, 4°C で超遠心した。遠心後上清を除去し、沈殿物に 500  $\mu$ L のリン酸溶液を 2 回に分けて加えながらプラスチック製ホモジナイズ棒でホモジナイズ後、105,000xg, 60 min, 4°C で超遠心した。遠心後、上清を捨て、沈殿に最初の組織の 0.25 倍量の Sucrose 溶液を 2 回に分けて加えながらホモジナイズした。タンパク濃度は牛血清アルブミンを標準として Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) で測定した。タンパク溶液に 10 mg/mL になるよう Sucrose 溶液を加え、使用するまで -80°C で保存した。

#### 薬物代謝酵素活性測定

キメラマウス肝臓中薬物代謝酵素活性を測定するために、キメラマウス肝臓から抽出したミクロソームに Table 2 の基質と緩衝液を添加し、37°C にて 5 分間プレインキュベート後、NADPH 生成系補酵素溶液を加

えて 37°C にてインキュベートした。酵素反応には同じドナー由来のキメラマウス 3 匹分のミクロソームを等量混合したものを用いた。反応液にはそれぞれの代謝物に対する内部標準物質を添加し、攪拌した後 4°C 下で 9600xg、10 分間遠心分離して上清を回収した。

#### HPLC による代謝物の定量

各代謝酵素反応で得られた上清中の代謝物の濃度は、HPLC (株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いて測定した。HPLC 分析に使用した分析カラムを Table 3 に示した。また、反応代謝物の HPLC 分析条件を Table 4 に示した。それぞれの代謝物標品で検量線を作成し、内部標準物質で補正したピーク面積から濃度値を算出した。それぞれのマウスの薬物代謝酵素活性はヒトの 50 ドナーミクロソーム (HLM 50 Donor Pool, BD Gentest™; BD Biosciences, Woburn, MA) の活性に対する比として示した。

#### (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。

Table 2. Reaction conditions for determination of CYP activities using microsomes for HPLC analysis

	Enzyme activity	Substrate (Concentration, $\mu$ M)	Metabolite	Buffer*	Incubation time (min)
CYP1A2	Phenacetin O-deethylase	Phenacetin (200)	Acetaminophen	PB	20
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylase	Diclofenac (6)	4-Hydroxydiclofenac	TB	30
CYP2C19	S-Mephenytoin 4'-hydroxylase	S-Mephenytoin (60)	4'-Hydroxymephenytoin	PB	60
CYP2D6	Debrisoquin 4'-hydroxylase	Debrisoquin (100)	4-Hydroxydebrisoquin	PB	30
CYP2E1	Chlorzoxazone 6'-hydroxylase	Chlorzoxazone (100)	6-Hydroxychlorzoxazone	PB	10
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylase	Midazolam (10)	1'-Hydroxymidazolam	PB	10

\* TB, Tris-HCl buffer (pH 7.5); PB, potassium phosphate buffer (pH 7.4).

Table 3. Assay Column used in this study

CYP Isoform	Column	Column length	Column I.D.
CYP1A2	CAPCELL PAK C18, UG120	4.6×250 mm	5 µm
CYP2C19			
CYP2C9	Inertsil ODS-3	4.6×250 mm	5 µm
CYP2D6	Inertsil ODS-3	4.6×150 mm	5 µm
CYP2E1	Xterra RP18	4.6×150 mm	5 µm
CYP3A4			

Table 4. Analytical conditions of HPLC for CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4 assays

Enzymes	Analyte	Internal standard	Injection volume (µl)	Mobile phase			Column temperature (°C)	UV Detection (nm)
				Solvent A*	Solvent B	Gradient program, %B (min)		
CYP1A2	Acetaminophen	0.1 µg Caffeine monohydrate	95	50 mM PB	acetonitrile	Isocratic mode (A/B=91/9)	35	245
CYP2C9	4'-Hydroxy diclofenac	0.4 µg Phenacetin	50	0.5% (v/v) AAAS	methanol containing 0.5% (v/v) acetic acid	40 (0)→90 (30)→90 (35)→40 (36)	50	280
CYP2C19	(±)4'-Hydroxy mephenytoin	0.1 µg Phenobarbital sodium	95	50 mM PB	acetonitrile	Isocratic mode (A/B=90/20)	35	240
CYP2D6	4'-Hydroxy debrisoquine	7 ng Metoprolol	50	23 mM perchloric acid	acetonitrile	Isocratic mode (A/B=82/18)	40	ex. 229 em. 286
CYP2E1	6-Hydroxy chlorzoxazone	0.4 µg Phenacetin	50	0.5% phosphoric acid	acetonitrile	Isocratic mode (A/B=90/20)	35	287
CYP3A4	1'-Hydroxy midazolam	0.01 µg Phenacetin	50	10 mM PB (pH 7.4)	Acetonitrile/methanol mixture (75, v/v)	30 (0)→30 (5)→60 (17)→60 (25)→30 (26)	40	263

\* PB, potassium phosphate buffer; AAAS, acetic acid aqueous solution.

+ This analyte was quantified by a standard curve of dexmethazone, because we could not obtain an authentic 6-Hydroxydexmethazone.

Table 5. The Chimeric mice used in the present study

Donor	Age	Gender	Race	hAlb(mg/mL)	RI(%)	Mice (n)
A	3 mo	Male	Caucasian	9.6-10.6	78.9-84.9	3
B	1 ye	Male	Caucasian	5.0-8.9	79.5-91.4	3
C	5 ye	Male	African American	13.5-17.8	93.0-96.9	3
D	14 ye	Male	Caucasian	4.3-7.8	72.6-86.6	3
E	22 ye	Male	African American	4.0-5.9	68.9-77.8	3
F	22 ye	Male	Asian	5.9-8.1	71.6-80.4	3
G	35 ye	Male	Caucasian	4.9-6.4	65.0-70.1	3

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

F: 22 year/ Male/ Asian

G: 35 year/ Male/ Caucasian

### C. 研究結果

#### キメラマウスのヒト置換率

本年度は22歳と35歳の2ドナーの肝細胞を用いて作製したキメラマウス6例を含む21例のキメラマウスをヒト肝薬物代謝酵素の測定に使用した。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 5に示した。

#### キメラマウス肝臓中代謝酵素の発現量測定

本年度新たに以下の6つのCYP分子種

(CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP2E1) の発現量を測定した。CYP2C19は年齢に依存して発現量が減少する傾向が見られたが、コントロールの成人5ドナーの肝組織プールに比べて成人ドナー由来のキメラマウスの発現量は低かった (Fig. 1-1, 1-2)。

CYP3A7, FM01, FM03は出生を機に肝臓における発現量が変化する薬物代謝酵素である。CYP3A7は胎児肝臓で発現が高く生後低下する。キメラマウス肝臓では若年ドナーのキメラマウスで発現が高く、成人ドナーでは低い傾向にあった (Fig. 2)。FM01は胎

児肝ではFM01の発現が高く、出生後にFM01の発現は低下しFM03の発現が誘導されることが知られている (文献5, 6)。キメラマウス肝臓においては、若年ドナーにおいて、FM01とFM03どちらも高く、成人ドナーでは低い傾向にあった (Fig. 2)。キメラマウス肝臓のCYP3A7とFM01の遺伝子発現をヒト胎児肝臓と比較したところ、CYP3A7のキメラマウス肝臓の発現量は胎児肝と比較すると若年ドナーのキメラマウス肝臓であってもその発現量は1/10以下であった。一方、若年ドナーキメラマウスのFM01の肝臓での発現量は妊娠20週の胎児肝よりも高く、ヒト成人ドナーキメラマウスでも肝組織プールに比べて10倍以上の発現量であった (Fig. 3)。その他の分子種については胎児での発現はほとんど見られなかった (Data not shown)。今年度追加した成人2ドナーについてはCYP2D6で22歳ドナーの発現が他のものに比べて高い発現を示したが、その他の分子種については特に目立つ変動は示さなかった (Fig. 1-1, 1-2, 2)。

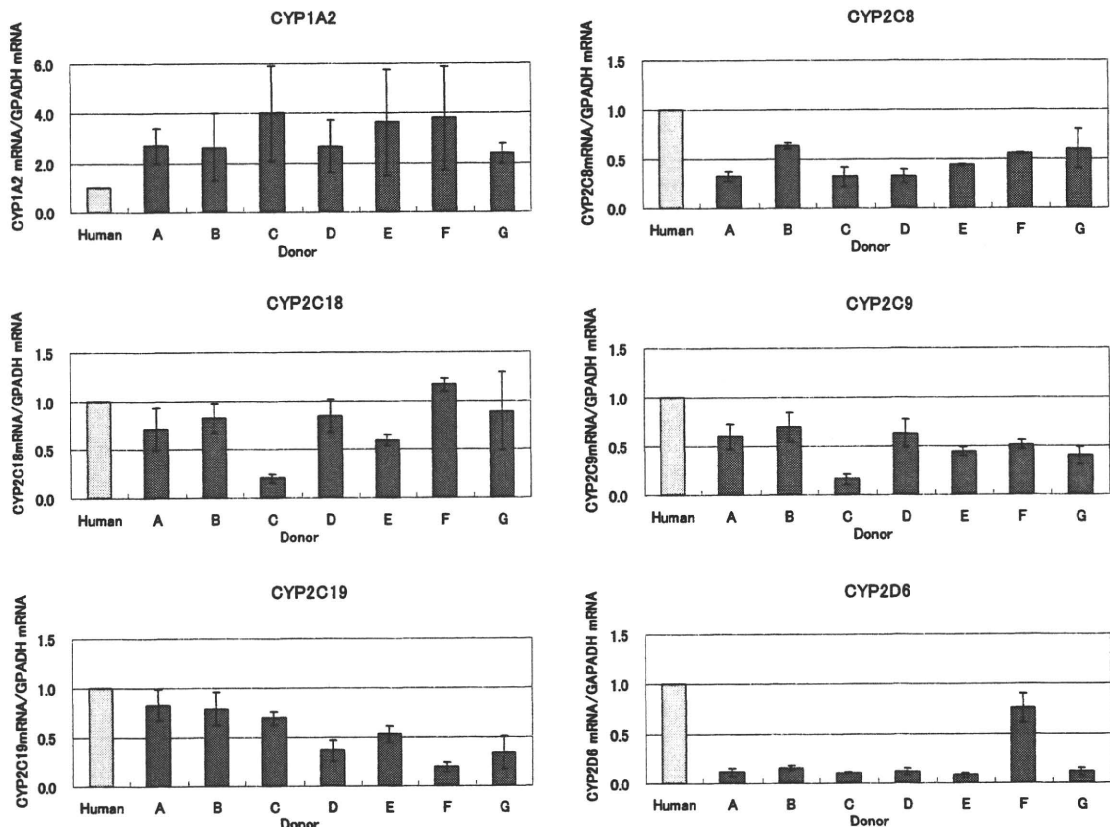


Fig.1-1. Human CYPs expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human CYP mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.