

Fig.1-2. 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.

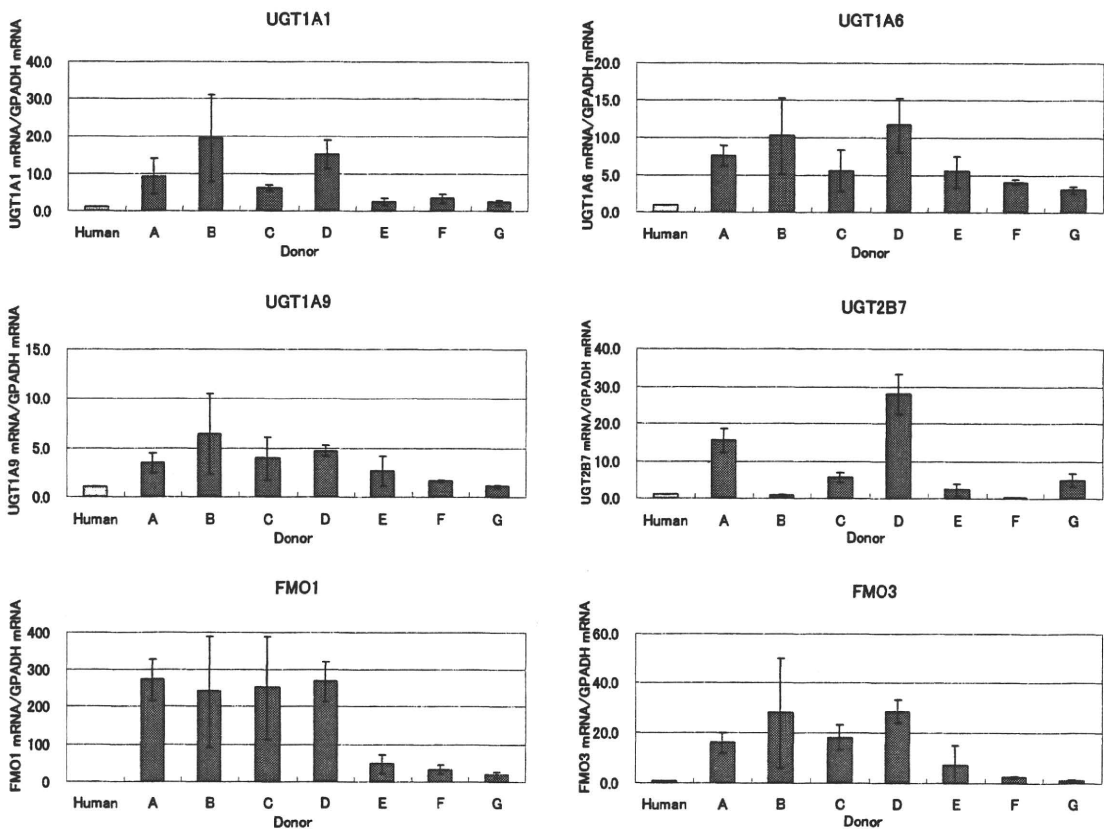
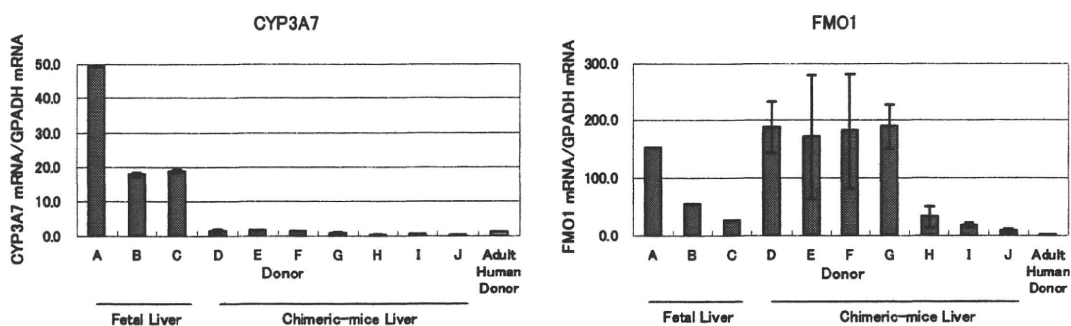


Fig.2. Human UGTs and FMOs expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human UGTs and FMOs mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

キメラマウス肝臓中代謝酵素活性測定

キメラマウス肝臓中で発現しているmRNAが実際に酵素活性を持っているか調べるため、6つのCYP分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP2E1) につい

て酵素活性を測定した。いずれの分子種でも50ドナーマイクロゾームと同レベル程度の活性が見られたが、mRNAの発現と同様にばらつきがあり、年齢依存の傾向は見られなかった (Fig. 4)。



Donor
 A: 20W Gestation, Male
 B: 24W Gestation, Male
 C: 22-40W Gestation, 63 Spontaneously donor, Male/Female, Caucasian
 D: 3months/ Male/ Caucasian
 E: 1years/ Male/ Caucasian
 F: 5years/ Male/ African American
 G: 14years/ Male/ Caucasian
 H: 22years/ Male/African American
 I: 22years/ Male/Asian
 J: 35years/ Male/ Caucasian

Fig.3. CYP3A7 and FMO1 gene expression on the chimeric mice liver, fetal and adult human liver. Relative enzyme activity levels of human CYP and FMO enzymes were determined as described at the Materials and Methods section.

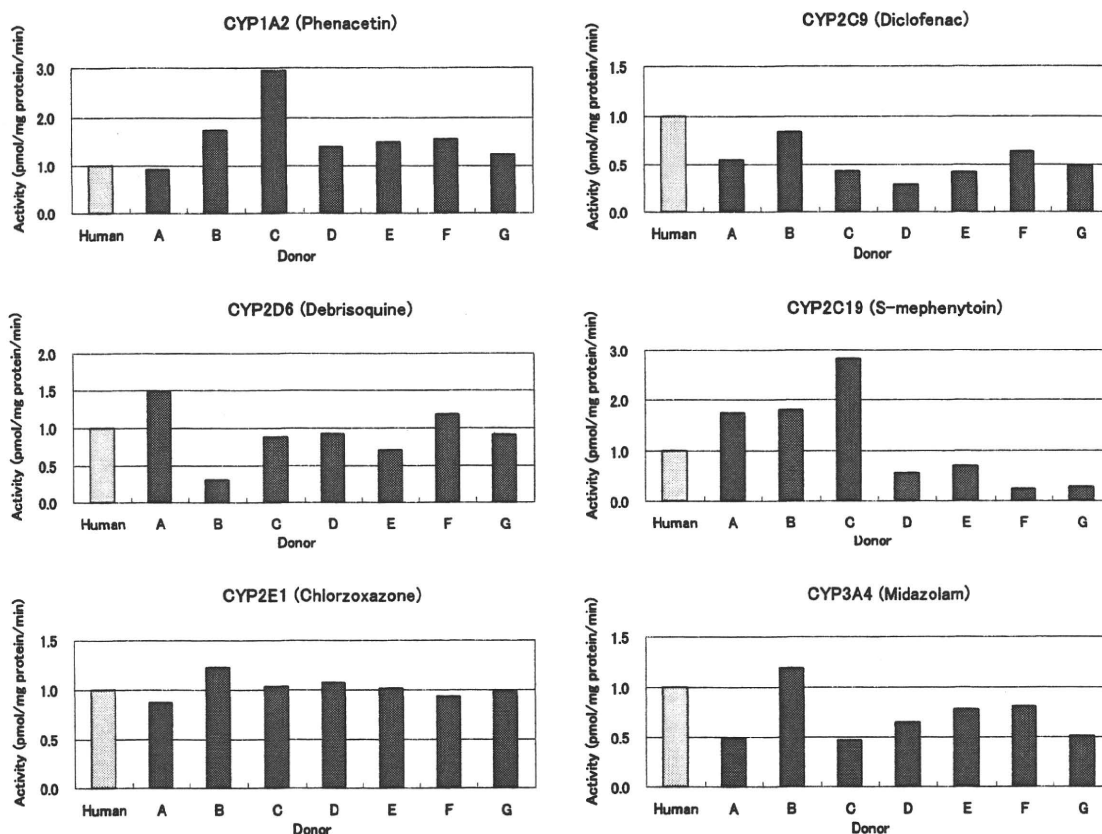


Fig.4. Human Drug Metabolizing Enzyme Activity on the chimeric mice. Relative enzyme activity levels of human CYP enzymes were determined as described at the Materials and Methods section.

D. 考察

昨年度検討した、異なる年齢のドナー肝細胞を用いて作製したキメラマウス肝臓中のヒト薬物代謝酵素のmRNA発現データを補完する目的で、今年度は22歳と35歳の2ドナー由来のキメラマウスを作製し、年齢と共に発現が変化するCYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP2E1の6CYP分子種を追加して遺伝子発現を定量性リアルタイムRT-PCRにより調べた。また、上と同じCYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP2E1についてはキメラマウス肝臓からミクロソームを調製し、代謝酵素活性を測定した。

遺伝子発現量測定では新たに追加したCYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP2E1はいずれも年齢と共に発現が増加することが報告されているが、キメラマウスではCYP2C19のみドナー年齢が高くなるに従って減少する傾向が見られた。CYP2D6についてはキメラマウス肝臓において肝組織プールに比較して全体的に発現量が低かった。それ以外の分子種については、ばらつきは見られるが年齢依存的な発現量の変化は見られなかった。

代謝酵素活性においても同様に年齢依存性は見られなかった。mRNAの発現で年齢依存的な減少が見られたCYP2C19は活性ではそのような傾向は見られなかった。また、発現量が全体的に低かったCYP2D6の活性はいずれの年齢のキメラマウスにおいてもヒト成人ドナーとほぼ同じレベルの発現を示した。

本年度測定した酵素活性とそれに対応する発現量を比較すると、そのパターンにはおおむね類似性が見られ、mRNAの発現と酵素活性が相関していることが示された。

発現量が胎児で高いといわれているCYP3A7のキメラマウス肝臓の発現量はドナー年齢に依存して低下傾向にあったが、胎児肝と比較すると若齢ドナーのキメラマウス肝臓であってもその発現量は胎児肝の1/10以下であったことから、キメラマウス肝臓のCYP3A7の発現量は成人の発現様式に近いと考えられた。一方、胎児肝で発現が高いことが知られているFM01の発現量は、若齢ドナーキメラマウス肝臓で胎児よりも高い値が認められ、成人ドナーキメラマウス肝臓においても成人5ドナー肝組織プールに比べて顕著に高かった。このことは、キメラマウスでは、ヒト肝臓においてFM01

の発現を抑制している何らかの機構が働いていないのではないかと考えられた。

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。

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. Zhang Z. and Cashman J. R. Quantitative Analysis of FMO gene mRNA levels in human tissues. Drug Metabolism and disposition 2006, 34:19-26
6. Koukouritaki S B, Simpson P, Yeung C K, Rettie A E and Hines R N. Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FM01) and 3 (FM03) developmental expression. Pediatric research 2002, 51:236-243

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
1. 論文発表

1. 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.* 91:1668-1677, 2010.
 2. 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.* 177:654-665, 2010.
 3. Wisse E, Braet F, Duimel H, Vreuls C, Koek G, Olde Damink SW, van den Broek MA, De Geest B, Dejong CH, Tateno C, Frederik P. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *World J Gastroenterol.* 16:2851-2866, 2010.
 4. Kikuchi R, McCown M, Olson P, Tateno C, Morikawa Y, Kato Y, Bourdet D, Monshouwer M, and Fretland AJ. Effect of HCV infection on the mRNA expression of drug transporters and cytochrome P450 enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition* 38:1954-1961, 2010.
 5. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, and Tateno C. In Vitro Evaluation of Cytochrome P450 and Glucuronidation Activities in Hepatocytes Isolated from Liver-Humanized Mice. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 25:539-550, 2010.
 6. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, and Yoshizato K. Growth Hormone-Dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-Repopulated Liver. *Endocrinology* (in press)
 7. Takano T, Tsukiyama-Kohara K, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tokunaga Y, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, and Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes *Journal of Hepatology* (in press)
 8. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 acts synergistically with Interferon alpha to enhance the expression of interferonstimulated genes and inhibit hepatitis C virus replication *J Hepatol* (in press).
 9. 加国雅和、立野知世 ヒト肝細胞置換ヒト型マウス 小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通編、SERIES モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール 株式会社エル・アイ・シー、東京 pp436-444、2011
2. 学会発表
 1. Tateno C, Ohshita H, Yoshizane Y, Yamasaki C, Yanagi A, Ishida Y: Donor age-independent gene expressions in humanized chimeric mouse livers and aging of human hepatocytes through in vivo passages. FASEB Summer Research Conference. Snowmass village, Colorado, 2010
 2. Ishida Y, Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Yokomichi H, Chyayama K, Tateno C: A novel hepatitis B virus infection and replication model developed using primary human hepatocytes derived from chimeric mice with humanized livers. FASEB Summer Research Conference. Snowmass village, Colorado, 2010
 3. Tateno C, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Ishida Y: Reduced susceptibility of human hepatocyte-repopulated chimeric mice to TNF α -mediated hepatocellular apoptosis with LPS-sensitization. 15TH International symposium on cells of the hepatic sinusoid. 2010, Pasadena, CA.
 4. 立野知世、山崎ちひろ、柳愛美、吉実康

美、石田雄二 第17回肝細胞研究会 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓のLPSへの反応性 平成22年6月18日 秋田アトリオン

5. 石田雄二、眞田春美、加国雅和、島田卓、茶山一彰、立野知世 第46回日本肝臓学会 HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスの血清中及び肝臓中のcccDNA量の解析 平成22年5月27日 ホテルメトロポリタン山形

6. Ishida Y, Urabe M, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Ozawa K, Tateno C 第16回日本遺伝子治療学会 Gene transduction into human hepatocytes transplanted into a chimeric mouse by using self-complementary recombinant AAV8 vectors 平成22年7月1日 栃木県総合文化センター

7. Ohshita H, Yanagi A, Ishida Y, Tateno T Transplanted with Human Hepatocytes of Various Aged Donors. 第25回日本薬物動態学会 平成22年10月7日-9日 大宮ソニック

シティ

8. 立野知世、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、石田雄二 第24回肝類洞壁細胞研究会 第24回肝類洞壁細胞研究会 平成22年11月27日-28日 コラッセ福島

9. 立野知世、柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、大西千元、石田雄二 マウス肝臓への継代移植によるヒト肝細胞の増幅 第10回日本再生医療学会総会 2011年3月1日 京王プラザホテル

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

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 東京医科歯科大学非常勤講師

研究要旨

肝移植に替わるあるいはそれを補完するために、多能性幹細胞から分化誘導させた肝細胞様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細胞およびマウス iPS細胞から、胚様体接着培養法や単層培養法を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。ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞に比較して倫理面や免疫拒絶の面でも有利なことから、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、日本人由来のヒトiPS細胞を簡便に調製するために、ヒト活性化Tリンパ球を用い、センダイウイルスゲノムに山中4因子の遺伝子をタンデムに導入した細胞非浸襲性のベクターによるiPS化を目指している。また購入したヒトiPS細胞を用いて、ヒト肝星細胞由来のLI90との共培養による肝細胞分化への影響や、ゲノム安定化や未分化維持に関してマウスES細胞との異同についても追究した。

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細胞で問題の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、センダイウイルスベクターを用いて、ヒト活性化リンパ球からのiPS化と、ヒト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。また、購入したヒトiPS細胞を使って、ヒト肝星細胞由来細胞株LI90との共培養による肝細胞分化への影響、ならびにマウスES細胞で研究してきた未分化維持因子DPPA4についても検討した。

B. 研究方法

活性化Tリンパ球は、末梢血から分離したT細胞を抗CD3抗体でコートしたフラスコ中でIL2を加えて培養したものを使用した。培地は無血清培地と10%ヒト血清を含む培地を使用した（東京医歯大難研・清水則夫准教授との共同研究）。山中4因子の遺伝子をタンデムにゲノム中に導入したセンダイウイルス（SeV: KOSM, KOSM302L）を活性化Tリンパ球にMOI2-5の比で加えて2時間浸透培養を行った。あらかじめフィーダー細胞（MEF, SL10; ReproCell）を播いてある6-well plateに、well当たり10万から100万の細胞を播種し、bFGFを含むhES培地（ReproCell）で培養を開始した。ほぼ2日に一回の割合で培地交換（2/3）を行い、経過を観察した（産業技術総合研究所・中西真人博士との共同研究）。

理研細胞バンクより購入したヒトiPS細胞について、未分化維持因子DPPA4の発現や機能と、これまで得ているマウスES細胞の結果と

比較し検討を加えた。

ヒトiPS細胞とLI90との共培養系は、準備が整った。

C. 研究結果

現時点までには、SeV ベクターを用いたヒト活性化T細胞のiPS化には成功していない。現在、ヒト線維芽細胞との違いを中心に再検討している段階にある。その中で、活性化Tリンパ球を使う場合、フィーダー細胞はSL10よりもMEFが適当であること、ベクターとT細胞との培養に工夫が必要なことも判明した。

DPPA4は、マウスES細胞と同様、ヒトiPS細胞に高発現し、活性クロマチンに結合していることが判明した。マウスES細胞では、DPPA4は未分化維持に必須であり、ヒストンH1と同じくらの流動性を示す、クロマチン因子であることを明らかにしているが、ヒトiPS細胞でも同様の機能を発揮している重要な未分化維持因子であることが推定できる。

D. 考察

ヒト細胞のiPS化は様々な種類の細胞から成功しているが、採取に際して侵襲も負担も少ない細胞としては、末梢血の細胞が最も望ましい。その中でも、活性化Tリンパ球からのiPS化に成功すれば、耳たぶや指先からのわずか1滴の血液を出発材料にしたiPS化が可能となり、健常成人はもちろん、疾患患者や新生児の細胞からのiPS化も容易になる。残念ながら現時点までではヒト活性化Tリンパ球からのiPS化に至っていないが、英知と労力を結集して成功にこぎ着けたいと決意を新たにしていく。

マウスES細胞では、DPPA4はN末端側でDNAとC末端側でコアヒストンH3と結合するユニークなクロマチン結合因子であることが判明した。同様に、ヒトiPS細胞でもクロマチンの安定化や遺伝子発現制御を介して、多能性幹細胞の未分化維持に関与している可能性

が高い。

E. 結論

山中4因子の遺伝子をタンデムに導入したS eVベクターによる、活性化Tリンパ球のiPS化に挑んでいるが、現時点では成功に至っていない。引き続き、条件などを検討中である。

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

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), 327-337 (2010)

Sakasai R, Teraoka H, Takagi M, and Tibbetts RS: Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia-mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison. *Journal of Biological Chemistry* 285(20), 15201-15208 (2010)

2. 学会発表

逆井 良、北尾洋之、掛地吉弘、寺岡弘文、前原喜彦：トポイソメラーゼ I 阻害剤による転写を介したDNA鎖切断の解析、第69回癌学会学術総会、大阪、2010年9月24日；プログラム p. 303.

Masaki H, Nishida T, Sakasai R, Kitajima S, Teraoka H: Biological function of DPPA4 in mouse ES cells and human iPS cells、第33回分子生物学会年会・第83回生化学会合同大会、神戸、2010年12月10日；プログラム p. 424.

藤森浩彰、吉岡研一、鹿内弥磨、益谷美都子、寺岡弘文：マウス胚性幹細胞の分化過程をモデルにした、がん性幹細胞発生機構の検討、第10回再生医療学会総会、東京、2011年3月1日；日本再生医療学会雑誌 Vol. 10 Suppl. p. 217.

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 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

研究分担者 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、キメラマウスを用いたHBV感染防御実験を行った。結果：Genotype C 由来のHBsモノクローナル抗体を組み合わせることで、遺伝子型Aおよびワクチンエスケープ変異株（遺伝子型C-145R導入変異株）の感染防御が可能であった。今後は、iPS細胞由来のキメラマウスを構築し、HBV感染実験を行いたい。

共同研究者氏名
杉山真也、村上周子
名古屋市立大学大学院医学研究科

A. 研究目的

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、人種による宿主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、これらの問題的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、宿主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。これまでに我々は、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、これらの宿主因子を加味した検討を予定している。

4) HBV 感染防御実験

感染源については3種類の1.24倍長HBV複製モデルを作成し(遺伝子型A野生株、

遺伝子型C野生株、遺伝子型C-145R導入変異株)、これをHuh7細胞にtransfectionしてできた培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種、回収されたマウス血清を材料として感染実験を行なった(1.0x10⁴copies/匹)。HBVワクチン(ビームゲン、遺伝子型C、adr)接種後から得られた数種類の抗体を用いて感染防御の可能性を検討した。

(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

Genotype C由来のHBsモノクローナル抗体により、遺伝子型Aおよび遺伝子型C野生株HBV群では全例でHBV-DNAの検出はされなかった。ワクチンエスケープ変異株(遺伝子型C-145R導入変異株)では、単独のモノクローナル抗体による感染防御はできなかったが、複数組み合わせることにより、防御可能であった。

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. 結論

現在日本で使用されている遺伝子型C由来のHBワクチンにより、遺伝子型Aやエスケープ変異株の感染防御は可能であった。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida T, Kusumoto S, Inagaki A, Mori F, Ito A, Ri M, Ishida T, Komatsu

H, Iida S, Sugauchi F, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R.

Reactivation of hepatitis B virus in HBsAg-negative patients with multiple myeloma: two case reports. *Int J Hematol.* 2010;91(5):844-9.

2. Kusumoto S, Tanaka Y, Ueda R, Mizokami M. Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-plus-steroid combination chemotherapy. *J Gastroenterol.* 2011;46(1):9-16.

3. Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol.* 2011;54(1):19-25.

4. Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res.* 2011;41(1):1-21.

5. Yuen MF, Ka-Ho Wong D, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of Hepatitis B Virus (HBV) Infection through Blood Transfusion from Blood Donors with Occult HBV Infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(5):624-32.

2. その他の発表

1. Sugauchi F, Tanaka Y, Tajiri K; Kishi H, Matsuura K, Sugiyama M, Joh T, Mizokami M. In vivo model using uPA/SCID mice with human hepatocytes to study cross-genotype protection of HBV and a role of HBs antigen mutation in immunity escape. 61st

American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), Oct 29-Nov 2 2010, Boston MA, USA.

2. 菅内文中, 田中靖人, 田尻和人, 岸裕幸, 山内 学, 城 卓志, 溝上雅史. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるB型肝炎ウイルス感染防御の試み。第46回日本肝臓学会総会 2010年5月26-27日 山形

- H. 知的財産権の出願・登録状況
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 22 年度の研究目的は、研究班長の池田らが確立しつつある安定的かつ効率的なヒト iPS 細胞からの肝細胞分化系を用いて、肝細胞分化過程における様々なマーカー遺伝子群の発現変化を解析するものである。すなわち NANOG 等の未分化マーカーから、内胚葉、中胚葉、外胚葉マーカー、および分化肝細胞マーカー等の発現変動を解析し、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の最適遺伝子の同定と、そのプロモーター領域における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

池田らによるヒト iPS 細胞に Activin A, FGF-2, BMP-4 刺激をすることで内胚葉系に分化誘導後、さらに HGF, Dex, OSM で刺激することで成熟肝細胞に分化可能な系を用いて、それぞれの分化誘導因子刺激後に細胞より RNA を抽出した。抽出した RNA 画分を用いて、未分化マーカーである NANOG, SOX2, OCT3/4, REX1、胚葉分化マーカーであ

る FOXA2, SOX17, HEX, FOXA1, GATA4, GATA6, CXCR4、肝細胞マーカーである CK18, CK19, Alb, AFP, CD55 遺伝子の発現変動を RT-PCR 法を用いて解析を行った。

（倫理面への配慮）

ヒト細胞として平成 22 年度は既に京都大学山中らにより株化されているヒト正常 2 倍体繊維芽細胞ゆらいヒト iPS 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

池田らの開発したヒト iPS 細胞からの肝細胞分化系を用いて、各種分化マーカー遺伝子の発現変動を解析したところ、SOX2, NANOG, OCT3/4 の未分化マーカーは Activin A、あるいは BMP4 刺激後に急激に発現低下が起これ、これらの分化誘導因子により iPS 細胞の未分化性が失われていることが強く予想された。一方、内胚葉マーカーである FOXA2, SOX17 の発現は Activin A、あるいは BMP4 刺激後に急速に増加し、Activin A および BMP4 の二重刺激により効果的に iPS 細胞から内胚葉系細胞に分化していることが強く示唆された。

さらに肝細胞分化マーカーである CK18, Alb, AFP は HGF、あるいは OSM 刺激後に急激に発現が増加し、HGF および OSM 刺激によりある程度肝細胞分化が誘導されていることが示された。

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。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とためのマーカー遺伝子の同定と、それらプロモーター領域を用いた ChIP 法の確立が必要不可欠のものとする。本年度は、池田らによる肝細胞分化誘導系を用いて、様々な分化マーカー遺伝子の発現変動が明らかとなり、ChIP 法確立のための標的遺伝子がある程度同定された。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 細胞から肝細胞分化誘導過程におけるエピジェネティック分子基盤の解明と、疾患患者由来ヒト肝細胞保持キメラマウスを用いた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ために、iPS 細胞から肝細胞分化過程における様々な分化マーカー遺伝子

の発現変動を解析し、肝細胞分化過程における詳細なエピジェネティック解析の基盤となる標的遺伝子を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizutani, E., *Suzumori, N., Ozaki, Y., Oseto, K., Yamada-Namikawa, C., Nakanishi, M., and Sugiura-Ogasawara, M. *Hum Reprod.* In press (査読有り)
2. Sugiyama, M., Tanaka, Y., Nakanishi, M., and *Mizokami, M. Novel Findings for the Development of Drug Therapy for Various Liver Diseases: Genetic Variation in IL-28B Is Associated With Response to the Therapy for Chronic Hepatitis C. *J Pharmacol Sci.* in press (査読有り)
3. Shimada, M., Haruta, M., Niida, H., Sawamoto, K., and *Nakanishi, M. PP1g is a phosphatase responsible for dephosphorylation of histone H3 at threonine 11 after DNA damage. *EMBO rep.* 11, 883-889 (2010) (査読有り)
4. Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., and *Nakanishi, M. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci.* 101, 2505-2509 (2010) (査読有り)
5. Niida, H., Murata, K., Shimada, M., Ogawa, K., Ohta, K., Suzuki, K., Fujigaki, H., Khaw, A.K., Banerjee, B., Hande, P.M., Miyamoto, T., Miyoshi, I., Shirai, T., Motoyama, N., Delhase, M., Appella, E., and *Nakanishi, M. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo. *EMBO J.* 29, 3558-3570 (2010) (査読有り)

6. Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., and Murakami-Tonami, Y. Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell Cycle* 9, 3233-3242 (2010) (査読有り)

7. Sakai, S., Ohoka, N., Onozaki, K., Kitagawa, M., Nakanishi, M., and Hayashi, H. Dual mode of regulation of cell division cycle 25A protein by TRB3. *Biol Pharm Bull.* 33, 1112-1116 (2010) (査読有り)

8. 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-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes and Dev.* 24, 333-338 (2010) (査読有り)

2. 学会発表

1. 第 69 回日本癌学会総会 ガン研究入門コース 癌と細胞周期 中西真

2. 2010 日本分子生物、生化学会合同会議 シンポジウム Chk1-GCN5 と PP1g-HDAC3 複合体によるヒストンバイナリーコードの変換は DNA 損傷による E2F 標的遺伝子の発現を抑制する 中西 真、島田緑、春田真由美

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出

分担研究者 水口 裕之 (独)医薬基盤研究所

本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出を試みる。これまでに本研究室で開発した分化誘導法を活用することで、ヒト iPS 細胞から効率的に肝細胞を誘導し、フェニックスバイオ社・立野知世博士との連携の元、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス個体への移植実験を実施することで、肝炎モデルへ応用可能なキメラマウスの作出を検討した。

研究協力者

川端健二 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

西川恵三 (独)医薬基盤研究所

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

形山和史 大阪大学大学院薬学研究科

稲村充 大阪大学大学院薬学研究科
(独)医薬基盤研究所

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科
(独)医薬基盤研究所

長基康人 大阪大学大学院薬学研究科
(独)医薬基盤研究所

A. 研究目的

現在世界には2億人、本邦には200万人のC型肝炎感染者がおり、世界では年間200~300万人ずつ感染者が増加している。依然として難治性1b型高

ウイルス量患者に対しては既存薬剤の奏効率が50%に過ぎないこと、インターフェロン投与による副作用発現により投与の中断を余儀なくされる場合があること、各種薬剤耐性ウイルスが出現することなど、現在臨床で使用されている肝炎治療薬には克服すべき課題が山積している。従って、さらなるウイルス性肝炎治療薬の開発の必要性の点から、創薬応用に適した生体モデルの創出が必須となっている。

近年、チンパンジーなどの霊長類動物の代替手段として、uPA トランスジェニックマウスと、免疫不全マウスを交配して得られた uPA 免疫不全マウスへ、ヒト肝細胞を移植・生着させたヒト肝細胞をもつキメラマウスの利用が注目を集めている。申請者は、独自開発した次世代アデノウイルス (Ad) ベクター技術を駆使することで、ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させる技術の開発に成功している。そこで本研究では、フェニックスバイオ社・立野知世博士との連携の元、申請者が作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を、uPA 免疫不全マウスへ移植することで、キメラマウスを作出するための基盤技術の開発を実施する。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出することで、生体内での肝炎ウイルスの感染および複製の解析や投薬

による治療効果の検討を実施することができる。さらに、細胞のソースとして iPS 細胞を用いていることから、テラーメイド研究を見据えた実験系の開発が可能となり、新規のウイルス性肝炎治療薬の開発につながる評価系の実現が期待できる。

本年度は、Ad ベクターにより 3 種類の遺伝子を導入することで作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて、フェニックスバイオ社・立野知世博士グループにおいて、キメラマウスの作製に関する検討を行った。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMEF5 のマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子、ヒト SRY-box containing gene 17 (SOX17) 遺伝子、hematopoietically expressed homeobox runt-related transcription factor (HEX) 遺伝子あるいは X 遺伝子 (仮称の遺伝子名) を挿入し、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM41-K7 に挿入することにより pAd-K7-EF-LacZ、pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-X を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad-LacZ、Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-X を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。

B-2. 内胚葉系細胞、肝幹細胞、肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞 (Dotcom) を分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Furue MK et al., Proc Natl

Acad Sci USA, 2008, 105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase (Invitrogen 社) を用いてヒト iPS 細胞を回収後、6 因子 (10 μ g/mL human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin) および 100 ng/mL Activin A (R&D systems 社) を含む hESF-DIF (Cell Science & Technology Institute 社) 培地に懸濁後、マトリゲルでコーティングした細胞培養用 12 プレートに播種した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-SOX17) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で中内胚葉系細胞に作用させた。培地は上記のものと同じものを使用した。24 時間後に X-gal 染色により遺伝子導入効率を、48 時間後に免疫抗体染色により内胚葉分化効率を測定した。

次にヒト iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-HEX; 3,000 VP/cell) で作用させた後、20 ng/mL FGF4 (R&D systems 社) と 20 ng/mL BMP4 (R&D systems 社) を含んだ hESF-DIF 培地で 9 日間培養し、肝幹細胞を得た。

ヒト iPS 細胞由来の肝幹細胞を各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-X; 3,000 VP/cell) で作用させた後、20 ng/mL HGF (R&D Systems 社)、20 ng/mL Oncostatin M (R&D Systems 社)、 10×10^{-6} M dexamethasone (Sigma 社) を添加した hepatocyte culture medium (Lonza 社) で 9 日間培養し、肝細胞を誘導した。

分化誘導した iPS 細胞由来肝幹細胞における ASGPR1 細胞の発現はフローサイトメトリを用いて計測を行った。分化誘導した細胞を 1% EDTA-PBS 溶液により細胞を回収後、抗 ASGPR1 抗体 (N-18,

Santa Cruz)及び Alexa Fluor 488 標識抗 IgG 抗体 (Invitrogen)を用いて染色を行った。

B-3. iPS 細胞由来肝細胞の生体移植実験

移植のレシピエントマウスには、ヒトアルブミンプロモーターによって uPA 遺伝子を発現する uPA トランスジェニックマウスと、免疫不全マウス SCID を交配して得られた uPA 免疫不全マウスの 2~4 週齢を用いた。iPS 細胞由来肝細胞は、PBS 洗浄後、0.025%トリプシン/EDTA 溶液によって回収後、DMEM/10%FCS 培地へ懸濁した。uPA 免疫不全マウスをエーテル吸入麻酔し、iPS 細胞由来肝細胞懸濁液をハミルトンシリンジにより脾臓へ 25 μ l(4 X10e5 あるいは 1X10e6 細胞)注入した。移植マウスから毎週採血を実施し、血中ヒトアルブミン量を Human albumin ELISA quantitation set (Bethyl laboratory)にて計測を行った。

C. 研究結果

中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞において発現している転写因子 SOX17、HEX、X 遺伝子を改良型 Ad ベクター (ファイバー領域にポリリジン配列を付与したファイバー改変 Ad ベクター) を用いて時期特異的に一過性に過剰発現することで、効率的な肝細胞の分化誘導を行った(図 1A)。その結果、ASGPRI 陽性率 40%の肝細胞が誘導された(図 1B)。別実験の結果によれば、本プロトコールに従い作製された肝細胞は、約 80%の細胞がアルブミン陽性を示し、CYP3A4、CYP2D6 などの薬物代謝酵素の活性レベルがヒト初代培養肝細胞と同等であること、さらに細胞の形態は、細胞間隙が明瞭になり、多核の細胞が現れるなど、ヒト初代培養肝細胞の形態と酷似していることを確認している。

続いて、フェニックスバイオ社・立野知世博士グループにおいて、uPA 免疫不全マウスへの移植を試みた(図 2A)。ヒト iPS 細胞由来肝細胞 4X10e5 細

胞を、9匹の uPA 免疫不全マウスへ移植した結果、移植後 28 日目より 1 匹の移植マウスにおいて血中ヒトアルブミンが観察された(図 2B)。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞 1X10e6 細胞を、10 匹の uPA 免疫不全マウスへ移植した結果、移植後 34 日目より 1 匹の移植マウスにおいて血中ヒトアルブミンが観察された(図 2B)。

D. 考察

申請者が開発した時期特異的に SOX17、HEX、X 遺伝子を iPS 細胞へ遺伝子導入することで分化誘導された肝細胞は、uPA 免疫不全マウスへの生着が可能であり、かつ生体内でヒトアルブミンを産生できることが明らかとなった。しかしながら、キメラマウスを肝炎ウイルスの感染実験や薬物代謝能へ利用するには、血中ヒトアルブミン濃度が mg/ml レベルの高い生着効率の実現が必要となる。今後は、生着効率の改善を実現するために、移植直前に iPS 細胞由来肝細胞を剥離する条件の検討を行う。また、肝幹細胞から肝細胞への分化誘導に関して、培養条件 (3 次元培養等) の検討や更なる機能遺伝子の導入を組み合わせることで、キメラマウスの作出に適した、成体肝細胞と類似する細胞の分化誘導法の開発が必要であることが考えられる。

E. 結論

生着効率の点で改善の必要性はあるもの、Ad ベクターによる導入法を用いて作出されたヒト iPS 細胞由来肝細胞をもつキメラマウスを作出することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A,

1. 特許取得
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

2. 学会発表

- 1) 川端健二, 水口裕之. 遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
- 2) 高山和雄, 稲村充, 川端健二, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
- 3) 田代克久, 川端健二, 櫻井文教, 水口裕之. 幹細胞の分化誘導系におけるアデノウイルスベクターの有用性, 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2010 年 10 月, 大阪.
- 4) 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 川端健二, 水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的な分化誘導, 第 9 回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム 2010, 2010 年 10 月, 京都.
- 5) 稲村充, 川端健二, 高山和雄, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 水口裕之. HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導, 第 16 回肝細胞研究会, 2010 年 6 月, 秋田.
- 6) 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 川端健二, 水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導, 第 16 回肝細胞研究会, 2010 年 6 月, 秋田.

H. 知的財産権の出願・登録状況

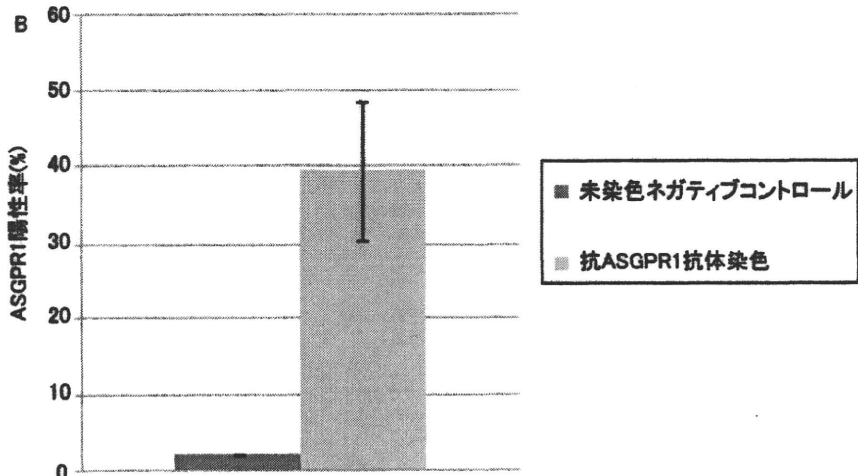
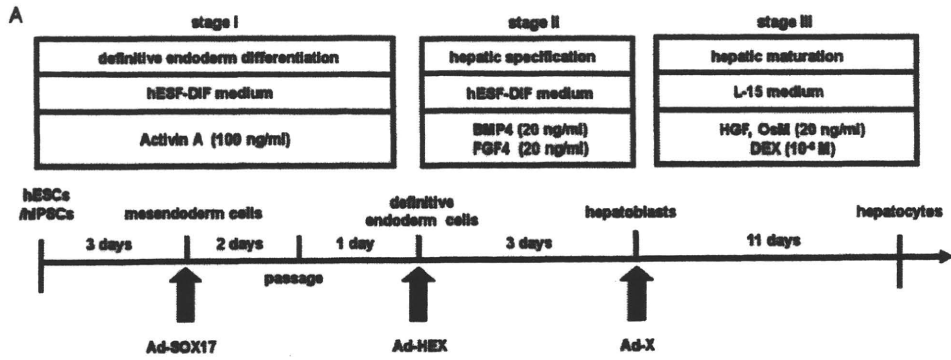


図1 Adベクターによる遺伝子導入法を用いたiPS細胞からの肝細胞分化誘導法
 (A)ヒトiPS細胞から肝細胞を分化誘導するための培養プロトコル。
 (B)分化誘導されたiPS細胞由来肝細胞のASGPR1の発現をフローサイトメトリ解析によって検討した。

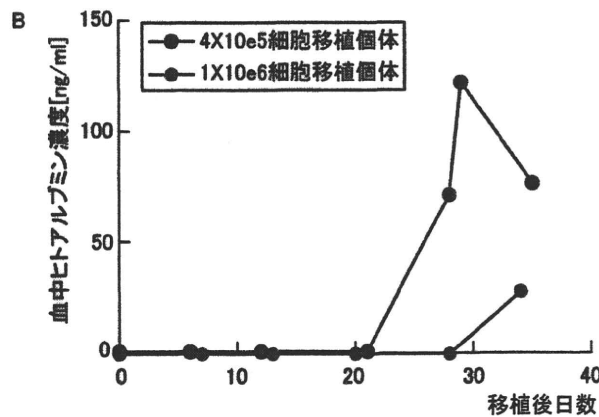
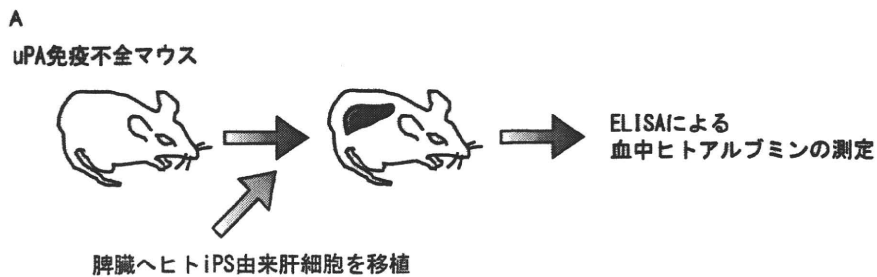


図2 iPS細胞由来肝細胞のuPA免疫不全マウスへの移植実験
 (A)2-4週齢のuPA免疫不全マウスへ、Adベクターによる遺伝子導入法を用いて作製した肝細胞を脾臓経由で移植を行った。
 (B)iPS細胞由来肝細胞を移植後、経時的に採血を行い、血中ヒトアルブミン濃度をELISAによって測定した。

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
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	41	375-385	2011

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
Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, <u>Yoshizato K.</u>	Hepatic hyperplasia associated with discordant xenogeneic parenchymal-nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice.	Am J Pathol.	177 (2)	654-665	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

Kubo S, Kataoka M, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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.	21	40-50	2010
<u>Yoshizato K</u> , Tateno C.	A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans.	PPAR Research	2009	1-11	2009
Nishie M, Tateno 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> , Tateno C	In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse.	Expert Opin Drug Metab Toxicol.	5(11)	1435-1446	2009
Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, <u>Yoshizato K</u> , 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.	15; 237 (1)	119-126	2009
Zion O, Genin O, Kawada N, <u>Yoshizato K</u> , 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.	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
加国雅和、 <u>立野知世</u>	ヒト肝細胞置換ヒト型マウス	小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通	SERIES モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール	株式会社エール・アイ・シー	東京	2011	436-444