

- Association. Osaka, 2010
31. Kikitsu A, Morita H, Shimamoto A, Tahara H. Establishment of novel method for the evaluation of DNA binding activity of telomere binding protein by DNA strand exchange. EMBO Conference/Telomere and the DNA Damage Response. フランス, 2010
32. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H. A novel senescence-associated microRNA miR-22: implications for tumorigenesis. The 20th International Symposium of Hiroshima Cancer Seminar in conjunction with Three Universities' Consortium "Recent Progress in Carcinogenesis, Progression and Therapy of Breast Cancer". 広島, 2010
33. Sera Y, Zensho K, Shimamoto A, Tahara H. TERT promotes generation of induced pluripotent stem cells from senescent fibroblasts. 第 33 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2010
34. Hino Y, Xu D, Fukunaga S, Tamaki A, Takeshita F, Kudo Y, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H. hsa-miR-22 acts as a potential regulator of cellular senescence and tumorigenesis. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Kobe, 2010
35. Fujimoto M, Matsuo J, Tabuchi A, Katayama K, Nakashima A, Akita T, S. H. Do. Son, Tanaka J. Study on hepatitis viral infection among general population in Cambodia. The 21th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2011). Thailand, 2011
36. Matsuo J, Okita H, Mizui M, Katayama K, Tabuchi A, Akita T, Nakashima A, Tanaka J. Progress of liver disease in hepatitis C virus carriers found at the blood donation and its outcomes:18-year cohort study on 1021 carriers. The 46th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2011). Berlin. 2011
37. 松尾順子, 水井正明, 片山恵子, 沖田肇, 田中純子. 献血を契機に見いだされた HCV キャリアの後方視的の追跡調査: 17 年間の臨床診断に基づく成績より. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形. 2010
- 松尾順子, 藤本真弓, 山口拓洋, 田渕文子, 中島歩, 片山恵子, 田中純子. カンボジア王国における肝炎ウイルス感染状況のパイロットスタディ. DDW-Japan2010 第 14 回 日本肝臓学会大会. 神奈川, 2010
38. 大竹ひかり, 柴田真美, 曾我部愛由子, 池本珠莉, 久保川佳子, 榎響子, 村上茂, 田中純子. 30 代女性に対する乳癌検診は有効か- 有効性, 感度, 費用対効果での検証-. 第 20 回日本乳癌検診学会総会. 福岡, 2010
39. 藤本真弓, 松尾順子, 田渕文子, 片山恵子, 中島歩, 秋田智之, DO HUY SON, SVAY SOMANA, 田中純子. カンボジア王国における肝炎ウイルス感染状況把握のための血清疫学調査研- パイロット

- 調査結果- . 第 8 回日本予防医学会学術総会. 石川, 2010
40. 佐藤友紀, 秋田智之, 田中純子, 甲奴町における pdmH1N1 インフルエンザ流行動態に関する数理モデルを用いた検討. 第 21 回日. 疫学会学術総会, 北海道, 2011
41. Fuchimoto Y, Hoshino K, Tanabe M, Yamada Y, Naoki S, Hibi T, Shinoda M, Obara H, Kawachi S, Kitagawa Y, YMorikawa Y. Living- Related Partial Liver Transplant for Primary Sclerosing Cholangitis (PSC): Post-Transplant Recurrence and Preventative Measures XXIII International Congress of The Transplantation Society. Vancouver, 2010
42. Fuchimoto Y, Shimojima N, Hotta R, Arisue A, Tomia H, Takasoto A, Yamamoto Y, Mori M, Hoshino K, Matsufuji H, Nakahara T, Morikawa Y. Lymph Node Dissection Using RI Navigation for Pediatric Solid Tumors. The 7th International Sentinel Node Society Meeting. Yokohama, 2010
43. 瀧本康史, 福田和正, 山本裕輝, 森晶玄, 富田紘史, 高里文香, 下島直樹, 星野健, 才川義朗, 北川雄光, 滝田順子, 細井創, 森川康英: 小児外科における基礎研究 横紋筋肉腫細胞株における CD133 の発現解析による抗癌剤耐性, 腫瘍形成能の評価. 第 47 回日本小児外科学会学術集会. 愛知, 2010
44. 瀧本康史, 星野健, 今留謙一, 大隅朋夫, 嶋田博之, 富田紘史, 高里文香, 山本裕輝, 森昌玄, 下島直樹, 日比泰三, 篠田昌弘, 尾原秀明, 河地茂行, 田辺稔, 北川雄光, 向井万起夫, 森川康英: 小児移植医療 小児肝移植後リンパ増殖症 (PTLD) に対する FACS を用いた迅速な診断とリツキシマブの治療適応の検討. 第 47 回日本小児外科学会学術集会. 愛知, 2010
45. 瀧本康史, 森昌玄, 高里文香, 富田紘史, 山本裕輝, 下島直樹, 星野健, 内藤陽子, 肥沼吾郎, 森川康英: 治療に難渋した良性疾患 気管無形成の長期生存例 食道気管瘻の管理と食道再建術にいたるまで. 第 47 回日本小児外科学会学術集会. 愛知, 2010
46. 瀧本康史, 絵野澤伸, 梅澤明弘, 林免, 森川康英: 骨髄-臓器 composite graft によるドナー特異的免疫寛容誘導 骨髄-臓器 composite graft の作製. 第 47 回日本小児外科学会学術集会. 愛知, 2010
47. 瀧本康史, 富田紘史, 高里文香, 森昌玄, 山本裕輝, 下島直樹, 星野健, 北東功, 池田一成, 森川康英: 超低出生体重児腸穿孔における開腹術の有効性 腹腔ドレナージ術と比較して. 第 47 回日本小児外科学会学術集会. 愛知, 2010
48. 瀧本康史, 星野健, 田辺稔, 松原健太郎, 日比泰三, 下島直樹, 篠田昌宏, 尾原秀明, 河地茂行, 北川雄光, 森川康英: 原発性硬化性胆管炎に対する生体部分肝移植後の再発と HLA 相同性ならびに B 細胞除去の役割. 第 47 回日本移植学会総会. 京都, 2010
49. 瀧本康史, 富田紘史, 高里文香, 山本裕輝, 森昌玄, 下島直樹, 星野健, 田

波穰, 森川康英:リンパ管腫に対する硬化療法 造影剤を溶解剤に用いた透視ガイド下注入療法について. 第 26 回日本小児外科学会秋季シンポジウム. 神奈川, 2010

50. 瀧本康史, 福田和正, 山本裕輝, 下島直樹, 星野健, 才川義朗, 北川雄光, 滝田順子, 細井創, 森川康英:横紋筋肉腫細胞株における CD133 陽性細胞の癌幹細胞機能の評価. 第 52 回日本小児がん学会総会. 大阪, 2010

#### G. 知的所有権の取得状況

特許 2010-049928 (特許国内優先権主張),

発明者:田原栄俊

老化の診断方法、老化の診断キット、老化抑制物質のスクリーニング方法およびがん抑制剤

## ヒト肝細胞キメラマウス肝臓へのヒト類洞内皮細胞の移植

研究分担者 立野知世 株式会社フェニックスバイオ

研究協力者 山崎ちひろ 広島県産業科学技術研究所

柳愛美 株式会社フェニックスバイオ

吉実康美 株式会社フェニックスバイオ

石田雄二 株式会社フェニックスバイオ

Eddie Wisse Maastricht University

**研究要旨** 我々は、これまで、マウス肝臓の70%以上がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを作製してきた。このキメラマウスの肝臓は、肝細胞はヒト由来であるが、非実質細胞はマウス由来である。本研究では、キメラマウスへのヒト免疫細胞の生着をより誘導することを期待して、キメラマウス肝臓の類洞内皮細胞をヒト類洞内皮細胞で置換することを目的とした。ホストマウスの類洞内皮細胞を除去する目的で17週齢のキメラマウスにモノクロタリンを投与後、継代培養したヒト類洞内皮細胞を脾臓より移植した。その結果、移植後2週目の肝臓において、ヒト類洞内皮細胞の生着は確認されなかった。そこで、3週齢のホストマウスにヒト肝細胞と継代培養ヒト類洞内皮細胞を同時に移植したところ、移植後1週間目の肝臓において、real-time RT-PCR法によりヒトCD31の発現が認められ、ヒト類洞内皮細胞の生着の可能性が示唆された。今後、移植後の長期観察をするとともに、肝臓組織中でのヒト類洞内皮細胞の局在や性質を調べる。

### A. 研究目的

免疫細胞のより効率的な生着が可能なヒト肝細胞キメラマウスを作出するために、肝臓の類洞内皮細胞をヒト類洞内皮細胞に置換させることを目的とした。

### B. 研究方法

#### ヒト肝細胞キメラマウスの作出

凍結ヒト肝細胞は5歳/男性/アフリカ系アメリカ人 (BD Gentest, 米国) をキメラマウスのドナー肝細胞として用いた。キメラマウスのホストマウスである3週齢のurokinase

plasminogen activator transgenic/SCID (uPA<sup>+/+</sup>/SCID) マウスへ、1匹あたり  $2.5 \times 10^5$  個のヒト肝細胞をマウスの脾臓より注入した (20  $\mu$ L)。移植後3週目、および6週目からは週1回マウス血液を尾静脈から2  $\mu$ L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<sup>(1, 2)</sup>。10週齢以上のキメラマウスでマウス血中ヒトアルブミン濃度が7 mg/ml以上のキメラマウスを実験に使用した。

## ヒト肝細胞キメラマウスからのヒト肝細胞分離

マウス血中ヒトアルブミン濃度が 13 mg/ml 以上の 13-16 週齢のキメラマウスから、コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離した。この肝細胞にはわずかにマウス肝細胞が混入しているため、マウス肝細胞表面に特異的な抗体 (66Z) に磁気ビーズを結合させたものを用いて、マウス肝細胞を除去した<sup>(3)</sup>。肝細胞の生存率をトリパンブルー染色により、マウス肝細胞の混入率を fluorescent activating cell sorting (FACS) により計測した。

## ヒト類洞内皮細胞

広島大学外科学において肝切除術における切除肝の正常部位をインフォームドコンセントを行った上で採取し、類洞内皮細胞を分離した。本実験には、分離後2継代して凍結保存したヒト類洞内皮細胞 (76才、男性) を使用した。

## 類洞内皮細胞の移植

キメラマウスの腹腔に 400 mg/kg b.w. のモノクロタリン (Sigma-Aldrich Corp.) を投与した。モノクロタリンはマウス肝臓の類洞内皮細胞に障害を与え除去する作用があることが知られている<sup>(4)</sup>。投与2日目のキメラマウスの脾臓から1匹当たり  $1.9 \times 10^6$  個の継代培養ヒト類洞内皮細胞を脾臓経由で移植した (20  $\mu$ L)。移植後2週目にマウスを解剖し、肝臓を採取した。

## 類洞内皮細胞およびヒト肝細胞の同時移植

3週齢の uPA/SCID マウスに 200 mg/kg のモノクロタリンを腹腔内投与または非投与 24 時間後に、キメラマウスより分離した肝細胞  $5.0 \times 10^5$  個と上記継代培養ヒト類洞内皮細胞  $5.0 \times 10^5$  個ずつを混合し脾臓より移植した (20  $\mu$ L)。マウスの一部は移植後1週目に解剖し肝臓を採取した。残りのマウスは移植後3、6、7週目にマウス血中ヒトアルブミンを測定し、移植後7週目以降に解剖、肝臓を採取する予定。

## 肝臓の電子顕微鏡観察

17 週齢のキメラマウスにモノクロタリンを投与 24 時間目に 2% glutaraldehyde / 0.1M cacodylate buffer, pH 7.4 で門脈より灌流固定後、肝臓を細切し 2% OsO<sub>4</sub> / 0.1M phosphate buffer で 1 時間後固定した。脱水後エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製した。また、14 週齢の非移植の uPA/SCID マウス肝臓超薄切片も同様に作製した。電子染色後、透過型電子顕微鏡により観察を行った<sup>(5)</sup>。

## 肝臓からの total RNA の調製

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

## 定量性リアルタイム RT-PCR 法による hCD31 および hStabillin II の定量

調製した total RNA から以下のように cDNA を合成した。Total RNA 1  $\mu\text{g}$ 、dNTP (2.5 mM) 2  $\mu\text{L}$ 、ランダムプライマー 1  $\mu\text{L}$  を混合し、全量 13  $\mu\text{L}$  を 65°C で 5 分間変性させた後、氷冷した。この調製液に 5 $\times$ First-strand buffer 4  $\mu\text{L}$ 、100 mM DTT 1  $\mu\text{L}$ 、RNAase free 水 1  $\mu\text{L}$ 、SuperScript III RT 逆転写酵素を 1  $\mu\text{L}$  (200U/ $\mu\text{L}$ ) 加えて全量 20  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  に対し forward および reverse primer を 5 mol/ $\mu\text{L}$ 、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  $\mu\text{L}$  とした。それぞれの遺伝子について 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) 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。Primer は、hCD31 は Forward: TATGCAGACCTCAGAATCTAC, Reverse CACTTAATGTGGAGCTGAG、hStabillin II は Forward: ATTCAATGTAAATGAGCTTTTGG, Reverse: CTTTATTTGATTGTCCTTATCGC を用いた。陽性コントロールとして、市販の 5 ドナーの肝組織プール由来の RNA (pooled ヒト肝臓、Biochain Institute Inc.) から合成した cDNA を用いた。発現量は各遺伝子のサイクル数 (Ct 値) から  $2^{\text{Ct}}$  として表し、目的の mRNA の pooled 肝臓の mRNA に対する相対比として示した。

### (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。

類洞内皮細胞は、広島大学の倫理委員会にて承認を得た上で、患者にインフォームドコンセントを行ったものを使用した。

ヒト肝臓由来 RNA は、市販の 5 ドナーの肝組織プール由来の RNA (pooled ヒト肝臓、Biochain Institute Inc.) を用いた。

## C. 研究結果

### ヒト類洞内皮細胞の継代培養

凍結ヒト類洞内皮細胞 2 バイアル (1.1  $\times 10^6$  cells/1 バイアル) を融解し、190xg、5 分遠心後、上清を除き、細胞を 10% FBS 添加血管内皮細胞用基礎培地 (EBM2) (三光純薬) 培地に懸濁し、トリパンブルー染色により細胞数、生存率を計測した (細胞数 1.7  $\times 10^6$  cells、生存率 73.4%)。細胞懸濁液を、直径 15 cm の培養dish 2 枚に播種した (播種密度 8.7  $\times 10^5$  cells/25 mL /dish)。翌日、培地交換を行い、7 日間培養した。この時の培地は、10% FBS 添加 EBM2/MCDB 培地を用いた。培養 7 日目に、EDTA/トリプシンを用いて細胞を剥がし、直径 15 cm の培養dish 7 枚に播きなおし (播種密度 1.0  $\times 10^6$  cells/25 mL/dish)、7 日間培養した。培養 7 日目に EDTA/トリプシンを用いて細胞を剥がし、細胞数、生存率を計測したところ、細

胞数 $9.7 \times 10^6$  cells、生存率97.7%であった。

#### ヒト類洞内皮細胞移植キメラマウス肝臓におけるhStabillin IIとhCD31 mRNAの発現

17週齢のキメラマウス4匹にモノクロタリン400 mg/kgを1回腹腔内に投与し、24時間後に4匹中3匹に脾臓より継代培養ヒト類洞内皮細胞を移植した。また、モノクロタリン非投与およびヒト類洞内皮細胞非移植のキメラマウス3匹、およびキメラマウスのドナー細胞を陰性コントロールとした。また、移植前の継代培養ヒト類洞内皮細胞とpooledヒト肝臓を陽性コントロールとして用いた。これらのサンプルからcDNAを調整し、hStabillin IIに特異的なprimerを用いてreal-time RT-PCRを実施した。その結果、Pooledヒト肝臓ではhStabillin IIの高いmRNA発現量がみられたが、移植前の継代培養ヒト類洞内皮細胞においては検出されなかった。モノクロタリン処理したキメラマウス肝臓では、ヒト類洞内皮細胞移植、非移植にかかわらず、hStabillin IIは検出されなかった。移植前の継代培養ヒト類洞内皮細胞においてもhStabillin IIが検出されなかったことから、移植に用いた継代培養ヒト類洞内皮細胞は継代培養の過程でhStabillin IIの発現を失った可能性が考えられた。

そこで、他のヒト類洞内皮細胞のマーカーとして、hCD31を用いることとした。hStabillin IIと同様にサンプル中のhCD31 mRNA発現量を調べたところ、陽性コントロールであるpooledヒト肝臓および継代培養ヒト類洞内皮細胞においてhCD31の高い発現

が見られた。しかしながら、移植後2週目のキメラマウス肝臓では、ヒト類洞内皮細胞を移植していないキメラマウス3匹と同様、hCD31 mRNAはほとんど検出されなかった。キメラマウスのドナー肝臓においても、hCD31 mRNAはほとんど検出されなかった(図)。したがって、キメラマウスに400 mg/kgのモノクロタリン投与後に継代培養ヒト類洞内皮細胞を移植しても、キメラマウス肝臓には生着しなかったと考えられた。

#### キメラマウス肝臓のモノクロタリン投与後およびホストマウス肝臓の微細構造

14週齢のキメラマウスに400 mg/kgのモノクロタリンを投与24時間後に肝臓を採取し、透過型電子顕微鏡を用いて微細構造を観察した。その結果、ヒト肝細胞で強度の脂肪変性や肝細胞死が認められたが、目的とするマウス類洞内皮細胞への障害、剥離は観察されなかった。

ホストマウスである3週齢uPA/SCIDマウスの肝臓は、uPAの発現により肝細胞に多数の小さな脂肪滴が蓄積することから白色を呈している。7週齢以降のuPA/SCIDマウスの肝臓には、白い領域と赤い領域が観察される。赤い領域はuPAの遺伝子が欠失し、正常マウスの肝細胞のコロニーが増殖している領域である。14週齢のuPA/SCIDマウスの白い領域は、3週齢uPA/SCIDマウスの白い肝臓と同様の形態を示すと考えられ、14週齢のuPA/SCIDマウスの白い領域を採取し透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、uPA/SCIDマウス肝臓の白い領域には、類洞内皮細胞のdisse腔からの乖離が観察された。

以上の結果から、キメラマウス肝臓では

モノクロタリンによる類洞内皮細胞の障害は期待できないが、3週齢のuPA/SCIDマウスにヒト類洞内皮細胞を移植することにより、生着が期待できるのではないかと考えた。そこで、3週齢のuPA/SCIDマウスへヒト肝細胞とヒト類洞内皮細胞を同時に移植することとした。

#### ヒト肝細胞およびヒト類洞内皮細胞移植キメラマウス肝臓におけるhCD31 mRNAの発現

3週齢のuPA/SCIDマウス5匹に200 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与後24時間後にヒト肝細胞 ( $5 \times 10^5$ 個)とヒト類洞内皮細胞 ( $5 \times 10^5$ 個)を脾臓より移植した。また、5匹には非投与の状態ヒト肝細胞 ( $5 \times 10^5$ 個)と継代培養ヒト類洞内皮細胞 ( $5 \times 10^5$ 個)を脾臓より移植した。移植したヒト肝細胞は、キメラマウスから分離した肝細胞を用いた。この肝細胞は生存率は90.9%、ヒト肝細胞の純度は99.3% (マウス肝細胞混入率: 0.7%)であった。尚、キメラマウスから分離したヒト肝細胞は、3週齢のuPA/SCIDマウス肝臓に生着し置換率70%以上の高置換キメ

ラマウスが得られる事を確認している。また、これまでの予備検討より、ヒト肝細胞を移植していない通常のマウスは400 mg/kgのモノクロタリンを投与すると死亡する場合があるので、200 mg/kgの投与量とした。

移植後1週目にモノクロタリン投与、非投与マウスを2匹ずつ解剖し肝臓を採取した。これらの肝臓よりcDNAを調整し、hCD31 mRNAの発現をreal-time RT-PCRにより調べた。その結果、継代ヒト類洞内皮細胞を移植したマウスではhCD31 mRNAの発現が認められた。また、モノクロタリンを投与したマウスの方が非投与のマウスに比べて約10倍の高い発現量を示した。ただし、この発現量は、pooled肝臓に比較すると1/100程度であった (図)。

現在飼育中のマウス (モノクロタリン投与3匹、非投与3匹)は、移植後7週以降に解剖し、肝臓におけるhCD31 mRNA発現量の測定を行う予定である。また、併せて、ヒト類洞内皮細胞特異的な免疫染色も行い、その局在、形態を観察する予定である。

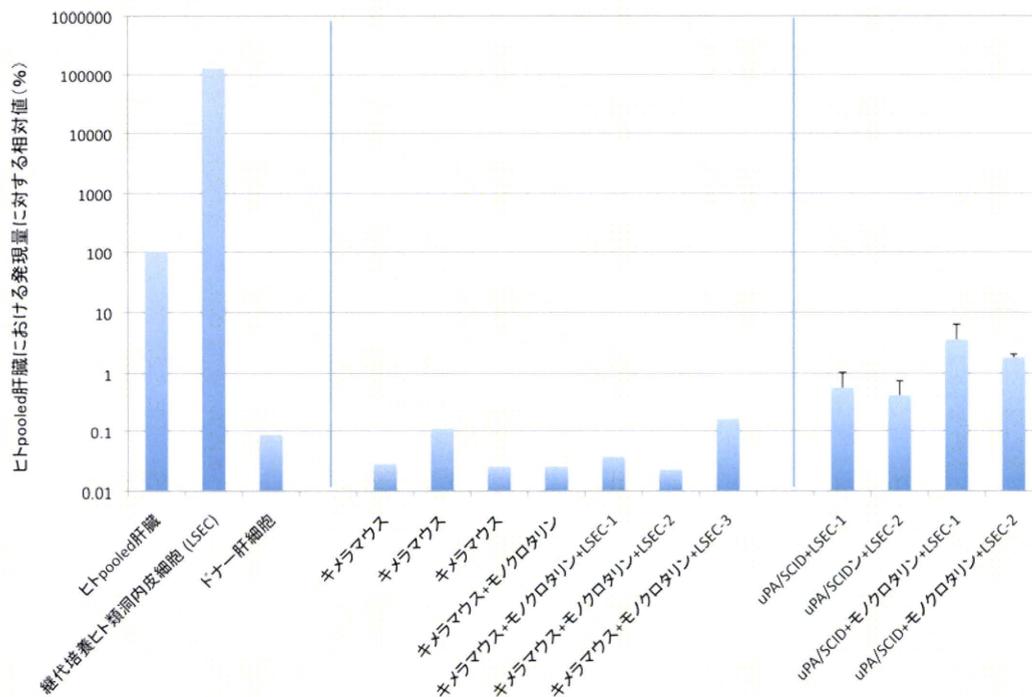


図 キメラマウス肝臓におけるhCD31 mRNAの発現量

#### D. 考察

現在のヒト肝細胞キメラマウスは、肝実質細胞はヒト由来であるが、その他の非実質細胞はマウス由来である。類洞内皮細胞は、disse腔を介して肝細胞と隣接している。類洞内皮細胞と肝細胞は、直接または間接的な相互作用が知られているが、その多くは明らかにされていない。類洞内皮細胞の機能の一つとして、免疫寛容作用が知られている<sup>(6)</sup>。このことから、キメラマウス肝臓にヒト類洞内皮細胞が生着することにより、外部から移植したヒト免疫細胞の免疫寛容効果が期待できる。そこで、本研究では、キメラマウスへのヒト免疫細胞の生着をより誘導することを期待して、キメラマウス肝臓の類洞内皮細胞をヒト類洞内皮細胞で置換することを目的とした。また、キメラマウス肝細胞とヒト肝細胞の遺伝子発

現をマイクロアレイ解析を用いて比較すると、多くの遺伝子が近いレベルで発現しているが、キメラマウス肝細胞の発現遺伝子の約15%が2倍の範囲を超えて、高いまたは低い値を示している。このことは、キメラマウス肝臓において、ヒト由来肝細胞とマウス由来非実質細胞での直接的または間接的な相互作用に不具合が生じていることが起因している可能性がある。このことから、キメラマウスの類洞内皮細胞をヒト由来細胞に置換する事により、キメラマウス肝臓がより正常なヒト肝臓組織に近づくことも期待される。

まず、本研究では、キメラマウス肝臓のマウス類洞内皮細胞に障害を与えることを目的としてモノクローリンを投与後、ヒト類洞内皮細胞を移植した。予備実験により、マウスとキメラマウスではモノクローリン

に対する耐性が異なる事が確認された。このことから、通常マウスの類洞内皮細胞を除去する実験には、200 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与するが、キメラマウスではモノクロタリンへの耐性が高いため400 mg/kgを投与し、ヒト類洞内皮細胞を移植した。しかしながら、キメラマウス肝臓へのヒト類洞内皮細胞の生着は確認できなかった。

そこで、キメラマウスへの400 mg/kgモノクロタリン投与後の肝臓の微細構造を電子顕微鏡により観察した。その結果、モノクロタリン投与において、ヒト肝細胞の脂肪沈着や肝細胞死は観察されたが、マウス類洞内皮細胞の障害、剥離は観察されなかった。これまでの報告より、マウスへ200 mg/kgモノクロタリンを投与した場合、類洞内皮細胞の障害と移植した類洞内皮細胞の生着が確認されている<sup>(4)</sup>。本実験により400 mg/kgモノクロタリン投与後の肝臓の類洞内皮細胞に障害が認められなかったことから、マウス肝細胞とヒト肝細胞におけるモノクロタリンの薬物代謝能が異なる可能性が考えられた。

uPAはセリンプロテアーゼであるため、uPA/SCIDマウス肝臓では肝臓の細胞外マトリックスが分解されていると考えられる。電子顕微鏡観察により、uPA/SCIDマウス肝臓の類洞内皮細胞がdisse腔より乖離している像が頻繁に観察された。このような形態が、uPA/SCIDマウスへのヒト肝細胞の高い生着に繋がっていると考えられる。そこで、キメラマウス肝臓へヒト類洞内皮細胞を効率的に生着させるために、3週齢uPA/SCIDマウスへヒト肝細胞とヒト類洞内皮細胞を同

時に移植することとした。またマウス類洞内皮細胞に障害を与えるために、モノクロタリンを移植前に投与した。モノクロタリン投与、非投与3週齢uPA/SCIDマウスへヒト肝細胞と同時にヒト類洞内皮細胞を移植したところ、移植後1週間目にマウス肝臓においてヒト類洞内皮細胞のマーカであるhCD31 mRNAの発現が認められた。また、モノクロタリン投与を行ったマウスの方が約10倍高い発現が認められた。このことから、3週齢のuPA/SCIDマウスにヒト肝細胞とヒト類洞内皮細胞を同時に移植する事により、ヒト類洞内皮細胞がヒト肝細胞と共にマウス肝臓へ生着する可能性が示唆された。今後、長期観察を行い、キメラマウス肝臓におけるヒト類洞内皮細胞の局在、形態、性質に関して調べる予定である。また、今後、ヒト類洞内皮細胞による置換率の向上をめざす。

## E. 結論

今年度は、キメラマウスへのヒト類洞内皮細胞の移植方法をほぼ確定した。また、キメラマウス肝臓中のヒト類洞内皮細胞の検出法を確立した。

本文中に引用した参考文献：

1. Tateno C, Yoshizane Y, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004; 165:901-912
2. 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)

3. 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.
4. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest.* 2008 118:935-45.
5. 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.* 2010 16:2851-2866.
6. Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Hara H, Zhou W, Ishiyama K, Mitsuta H, Ide K, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells tolerate T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol.* 2005 175:139-46.

#### 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. ヒト肝臓置換ヒト型マウス 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 $\alpha$ -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 なし  
平成22年6月18日 秋田アトリオン 3. その他
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 なし
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 C：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

## 人工多機能幹細胞に関する研究

研究分担者 伊藤 敬 長崎大学 教授

**研究要旨** 人工多能幹細胞の誘導効率改善を目的として、山中教授の発見した4因子に加えてクロマチン修飾酵素をウイルスベクターによりマウス繊維芽細胞に導入した。ヒストン脱ユビキチン化酵素を導入することにより幹細胞コロニーの出現頻度に差異が認められた

未分化細胞特異的な転写因子に加えて翻訳後修飾酵素が未分化転化に影響を与えたことは、翻訳後修飾酵素自体のリプログラミングに於ける重要性を示唆する。平成22年度の結果を追試することにより再現性を確認することが重要であると考え

### A. 研究目的

人工多能幹細胞の誘導効率改善。

### B. 研究方法

山中教授の発見した4因子に加えてクロマチン修飾酵素をウイルスベクターによりマウス繊維芽細胞に導入することにより人工多能幹細胞の誘導効率改善を試みた。

### C. 研究結果

ヒストン脱ユビキチン化酵素により幹細胞コロニーの出現頻度に差異が認められた。

### D. 考察

未分化細胞特異的な転写因子に加えて翻訳後修飾酵素が未分化転化に影響を与えたことは、翻訳後修飾酵素自体のリプログラミングに於ける重要性を示唆する。

### E. 結論

平成22年度の結果を追試することにより再現性を確認することが重要である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, Kera Y, Noda T, Igarashi K. 2011. Methionine Adenosyltransferase II Serves as a Transcriptional Corepressor of Maf Oncoprotein. *Mol Cell* 41: 554-566.

2. Richly H, Rocha-Viegas L, Ribeiro JD, Demajo S, Gundem G, Lopez-Bigas N, Nakagawa T, Rospert S, Ito T, Di Croce L. 2010. Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1. *Nature* 468: 1124-1128.

3. Lancaster OM, Breuer M, Cullen CF, Ito T, Ohkura H. 2010. The meiotic recombination checkpoint suppresses NHK-1 kinase to prevent reorganisation of the oocyte nucleus in *Drosophila*. *PLoS Genet* 6: e1001179.

4. Higashi M, Inoue S, Ito T. 2010. Core histone H2A ubiquitylation and transcriptional regulation. *Exp Cell Res* 316: 2707-2712.

5. Sawatsubashi S, Murata T, Lim J, Fujiki R, Ito S, Suzuki E, Tanabe, M, Zhao Y, Kimura S, Fujiyama S, Ueda T, Umetsu D, Ito T, Takeyama K, Kato S. 2010. A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. Genes Dev 24: 159-170.

## 2. 学会発表

1. 伊藤 敬: Histone Modifications and Transcriptional Regulation. 33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

特許第4393171号

発明の名称；クロマチン機能調節因子

発明者：伊藤敬

出願番号；特願2003-408415

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 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
田中純子	スクリーニングの理論	予防医学指導士テキスト編集委員会	予防医学指導士テキスト	日本予防医学会	岡山	2010	145-150
田中純子, 秋田智之	医用データと統計的推測の考え方						151-156
田中純子	医学研究のデザイン						157-159
加国雅和, 立野知世	ヒト肝臓置換ヒト型マウス	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	株式会社エル・アイ・シー	東京	2011	436-444

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
Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, <u>Ohdan H.</u>	Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy.	J Hepatobiliary Pancreat Sci	29	Epub ahead of print	2011
Doskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, <u>Chayama K,</u> <u>Ohdan H.</u>	Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> and CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity.	J Immunother.	34(2)	129-138	2011
Ushitora Y, Tashiro H, Takahashi S, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, <u>Chayama K,</u> <u>Ohdan H.</u>	Splenectomy in chronic hepatic disorders: portal vein thrombosis and improvement of liver function.	Dig Surg	28(1)	9-14	2011
Kawaoka T, Hiraga N, Takahashi S, Takaki S, Mitsui F, Tsuge M, Nagaoki Y, Kimura Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Tashiro H, <u>Ohdan H,</u> <u>Chayama K</u>	Prolongation of interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including amino acid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus.	Scand J Gastroenterol	45(12)	1488-1496	2010
Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, <u>Ohdan H.</u>	Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice.	J Immunol.	184(6)	3269-3275	2010
Yoshida M, Ikeda S, Sumitani D, Takakura Y, Yoshimitsu M, Shimomura M, Noma M, Tokunaga M, Okajima M, <u>Ohdan H.</u>	Alterations in portal vein blood pH, hepatic functions, and hepatic histology in a porcine carbon dioxide pneumoperitoneum model.	Surg Endosc	24(7)	1693-1700	2010
田中友加, <u>大段秀樹.</u>	【B型肝炎・肝移植後の再発予防法の現状】 高力価HBs抗体含有免疫グロブリン大量投与のアロ免疫応答に対する影響.	今日の移植	24(1)	103-107	2011

大段秀樹.	【肝胆臓薬物治療学の進歩 この30年】 肝臓分野 肝 移植 肝移植の免疫抑制療 法におけるセルセプトの役 割.	肝・胆・膵	6	1182-1187	2010
大段秀樹, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田澤宏文, 田 中友加, 五十嵐友香.	臓器移植におけるB細胞性 免疫応答とその制御法 抗 HLA 抗体関連拒絶反応の 克服.	今日の移植	23(6)	783-788	2010
大段秀樹.	ネオオーラル10年の歩み 解 明されたシクロスポリンの 新規作用 B-1細胞への分 化抑制作用.	今日の移植	23(6)	722-728	2010
大段秀樹.	【抗体関連型拒絶反応の病 理と臨床】 B細胞 lineage と抗体性拒絶反応の制御.	移植	5	434-440	2010
尾上隆司, 大段秀樹.	T細胞の経口トレランス誘 導と肝類洞内皮細胞.	臨床免疫・アレルギー一 科	54(5)	604-612	2010
田代裕尊, 田妻進, 佐々 木民人, 茶山一彰, 浅原 利正, 大段秀樹.	【原発性硬化性胆管炎の最 近の話題】 原発性硬化性胆 管炎に対する肝移植の適応 と問題点.	胆と膵	8	771-774	2010
井手健太郎, 大段秀樹.	【術前・術後に要注意 併 存疾患の手術リスクと対 策】 特殊薬剤服用中の手術 副腎皮質ホルモン剤 ステ ロイド投与患者における周 術期管理.	外科	72(9)	955-958	2010
大段秀樹.	【Liver Transplant Frontier】 肝移植における免疫モニタ リング.	今日の移植	23(3)	63-369	2010
Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K.	Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients.	Journal of hepatology	53	439-434	2010
Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M.	Animal model for study of human hepatitis viruses.	Journal of gastroenterology and hepatology	26	13-18	2011

Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, <u>Chayama K.</u>	HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy.	Gut	60	261-267	2011
Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, <u>Tateno C</u> , Yoshizato K, <u>Chayama K.</u>	Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor.	The Journal of general virology	91	1668-1677	2010
Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kumada H, <u>Chayama K.</u>	Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b.	Journal of hepatology	54	408-414	2011
Noda I, Kitamoto M, Nakahara H, Hayashi R, Okimoto T, Monzen Y, Yamada H, Imagawa M, Hiraga N, <u>Tanaka J</u> , <u>Chayama K.</u>	Regular surveillance by imaging for early detection and better prognosis of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus.	Journal of gastroenterology	45	105-112	2010
Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Kubo M, Tsunoda T, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y, <u>Chayama K.</u>	ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy--a genome-wide study of Japanese HCV virus patients.	Gastroenterology	139	1190-1197	2010
Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, <u>Chayama K.</u>	HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice.	The Journal of general virology	91	1854-1864	2010
Tsuge M, Noguchi C, Akiyama R, Matsushita M, Kunihiro K, Tanaka S, Abe H, Mitsui F, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, <u>Chayama K.</u>	G to A hypermutation of TT virus.	Virus research	149	211-216	2010