

201125008A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 一雄

平成24年(2012)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	1
--	---

### II. 分担研究報告

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	6
-----------------------------------	---

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	10
--	----

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	15
--	----

肝炎ウイルス感染モデルの構築 田中 靖人	17
-------------------------	----

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	20
---	----

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	23
--------------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	35
-----------------	----

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（平成23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

研究代表者 池田 一雄 大阪市立大学大学院医学研究科・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、レピシエントである uPA/SCID マウスでのヒト肝細胞の Kinetics が解析され、凍結ヒト肝細胞のマウスへの生着率は約 10% で、移植後 11 週で約 1 万倍に増殖すること、肝障害を引き起こす化合物を投与することで増殖性ヒト肝細胞、キメラマウス由来凍結ヒト肝細胞の生着が向上することが明らかにされた。宿主側の改良も加わり、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したマウスでは、血中ヒトアルブミン濃度の顕著な上昇が認められた。肝切片上には、ヒトアルブミン、ヒト CK8/18 陽性コロニーが多数観察された。正常免疫能を有するマウス胎児へのヒト iPS 細胞由来肝細胞移植では、生後 10 日後、30 日後の観察で、ヒトアルブミン、ヒト CK8/18 陽性コロニーが確認された。In vitro の系では、中空糸にヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を充填することにより、3 次元培養系を作成し、HBV の感染実験を行ったところ、感染初期から経時的に培養上清中の HBV-DNA 量の増加を確認した。また、p16 因子がヒト iPS 細胞の分化誘導に効果を示すことが明らかとなり、さらに、マウス胚操作による新たなヒト肝細胞キメラマウスの開発を目指す実験も開始された。

研究分担者

吉里 勝利 株式会社フェニックスバイオ  
(大阪市立大学大学院医学研究科客員教授)

立野 知世 株式会社フェニックスバイオ

寺岡 弘文 東京医科歯科大学非常勤講師

田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科・教授

中西 真 名古屋市立大学大学院医学研究科・教授

水口 裕之 医薬基盤研究所チーフプロジェクトリーダー  
(大阪大学大学院薬学研究科・教授)

## 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

(A) 3 週齢の uPA/SCID マウス 1 匹あたり、 $2.5 \times 10^5$  個のヒト肝細胞を、脾臓経由で移植した。移植後 2 日目のキメラマウスの肝臓のパラフィン切片を作製し、ヒト特異的アルブミン抗体で免疫染色を行った。移植後 11 週のキメラマウス ( $n=199$ ) の平均血中ヒトアルブミン値、平均体重、平均肝重量体重比、比重 ( $1.06 \text{ g/cm}^3$ )、およびキメラマウス肝臓における一定面積あたりのヒト肝細胞数をもとに、キメラマウス肝臓に存在するヒト肝細胞数の平均値を算出した。

リポゾームクロドロネート、化合物 X を調整し、移植 2 日前の uPA/SCID マウスに腹腔内投与した。ヒト増殖性肝細胞 (生存率: 96.9%、移植生存細胞数:  $5 \times 10^5$  個)、ヒト iPS 細胞由来肝細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を脾臓より注入した。移植後 1 週目より毎週血液を採取し、ヒトアルブミン濃度を ELISA 法により測定した。

(B) ヒト iPS 由来肝細胞を PBS にて  $1 \times 10^4$  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、卵黄囊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 日に帝王切開により取り出し、仮親に預け、10 日後、30 日後に犠牲死させ、肝臓切片を作製し、解析した。

(C) 中空系モジュールにヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を充填して 3 次元培養系を作成した。感染源としては、HBV のウイルス粒子を含む患者血清を用いた。3 次元培養系に患者血清を  $10^5$  copies/well となるように添加することで感染を成立させ、その後培養上清中の HBs 抗原、HBV DNA、細胞内 HBV core 関連抗原を測定し、HBV 感染・複製を確認した。

(D) iPS 細胞の細胞増殖を強制的に停止することが肝細胞への分化に如何なる影響を与えるかを、テトラサイクリン添加により誘導可能な p16、p53 および p21 発現レンチウイルスベクターをヒト iPS 細胞に導入し、上記遺伝子を発現誘導した後に各種分化、未分化マーカー遺伝子の発現変化を解析した。また、iPS 細胞の未分化維持因子 DPPA4 の発現や機能について検討を加えた。

(E) 胚操作によって肝細胞を置換させた改良型ヒト肝細胞キメラマウスの開発を目指し、urokinase type plasminogen activator (uPA) の肝障害遺伝子としての有効性確認のため uPA 遺伝子トランスジェニック (Tg) のホモマウスの胚に EGFP 陽性のマウス ES 細胞を移植した。

#### C. & D. 研究結果と考察

(A) 移植後 2 日目の uPA/SCID マウス肝臓中のヒト肝細胞数は、 $2.54 \pm 0.21 \times 10^4$  個であった。移植細胞数は  $2.5 \times 10^5$  個であったことから、肝臓への生着率は約 10.2% であった。移植後 11 週目のキメラマウス肝臓のヒト肝細胞による置換率は、ヒト

アルブミン濃度と免疫染色により算出した置換率の相関式から求めたところ、約 86.2% であった。肝重量体重比とヒトアルブミン濃度の相関式から求めた肝重量は約 2.5 g であった。一定面積あたりのヒト肝細胞数は  $3169.8 \text{ cells/cm}^2$  であった。これらの値より求めたキメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞数は、 $3.67 \times 10^8$  個であり、uPA/SCID マウス肝臓へ生着したヒト肝細胞は、11 週間で 14,700 倍に増加したと考えられた。また、化合物 X を投与した uPA/SCID マウスにヒト増殖性肝細胞を移植したところ、移植後 3-11 週までは非投与群に比べて高値を示したが、リポゾームクロドロネート投与により、uPA/SCID マウス肝臓へのキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞の生着は向上しなかった。

さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したマウスでは、その血中において、移植後 7 日目よりヒトアルブミンが観察された。一方で、内胚葉系細胞や肝幹前駆細胞を移植したマウスではヒトアルブミン濃度の顕著な上昇はみとめられなかった。血中ヒトアルブミンが検出されたマウス個体について、肝臓切片を作製して免疫染色を行ったところ、ヒトアルブミンやヒト CK8/18 両陽性のコロニーが多数観察された。ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、uPA 免疫不全マウスへの生着が可能であるだけでなく、マウス生体内で増殖し、マウス肝細胞を置換できることが明らかとなった。

(B) 正常免疫能を有するマウス胎児への卵黄嚢静脈からの細胞懸濁液の注入では、生後 10 日後、30 日後においてマウス

肝に、免疫組織化学染色にてヒトアルブミンやヒト CK8/18 陽性を示すコロニーが確認された。これは、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が免疫学的寛容を確得し、マウス肝臓への生着に成功したことを示す。

(C) ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による 3 次元培養において、培養上清中に HBs 抗原や HBV-DNA、細胞内 HBV core 関連抗原が検出された。上清中の HBV-DNA 量が培養期間を通じて継続的に検出され、HBV-DNA 量は  $10^4$ - $10^5$  copies/ml であり、60 日間は培養の継続が可能であった。今回の実験に用いた 3 次元培養系は不死化したヒト肝細胞株においても長期間での培養が可能であることを確認している。ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞を用いることで、初代培養による 3 次元培養を安定して行うことが可能となり、より生体に近い状態での検討が期待できる。長期間での培養実験を通じて、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。また、患者血清からの感染が可能であり、同一の感染源に関して、キメラマウス、キメラマウス肝細胞、肝細胞株を用途に応じて選択、あるいは *in vivo* と *in vitro* の比較検討も行えるため、検体別の多様な解析が期待できる。

(D) iPS 細胞に細胞周期停止機能をもつ p16, p53, p21 の発現を、テトラサイクリン存在下で誘導したところ、p16 および p53 遺伝子を発現誘導したときのみ、強い増殖抑制効果を認めた。興味深いことに、p16 を発現誘導した時のみ、未分化マーカーの発現が大きく低下し、また

内胚葉、中胚葉、外胚葉マーカーの発現が大きく増加した。一方、これら未分化・分化マーカーの変動は p53 遺伝子や p21 遺伝子を発現誘導させても全く認められなかった。これらの効果は、一過性に p16 遺伝子を発現誘導させても同様に認められた。また、DPPA4 は、マウス ES 細胞と同様、ヒト iPS 細胞に高発現し、ヒストン H1 と同程度の流動性を持って活性クロマチンに結合していることが判明した。

(E) 得られた EGFP<sup>+</sup>-m-ESC/uPA ホモマウスから肝臓、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。ヘテロ個体での実験と比較して、ホモ個体でのキメラ化率はかなり低かった。理由は不明である。また、ヘテロ個体での実験と同じように肝臓でキメラ化率が高いということはなかった。以上より uPA 遺伝子に関してヘテロであってもホモであっても、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ないことが分かった。uPA 遺伝子は新生仔マウス肝臓には強い肝障害を誘導するが、胚期肝臓にはそのような作用がない可能性が高くなった。

#### E. 結論

ヒト iPS 細胞からより成熟した肝細胞を誘導・作成することで、ヒト肝細胞保持キメラマウスを作成した。今後、肝炎ウイルス感染実験にも使用可能な細胞置換率の高いマウスを作成するためのさらなる成熟した肝細胞の分化誘導法の開発が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表 別掲

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 23 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
研究参加者	島田 美穂	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
	塩田 明	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
	塩尻 信義	静岡大学理学部

研究要旨：本研究は、次の二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 3 次元培養し、この培養体に新鮮培養液を通液させる方法の開発を行った。22 年度はヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル中に培養し、ゲル上面に突き刺したプラスチック針を介して培養液を送液したが、針が実験中抜けるなど不安定であることが分かったので、ゲル下面から送液することを試みた。この方法で安定的にゲル全体に通液することができるようになった。研究目的 2 では、前年度に引き続き、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した。平成 22 年に引き続き、urokinase type plasminogen activator (uPA) の肝障害遺伝子としての有効性テストを行った。uPA 遺伝子トランスジェニック (Tg) のホモ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。このため、障害遺伝子として新たにジフテリア毒素遺伝子を選び、コトランスジーンのコストラクト作成を開始した。

**A. 研究目的**

次の二つの目的 (A-1 と A-2) を持って研究を展開した

- 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**

前年度に引き続き、コラーゲンゲルの 3 次元基質に細胞を培養し、これに培養液を安定的に通液することが可能な装置開発を行った。モデル細胞としてヒト線維芽細胞を利用した。平成 22 年度までの培養液送液は次の様に行った。送液ポンプに固定した注射筒の先



にシリコンチューブを繋ぎこのチューブの先にプラスチック針を繋いだ。この針をコラーゲルの上面中央部に突き刺してゲル内に通液した。この方法は目的に適切だったが、実験中、針がゲルから抜けるなど実験装置としての安定性に問題があることが分かった。そこで、チューブの先端を平たく潰して培養皿の下面中央に固定してその上に細胞を含むコラーゲンゲルを入れゲル化して通液する方法に変えた。この方法で安定的にかつ、ゲル全体に渡って通液できることが分かった。

### 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）ゾル中に  $5.0 \times 10^5$  個/ml の濃度で懸濁した。このゾル 2.5 ml を 3.5 cm 直径の培養ウエルに入れた。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-flow-culture）と非通液培養体（3D-nonflow-culture）と比較した。

上記実験で細胞を入れないコラーゲンゲルを用いてインクや色素を入れた培養液を通液し、ゲル内への培養液の浸潤の様子を調べた。また、培養された細胞に関して、①組織学的形態及び②ゲルの収縮能の評価を行った。

### C-1. 研究結果

（1）無細胞ゲルへの通液実験でゲル内への培養液の浸潤状態を調べた。この時、フェノールレッドを含まない培養液でゲルを作り、通液用培養液にフェノールレッドを添加し

てフェノールレッドの動態で培養液の浸潤の様子を評価した。ゲル内にポンプによって送り込まれた培養液は、下面送液口を中心に円形に水平方向及び垂直方向に徐々に浸潤しゲル内を満遍なく広がりゲル上面に達することが分かった。また、ゲルとチューブの送液口が外れることも殆どなかった。従って、この方法は私達の目的に適う方法であると結論付けた。

（2）ヒト線維芽細胞を封入したコラーゲンゲル 3D-flow-culture 実験。上記新しい方法で、細胞を含んだ 3 次元培養を行い、通液した場合と通液しない場合で細胞の組織学的状態及びゲルの収縮の程度を比較した。通液しない場合に比較して、細胞は典型的なスピンドル状を呈し、また、コラーゲン線維を細胞周辺に強く牽引していた。この観察を支持するように、細胞によるゲルの収縮の程度は通液をした場合が強かった。

### D-1. 考察

本年度、安定してかつ再現性良く、培養液をコラーゲンゲル内に満遍なく徐々に浸潤させる方法としてコラーゲンゲルの下面中央から培養液をゲル内に送液する方法を確立できたことは、本研究課題の成功に一歩近づいたことを意味しておりその意義は大きい。また、通液した場合がしない場合より、細胞の活性が高いことを示唆する実験結果も得られた。この結果はこれまで過去 2 年の実験結果と一致しており、私達が研究計画を立てる時に期待していたものである。

### A-2. ヒト肝臓を有するキメラマウスの作成法の開発

私達が目指しているキメラマウスの作成法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ジェンアクチベーター遺伝子（uPA）を連結した遺伝子を生殖細胞に導入して得られた遺伝子導入マウス（uPA<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uPA遺伝子ヘテロ個体(uPA<sup>+</sup>/Tgマウス)を使用した。得られた結果は、期待に反して、肝臓が特に高効率にm-ESC由来の細胞で置換されるということではなかった。そこで本年度は全く同じ研究を、ホモ個体(uPA<sup>+/+</sup>Tgマウス)をホストとして実施した。

## B-2. 研究方法

平成21年度に次の実験を行った。

- ①♀uPA<sup>+</sup>/Tg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。

得られた出産仔について以下の実験を行った。

- 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

得られたEGFP<sup>+</sup>m-ESC/uPAホモマウスから平成22年度と同様に、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。ヘテロ個体での実験と比較して、今年度行ったホモ個体でのキメラ化率はかなり低かった。理由は不明である。また、ヘテロ個体での実験と同じように肝臓でキメラ化率が高いということはなかった。

## D-2. 考察

本年度の研究の結果、uPA遺伝子に関してヘテロであってもホモであっても、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ないことが分かった。uPA遺伝子は新生仔マウス肝臓には強い肝障害を誘導するが、胚期肝臓にはそのような作用がない可能性が高くなった。

## E. 結論

本研究は、より有効な新しい肝炎ウイルス感染実験モデル系の開発を目指すものであり、次の2つの目的を持って行われた。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。本年度は、安定的に且つゲル内全域に培養液を徐々に浸潤させる方法を確立できた。この方法で、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、細胞の形態、コラーゲン線維を牽引する能力などにおいて通液した場合が優れていることが分かった。研究目的2では、肝障害誘導遺伝子として知られているuPA遺伝子は私達の研究目的には利用できないことが分かった。そのため、これに変わる遺伝子としてジフテリア毒素遺伝子を利用できるかどうか調べることにした。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012 Feb 13.
2. Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing. *Curr Drug Discov Technol*. 2012, 9, 63-76.
3. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 19; 412(1):74-9.
4. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol*. 2011 Oct; 226(10):2535-42.
5. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol*. 2011 Aug; 179(2):1050-60.
6. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):781-8.
7. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*. Sep 2;54(3):764-71.
8. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011 May 1;167(1):e29-37.
9. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology*. 2011 Apr;152(4):1479-91.
10. 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 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2011 Jul;55(1):11-8.
11. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2011 May; 54(5):872-8.

## 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23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

研究協力者

山崎ちひろ 株式会社フェニックスバイオ

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

研究要旨：昨年度まで、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ところ、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考えられた。今年度は、ヒト肝細胞のuPA/SCIDマウス肝臓におけるKineticsを明らかにするとともに、uPA/SCIDマウス肝臓への移植細胞の生着率の向上をめざした検討を行った。その結果、通常、キメラマウス作製に用いている凍結ヒト肝細胞のuPA/SCIDマウスへの生着率は約10%で、移植後11週で約1万倍に増殖したと考えられた。また、化合物Xを投与する事により、これまで生着率が低かったキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞、および増殖性ヒト肝細胞の生着が向上した。

A. 研究目的

本研究の最終目標は、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事である。しかしながら、これまで、未熟なヒト肝細胞がuPA/SCIDマウスの肝臓への生着・増殖の過程で成熟するかどうか明らかにされていなかった。そこで、平成21、22年度は、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ところ、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考えられた。

一方、これまで、肝細胞へ分化させたヒトiPS細胞をuPA/SCIDマウスへ移植したが、uPA/SCIDマウス肝臓への生着率がヒト肝細胞と較べて極めて低かった。そこで、今年度は、以下の2点に関して検討した。[1] uPA/SCIDマウスの肝臓におけるヒト肝細胞の生着、増殖におけるKineticsを明らかにする。[2] uPA/SCIDマウス肝臓への移植肝細胞の生着率を上げる。これまで、キメラマウスから分離したヒト肝細胞をuPA/SCIDマウスに移植すると、高い生着が観察されるが、この肝細胞を凍結保存後融解して移植すると、生着率が低下することがわかっている。また、in vitroで継代培養できるヒト増殖性肝細胞をuPA/SCIDマウスに移植した場合も、生着率は非常に低いことが知られている(1)。そこで、生着率を上げるための検討には、もともと生着率の低いキ

メラマウス由来凍結ヒト肝細胞と増殖性ヒト肝細胞の2種を用いた。

## B. 研究方法

### [1] uPA/SCIDマウスの肝臓におけるヒト肝細胞の生着、増殖におけるKineticsの解析 ヒト肝細胞キメラマウスの作出

3週齢のuPA/SCIDマウス1匹あたり、 $2.5 \times 10^5$ 個のヒト肝細胞(米国より購入:5才、男児、黒人)を、脾臓経由で移植した。移植2日後にキメラマウス3匹を解剖し、肝臓と血液を採取した。

#### uPA/SCIDマウス肝臓への生着率の算出

移植後2日目のキメラマウスの肝臓のパラフィン切片(4  $\mu\text{m}$ )を作製し、ヒト特異的アルブミン抗体で免疫染色を行った。切片の一定面積当たりのヒト肝細胞数を顕微鏡下でカウントした。肝重量と比重(1.11  $\text{g}/\text{cm}^3$ )から肝臓体積を求め、肝臓中におけるヒト肝細胞数を求めた。これらの数値から、移植細胞数 $2.5 \times 10^5$ 個に対する、生着率を算出した。

#### キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞数の算出

14週齢(移植後11週)のキメラマウス( $n=199$ )の平均血中ヒトアルブミン値、平均体重、平均肝重量体重比、比重(1.06  $\text{g}/\text{cm}^3$ )、およびキメラマウス肝臓における一定面積当たりのヒト肝細胞数をもとに、キメラマウス肝臓に存在するヒト肝細胞数の平均値を算出した。

### [2] uPA/SCIDマウス肝臓への移植肝細胞の生着率の向上の試み

#### キメラマウス肝臓からのヒト肝細胞分離と凍結保存、融解、純化

マウス血中ヒトアルブミン濃度が13  $\text{mg}/\text{ml}$ 以上の移植後11週以降のキメラマウス肝臓から、コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を採取した。細胞数をカウント後、プログラムフリーザーを用いて凍結し、液体窒素下で保存した。凍結肝細胞を37度の温浴槽で融解し、磁気ビーズ標識マウス肝細胞特異抗体 66Zを反応させ、マウス肝細胞を除去した(2)。

#### uPA/SCIDマウスへのリポゾームクロドロネートおよび化合物Xの投与およびキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞移植

リポゾームクロドロネートを調整し(3)、

移植2日前のuPA/SCIDマウスに腹腔内投与(10  $\text{ml}/\text{kg}$  体重)した。化合物Xを生理食塩水で溶解し、移植2日前のuPA/SCIDマウスに腹腔内投与(200  $\text{mg}/\text{kg}$  体重)した。リポゾームクロドロネートと化合物X同時投与群と、コントロールとして非投与のマウス群も設けた。

融解したキメラマウス由来凍結保存ヒト肝細胞(生存率:76.4%、ヒト肝細胞純度:99.3%、移植生存細胞数: $1 \times 10^6$ 個)を脾臓より注入した。移植後1週目より毎週血液を採取し、ELISA法またはラテックスビーズを用いた免疫比濁法によりヒトアルブミン濃度を測定した。

#### uPA/SCIDマウスへの化合物Xの投与および増殖性ヒト肝細胞移植

化合物Xを生理食塩水で溶解し、移植2日前のuPA/SCIDマウスに腹腔内投与(200  $\text{mg}/\text{kg}$  体重)し、9ヶ月、男児、白人由来(米国より購入)由来の5継代目のヒト増殖性肝細胞(生存率:96.9%、移植生存細胞数: $5 \times 10^5$ 個)(1)を脾臓より注入した。移植後1週目より毎週血液を採取し、ヒトアルブミン濃度をELISA法により測定した。

#### (倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞および継代培養したヒト肝細胞は、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

### [1] uPA/SCIDマウスの肝臓におけるヒト肝細胞の生着、増殖におけるKineticsの解析

移植後2日目のuPA/SCIDマウス肝臓中のヒト肝細胞数は、 $2.54 \pm 0.21 \times 10^4$ 個であった。移植細胞数は $2.5 \times 10^5$ 個であったことから、肝臓への生着率は約10.2%であった。また、この時のマウス血中ヒトアルブミン濃度は511  $\text{ng}/\text{ml}$ であった。

移植後11週目(14週齢,  $n=42$ )のキメラマウス肝臓のヒト肝細胞による置換率は、ヒトアルブミン濃度( $12.0 \pm 2.8 \text{ mg}/\text{ml}$ )

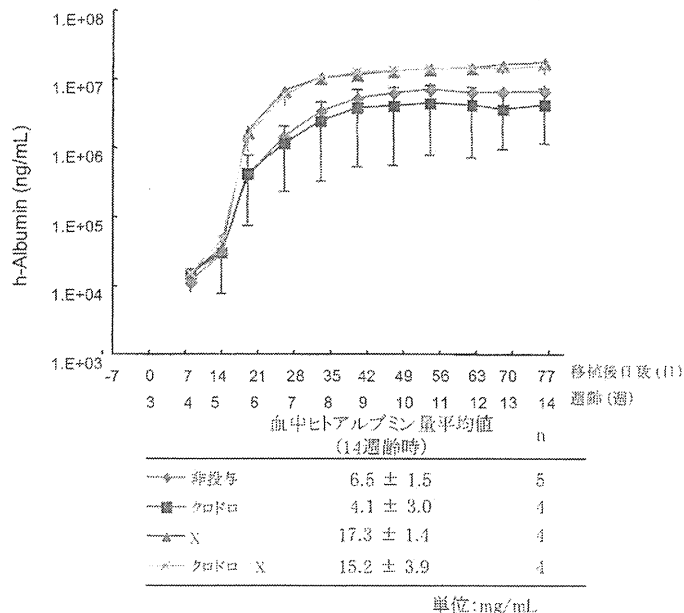
と免疫染色により算出した置換率の相関式から求めたところ、約86.2%であった。この時の平均体重は $17.2 \pm 2.9$  gであった。肝重量体重比とヒトアルブミン濃度の相関式から求めた肝重量は約2.5 gであった。一定面積あたりのヒト肝細胞数は $3169.8$  cells/cm<sup>2</sup>であった。これらの値より求めたキメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞数は、 $3.67 \times 10^8$ 個であった。したがって、uPA/SCIDマウス肝臓へ生着したヒト肝細胞は、11週間で14,700倍に増加したと考えられた。生着したヒト肝細胞が均等に分裂したと仮定すると、その間、13.8回分裂したという計算になった。

## [2] uPA/SCIDマウス肝臓への移植肝細胞の生着率の向上の試み

### uPA/SCIDマウスへの薬物処理によるキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞の生着への効果

移植後1週目より、毎週マウス血中ヒトアルブミン濃度を測定したところ、リポゾームクロドロネート投与群と非投与群に差は認められなかった一方で、化合物X投与群は移植後6週目以降は有意に高い値を示した。また同時投与群は、化合物X単独投与群と同等であった(図1)。

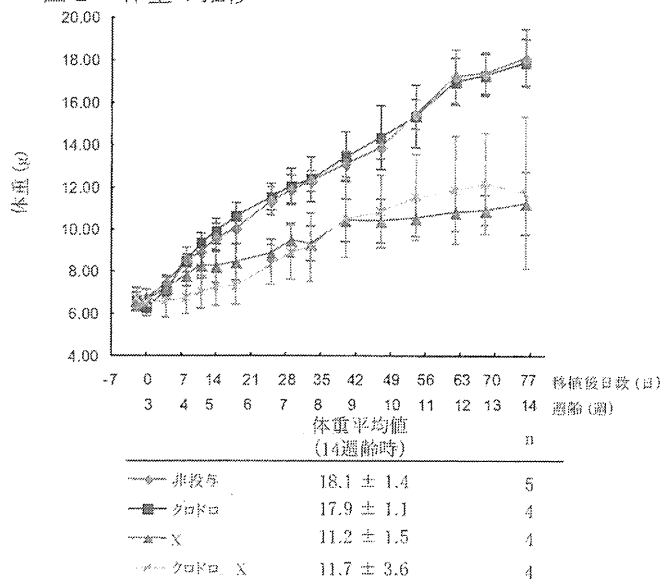
図1 血中ヒトアルブミン濃度の推移



体重推移は、非投与群とリポゾームクロドロネート投与群で同等、化合物X投与群と同時投与群で同等であり、後者が低い値を示した。また、これまでの検討から、非移

植のマウスに化合物Xを投与しても、体重の推移に影響しない事が分かっている。以上より、今回観察された化合物X単独及び同時投与群における体重増加抑制は、化合物Xの毒性によるものではなく、化合物Xの投与によりヒト肝細胞の置換率が急速に上昇した事が原因と考えられた(図2)。

図2 体重の推移



これらの結果から、リポゾームクロドロネート投与により、uPA/SCIDマウス肝臓へのキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞の生着は向上しなかったが、化合物X投与により生着率が向上したと考えられた。

### uPA/SCIDマウスへの処理によるヒト増殖性肝細胞の生着への効果

化合物Xを投与したuPA/SCIDマウスにヒト増殖性肝細胞を移植したところ、移植後3-11週までは非投与群に比べて高値を示したが、12週後では同等となった(図3)。体重はほぼ同等であった(図4)。このことから培養細胞である増殖性肝細胞のuPA/SCIDマウス肝臓への生着にも化合物Xの投与がわずかではあるが有効と考えられた。

## D. 考察

本実験より、キメラマウス作製に用いている凍結ヒト肝細胞のuPA/SCIDマウスへの生着率は約10%、移植後11週間で約1万倍に増殖したと考えられた。

また、リポゾームクロドロネートにより、Kupffer細胞を除去しても、uPA/SCIDマウス

肝臓におけるキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞の生着の向上には寄与しないと考えられた。化合物Xは、マウス肝臓に障害を与えることがわかっており、この障害により移植された凍結ヒト肝細胞がより生着しやすくなったのではないかと考えられた。

iPS細胞は培養細胞であるので、シャーレで増殖させた増殖性ヒト肝細胞を用いて、化合物X投与による生着の向上がみられるかどうか調べた。その結果、わずかであるが生着率の向上が認められた。

移植する際には、すべてのマウスに移植2日前に化合物Xを投与した。その結果、昨年度に較べて、生着率の向上が観察された。

#### E. 結論

化合物Xを投与する事により、これまで生着率が低かったキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞およびヒト増殖性肝細胞の生着が向上した。これらの結果から、iPS細胞由来肝細胞の移植の際には、uPA/SCIDマウスに化合物Xを投与することとした。

#### F. 健康危険情報

なし

本文中に使用した参考文献：

1. Yamasaki C., Tateno C., Aratani A., Ohnishi C., Katayama S., Kohashi T., Hino H., Marusawa H., Asahara T., Yoshizato K. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro J. Hepatol.44: 749-757, 2006.
2. 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.
3. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. J Immunol Methods 174: 83-93, 1994.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. J Hepatol. 2011, 54:872-878.

2. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K,

図3 血中ヒトアルブミンの推移

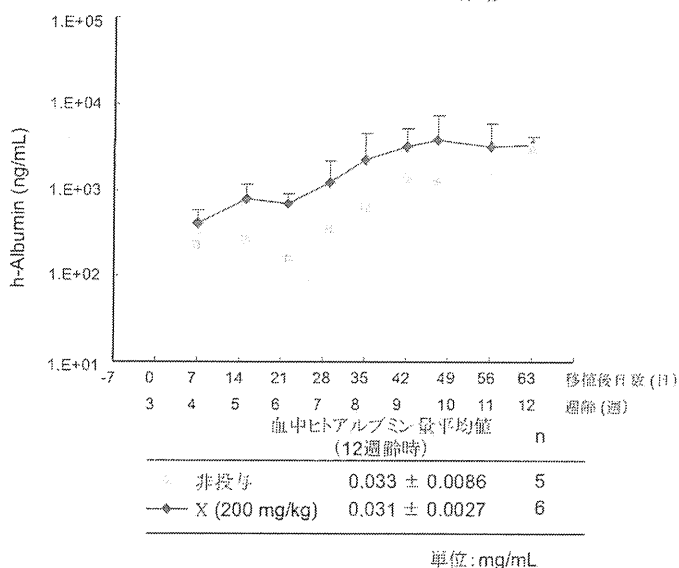
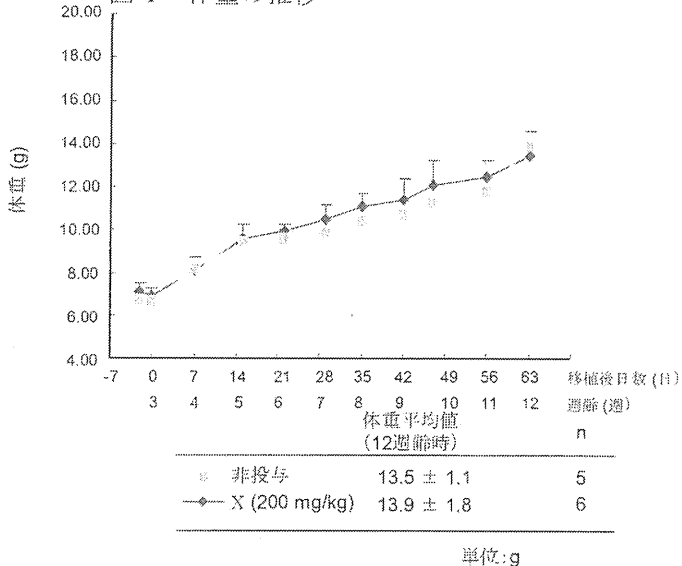


図4 体重の推移



これらの結果を受けて、今年度のiPS細胞から誘導された肝細胞をuPA/SCIDマウスへ

Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 167:e29-37, 2011.

3. Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing. *Curr Drug Discov Technol* (in press).

4. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*, 54:781-788, 2011.

5. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*, 54:764-771, 2011.

6. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of In Vivo Hepatic Clearance and Half-life of Drug Candidates in Human using Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab Dispos*, 40:322-328, 2012

7. Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, Tateno C, Ushiki J. Investigation of Drug-drug Interactions Caused by Human Pregnane X Receptor-mediated Induction of Cytochrome P450 3A4 and 2C Subfamilies in Chimeric Mice with a Humanized Liver. *Drug Metab Dispos*, 40:474-480, 2012.

8. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. *Hepatology* (in press).

## 2. 学会発表

1. 石田雄二、柳愛美、吉実康美、横道博、山崎ちひろ、茶山一彰、立野知世 ヒト肝細胞キメラマウスから分離したヒト肝細胞

を用いたHBV in vitro感染モデルの構築 第47回日本肝臓学会 東京、2011

2. 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、大西千元、石田雄二、立野知世 uPA/SCIDマウスへの継代移植によるヒト肝細胞の増殖能と性質に関する解析 第18回肝細胞研究会 東京、2011

3. Ishida Y, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Yokomichi H, Chayama K, Tateno C. Development of a novel in vitro hepatitis B virus-infection model by using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse liver, AASLD, サンフランシスコ、2011

4. 立野知世 ランチョンセミナー「創薬研究におけるヒト肝細胞キメラマウスの利用」PXBマウスを用いた創薬研究の現状と将来展望 薬物動態学会第26回年会 広島、2011

5. Tateno C, Ohbuchi M, Hamamura S, Ohshita H, Kazuki Y, Oshimura M, Sato K, Nakada N, Kato K, Kawamura K, Kamimura H, Usui T, Development of Cyp3a KO chimeric mice with humanized livers 薬物動態学会第26回年会 広島、2011

6. 福室真仁、田中仁、益森勝志、中嶋圓、林真、石田雄二、加国雅和、立野知世 ヒト肝細胞キメラマウス (PXBマウス®) を利用した小核試験 および コメットアッセイ 第40回環境変異原学会 東京、2011

7. Tateno C, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Ishida Y, Telomere shortening of human hepatocytes during mitosis through in vivo passages, *Liver Down Under* パース、2011

8. 立野知世、工藤 篤、和氣健二郎、加国雅和、井上亮、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、石田雄二 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓における特徴的な組織構築に関する考察 第25回肝臓洞壁細胞研究会 東京、2011

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

これまでに胚様体接着培養法や単層培養法を用いて、マウスやカニクイザルES細胞およびマウス iPS細胞からの機能的な肝細胞様細胞への分化誘導に成功している。臍帯血有核細胞からの肝細胞様細胞分化誘導も含めて、いずれの場合も誘導効率が低いことから、ヒト肝星細胞株との共培養を試みた。ヒトiPS細胞作製に関しては、これまで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ベクターを用いたiPS化を試みてきたが、今回は4因子を単独で挿入したセンダイウイルスベクターによるiPS化を目指した。さらに、ヒトiPS細胞のゲノム安定化や未分化維持に関して、未分化維持因子DPPA4を中心にマウスES細胞と比較して追究した。

### 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。そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来肝細胞の細胞治療や創薬分野における利用を目指し、センダイウイルスベクター（今年度は4因子それぞれ単独で導入したベクター）を用いたヒトiPS化の検討を継続した。また、購入したヒトiPS細胞を使って、マウスES細胞で研究してきた未分化維持因子DPPA4について検討した。一般的に、非肝臓源からの肝細胞様細胞誘導での大きな問題はその効率の低さにあることから、効率を上げる目的で、肝星細胞株LI90との共培養系を検討した。

### B. 研究方法

すでに、5種類のサイトカイン(FGF1/FGF2/HGF/SCF/LIF)の添加によって、ヒト臍帯血有核細胞をHLCに分化誘導することを報告している。その系において、ヒト肝星細胞株LI90(JC RB0160)との共培養を行った。インフォームドコンセントを得て調製されたヒト臍帯血は理研細胞バンクから購入した。

iPS化には、山中4因子が個別に導入されたF因子欠失センダイウイルスベクター(CytoTune™-iPS; DNAVEC)を用いた。

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の発現や機能を、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。

### C. 研究結果

ヒト臍帯血有核細胞をHLCに分化誘導する系において、肝星細胞株LI90との共培養を試みたが、予想に反して肝細胞様細胞の出現は完全に抑制され、樹状細胞が誘導された。5種類のサイトカインの内、FGF2に依存してLI90が分泌するGM-CSFなどの樹状細胞分化誘導・成熟因子によって、血球中の単球から樹状細胞が誘導されることが明らかとなった。

DPPA4は、マウスES細胞と同様、ヒトiPS細胞に高発現し、ヒストンH1と同程度の流動性を持って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、そのN末端側でDNAと、C末端側でコアヒストンH3と結合するクロマチン因子であることを明らかにしている。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た。

現時点までには、センダイウイルスベクターを用いたヒト活性化T細胞のiPS化には完全には成功していない。4因子を単独で挿入したセンダイウイルスベクターによるiPS化を目指し、現在探究中である。

### D. 考察

肝実質細胞の分化誘導には肝星細胞が関わっていることから、臍帯血有核細胞からのHLC誘導系でヒト肝星細胞株LI90との共培養を試みたが、肝細胞様細胞への分化誘導は完全に抑制された。ラット障害肝からの活性化星細胞が、単球から樹状細胞の分化誘導に有効であったことから、障害肝では肝星細胞が樹状細胞誘導に関わり、肝臓の免疫系に貢献している可能性が示唆された。

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。ヒトiPS細胞でもマウスES細胞と同様に、リンカーヒスト

ンH1と同程度の流動性を示すことから、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。

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リンパ球からの満足なiPS化に至っていない。

#### E. 結論

ヒト臍帯血有核細胞を肝細胞様細胞に分化誘導する系における肝星細胞株LI90との共培養では、肝細胞様細胞の出現は完全に抑制された。

未分化維持因子DPPA4は、ヒトiPS細胞においてマウスES細胞と類似した挙動を示したことから、ヒトiPS細胞においても活性クロマチンに結合するユニークな未分化維持因子であることが判明した。

#### 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

Atsumi Y, Fujimori Y, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno S, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, and Yoshioka K: Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. **PLoS ONE** 2011; 6: e23432 (10 pages)

Ozeki R, Kakinuma S, Asahina K, Shimizu-Saito K, Ariei S, Tanaka Y, and Teraoka H: Hepatic stellate cells mediate differentiation of dendritic cells from monocytes. **Journal of Medical and Dental Sciences** 2012; 59: 43-52

寺岡弘文：非肝臓源から肝細胞系譜への分化誘導—学内共同研究のまとめ(総説)、**お茶の水医学雑誌** 2012;60:7-17

##### 2. 学会発表

吉岡研一、熱海悠子、益谷美都子、四戸啓太郎、寺岡弘文：正常な老化細胞のゲノム安定性は一過的なH2AX誘導によって維持されている(一般講演—疾患生物学)、第34回分子生物学会年会、横浜、

2011年12月14日;プログラム p. 123.  
Atsumi Y, Fujimori H, Masutani M, Teraoka H, Yoshioka K: Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells、第34回分子生物学会年会、横浜、2011年12月14日;プログラム p. 264.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (該当なし)

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 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によるヒト肝細胞キメラマウスを作製することにより、患者の個体モデルとして疾患の発病前や感染源に曝露する前の状態から経時的な解析が可能となる。また、培養細胞株は3次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。中空糸にヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を充填することにより、3次元培養系を作成した。この3次元培養系においてB型肝炎ウイルス（HBV）感染患者血清を感染源として（ $>10^5$  copies/ml）HBVの感染実験を行い、培養上清中のHBV-DNA量およびHBs抗原を測定することにより感染を確認した。その結果、感染初期から経時的に培養上清中のHBV-DNAの増加を確認した。培養期間を通じた上清中のHBV-DNA量は $10^4$ - $10^5$  copies/mlであり、60日間は培養の継続が可能であった。今後は、iPS細胞由来のキメラマウスを構築し、HBV感染実験を行うとともに、単離した肝細胞を用いた3次元培養系によるin vitroでの感染実験も行い、比較検討したい。

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

までに我々は、HBV genotype (A-J) それぞれの感染材料を作成し、さらにキメラマウスによる感染防除実験を行ってきた。今年度は、キメラマウスの肝組織より単離した初代肝細胞を用いて3次元培養を行い、患者血清からのHBV感染・複製を試みた。

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)やリビリン感受性試験などを行ってきた。

キメラマウス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等の問題点もあり、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して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。前年度

B. 研究方法

- 1) 中空糸モジュールにヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を充填して3次元培養系を作成した。
- 2) 感染源としては、HBVのウイルス粒子を含む患者血清を用いた。
- 3) 3次元培養系に患者血清を $10^5$  copies/well となるように添加することで感染を成立させ、その後培養上清中のHBs抗原、HBV DNA、細胞内HBV core関連抗原を測定し、HBV感染・複製を確認した。

（倫理面の配慮）

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。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

### C. 研究結果

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による3次元培養において、培養上清中にHBs抗原やHBV-DNA、細胞内HBV core関連抗原が検出された。上清中のHBV-DNA量が培養期間を通じて継続的に検出され、HBV-DNA量は $10^4$ - $10^5$  copies/mlであり、60日間は培養の継続が可能であった。

### 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。

今回の実験に用いた3次元培養系は不死化したヒト肝細胞株においても長期間での培養が可能であることを確認している。ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞を用いることで、初代培養による3次元培養を安定して行うことが可能となり、より生体に近い状態での検討が期待できる。長期間での培養実験を通じて、各種変異体の感染効率の違いやHBV感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。また、患者血清からの感染が可能であり、同一の感染源に関して、キメラマウス、キメラマウス肝細胞、肝細胞株を用途に応じて選択、あるいはin vivoとin vitroの比較検討も行えるため、検体別の多様な解析が期待できる。iPS細胞由来のヒト肝細胞キメラマウスにおいても同様の検討を行うことは可能と考えられる。

### E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞を中空糸に充填した3次元培養系において、患者血清からのHBV感染・複製の可能性が示された。3次元環境での培養肝細胞はin vitroの非常に有用な感染モデルとなりうる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Matsuura K, **Tanaka Y**, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. *Hepatology*. 2011;41(6):505-511.
2. Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, **Tanaka Y**, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(21):6328-6331.
3. Sa-Nguanmoo P, **Tanaka Y**, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res*. 2011;158(1-2):209-15.
4. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. *J Virol*. 2012;86(4):2143-2152.
5. Date T, Morikawa K, **Tanaka Y**, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and Infectivity of a Novel Genotype 1b Hepatitis C Virus Clone. *Microbiol Immunol*. 2012 in perss.

#### 2. 学会発表

1. Sugauchi F, **Tanaka Y**, Matsuura K, Watanabe T, Tajiri K, Kishi H, Mizokami M. CROSS-GENOTYPE PROTECTION OF HBV AND A ROLE OF HBS ANTIGEN MUTATION IN IMMUNITY ESCAPE IN VITRO AND IN VIVO