

201125008B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 池田 一雄

平成24年(2012)年3月

目次

I. 総合研究報告

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 ————— 7

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 ————— 15

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 ————— 28

肝炎ウイルス感染モデルの構築

田中 靖人 ————— 31

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 ————— 37

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 ————— 42

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 50

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 64

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）
総合研究報告書

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 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。平成 21 年度には日本人線維芽細胞由来のヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化誘導実験で、内胚葉系細胞マーカーの Sox17, Pdx1, 肝芽細胞マーカーの Afp は、分化誘導開始 15 日目、20 日目に発現し、Afp では分化誘導に伴い遺伝子発現量が増加すること、成熟肝細胞マーカーの Alb は、分化誘導開始 20 日目で強く発現することが確認された。また、未熟なヒト肝細胞が uPA/SCID マウス内でヒト成熟肝細胞へ分化することも確認された。平成 22 年度には、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、その濃度は低いながらも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。平成 23 年度には、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、中空系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 量の増加を確認できた。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) MitomycinC 処理を施した MEF を gelatin でコートした 12-well plate、24-well plate、8-well plate に播種した。翌日、その MEF 上に適切な数のヒト iPS 細胞を播種し、ヒト ES 細胞用培地 (1% non-essential amino acid、200mM L-glutamine、20% KSR、0.1M 2-mercaptoethanol、bFGF (5ng/ml) を含む DMEM-F12 培地) で 7 日間培養した。その後、B27 supplement を含む RPMI に 100ng/ml の activin A を添加し 5 日間培養を行い、ヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行った。次に、低酸素条件下 (4%O₂) で BMP-4 (20ng/ml)、bFGF (10ng/ml) を添加して 5 日間培養を行った後、HGF (20ng/ml) を添加してさらに 5 日間培養を行い、肝芽細胞への分化誘導を促した。そして、成熟肝細胞への分化誘導として酸素条件を元に戻し (20% O₂)、培地を Hepatocyte Culture Medium (EGF を除き、ascorbic acid、BSA-FAF、hydrocortisone、transferrin、insulin、GA-1000 を含む HBM 培地) に交換して OncostatinM (20ng/ml) を添加し 5 日間培養を行った。RT-PCR 法及び Western blot 法による様々な肝細胞マーカー遺伝子の発現やタンパク質発現を指標に肝細胞系譜への分化誘導を検討した。

(B) ヒト iPS 細胞から分化誘導させた肝細胞を、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、 0.5×10^5 cells/ $20 \mu\text{l}$ 、 1×10^5 cells/ $20 \mu\text{l}$ 、 2×10^5 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 ELISA 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。

(C) 3 週齢の uPA/SCID マウス 1 匹あたり、 2.5×10^5 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 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: 5×10^5 個)、ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (1×10^6 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。

(D) ヒト iPS 由来肝細胞を PBS にて 1×10^4 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。

(E) 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。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。

(F) 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。

(G) 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) ヒト iPS 細胞 (未分化状態)、分化誘導を開始して 15 日目 (HGF (20ng/ml) を添加した 5 日後) の細胞及び分化誘導を開始して 20 日目 (OncostatinM (20ng/ml) を添加した 5 日後) の細胞を用いた RT-PCR 法により肝細胞マーカー遺伝子の発現を比較することで、ヒト iPS 細胞から肝細胞系譜への分化段階の評価を行った。その結果、内胚葉系細胞マーカー遺伝子の Sox17、Pdx1、肝芽細胞マーカー遺伝子の Afp は、分化誘導開始 15 日目、20 日目に発現し、Afp では分化誘導に伴い遺伝子発現量が増加していた。また、成熟肝細胞マーカー遺伝子の Alb は、分化誘導開始 20 日目で強い発現が確認された。未分化マーカー遺伝子である Nanog は、分化誘導を開始してからも発現が確認され、薬物代謝系マーカー Cyp7a1、Cyp3a1 の遺伝子発現は確認されなかった。Western blot 法により、内胚葉系細胞マーカー FOXA2、肝芽細胞マーカー AFP、HNF4 α タンパク質は、分化誘導開始 15 日目に発現が確認され、分化誘導開始 20 日目には成熟肝細胞マーカー ALB、胆管上皮細胞マーカー CK18 タンパク質の発現が確認された。また、肝芽細胞マーカー AFP や成熟肝細胞マーカー ALB は分化誘導に伴いタンパク質発現量が増加していた。以上の

結果より、ヒト iPS 細胞が内胚葉、肝芽細胞を経て肝実質細胞へと分化誘導していることが明らかになった。

(B) 平成 22 年度では、uPA/SCID マウスへ移植した結果、ELIZA によるヒトアルブミンの血中濃度測定で移植 14 日後最大で 18.4ng/ml の値を測定した。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。

(C) 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 2.5×10^5 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、 3.67×10^8 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。

(D) 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。

(E) 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。

(F) 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。

(G) 得られた EGFP⁺-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

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総合研究報告書（平成 21～23 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 学術顧問

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の開発を行った。モデル細胞として取り扱いが簡単なヒト線維細胞を利用した。まず、無細胞でコラーゲンゲルを作製した。このゲル上面に注射針を突き刺しポンプで色素含んだ培養液を送液した。色素のゲル中への浸潤の様子からこの方法で培養液をゲル中に万遍に通液で生きることが分かった。ゲル下面から送液した方が、安定的に通液出来たので下面中央に送液チューブを挿入して送液することにした。線維芽細胞をコラーゲンゲル中に封入し、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、通液細胞はゲル収縮力、細胞増殖能、及びゲルの再構築力のいずれに於いても優れていることが分かった。更に、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、モデル細胞として入手が容易なマウスES細胞を利用した。肝芽細胞に特異的に障害遺伝子を発現するマウスの胚盤胞にEGFPを発現するES細胞を移植し、この細胞が肝芽形成期にホストの障害肝芽細胞と置換して正常肝細胞から成る肝臓を形成可能かを調べた。障害遺伝子としてアルブミンプロモーターで駆動されるurokinase type plasimnogen activator (uPA)を選び、これを発現するトランスジェニックマウス胚盤胞をホストとした。この遺伝子に関してヘテロ及びホモ個体の胚で実験を行ったがいずれの場合も期待された結果を得ることが出来なかった。uPAは肝芽細胞に障害を与えないと結論付けた。今後、ジフテリア毒素遺伝子を障害遺伝子として選び、また、ホストもマウスではなく、実験操作が容易なラットにして、研究

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必要である。

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て、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 研究目的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

ヒト肝炎ウイルスは、人体内 (*in vivo*) では、特異性の高い認識機構でヒト肝細胞膜受容体と結合し、細胞内に侵入し、そこで宿主細胞の構成物を利用して増殖し、細胞に障害を与えるとともに、細胞外に脱出し近隣肝細胞に取り付いてこれら細胞に同様な障害を与えて、ウイルス感染症状を惹起する。このウイルス-宿主細胞間の“利益/不利益相互作用”を、人体を離れて試験管の中 (*in vitro*) で再現できれば、この相互作用の仕組みの詳細の解明に資することは疑いがない。これまでこのような *in vitro* モデル系の開発が多く研究者によって試みられたにも拘らず、実用に堪える系の成功例は報告されていない。

in vitro モデル系開発不成功の最大の原因は、宿主細胞 (肝細胞) を取り巻く *in vitro* 培養環境と人体の *in vivo* 環境との乖離が大きいことであると思われる。人体の *in vivo* 環境を可能な限り模倣した培養法の開発を行い、この培養法で人体内での肝炎ウイルスとヒト肝細胞間の“利益/不利益相互作用”と限りなく近い相互作用を再現させることを目指した。

次の二つの観点から新しい培養法の開発研究実験を実施した。

1. 培養状態を従来の平面培養ではなく、3次元培養で行う。

2. 従来の培養法では、細胞への酸素と栄養物の供給と分泌される老廃物を含む代謝産物の除去は、主として培養液を一定の間隔で新鮮なものと交換することによってなされて来た。酸素・栄養物の供給と代謝産物の除去をより効率よく行わせるため、3次元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。

培養対象細胞は、ヒト肝細胞であるが、入手が容易で培養法が簡便であるヒト線維芽細胞を当面の培養対象細胞とした。具体的には、“培養皮膚”の作成法として確立しているコラーゲングル培養法に注目し、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行った。

当初、バレルに一定量の培養液を入れたBAS社製のシリンジ送液ポンプに繋いだシリコンチューブに連結したプラスチックの針先をコラーゲングル上面中央部に突き刺し、ポンプで一定速度の培養液を押し出し、針先からゲル内に注入してゲルに培養液を浸潤させることを試みた。液中に有色インクを入れその動態で培養液のゲル内浸潤状態を判定した。この方法では、培養中、針がゲルから脱落する事故が起こったので下面中央部から送液することでこの問題を解決できないか検討した。

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) ズル中に 5.0×10^5 個/ml の濃度で懸濁した。このズル 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 1.3×10^6 個となる。ウエルを 37 °C および 5% CO₂ にセットされたインキュベーターに入れ、細胞をコラーゲングル中に立体培養した。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走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、1, 3, 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、細胞の状態を観察して、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。

培養された細胞に関して次の評価を行なった。①細胞密度とゲルの収縮の程度を調べた。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。③ TGF- β 1、NF- κ 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。さらに、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。②1つの装置で、6個の培養体に通液できるようにする。

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。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合う方法であると結論付けた。

2. 培養後一日目で、既に、3D-flow-culture の死細胞数が 3D-nonflow-culture のそれよりも少なかった。この傾向は培養期間を通じて見られた。

3. 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。

4. 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。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。3D-flow-culture の方が 3D-nonflow-culture より細胞増殖が活発であると思われる。

5. 3D-flow-culture の細胞はコラーゲンを新たに合成してゲルを再構築していることを示唆している組織像が得られた。

以上の観察結果は、期待通り、3D-flow-culture は、3D-nonflow-culture より良い培養環境を細胞に与えていることを示唆している。また、私達の方法によって、かなり長期間、細胞を 3D-flow-culture できる可能性が出て来た。

6. TGF- β 1、NF- κ 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-flow-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。

7. 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

本研究によって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步近づいたことを意味しておりその意義は大きい。さらに、本研究によって、私達が、当初、期待していた「3D-flow-cultureは、3D-nonflow-cultureより良い培養環境を細胞に与えている」ことを支持する結果が得られた。通液培養の方が、静置培養に比べて細胞の増殖能が高まった。いくつかの遺伝子の発現レベルを調べ、通液と非通液で細胞の遺伝子発現プロファイルに大きな違いがあることが分かった。このプロファイルの再現性と生物学的意味に関しては今後更に検討を進める予定である。

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。3年間の経験を踏まえて、今後さらに装置の改良を行なっていきたい。また、この新装置の性能テストを本来の目的である肝細胞をこの装置で培養し、3D-flow-culture法の優位性を検証したい。

A-2 研究目的 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、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、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。その後の研究によってこのキメラマウスヒト肝細胞が、*in vivo*で人体内肝細胞と近似した性質を示し、様々な観点からのヒト肝細胞研究に貢献することが分かって来た。

しかしながら、このキメラマウスは、5種類ある肝臓細胞の中でも、肝細胞のみがヒト化したものである。実際の肝臓の機能は、存在する各種肝臓細胞の相互作用によ

る共同作業で果たされている。この意味で、現在のキメラマウスは、ヒト肝臓の理想的なモデルにはなり得ていない。例えば、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。

本研究では、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。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^{+/+}-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、その肝臓が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がある。この仮説を検証するため、本研究では、入手と実験操作が容易であるマウスES細胞(m-ESC)を使用して実験を行った。最初に、ヘテロ個体(uPA^{+/+}-Tgマウス)をホストとして使用した。ヘテロ個体では肝障害程度が穏やかで本研究の目的に利用できないことが明らかになった場合は、ホモ個体(uPA^{+/+}-Tgマウス)をホストとして実験する。

B-2. 研究方法

ヘテロ個体(uPA^{+/-}-Tgマウス)胚盤胞へのES細胞の移植実験は以下のように行った。ホモ個体への移植の場合は、下記段階1の♀C57BL/6の代わりに、♀uPA^{+/+}-Tgマウスから卵子を採取し、これを同♂の凍結精子と受精させた。

1. ♀C57BL/6から卵子を採取し、これをuPA^{+/+}-Tgマウスから得た凍結精子と体外受精させる。
2. 受精卵を培養し胚盤胞期胚まで発生させる。得られた胚盤胞期胚をuPA^{+/-}-m-BCと呼ぶ。
3. uPA^{+/-}-m-BC に野生型マウスから樹立されたEGFPで標識されたm-ESC (EGFP⁺-uPA^{+/-}-m-ESCと呼ぶ)を注入する。得られたm-BCをキメラm-BCと呼ぶ。
4. キメラm-BCを偽妊娠♀マウスに移植し、胚発生させる。
5. 胚発生の適切な段階の胚および出産子(生後1週間以内)の各組織に於けるEGFP⁺-細胞の分布を実体蛍光顕微鏡で概観する。
6. 実験項目5の各胚および出産子の各組織から組織切片標本を作製し、EGFP⁺-細胞細胞の割合を組織毎に算出し、各組織のキメラ率とする。
7. 肝臓のキメラ率と他の各組織のキメラ率に有為な差があるかどうかを判定する。

C-2. 研究結果

I. 本実験で確保すべき♀C57BL/6マウスの匹数の推定のための体外受精実験

1. 6匹の♀C57BL/6マウスから得られた卵数から一匹当たり29個の卵子を得ることが分かった。
2. この卵を凍結精子で体外受精させた。有効受精率は約19%であった。
3. 有効受精卵を培養したところ、胚盤胞期胚まで発生することができた受精卵の割合は32%であった。
4. 以上の結果から、凍結精子を使った場合には♀C57BL/6マウス1匹あたり「2個」に過ぎない事が判った。しかし、凍結精子は受

精率が低下する事は予め予測されていた事であり、「新鮮精子」の使用によって受精率を改善する事が出来る。過去のデータを集計すると、有効受精率は69% (1946/2815)である。この値を使って、「10匹の♀C57BL/6マウスを確保できれば、これから約60個の胚盤胞期胚が得られる。これらにEGFP^{+/+}/uPA^{+/-}-m-ESCを注入しキメラマウス作成出来れば、仮説検証可能な実験となる」と結論づけた。

II. EGFP⁺-uPA^{+/-}-m-ESCの培養試験

本研究で使用予定であるEGFP⁺-uPA^{+/-}-m-ESCを「独立行政法人理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター (BRC)から恵与を受けた。ガラスアンプル内の凍結細胞を、BRC指定の方法に従い融解し培養を行った。7 x 10⁻⁵ (アンプル内の約1/3)の細胞を60-mm dishに蒔種し、標準化された培養環境下でコロニーを増幅させた。培養2日後、コロニーの形態は良好で、我々が使用している129由来の細胞株に近い印象を受けた。即ちドームの様な隆起が見られ、輪郭もはっきりしているものである。我々が樹立したB6由来の細胞は、やや扁平で細長い形態を示す。増殖速度は通常の129/B6由来のそれよりも遅い印象を受けたが、これは継代数の問題や使用する培地に含まれる血清などの因子に左右されているかもしれない。

培養2日後のコロニーを405nm付近波長下で観察したところ、コロニーから緑色蛍光が観察する事ができた。

III. EGFP⁺-m-ESC キメラマウスの作成

uPA^{+/+}及び uPA^{wt/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^{+/+}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⁺-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

最終的に離乳仔をそれぞれ11及び10匹得た。前者のEGFP⁺-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。

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

V. uPA ホモマウス胚盤胞へのEGFP⁺-m-ESC 移植実験

得られたEGFP⁺-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ではなかった。

D-2. 考察

本研究の結果、uPA ヘテロ個体或はホモ個体の胚盤胞に野生型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。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、胚期肝臓に対してはそ

のような作用を示さない可能性が高い。

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。本研究によって、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。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、通液細胞はゲル収縮力、細胞増殖能、及びゲルの再構築力のいずれに於いても優れていることが分かった。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、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した。私達の考え方で肝臓全体がヒト化されたマウスが作成できれば、より人体に近いヒト肝臓研究のモデル動物の出現であり、肝炎ウイルス研究にとって新局面を拓くものと期待される。

この研究では、肝不全マウスの胚に正常ES細胞を移植して成長させる技術が必須であったが、それには成功した。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のではなく、置換率は他の組織と同程度であった。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。

本研究で目指している通液性立体培養法及びヒト肝臓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。

本研究参加者

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

本 真 深江化成

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- β -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.
12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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 21-23 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
大下浩樹 株式会社フェニックスバイオ
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

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に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、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獲得していることが判明した。このことは、iPS 細胞から分化させたヒト肝細胞が未熟な場合でも、uPA/SCID マウスに移植することで成熟ヒト肝細胞へと分化する可能性がある事を示唆した。また、uPA/SCID マウス肝臓におけるヒト肝細胞の Kinetics の解析から、通常、キメラマウス作製に用いている凍結ヒト肝細胞のホストマウス肝臓への生着率は約 10%である事と、生着したヒト肝細胞は 11 週間で約 1 万倍に増殖している事が明らかになった。またリボゾームクロドロンと化合物 X を移植前のホストマウスに投与したところ、化合物 X の投与はホストマウス肝臓へのキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞とヒト増殖性肝細胞の生着を向上させる効果がある事が分かった。

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事を目的としている。このようなキメラマウスを作製する上で、重要な点が2つあると考えられる。

まず1つ目は、これまでに報告されているiPS細胞から誘導された肝細胞は、分化が不完全で未熟な形質を維持しているという点である。In vitroで完全に肝細胞へと分化させる手法の確立が待たれるものの、ある程度肝細胞としての性質を獲得した細胞であれば、ホストマウス肝臓中で自発的に成熟した肝細胞へと分化する可能性がある。ヒト肝臓の機能は、新生児と成人で大きく異なっており、新生児のシトクロームP450 (CYP) 活性とグルクロン酸抱合能は低いものの、生後3ヶ月程で成人と同等となる。その一方で、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。これらを踏まえて、ホストマウス肝臓中でヒト肝細胞が成熟する可能性を検討するため、我々はまず、若いドナー由来の肝細胞を移植して作製されたキメラマウス肝臓を解析し、その性質が胎児型なのか成人型なのかを検討した（平成21-22年度）。

もう1つの重要な点は、効率よくキメラマウスを作製するには、移植された細胞が効率よく肝臓に生着し増殖する必要があるという事である。しかしながら、高度にヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを作製するには、どれくらいの細胞が生着しかつ増殖する必要があるのかは、これまで不明であった。そこで我々は、ホストマウス肝臓におけるヒト肝細胞のkineticsを解析することでその生着率と増殖能を明らかにすると共に、低い生着率を示すキメラマウス由来凍結ヒト肝細胞とヒト増殖性肝細胞を用いて、移植細胞の生着率を向上させる方法について検討した（平成23年度）。

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/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 $0.75 \sim 1.05 \times 10^6$ 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回の頻度で尾静脈から血液を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た。260 nm 及び 280 nm の吸光度を分光光度計 (BioPhotometer, Biorad) で測定し、RNA 濃度を定量した。

定量性リアルタイム 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 1 μg 、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 5 \times First-strand buffer 4 μL 、100 mM DTT 1 μL 、RNAase free 水 1 μL 、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 を鋳型として、以下の条件で PCR を行った。逆転写反応液 1 μL に対し forward および reverse primer を 5 pmol/ 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) を使い、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した遺伝子は、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP3A7、CYP2E1、UGT1A1、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、FM01、FM03 で、プライマーの合成は Operon (Tokyo, Japan) に委託した。各プライマーの配列を Table 1 に示す。これらの primer はマウスホモログに交差反応しないことを確認した。

Table 1.

Primer	Sequence	
	Forward primers(5'-3')	Reverse primers(5'-3')
CYP1A2	GCTTCTACATCCCAAGAAAT	ACCATTGGCCAGGACT
CYP2C8	GGGACTTTATCGATTGCTTC	GGTGTCTGTTGTCTCTGTTC
CYP2C9	CCAGATCTGCAATATTTTCTC	CAAGCTTTCAATAGTAAATTCAGATG
CYP2C18	AGGACATGAGCAATCCTTAACC	GCTTCATATCCATGCAACAC
CYP2C19	TGAATGAAAAACATCAGGATTG	CAAGGTTTTAAGTAATTTGTTATGG
CYP2D6	CTTGACAAAAGCCGTGA	GACAGCATTGACACCTC
CYP2E1	GGCTGAAATAAAGATATGTGTC	TTTCTCTCCATTTCAC
CYP3A4	ACTGCCITTTTGGGAATA	GGCTGTGACCATATAAAG
CYP3A7	ATCATTTGGAGTGAGCATCG	TTGGGGTAAGGAATGAAAG
UGT1A1	TTGATCCAGTGGATGGC	ATGCTCCGTCTCTGATGTACAAC
UGT1A6	ACACCCCTGAACCTTTAAGGAG	GCTGAATGTATGCTCCAGG
UGT1A9	AGGACATTTATTATGCCACCG	CAAAACAAAGTCCGTTGCG
UGT2B7	TGACATGAAGAAGTGGGATCAG	CAACATTTGGTAAGAGTGGATATGG
FM01	ATGGGAAATTCGGCACAGAC	ACCATGTCCCATGGGATAGC
FM03	TGGCCCTTGTAGTCCCTACCAG	GGCTTCTGAAGTCTCCCGACC
GAPDH	GGAGTCAACGGATTGGT	AAGATGGTATGGGATTTCCA

データ解析は 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster CA) で行った。内部標準遺伝子としてヒト Glyceral dehyde 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 NTC のサイクル数を減じ (ΔCt)、 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 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 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 μL のリンス溶液を 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

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

	Enzyme Activity	Substrate (Concentration, μ M)	Metabolite	Buffer※	Incubation time (min)
CYP1A2	Phenacetin <i>O</i> -deethylase	Phenacetin (20)	Acetaminophen	PB	20
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylase	Diclofenac (6)	4-Hydroxydiclofenac	TB	20
CYP2C19	<i>S</i> -Mephenytoin 4'-hydroxylase	<i>S</i> -Mephenytoin (60)	4'-Hydroxymephenytoin	PB	20
CYP2D6	Debrisoquin 4'-hydroxylase	Debrisoquin (100)	4'-Hydroxydebrisoquin	PB	20
CYP2E1	Chlorzoxazone 6'-hydroxylase	Chlorzoxazone (100)	6-Hydroxychlorzoxazone	PB	20
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylase	Midazolam (10)	1'-Hydroxymidazolam	PB	20

※TB: Tris-HCl buffer(pH7.5), PB: Pottasium phosphate buffer (ph7.4).

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 μ m
CYP2C19			
CYP2C9	Inertsil ODS-3	4.6×250 mm	5 μ m
CYP2D6	Inertsil ODS-3	4.6×150 mm	5 μ m
CYP2E1	Xterra RP18	4.6×150 mm	5 μ m
CYP3A4			

後、105,000 \times g、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

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9600 \times g、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。

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

Enzymes	Analyte	Internal standard	Injection volume (μL)	Mobilephase				
				Solvent A [#]	Solvent B	Gradient program, %B (min)	Column temperature (°C)	UV detection (nm)
CYP1A2	Acetaminophen	0.1 μg Caffeine monohydrate	95	50 mM PB	Acetonitrile	Isocratic mode (A/B=91/9)	35	345
CYP2C9	4-Hydroxy diclofenac	0.4 μg Phenacetin	50	0.5 % (v/v) AAAS	Metanol 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=80/20)	35	240
CYP2D6	4'-Hydroxy debrisoquin	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=80/20)	35	287
CYP3A4	1'-Hydroxy midazolam	0.01 μg Phenacetin	50	10 mM PB	Acetonitrile/ Methanol mixture (7/5, v/v)	30(0)→30(5)→60(17)→60(25)→30(26)	40	263

*PB: Potassium phosphate buffer (pH 7.4), AAAS: Acetic acid aqueous solution

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

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、 2.5×10^5 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 μm)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 g/cm³)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 2.5×10^5 個に対する、生着率を算出した。