

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 g/cm³）、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。

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 mg/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 ml/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 mg/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：1×10⁶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

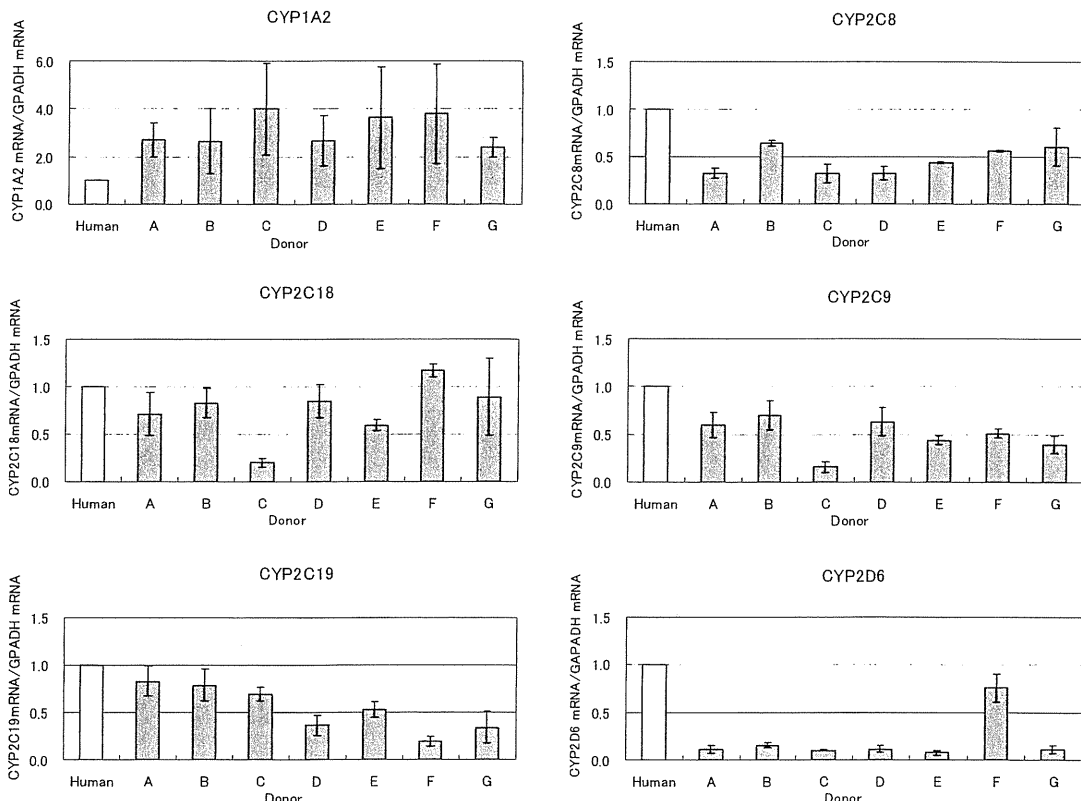


Fig.1-1. Human CYPs expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human CYP mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

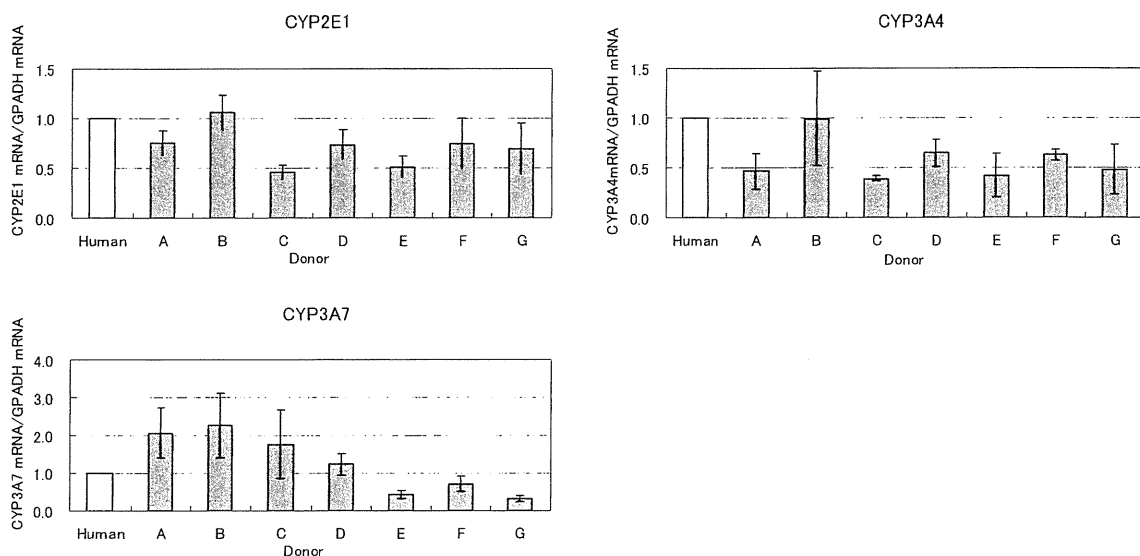


Fig. 1-2. Human CYPs expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human CYP mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

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 mg/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： 5×10^5 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

キメラマウスのヒト置換率

平成21-22年度は、全部で21例のキメラマウスをヒト肝薬物代謝酵素の測定に使用した。使用したキメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度と置換率をTable 5に示した。

キメラマウス肝臓中代謝酵素の発現量測定

CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP2E1の発現量を測定した。CYP2C19は年齢に依存して発現量が減少する傾向が見られたが、コントロールの成人5ドナーの肝組織プールに比べて成人ドナー由来のキメラマウスの発現量は低かった（Fig. 1-1, 1-2）。CYP3A7、FM01、FM03は出生を機に肝臓における発現量が変化する薬物代謝酵素である。CYP3A7は胎児肝臓で発現が高く生後低下する。キメラマウス肝臓では若年ドナーのキメラマウスで発現が高く、成人ドナーでは低い傾向にあった（Fig. 2）。FM01は胎児肝ではFM01の発現が高く、出生後にFM01の発現は低下しFM03の発現が誘導されることが知られている（文献5, 6）。キメラマウス肝臓においては、若年ドナーにおいて、FM01とFM03どちらも高く、成人ドナーでは低い傾向にあった（Fig. 2）。キメラマウス肝臓のCYP3A7とFM01の遺伝子発現をヒト胎児肝臓と比較したところ、CYP3A7のキメラマウス肝臓の発現量は胎児肝と比較すると若年ドナーのキメラマウス肝臓であってもその発現量は1/10以下で

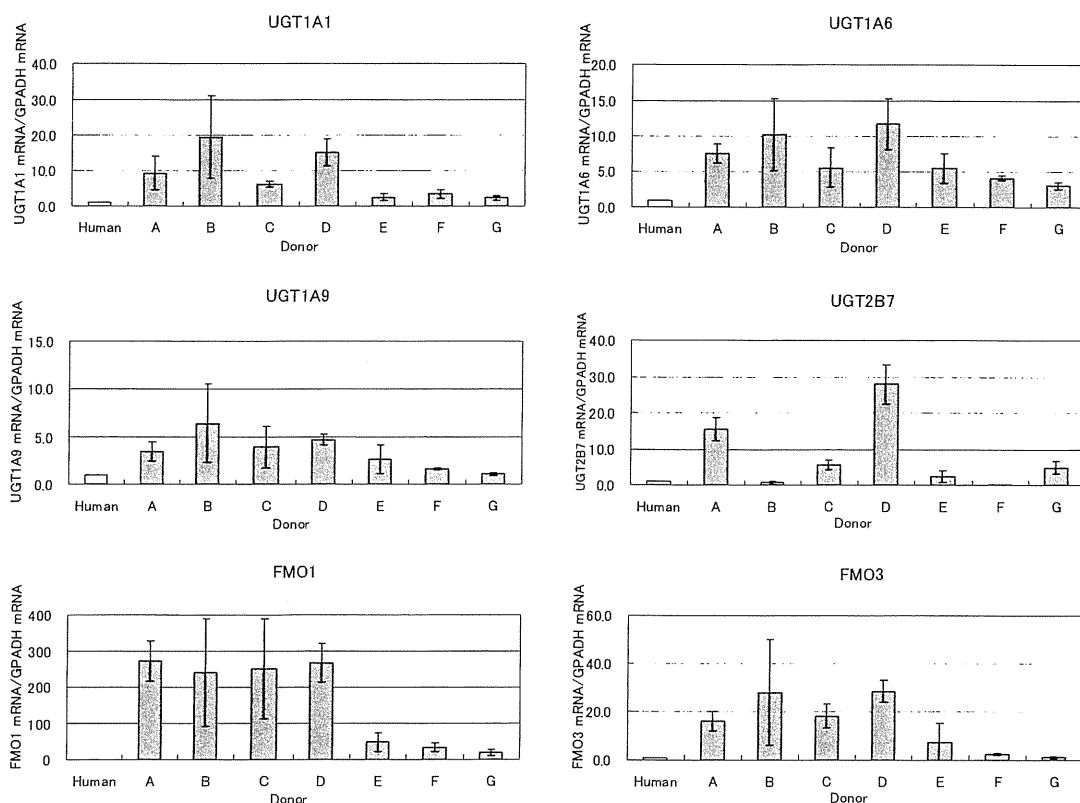


Fig. 2. Human UGTs and FMOs expressions in the chimeric mouse livers. Relative expression levels of human UGTs and FMOs mRNAs were determined as described at the Materials and Methods section.

あった。一方、若齢ドナーキメラマウスのFMO1の肝臓での発現量は妊娠20週の胎児肝よりも高く、ヒト成人ドナーキメラマウスでも肝組織プールに比べて10倍以上の発現量であった (Fig. 3)。その他の分子種については胎児での発現はほとんど見られなかった (Data not shown)。今年度追加した成人2ドナーについてはCYP2D6で22歳ドナーの発現が他のものに比べて高い発現を示したが、その他の分子種については特に目立つ変動は示さなかった (Fig. 1-1, 1-2, 2)。

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、年齢に依存した傾向は見られなかった (Fig. 4)。

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 2.5×10^5 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 ng/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 ± 2.8 mg/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 ± 2.9 gであった。肝

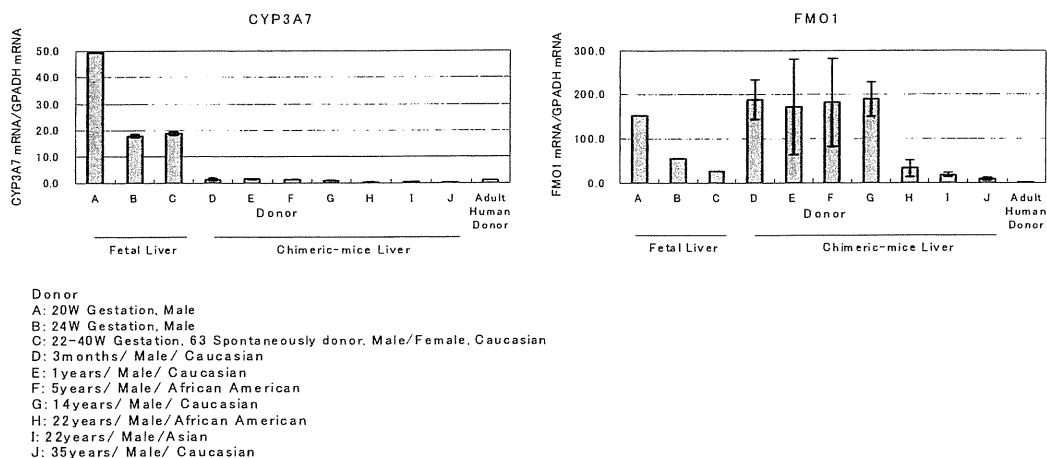


Fig. 3. CYP3A7 and FMO1 gene expression on the chimeric mice liver, fetal and adult human liver. Relative enzyme activity levels of human CYP and FMO enzymes were determined as described at the Materials and Methods section.

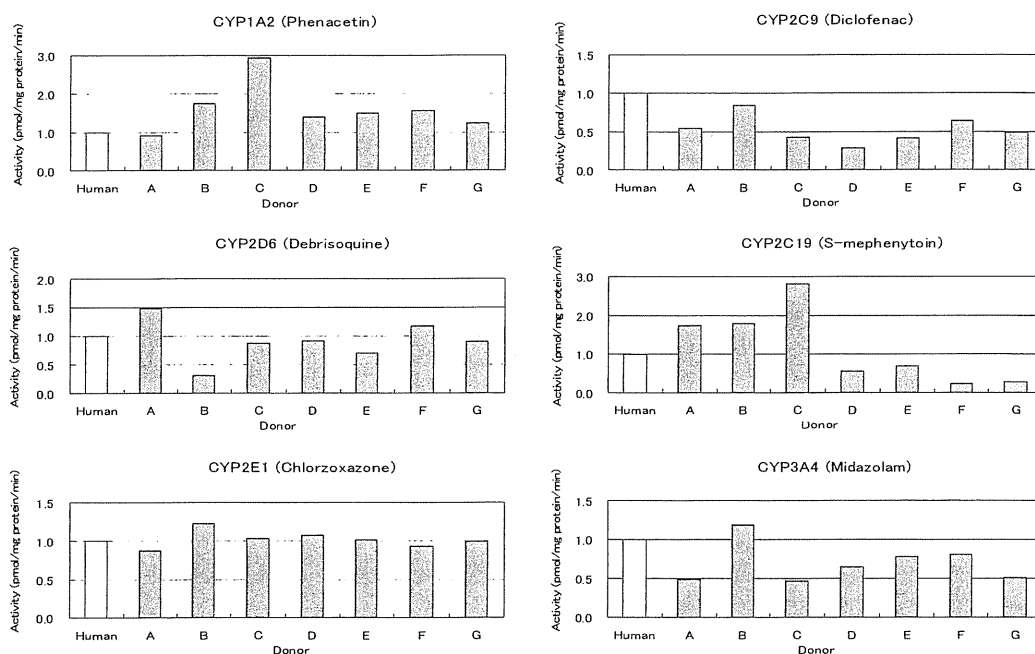


Fig. 4. Human Drug Metabolizing Enzyme Activity on the chimeric mice. Relative enzyme activity levels of human CYP enzymes were determined as described at the Materials and Methods section.

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2.5gであった。一定面積あたりのヒト肝細胞数は3169.8 cells/cm²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 x 10⁸個であった。従って、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。

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

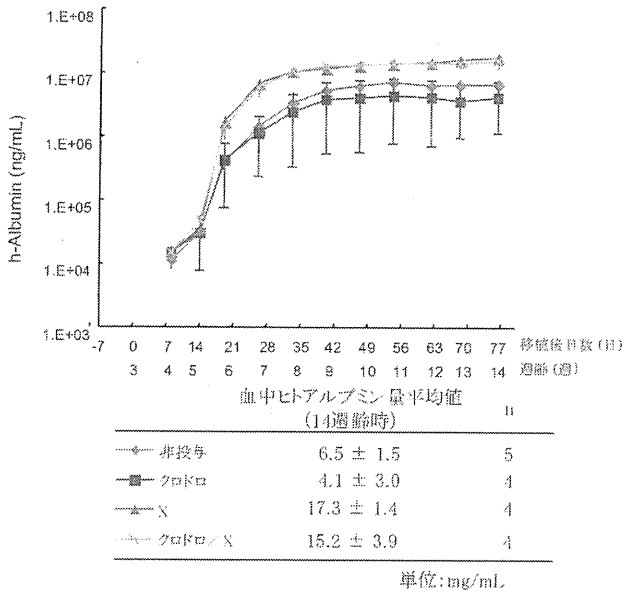


Fig. 5 血中ヒトアルブミン濃度の推移

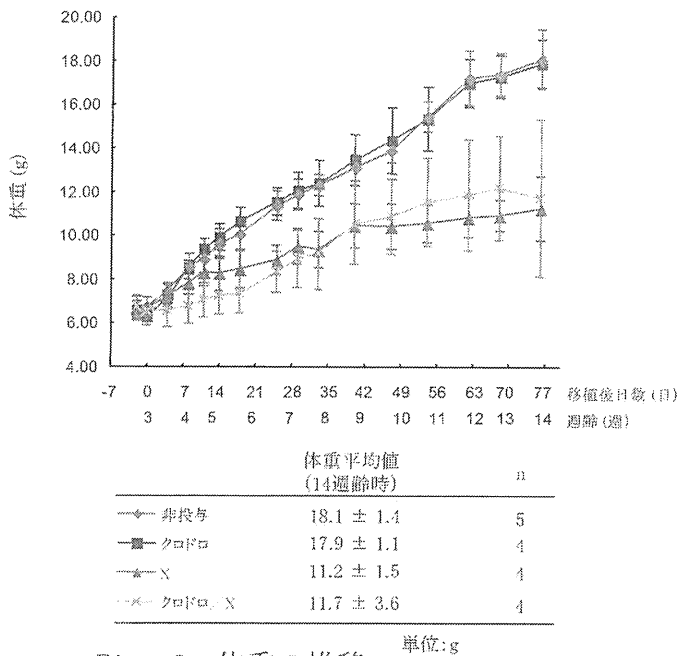


Fig. 6 体重の推移

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 (Fig. 5)。

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

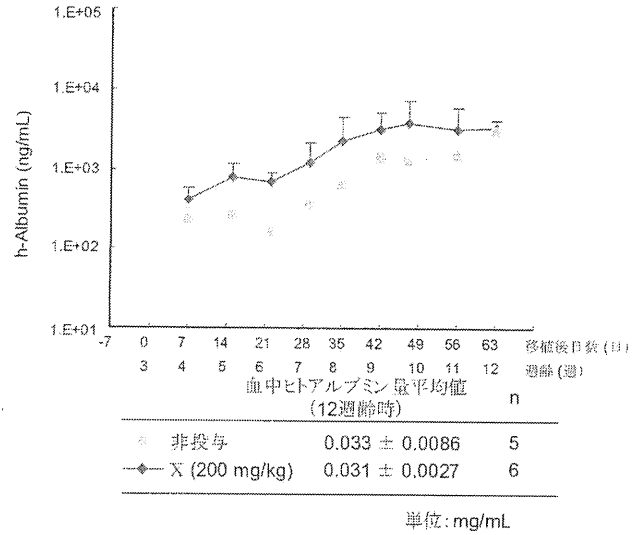


Fig 7 血中ヒトアルブミンの推移

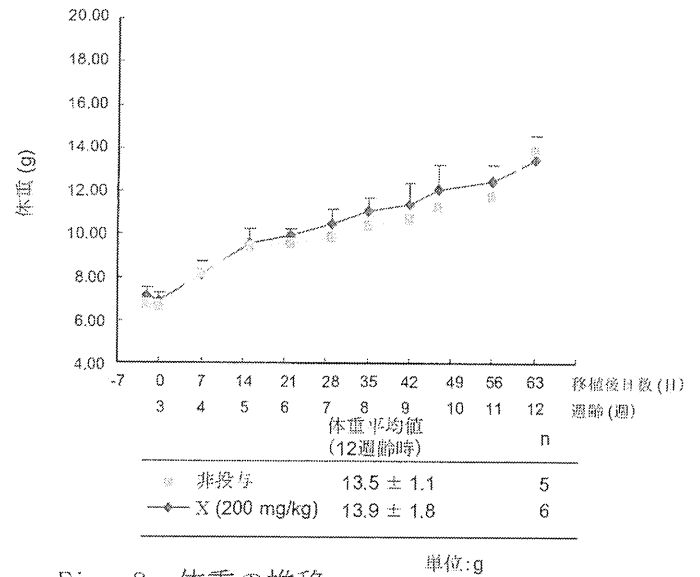


Fig. 8 体重の推移

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 (Fig. 6)。

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 (Fig. 7)。体重はほぼ同等であった (Fig. 8)。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

平成21年度から22年度にかけて、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発現と酵素活性について解析を行った。

mRNAの解析では、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CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP2E1のうち、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。

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、そのパターンには概ね類似性が見られ、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。

平成23年度の解析から、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。

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

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。

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。

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 (FMO1) and 3 (FMO3) 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, Turky 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 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. Pediatric research 2002, 51:236-243
7. 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.
8. 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.

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 152:1479-1491, 2011.

- (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 55:512-521, 2011.

- (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 interferon-stimulated genes and inhibit hepatitis C virus replication J Hepatol 55:11-8, 2011.
- (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
- (10) 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.
- (11) 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. 167:e29-37, 2011.
- (12) 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).
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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
- (16) 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.
- (17) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe A, 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. 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, Chayama 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 秋田アトリエ
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 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
10. 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 平成23年6月2日 ホテルグランパシフィックLE DAIBA
11. 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 平成23年6月25日 東京ガーデンパレス
12. 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, 平成23年11月4-8日, サンフランシスコ
13. 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 平成23年11月18日 広島国際会議場
14. Tateno C, Ohbuchi M, Hamamura S, Ohshita H, Kazuki Y, Oshimura M, Sato K, Nakada N, Kato K, Kawamura A, Kamimura H, Usui T, Development of Cyp3a KO chimeric mice with humanized livers 薬物動態学会第26回年会 平成23年11月18日 広島国際会議場
15. 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 コメントアッセイ第40回環境変異原学会 平成23年11月21-22日 一橋記念講堂
16. Tateno C, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Ishida Y, Telomere shortening of human hepatocytes during mitosis through in vivo passages, Liver Down Under 2011, 平成23年12月2日, オーストラリア、パース
17. 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回肝類洞壁細胞研究会 平成23年12月19日 東京ガーデンパレス
- 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

重篤な肝疾患に対する根治的治療法として脳死肝移植や生体肝移植が知られているが、深刻なドナー不足を筆頭に克服すべき課題も多い。そこで、肝移植に替わる、あるいはそれを補完するために、多能性幹細胞を含む非肝臓源の細胞から分化誘導させた肝細胞を用いた、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細胞の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ができています。さらに、マウスES細胞から肝芽細胞様細胞への分化誘導と、マウス胎仔肝へのex utero移植による生着・増殖にも成功している。そこでマウスやヒトiPS細胞を用いて、肝細胞系譜への有効な分化誘導法を検討した。さらに、侵襲性の少ない末梢血細胞からのiPS化、iPS細胞/ES細胞の未分化維持やゲノム安定化機構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。そこで本研究では、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Tリンパ球からのiPS化と、ヒトiPS細胞から肝細胞系譜への効率的な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

マウスiPS細胞をActivin Aと4日間、FGF2/HGF/EGFと4日間培養し、肝細胞系譜関連遺伝子の発現を調べた。誘導された肝芽細胞様細胞をuPA/SCIDマウスに経脾門注し、3-4週間後に肝への生着を観察した（フェニックスパイオの立野知世博士、吉里勝利博士との共同研究）。

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（SL10; ReproCell）を播いてある6-well plateに細胞を播種し、FGF2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）。また、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; DNAME C）も用いた。

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。

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肝細胞様細胞に分化誘導でき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（JCRB0160）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。

C. 研究結果

マウスES細胞と類似の方法で、マウスiPS細胞から肝芽細胞を分化誘導できた。uPA/SCIDマウスに経脾門注し、肝臓への生着・増殖を観察したが、肝臓および脾臓に高頻度に腫瘍の発生が観察された。マウスiPS由来肝芽細胞に混在する未分化細胞の除去が課題となる。

DPPA4は、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。さらに、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、クロマチン結合能を有するユニークな未分化維持因子であることが明らかとなった。

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化については満足のいく結果は得られていない。

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。

D. 考察

ES細胞/iPS細胞からの肝細胞系譜への分化誘導の成功は、いかにして分化効率をあげるかにかかっている。成熟肝細胞でなく、増殖能のある肝前駆細胞の誘導が試みられている。肝芽細胞を分化誘導できたが、やはり効率化の問題と未分化細胞の除去の問題が立ちふさがっている。

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に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、何とか成功にこぎ着きたい。

マウスES細胞では、未分化維持因子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ている。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

ヒトiPS細胞からの肝細胞系譜への分化誘導の研究は、課題であるヒト型肝臓キメラマウス肝炎モデル開発をはじめとして、創薬や臨床応用に向けて、さらなる研究の深化が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

M Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, Takagi M, Goto H, Inagaki M, Mizutani S, and Teraoka H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5(1), e8821 (2010)

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* 2010; 15(4): 327-337

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* 2010; 285(20): 15201- 15208

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, Arai 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

Masaki H, Nishida T, Teraoka H: DPPA4 modulates chromatin structure via association with histone H3 and linker DNA in mouse embryonic stem cells. 7th Annual Meeting for the International Society for Stem Cell Research (Barcelona, Spain, July 8-11, 2009), Thursday Poster Session; Abstracts, p. 123.

Nishida T, Masaki H, Yoshioka K, Teraoka H: Transcriptional regulation of ERas by Nanog and Klf family proteins in mouse embryonic stem cells. 7th Annual Meeting for the International Society for Stem Cell Research (Barcelona, Spain, July 8-11, 2009), Thursday Poster Session; Abstracts, p. 129.

西田知弘, 正木久晴, 逆井良, 寺岡弘文: Transcriptional regulation of ER as gene in mouse embryonic stem cells, 第32回分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日; プログラム p. 187.

只井祐美, 齊藤佳子, 鹿内弥磨, 西田知弘, 正木久晴, 逆井 良, 寺岡弘文, 山崎ちひろ, 立野知世, 吉里勝利. マウスiPS細胞から肝細胞系譜への分化誘導, 「口演5 iPS-1 0-05-3」 第9回再生医療学会総会、広島、2010年3月18-19日; 日本再生医療学会雑誌 Vol. 9 Suppl. p. 163.

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.

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.

G. 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

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

分担研究者 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。今回の研究班では、1) 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により、遺伝子型Aおよびワクチンエスケープ変異株の感染防御が可能であった。2) ヒト肝細胞キメラマウス由来の肝細胞を充填した3次元培養系を用いてHBV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HBV感染を確認した。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

A. 研究背景・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がほとんどであり、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、これらの問題点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、ホスト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、これらのホスト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。

5) 3次元培養系の確立

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、HBVのウイルス粒子を含む患者血清10⁵copies/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

1) 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。

2) 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10⁴-10⁵copies/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
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurbanov F, **Tanaka Y**, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2010 ;40(1):14-30.
2. Tatematsu K, **Tanaka Y**, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009 ;83(20):10538-47.
3. Khan A, **Tanaka Y**, Azam Z, et al. Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan. *J Med Virol.* 2009 ;81(7):1189-97.
4. Elkady A, **Tanaka Y**, Kurbanov F, et al. Genetic variability of hepatitis C virus in South Egypt and its possible clinical implication. *J Med Virol.* 2009 ;81(6):1015-23.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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. *Hepatol Res.* 2011;41(6):505-511.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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. その他の発表
1. 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史.
ワークショップ4: B型肝炎の基礎
と臨床. HBV遺伝子型間における
細胞障害性の違い. 第45回日本肝
臓学会総会. 平成21年6月4日-5日.
神戸.
 2. 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.
 3. 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. 平成22年5月26-27日. 山
形.
 4. 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 MODEL USING
UPA/SCID MICE WITH
HUMAN HEPATOCYTES. THE
62ND ANNUAL MEETING OF
THE AMERICAN
ASSOCIATION FOR THE
STUDY OF LIVER DISEASES.
Nov.4-8, 2011. San Francisco.

H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

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 研究班の目標は日本人由来の 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

安定的かつ効率的なヒト細胞 iPS 化技術の確立と、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こと。また、分化誘導時における細胞周期停止が及ぼす影響について詳しく解析を行った。とりわけ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を目指した。

B. 研究方法

山中 4 因子を組み込んだレンチウイルス発現系を、理化学研究所三好博士より導入し、安定的にヒト細胞およびマウス細胞を iPS 化する系を確立した。確立したヒトおよびマウス iPS 細胞におけるプロモーター領域のヒストン修飾を解析するために、各種ヒストン修飾特異抗体を用いた ChIP 法を確立した。

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。

さらに、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明らかにする目的で、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。

(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り、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。

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。興味深いことに、これらの効果は、一過性 (24 時間) に p16 遺伝子を発現誘導させても同様に認められた。以上の知見は、p16 による分化誘導効果は細胞増殖停止によるものというよりは、特異な標的分子を介したものによると考えられた。

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、効率的な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。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。さらに、p16 遺伝子を発現誘導することで、効果的に分化方向に iPS 細胞を誘導することが可能と考えられた。この結果により、これまでの肝細胞誘導法に加えて、p16 遺伝子を導入することが iPS 細胞からの効果的な肝細胞分化に有効であることが示唆された。

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。

iPS 細胞に細胞周期停止機能をもつ p16 遺伝子を発現誘導したところ、未分化性質の喪失と、分化形質の獲得が確認された。p16 を用いることによりさらに効率的な iPS 細胞からの肝細胞分化系の確立が可能になると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Nakanishi M, Wakita T, Ogura Y, Yatabe Y, Shirai T. Histone H1 expression in human prostate cancer tissues and cell lines. *Pathol Int.* 62(2):84-92 (2012) (査読有り)

2. Delhase M, Kim SY, Lee H, Naiki-Ito A, Chen Y, Ahn ER, Murata K, Kim SJ, Lautsch N, Kobayashi KS, Shirai T, Karin