

- M, Nakanishi M. TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(4):E177-86 (2012) (査読有り)
3. Ogawa K, Murasaki T, Sugiura S, Nakanishi M, Shirai T. Organ differences in the impact of p27(kip1) deficiency on carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *J Appl Toxicol*. in press (2012) (査読有り)
4. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic variation of the IL-28B promoter affecting gene expression. *PLoS One* (2011) (査読有り)
5. Nakanishi M. Cell cycle. *Rinsho Ketsueki*. 52(10):1660-8(2011) (査読有り)
6. Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 41 (10) :936-945 (2011) (査読有り)
7. Harada N, Watanabe Y, Yoshimura Y, Sakumoto H, Makishima F, Tsuchiya M, Nakanishi K, Nakanishi M, Aoki Y. Identification of a checkpoint modulator with synthetic lethality to p53 mutants. *Anticancer Drugs*. 22 986-94 (2011) (査読有り)
8. Matsuyama M, Goto H, Kasahara K, Kawakami Y, Nakanishi M, Kiyono T, Goshima N, Inagaki M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci*. 124 2113-9 (2011) (査読有り)
9. Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, Oseto K, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. *Hum Reprod*. 26(5):1259-66 (2011) (査読有り)
10. Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Genetic variation in IL-28B is associated with response to the therapy for chronic hepatitis C. *J Pharmacol Sci*. 115(3):263-9 (2011) (査読有り)
11. Shimada, M., Haruta, M., Niida, H., Sawamoto, K., and *Nakanishi, M. PP1g is a phosphatase responsible for dephosphorylation of histone H3 at threonine 11 after DNA damage. *EMBO rep*. 11 883-889 (2010) (査読有り)
12. Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., and *Nakanishi, M. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci*. 101 2505-2509 (2010) (査読有り)
13. Niida, H., Murata, K., Shimada, M., Ogawa, K., Ohta, K., Suzuki, K., Fujigaki, H., Khaw, A.K., Banerjee, B., Hande, P.M., Miyamoto, T., Miyoshi, I., Shirai, T., Motoyama, N., Delhase, M., Appella, E., and *Nakanishi, M. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo. *EMBO J*. 29 3558-3570 (2010) (査読有り)
14. Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., and Murakami-Tonami, Y. Regulation of yeast forkhead transcription factors

- and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell Cycle* 9, 3233-3242 (2010) (査読有り)
15. Sakai, S., Ohoka, N., Onozaki, K., Kitagawa, M., Nakanishi, M., and Hayashi, H. Dual mode of regulation of cell division cycle 25A protein by TRB3. *Biol Pharm Bull.* 33, 1112-1116 (2010) (査読有り)
16. Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., Tashiro, S., and *Nakanishi, M. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes and Dev.* 24 333-338 (2010) (査読有り)
17. Ohoka, N., Sakai, S., Onozaki, K., Nakanishi, M., and Hayashi, H. Anaphase promoting complex/cyclosome-cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 289-294 (査読有り) (2010)
18. Nakanishi, M., Katsuno, Y., Niida, H., Murakami, H., and Shimada, M. Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosomal Res.* 18 103-113 (2010) (査読有り)
19. Nakanishi, M., Niida, H., Murakami, H., and Shimada, M. DNA damage responses in skin biology-Implications in tumor prevention and aging acceleration. *J Dermatol Sci.* 56 76-81 (2009) (査読有り)
20. Shimada, M., Yamamoto, A., Murakami, Tonami, Y., Nakanishi, M., Yoshida, T., Aiba, H., and Murakami, H. Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating Mad2p in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388 529-532 (2009) (査読有り)
21. Zineldeen, D.H., Shimada, M., Niida, H., Katsuno, Y., and Nakanishi, M. Ptpcd-1 is a novel cell cycle related phosphatase that regulates centriole duplication and cytokinesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 460-466 (2009) (査読有り)
22. Nishizuka, M., Kishimoto, K., Kato, A., Ikawa, M., Okabe, M., Sato, R., Niida, H., Nakanishi, M., Osada, S., and Imagawa, M. Disruption of the novel gene fad14 causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration. *Exp. Cell Res.* 315 809-819 (2009) (査読有り)
23. Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D.H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F., and Nakanishi, M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 3184-3189 (2009) (査読有り)

2. 学会発表

1. 中西 真

平成 23 年 10 月 3 日～5 日
第 70 回日本癌学会総会

2. 中西 真

「癌と細胞周期」

平成 22 年 9 月 22 日～24 日
第 69 回日本癌学会総会
ガン研究入門コース

3. 中西 真、島田緑、春田真由美

「Chk1-GCN5 と PP1g-HDAC3 複合体によるヒストンバイナリーコードの変換は DNA 損傷による E2F 標的遺伝子の発現を抑制する」

2010 日本分子生物、生化学会合同会議
シンポジウム
平成 22 年 12 月 10 日

4. 中西 真

「DNA 損傷部位への適切な dNTP 供給機構」

平成 21 年 10 月 2 日
第 68 回日本癌学会学術総会

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出

分担研究者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科

本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出を試みる。フェニックスバイオ・立野知世博士との連携の下、これまでに我々が開発した分化誘導法により作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞をマウス個体への移植実験を実施することで、肝炎モデルへ応用可能なキメラマウスの作出可能か否か検討した。

研究協力者

川端健二 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

田代克久 (独)医薬基盤研究所

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科
(独)医薬基盤研究所

長基康人 大阪大学大学院薬学研究科
(独)医薬基盤研究所

A. 研究目的

現在、世界的にヒト肝炎ウイルスの感染が問題となっており、その予防と治療は社会的な関心が非常に高く、新規治療法の開発が望まれている。しかし、ヒト肝炎ウイルスの感染域は非常に狭く、通常、培養肝細胞やマウスやラットなどの汎用されている実験動物には感染、増殖しないため、治療法の開発は遅れているのが現状である。従来はチンパンジーがヒト肝炎ウイルス感染モデル動物として使用されてきたが、近年、uPA トランスジェニックマウスと免

疫不全マウスを交配して得られた uPA 免疫不全マウスに、ヒト肝細胞を移植することで作出されたキメラマウスがヒト肝炎ウイルス感染モデル動物として注目を集めている。

我々は、独自開発した次世代アデノウイルス (Ad) ベクターを利用することで、ヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導技術の開発に成功している。そこで本研究では、フェニックスバイオ・立野知世博士との連携の下、作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を uPA 免疫不全マウスへ移植することにより、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスを作出するための基盤技術の開発を実施する。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスを作出するための技術が開発できれば、人種や個人差も反映したヒト肝炎ウイルス感染モデル動物の実現に繋がることが期待される。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMEF5 のマルチクローニング部位にヒト SRY-box containing gene 17 (SOX17) 遺伝子、ヒト hematopoietically expressed homeobox (HEX) 遺伝子、ヒト hepatocyte nuclear factor 4, alpha

(HNF4 α)遺伝子を挿入し、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM41-K7 に挿入することにより pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-HNF4 を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-HNF4 α を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。

B-2. 内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞、肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞 (Dotcom) を分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Furue MK et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase (Invitrogen 社) を用いてヒト iPS 細胞を回収後、6 因子 (10 μ g/mL human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin) および 100 ng/mL Activin A (R&D systems 社) を含む hESF-DIF (Cell Science & Technology Institute 社) 培地に懸濁後、マトリゲルでコーティングした細胞培養用 12 プレートに播種した。Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、Ad-SOX17 を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で中内胚葉系細胞に作用させた。培地は上記のものと同じものを使用した。次にヒト iPS 細胞由来の内胚葉系細胞に Ad-HEX を 3,000 VP/cell の濃度で作用させた後、20 ng/mL FGF4 (R&D systems 社) と 20 ng/mL BMP4 (R&D systems 社) を含んだ hESF-DIF 培地で 3 日間培養し、肝幹前駆細胞を得た。ヒト iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞に Ad-HNF4 α を 3,000 VP/cell の濃度

で作用させた後、8.3% tryptose phosphate broth (BD Biosciences 社)、10% FBS (Vita 社)、10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate (Sigma 社)、1 μ M insulin、25 mM NaHCO₃ (Wako 社) および 20 ng/mL HGF (R&D Systems 社)、20 ng/mL Oncostatin M (R&D Systems 社)、10⁻⁶ M dexamethasone (Sigma 社) を添加した L15 medium (Invitrogen 社) で 11 日間培養し、肝細胞を誘導した。また、最近、我々は上記の分化誘導法を改良し、より成熟した肝細胞の誘導に成功しているため、改良法を用いてヒト iPS 細胞から内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞への分化誘導も行った。

B-3. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の生体移植実験

移植のレシピエントマウスには、ヒトアルブミンプロモーターによって uPA 遺伝子を発現する uPA トランスジェニックマウスと、免疫不全マウスを交配して得られた uPA 免疫不全マウスの 2-4 週齢を用いた。3 遺伝子導入プロトコールにより誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞は、PBS 洗浄後、0.0125% トリプシン/EDTA 溶液にて回収後、DMEM/10%FCS 培地に懸濁した。uPA 免疫不全マウスをエーテル吸入麻酔し、ヒト iPS 細胞由来細胞懸濁液をハミルトンシリンジにより脾臓へ 25 μ l (4 \times 10⁵ あるいは 1 \times 10⁶ 細胞) 注入した。改良法により誘導したヒト iPS 細胞由来細胞 (内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞、肝細胞) は PBS 洗浄後、0.025% トリプシン/EDTA 溶液によって回収後、8.3% tryptose phosphate broth、10% FBS、10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate、1 μ M insulin、25 mM NaHCO₃ を添加した L15 medium 培地へ懸濁した。その後、1 \times 10⁶ 細胞/25 μ l を脾臓経由で uPA 免疫不全マウスへ注入した。移植したマウスから毎週採血を実施し、血中ヒトアルブミン量を ELISA にて検出を行った。また、ヒトアルブミンの産生がみとめられたマウス個体においては肝臓切片を作製し、抗ヒトアルブミン抗体、抗ヒト CK8/18

抗体を用いて免疫抗体染色を行った。

C. 研究結果

まず、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞において発現している転写因子 SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子を改良型 Ad ベクター（ファイバー領域にポリリジン配列を付与したファイバー改良 Ad ベクター）を用いて時期特異的に一過性に過剰発現することで、肝細胞の分化誘導を行った（図 1A）。我々は、本プロトコールに従い作製された肝細胞の約 80%がアルブミン陽性を示し、CYP3A4、CYP2D6 などの薬物代謝酵素の活性レベルがヒト初代培養肝細胞と同等であること、さらに細胞の形態は、細胞間隙が明瞭になり、多核の細胞が現れるなど、ヒト初代培養肝細胞の形態と類似していることを確認している。

そこで次に、フェニックスバイオ・立野知世博士グループの協力の下、uPA 免疫不全マウスへ iPS 細胞由来肝細胞の移植を行った（図 2A）。ヒト iPS 細胞由来肝細胞 4×10^5 細胞を、9 匹の uPA 免疫不全マウスへ移植した結果、移植後 28 日目より 1 匹の移植マウスにおいて血中ヒトアルブミンが観察された（図 2B）。一方、ヒト iPS 細胞由来肝細胞 1×10^6 細胞を、10 匹の uPA 免疫不全マウスへ移植した結果、移植後 34 日目より 1 匹の移植マウスにおいて血中ヒトアルブミンが観察された（図 2B）。しかしながら、いずれのマウスにおいても、検出された血中ヒトアルブミン濃度は非常に低いものであったため、今回移植に用いた細胞の生着率が低いことが示唆された。

Haridass らは、胎児肝細胞と成人肝細胞を用いて肝障害を誘導した免疫不全マウスへ移植し、成人由来肝細胞の方が高い生着率を示すことを報告している。したがって、iPS 細胞由来肝細胞の uPA 免疫不全マウスへの生着率を向上させるには、iPS 細胞由来肝細胞の更なる成熟化が必要であるものと考えられる。そこで次に、さらに成熟した肝細胞を移植す

ることを計画し、これまでの 3 遺伝子導入によるプロトコールを改良した方法で検討した。改良法で作製された内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞および肝細胞は、3 遺伝子導入法を用いて作製した細胞よりも効率良く肝細胞を誘導可能であることを確認している。特に、改良法で誘導した肝細胞は、3 遺伝子導入法により誘導した肝細胞と比較し、アルブミン産生量や一部の薬物代謝酵素の発現量が高いことを確認しており、改良法により、成熟度の高い肝細胞が誘導できたものと考えられる。

そこで次に、改良法により作製した肝細胞の移植を行った。なお、今回の検討では、成熟した肝細胞だけでなく、内胚葉系細胞や肝幹前駆細胞の移植も同時に実施した（図 2A）。ヒト iPS 細胞由来の各種細胞（内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞、肝細胞） 1×10^6 細胞を、それぞれ 4 匹の uPA 免疫不全マウスへ移植した結果、移植後 7 日目よりヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したマウス 4 匹において血中ヒトアルブミンが観察された。そのうち 3 匹はその後血中ヒトアルブミン濃度が増加し続け、最終的には移植後 26 日目までアルブミン濃度まで上昇した（図 2C）。これは、移植した肝細胞が免疫不全マウス体内で増殖していることを示唆している。この時の血中ヒトアルブミン濃度は 3 遺伝子導入法と比較して、非常に高い濃度であった。また、血中ヒトアルブミンが検出された個体の肝臓切片より、ヒトアルブミン、ヒト CK8/18 両陽性のコロニーが多数観察された（図 2D, E）。なお、内胚葉系細胞や肝幹前駆細胞を移植したマウスの血中においては、ヒトアルブミンは検出限界以下であった（図 2C）。

D. 考察

SOX17、HEX、HNF4 α の 3 遺伝子を導入することで分化誘導した肝細胞は、uPA 免疫不全マウスに移植することでマウス生体内に生着し、アルブミンを産生できることが明らかとなった。しかしながら、その生着効率は非常に低いものであった。一方で、

改良法で誘導した肝細胞は、uPA 免疫不全マウスへの生着が可能だけでなく、さらに生体内で増殖しているために、高いアルブミン産生につながったものと考えられる。我々は、*in vitro* において、3 遺伝子導入法で誘導した肝細胞と比較し、改良法で誘導した肝細胞は、より成熟した肝細胞であることを確認している。また、未熟で増殖活性が高い内胚葉系細胞や肝幹前駆細胞を移植したマウスの血中からはヒトアルブミンが検出されないか、非常に低い濃度であった。以上の結果から、肝幹前駆細胞等の未熟な細胞よりも、より成熟した肝細胞が移植には適しているものと推察される。したがって、キメラマウスを肝炎ウイルスの感染実験や薬物代謝実験へ応用するため、より高いレベルの置換効率を達成するには、更に成熟した肝細胞を移植することが有用であると考えられる。今後は肝細胞の成熟化に関して培養条件（3 次元培養等）等を検討することにより、キメラマウスの作出に適した成熟した肝細胞の分化誘導法の開発を試みるとともに、誘導した肝細胞を用いた肝細胞移植法を開発する必要があるものと思われる。

E. 結論

Ad ベクターによる機能遺伝子導入を利用して作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を uPA 免疫不全マウスへ移植することで、キメラマウスを作出することに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation of human iPS cells by gene transfer. *Methods. Mol. Biol.*, 826: 115-124, 2012
- 2) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka

A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.*, 20:127-137, 2012.

- 3) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 416: 119-124, 2011.
- 4) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*, 6, e21780, 2011.
- 5) Kawabata K., Takayama K., Nagamoto Y., Saldon M. S., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *J. Stem Cell Res. Ther.*, in press.
- 6) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol.*

Ther., 19, 400-407, 2011.

7) Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa H, Furue-Kusuda M, Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell. Reprogram.*, 12, 501-507; 2010

8) 川端健二、田代克久、水口裕之. iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、*薬学雑誌*、130、1527-1534, 2010

2. 学会発表

1) 高山和雄、稲村充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：FOXA2・HNF1 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、札幌。

2) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之：3 次元共培養法によるヒト ES・iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、札幌。

3) 水口裕之：遺伝子導入技術を駆使したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用、第 26 回長崎 DDS・再生医療研究会、2011 年 12 月 9 日、長崎。

4) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue,

Hiroyuki Mizuguchi: Efficient generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by HNF4 α transduction, 第 26 回日本薬物動態学会年会、2011 年 11 月 16-18 日、長崎。

5) 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之：幹細胞への高効率遺伝子導入技術を利用した分化誘導法の開発、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011 年 10 月 22 日、神戸。

6) 水口裕之：遺伝子導入技術を駆使したヒト ES/iPS 細胞から肝臓細胞への分化誘導、第 28 回日本小児肝臓研究会、2011 年 7 月 16 日、筑波。

7) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: HNF4 α promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts., The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011

8) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction., International Society for Stem Cell Research, Tronto, June, 2011

9) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山

和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：
HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞から
の成熟肝細胞への高効率分化誘導，第 18 回肝細胞
研究会、2011 年 6 月 24-25 日、東京。

10) 川端健二、水口裕之：遺伝子導入を用いた iPS 細胞
の肝細胞への高効率分化誘導法，第 10 回日本
再生医療学会総会、2011 年 3 月、東京。

11) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山
和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：
SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞から
の内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘
導、第 10 回日本再生医療学会総会、2011 年 3
月、東京。

12) 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之：幹
細胞の分化誘導系におけるアデノウイルスベク
ターの有用性，第 60 回日本薬学会近畿支部総
会・大会、2010 年 10 月、大阪。

13) 高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井
文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之：
SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞から
の内胚葉および胚体外内胚葉への選択的な分化
誘導、第 9 回次世代を担うファーマ・バイオフ
ォーラム 2010、2010 年 10 月、京都。

14) 稲村充、川端健二、高山和雄、田代克久、形山
和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：
HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS
細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導，第
16 回肝細胞研究会、2010 年 6 月、秋田。

15) 高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井
文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之：
SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞から

の内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘
導，第 16 回肝細胞研究会、2010 年 6 月、秋田。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

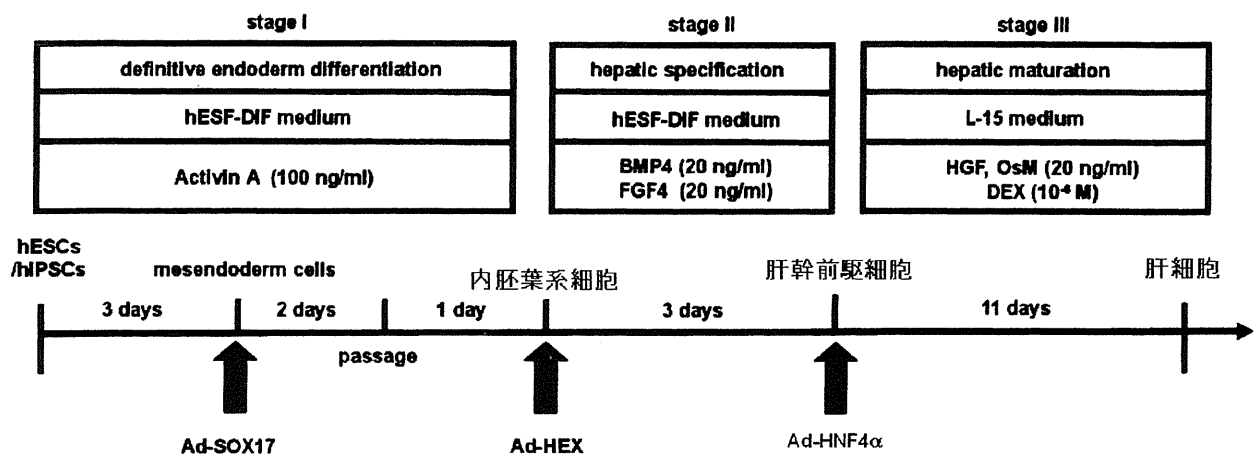


図1 Adベクターを利用した3遺伝子導入によるヒトiPS細胞からの肝細胞誘導法

A uPA 免疫不全マウス

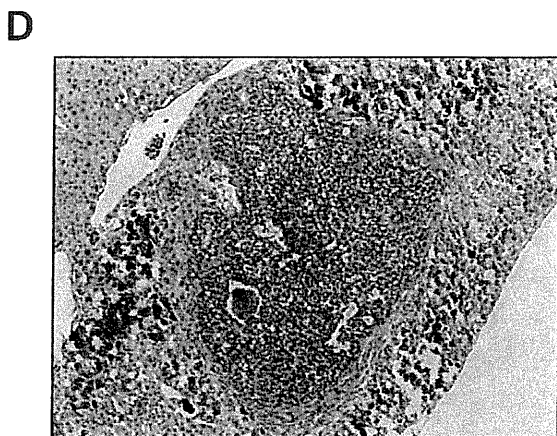
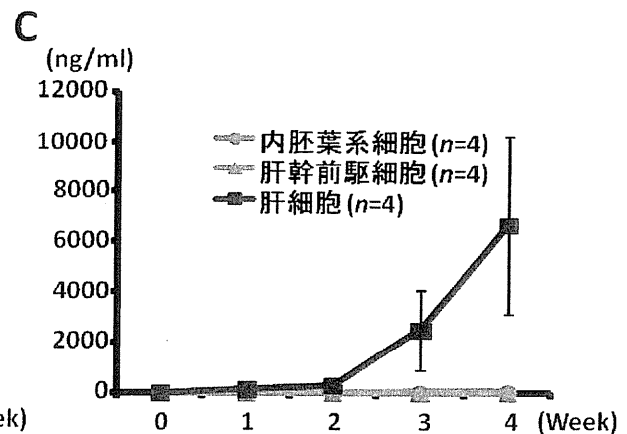
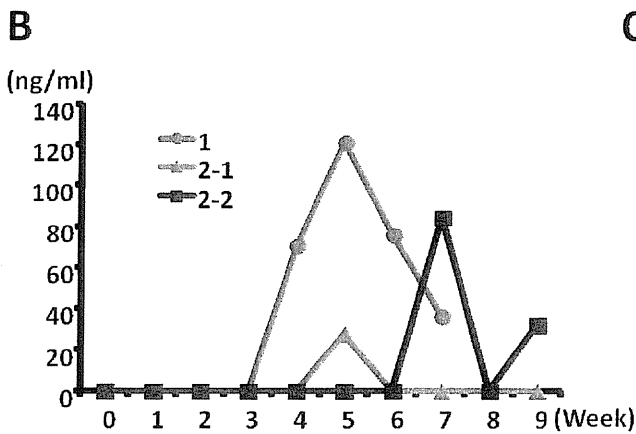
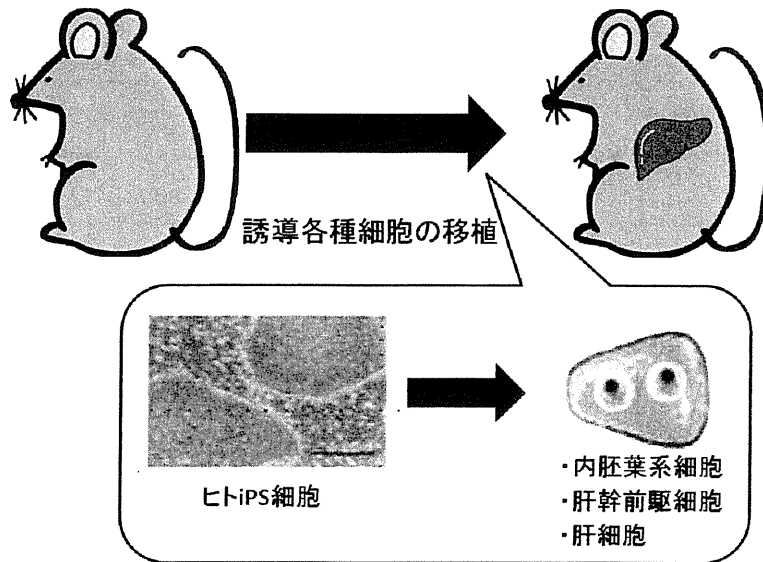


図2 ヒトiPS細胞由来肝細胞のuPA免疫不全マウスへの移植実験

- (A) 2-4週齢のuPA免疫不全マウスへ、Adベクターを用いて誘導した、ヒトiPS細胞由来の各種細胞を脾臓経路で移植を行った。
- (B and C) ヒトiPS細胞由来の各種細胞を移植後、経時的に採血を行い、血中ヒトアルブミン濃度をELISAによって測定した。それぞれ(B)3遺伝子導入法、(C)2遺伝子導入法で分化誘導を行った。
- (D and E) 2遺伝子導入法で分化誘導したヒトiPS細胞由来肝細胞を移植後、26日目に解剖し、肝臓切片を作製、免疫抗体染色によりヒトアルブミン(C)、ヒトCK8/18(D)陽性細胞をそれぞれ検出した。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 池田 一雄

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, <u>Ikeda K</u> , Kawada N.	MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis.	Gut		In press	2012
Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, <u>Ikeda K</u> , Kawada N.	Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b	Biochem Biophys Res Commun	412	74-79	2011
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, <u>Ikeda K</u> , 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.	226	2535-2542	2011
Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, <u>Ikeda K</u> , Yoshizato K, Kawada N.	Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice.	Am J Pathol.	179	1050-1060	2011
Miyaki T, Nojiri S, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Iio E, Takahashi S, Yan G, <u>Ikeda K</u> , Joh T.	Pitavastatin inhibits hepatic steatosis and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats.	Hepatol Res..	41	375-385	2011
Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, <u>Ikeda K</u> , Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y.	Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice.	Gastroenterology	137	1459-1466	2009

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Ohdan H, Chayama K.	Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse.	Hepatology.			In press
<u>Yoshizato K</u> , Tateno C, Utoh R.	Mice with Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing.	Curr Drug Discov Technol.	9	63-76	2012
Sekiya Y, Ogawa T, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b.	Biochem Biophys Res Commun.	Aug 19; 412(1)	74-9	2012
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, <u>Yoshizato K</u> , 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.	Oct; 226(10)	2535-42	2011
Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, <u>Yoshizato K</u> , Kawada N.	Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice.	Am J Pathol.	Aug; 179(2)	1050-60	2011
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, <u>Yoshizato K</u> , 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.	Sep 2;54(3)	781-8	2011

Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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	2011
Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, <u>Yoshizato K</u> .	Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure.	J Surg Res.	May 1;167(1)	e29-37	2011
Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, <u>Yoshizato K</u> .	Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver.	Endocrinology.	Apr;152 (4)	1479-91	2011
Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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.	Jul;55(1)	11-8	2011
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, <u>Yoshizato K</u> , 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.	May; 54(5)	872-8	2011

Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, <u>Yoshizato K</u> .	Hepatic hyperplasia associated with discordant xenogeneic parenchymal-nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice.	Am J Pathol.	177 (2)	654-665	2010
Ogawa T, Fujii H, <u>Yoshizato K</u> , Kawada N.	A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits.	Am J Pathol.	177 (1)	153-165.	2010
Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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(Pt 7)	1668-1677	2010
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun	391(1)	316-21	2010
Kubo S, Kataoka M, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumar E, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N	In Vivo Stable Transduction of Humanized Liver Tissue in Chimeric Mice via High-capacity Adenovirus-Lentivirus Hybrid Vector.	Hum Gene Ther.	21	40-50	2010
<u>Yoshizato K</u> , Tateno C.	A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans.	PPAR Research	2009	1-11	2009
Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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	51(6)	1046-54	2009

Nishie M, Tateno C, Utoh R, Kohashi T, Masumoto N, Kobayashi N, Itamoto T, Tanaka N, Asahara T, <u>Yoshizato K.</u>	Hepatocytes from fibrotic liver possess high growth potential in vivo.	Cell Transplant.	18 (5)	665-675	2009
Yoshizato K, Tateno C	In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse.	Expert Opin Drug Metab Toxicol.	5(11)	1435-1446	2009
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, <u>Yoshizato K.</u> , Chayama K.	G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection.	J Infect Dis.	1;199 (11)	1599-1607	2009
Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, <u>Yoshizato K.</u> , Nebert DW.	CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines.	Toxicol Appl Pharmacol.	15; 237 (1)	119-126	2009
Zion O, Genin O, Kawada N, <u>Yoshizato K.</u> , Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Halevy O, Pines M.	Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention.	Pancreas.	38 (4)	427-435	2009

研究分担者 立野 知世

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
加国雅和, <u>立野知世</u>	ヒト肝細胞置換 ヒト型マウス	小幡裕一, 城石俊彦, 芹川忠夫, 田中啓二, 米川博通	SERIES モデル 動物利用マニ ュアル 生物機能モデ ルと新しいリ ソース・リサ ーチツール	株式会社 エル・アイ・ シー	東京	2011	436-444

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, <u>Tateno C</u> , Hori 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
Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, <u>Tateno C</u> , 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
Utoh R, <u>Tateno C</u> , 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.	American Journal of Pathology	177	654-665	2010
Kikuchi R, McCown M, Olson P, <u>Tateno C</u> , Morikawa Y, Kato Y, Bourdet D, Monshouer M, and Fretland AJ.	Effect of HCV infection on the mRNA expression of drug transporter and cytochrome P450 enzymes in chimeric mice with humanized liver	Drug Metabolism and Disposition	38	1954-1961	2010
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 <u>Tateno C</u> .	In Vitro Evaluation of Cytochrome P450 and Glucuronidation Activities in Hepatocytes Isolated from Liver-Humanized Mice.	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	25	539-550	2010
Kubo S, Kataoka M, <u>Tateno C</u> , 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.	Human Gene Therapy	21	40-50	2010

Yoshizato K, <u>Tateno C</u> .	A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans.	PPAR Research	2009	1-11	2009
Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, <u>Tateno C</u> , 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	51	1046-1054	2009
Yamasaki H, Kuribayashi S, Inoue T, <u>Tateno C</u> , Nishikura Y, Oofusa K, Harada D, Naito S, Horie T, Ohta S	Approach for in vivo protein binding of 5-n-butyl-pyrazolo [1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry	Chemical research in toxicology	23	152-158	2009

研究分担者 寺岡 弘文

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	60(1)	7-17	2012
Ozeki R, et al.	Hepatic stellate cells mediate differentiation of dendritic cells from monocytes	Journal of Medical and Dental Sciences	59(1)	43-52	2012
Atsumi Y, et al.	Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells	PLoS ONE	6(8)	e23432 (10 pages)	2011
Ichijima Y, et al.	DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development	PLoS ONE	5(1)	e8821 (10 pages)	2010

Masaki H, et al.	DPPA4 modulates chromatin structure via association with core histone H3 and DNA in mouse embryonic stem cells	Genes to Cells	15(4)	327-337	2010
Sakasai R, et al.	Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia- mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison	Journal of Biological Chemistry	285(20)	15201-15208	2010

研究分担者 田中 靖人

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Viro.	86(4)	2143-2152	2012
Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneke K, Sata T, Mizokami M, Wakita T.	Replication and Infectivity of a Novel Genotype 1b Hepatitis C Virus Clone. Microbiol Immunol.	in press			2012
Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Higashi 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.	Hepato Res.	41(6)	505-511	2011

Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, <u>Tanaka Y</u> , Korba B, Chu C K.	Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants.	Bioorg Med Chem Lett.	21(21)	6328-6331.	2011
Sa-Nguanmoo P, <u>Tanaka Y</u> , Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Povorawan Y.	Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes.	Virus Res.	158(1-2)	209-15.	2011
Kusumoto S, <u>Tanaka Y</u> , Ueda R, Mizokami M.	Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-plus-steroid combination chemotherapy.	J Gastroenterol.	46(1)	9-16.	2011.
Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, <u>Tanaka Y</u> , Mizokami M, Yokosuka O.	Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion.	J Hepatol.	54(1)	19-25.	2011.
Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, <u>Tanaka Y</u> , 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.	41(1)	1-21.	2011.
Yuen MF, Ka-Ho Wong D, Lee CK, <u>Tanaka Y</u> , Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugouchi 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.	52(5)	624-32.	2011.
Yoshida T, Kusumoto S, Inagaki A, Morifuji F, Ito A, Ri M, Ishida T, Komatsu H, Iida S, Sugauchi F, <u>Tanaka Y</u> , Mizokami M, Ueda R.	Reactivation of hepatitis B virus in HBsAg-negative patients with multiple myeloma: two case reports.	Int J Hematol.	91(5)	844-849.	2010.