

レイ解析を基にして、分化段階の進行と共に発現上昇する遺伝子の中から HCV 感染・複製に必要な遺伝子を探索できれば宿主因子をターゲットとした創薬につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yagi K, Hayashi T. Cutting-edge research on hepatitis C treatment and the clinical perspectives. *Yakugaku Zasshi*, 130, 141-142, 2010.
2. 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*. 2011, 416(1-2):119-124.
3. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, Yagi K. Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(10):e64.
4. Yoshida T, Kondoh M, Yagi K. Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem*, 2011, 18(8):1239-1244.
5. Sakurai, F., Furukawa, N., Higuchi, M., Okamoto, S., Ono, K., Yoshida, T., Kondoh, M., Yagi, K., Sakamoto, N., Katayama, K., and Mizuguchi, H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a *Virus Res*. 2012, 165(2):214-218.

2. 学会発表

1. 吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁. RNA polymerase I 発現系を利用した HCV 複製評価系の開発. 第 17 回肝細胞研究会、平成 22 年 6 月、秋田
2. Yoshida T, Satoh F, Kondoh M, Mizuguchi H, Yagi K. Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication. 50th annual meeting of the American society for cell biology. December 11-15, 2010. Philadelphia, USA.
3. 山岸喜彰、吉田孟史、近藤昌夫、八木清仁. 感染

受容体発現バキュロウイルスを用いた HCV 感染機構の解析. 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

4. 吉田孟史、佐藤芙美、渡利彰浩、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁、RNA ポリメラーゼ I 発現系を利用した長鎖 RNA 発現ベクターの開発. 第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月、東京
5. Yoshida, T., Satoh, F., Akihiro, W., Kondoh, M., Mizuguchi, H., Sakamoto, N., Yagi, K. Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. HCV 2011. September 8-12. Seattle, USA.
6. 八木清仁、吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を利用した C 型肝炎ウイルスの複製・感染評価、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月、札幌
7. 山根誠司、吉田孟史、高山和雄、近藤昌夫、櫻井文教、谷英樹、坂本直哉、松浦善治、水口裕之、八木清仁、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HCV 感染モデルの作製. 日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月、札幌
8. Yamane, S. Yoshida, T., Takayama, K., Kondoh, M., Sakurai, F., Mizuguchi, H., Yagi, K. Human iPS-derived hepatocyte-like cells as a model for hepatitis C virus infection. *Experimental Biology* 2012. April 21-25. San Diego. USA
9. Yagi, K., Yoshida, T., Yamane, S., Takayama, K., Watari, H., Kondoh, M., Sakurai, F., Sakamoto, N., Matsuura, Y., Mizuguchi, H., Yagi, K. Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes. HCV 2012. October 5-9. Venice, Italy.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
無
2. 実用新案登録
無
3. その他
無

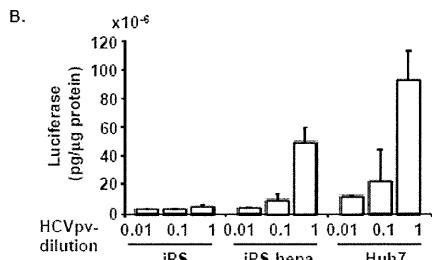
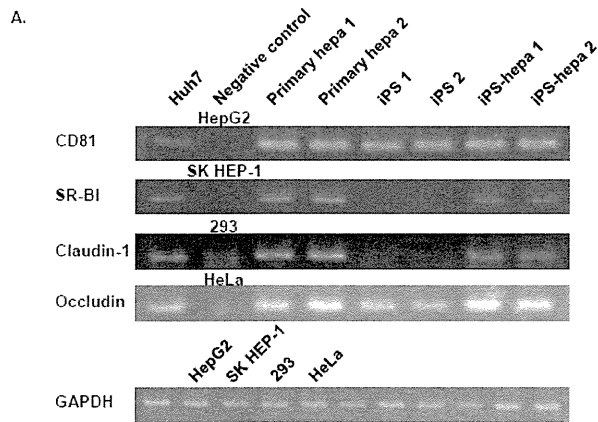


Figure 1 Infection of HCVpv with iPS cells and iPS-derived hepatocyte cells.

A) Expression of HCV entry receptors in iPS cells and iPS-hepa cells. Total RNA was extracted from the cells. Expression of HCV receptors mRNAs were detected by RT-PCR analysis as described in materials and methods. Huh7 cells were used as a positive control. HepG2, SK-HEP-1, 293 and HeLa cells were used as a negative control for CD81, SR-BI, occludin and claudin-1, respectively. B) Infection of HCVpv in iPS and iPS-hepa cells. The cells were treated with HCVpv for 2 h at the indicated dilution ratio. After 24 h of treatment, the luciferase activity was measured. The luciferase activity was normalized by the cellular protein levels. Data are means \pm SD (n=3).

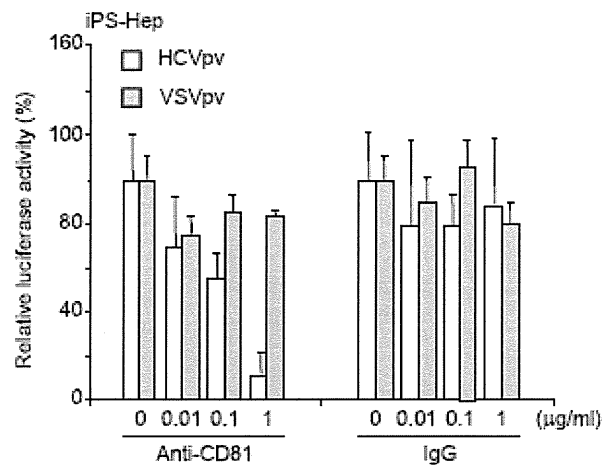


Figure 2 Effect of anti-CD81 antibody on infection of iPS-Hep cells with HCVpv. iPS-Hep cells were treated with mixtures of HCVpv (open column) or VSVpv (gray column) and anti-CD81 antibody or control mouse IgG at the indicated concentrations. After a 2-h incubation, the cells were cultured with fresh medium for 24 h. Then, the luciferase activities were measured. Data represent the percentage of vehicle-treated cells. Data are presented as means \pm SD (n = 3).

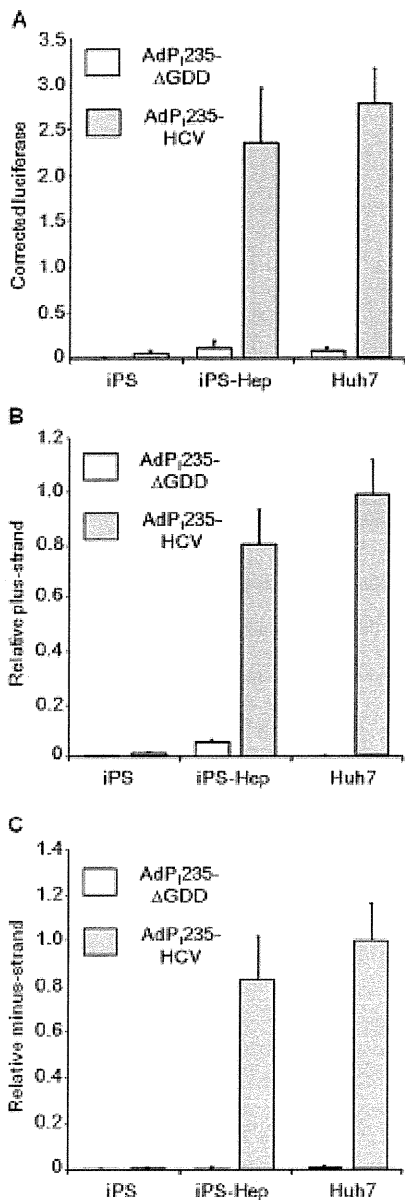


Figure 3 HCV replication and inhibition assay in iPS-Hep cells. (A-C) HCV replication assay in iPS-Hep cells. (A) Comparison of replication of HCV subgenomic replicons, AdP₂₃₅-HCV (gray column) and AdP₂₃₅-DGDD (open column), in iPS, iPS-Hep and Huh7 cells. The cells were infected with replicons, treated with Dox, and renilla luciferase activity was measured. To normalize for infectivity of Ad vector, cells were co-infected with AdP₂₃₅-fluc and Ad-tTA. After 72 h, firefly luciferase activity was measured. Corrected luciferase activity was calculated as the ratio of renilla luciferase activity to firefly luciferase activity. (B, C) Real-time PCR analysis of HCV plus- (B) and minus- (C) strand RNA in iPS-Hep cells. iPS-Hep cells were infected with replicons, and total RNA was subjected to real-time PCR analysis. The copy numbers were shown as ratio of those of Huh7. Data are presented as means ± SD (n=3).

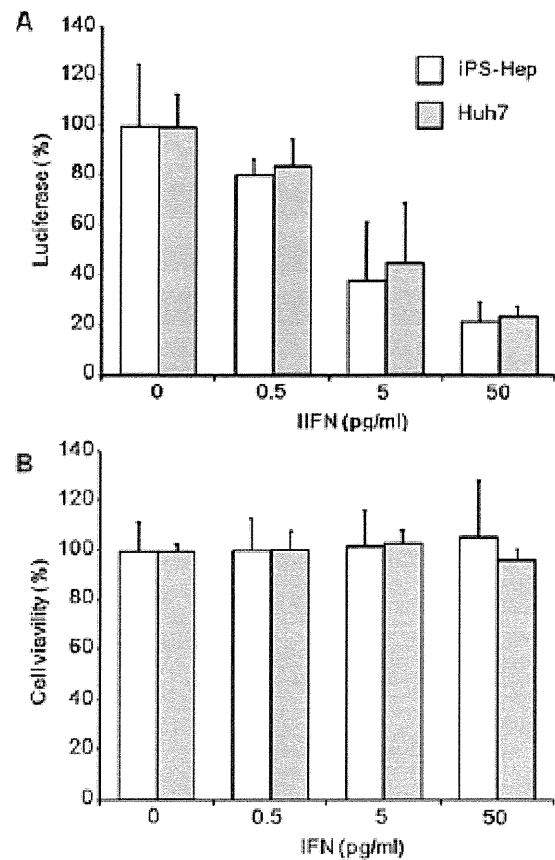


Figure 4 Effect of interferon on HCV replication in iPS-Hep cells. iPS-Hep (open column) and Huh7 (gray column) cells were infected with AdP₂₃₅-HCV and Ad-tTA. After 24 h, the cells were treated with Dox and the indicated concentration of interferon for 48 h. Luciferase activities (A) and cell viabilities (B) were measured. Data represent the percentage of the value for vehicle-treated cells, and are presented as means ± SD (n = 3).

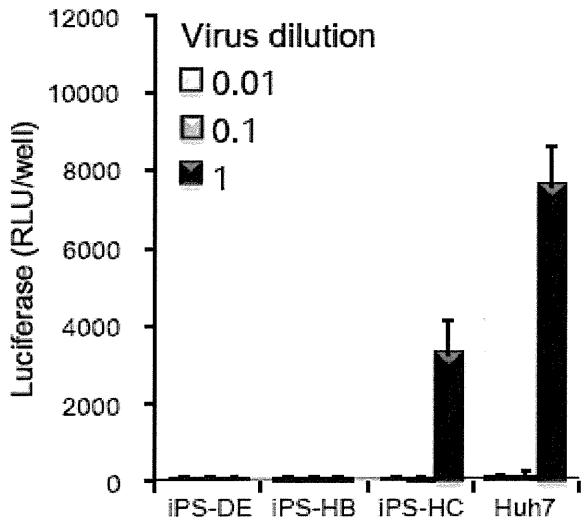


Figure 5. HCV infection assay in iPS-derived cells. iPS-derived definitive endoderm (iPS-DE), hepatoplast (iPS-HB), and hepatocytes (iPS-HC) were infected with HCVpv at the indicated dilution. After 2h of infection, the cells were cultured with fresh medium for 24h. Then luciferase activities were measured. Data are presented as means \pm SD (n=3).

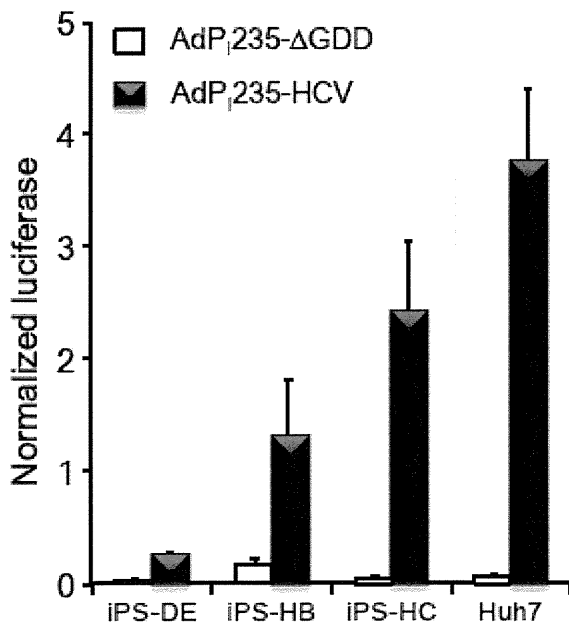


Figure 6. HCV replication assay in iPS-derived cells. HCV subgenomic replicon, AdP₂₃₅-DGDD(open) and AdP₂₃₅-HCV(closed), was introduced into iPS-derived definitive endoderm (iPS-DE), hepatoplast (iPS-HB), and hepatocytes (iPS-HC). Cells were treated with doxycycline, and renilla luciferase activities were measured.

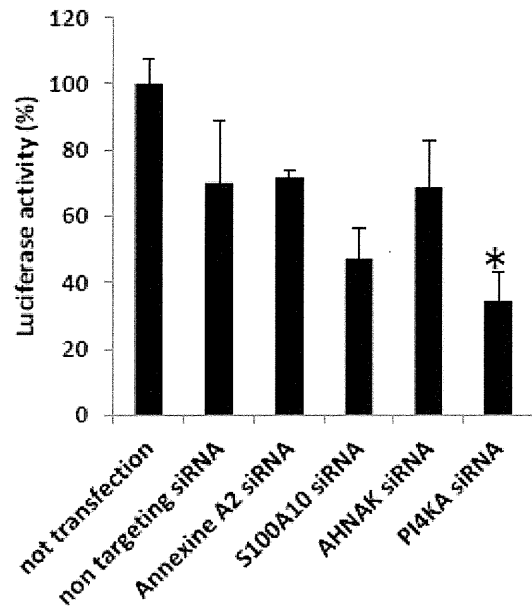


Figure 7. Huh7.5.1bFeo cells were treated with each siRNA for 72h. Luciferase activities were then measured. * p <0.05 not transfection vs non targeting siRNA

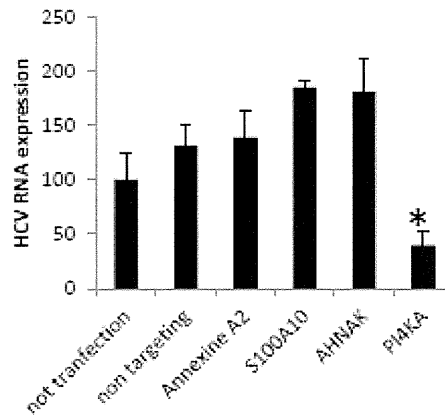


Figure 8. Huh7.5.1bFeo cells were treated with each siRNA for 72h. RNA was then extracted to prepare the cDNA, and real-time PCR was carried out to analyse the specific RNA content. The value was normalized by GAPDH mRNA content. * p <0.05 not transfection vs non targeting siRNA

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

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科

分担研究課題：ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製および C 型肝炎ウイルス研究への応用

研究要旨： 本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の新規解析法開発を行うことを目的とする。そのため、遺伝子導入技術を活用して、ヒト iPS 細胞から肝細胞への効率の良い分化誘導法を開発した。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞をさらに成熟化させるために、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程において、ナノピラープレート（日立ハイテック（株）から供与）を用いた三次元培養を行った。さらに、ヒト iPS 細胞から肝細胞への各分化段階の細胞における性質を詳細に評価するため、未分化ヒト iPS 細胞、内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞で DNA マイクロアレイ解析を実施した。大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における C 型肝炎ウイルス（HCV）感染・複製に関する遺伝子の発現の解析を実施した。

研究協力者

八木清仁 大阪大学大学院薬学研究科
近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科
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
形山和史 大阪大学大学院薬学研究科
田代克久 (独)医薬基盤研究所
稲村 充 大阪大学大学院薬学研究科
(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

A. 研究目的

現在世界には約 2 億人、日本には約 150～200 万人の C 型肝炎患者およびキャリア（持続感染者）がおり、慢性肝炎、肝硬変、肝がんなどの患者の 70%以上が HCV 感染患者であり、年間 3 万人が肝がんにより亡くなっている。現在、HCV 感染患者に対する治療法として、インターフェロン（IFN）療法が汎用されている。しかしながら、日本での HCV 感染患者の約 70%を占める HCV 遺伝子型 1 型感染患者に対しては、IFN 療法

の効果が弱いことが問題となっている。保有 HCV ウイルス量の多い難治性 1b 型患者に対しては既存薬剤療法（ペグインターフェロン/リバビリン併用療法）の奏効率が約 45%であること、インターフェロン投与による副作用発現により投与の中断を余儀なくされる場合があること、各種薬剤耐性ウイルスが出現することから、C 型肝炎の克服には宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットを同定することが急務となっている。

そこで本研究では、iPS 細胞技術の創薬応用を目的に、まず(1)ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させる技術を、我々が独自開発した次世代アデノウイルス（Ad）ベクター技術を駆使して開発し、分化誘導した肝細胞の応用として、(2) 大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、C 型肝炎をはじめとする肝炎克服研究のための *in vitro* 基盤技術（評価系）開発を行う。分化誘導状態の異なるヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて肝炎ウイルス感染能および複製能を解析することで、肝炎ウイルス感染・複製に関与する宿主因子の同定や宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析でき、肝炎ウイルス治療薬創

出に資する新規創薬ターゲットの同定につながることで期待される。

本研究では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に対して肝関連転写因子の遺伝子導入を行うことによって、肝分化を促進する遺伝子のスクリーニングを実施し、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子を導入することによって、肝分化を促進できることを明らかにした。さらに、上記の分化誘導方法で作製した細胞をナノピラープレートを用いて三次元培養することによって、さらに肝機能の高いヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製を試みた。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞への各分化段階の細胞を詳細に解析するために、未分化ヒト iPS 細胞、内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞において DNA マイクロアレイ解析を実施した。一方、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループにおいて、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV のレセプター発現や感染・複製に関する検討を実施した。

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 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子、ヒト SRV-box containing gene 17 (SOX17) 遺伝子、hematopoietically expressed homeobox runt-related transcription factor (HEX) 遺伝子、forkhead box protein A2 (FOXA2) 遺伝子、hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 α) 遺伝子、HNF1 β 遺伝子、HNF4 α 遺伝子あるいは HNF6 遺伝子を挿入した。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-LacZ、pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-K7-EF-FOXA2、pAd-K7-EF-HNF1 α 、pAd-K7-EF-HNF1 β 、pAd-K7-EF-HNF4 α 、pAd-K7-EF-HNF6 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) あるいは SuperFect (Qiagen 社) Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いてヒト胎児腎細胞由来細胞である 293 細胞にトランスフェクションすることにより、

AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-SOX17、AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HEX、AdK7-EF-HNF1 α 、AdK7-EF-HNF1 β 、AdK7-EF-HNF4 α 、AdK7-EF-HNF6 を作製し、定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。各 Ad ベクターの物理学的 (particle) タイターは Maizel らの方法により測定した。

B-2. 内胚葉系細胞、肝幹細胞、肝細胞への分化誘導および肝関連転写因子のスクリーニング

ヒト ES 細胞 (H9) やヒト iPS 細胞 (201B7、Tic、Dotcom) を分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 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 ES/iPS 細胞を回収した後、6 因子 (10 μ g/mL human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanalamine、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-GRO (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、各 Ad ベクター (AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-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。24 時間後に X-gal 染色により遺伝子導入効率を、48 時間後に免疫抗体染色により内胚葉分化効率を測定した。

次にヒト ES/iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を各 Ad ベクター (AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-HEX ; 3,000 VP/cell) で作用させた後、10 ng/mL FGF4 (R&D systems 社) と 10 ng/mL BMP4 (R&D systems 社) を含んだ hESF-DIF 培地で 9 日間培養し、肝幹前駆細胞を得た。

ヒト ES/iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞を各 Ad ベクター (AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-HNF4 α ; 3,000 VP/cell) で作用させた後、10 ng/mL FGF-4、10 ng/mL HGF (R&D Systems 社)、10 ng/mL Oncostatin M (R&D Systems 社)、 10^{-7} M dexamethasone (Sigma 社) を添加した hepatocyte

culture medium (Lonza 社) で9日間培養し肝細胞への分化効率の測定および機能性の評価を行った。

肝分化を促進する遺伝子のスクリーニング実験においては、上記と同様に、中内胚葉系細胞、内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞に SOX17、FOXA2、HEX、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、HNF6 を発現する Ad ベクターを感染させ分化能を検討した。

B-3. ヒト ES/iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 H9 (WA09) (WISC Bank, WiCell Research Institute) は 5 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学工業社)を含む霊長類 ES 細胞用培地である ReproStem (リプロセル社) を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞(MEF、ミリポア社)上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Dotcom は 10 ng/mL の bFGF を含む iPS 細胞用培地である iPSellon (カルディオ社) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。5-7 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼ (Roche 社) を用いてヒト ES/iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

B-4. FOXA2 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

前述と同様に、分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 hESF9 で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase cell detachment solution (日本ベクトン・ディッキンソン社) を用いてヒト ES/iPS 細胞を回収後、100 ng/ml Activin A (R&D systems 社)および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地(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 (すべて Sigma 社より購入))を含む 霊長類 ES 細胞用分化誘導基礎培養液である hESF-DIF (株式会社細胞科学研究所)に懸濁後、50 μ g/cm² Matrigel (日本ベクトン・ディッキンソン社) でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 プレート) (住友ベークライト社) の各ウェルに 6.25 \times 10⁴ cells/cm² の細胞密度で播種したのち、2

日間培養することで中内胚葉を得た。得られた細胞に各 Ad ベクター(AdK7-EF-FOXA2)を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で 90 分間作用させた。培地は 100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いた。その後、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いて毎日培地交換を行い、5 日目まで培養した。

B-5. 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-4.に記載された方法に準じて分化誘導した内胚葉 (培養 5 日目) を、0.05% trypsin-0.053 mM EDTA で細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、50 μ g/cm² Matrigel でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 プレート) の各ウェルに 1.25 \times 10⁵ cells/cm² の細胞密度で播種した。継代した翌日に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1 α) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させたのち、20 ng/ml FGF4 (R&D systems 社)、30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D systems 社) を含む HCM Hepatocyte Culture Medium (Lonza 社) に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、9 日目まで培養した。

B-6. ナノピラープレートを用いた肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3. および B-4.に記載された方法に準じて 9 日間培養して分化誘導した肝幹前駆細胞に各 Ad ベクター(AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1 α)をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で 90 分間作用させた後、10 ng/ml FGF1 (R&D systems 社)、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10 (R&D systems 社)、10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (R&D systems 社) を含む HCM に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin-0.053 mM EDTA を用いて細胞を

剥離したのち回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF（すべて 10 ng/ml の濃度で使用）を含む HCM に懸濁後、20 μ g/cm² Matrigel でコーティングした日立ナノピラー細胞培養 12 well プレート（日立ハイテクノロジーズ社）の各ウェルに 2.5×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種した。1 日後に Ad ベクター（AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1 α ）をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M（OsM、R&D systems 社）、10 ng/mL FGF4、 10^{-6} M Dexamethazone（DEX、Sigma 社）を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、13 日間（培養 12 日目から培養 25 日目まで）培養した。分化誘導肝細胞をさらに成熟化させるため、Matrigel を分化誘導肝細胞の上に重層化させた。0.25 mg/mL Matrigel、4 mM L-Glutamine、50 μ g/mL gentamycin sulfate、 1×10^{-5} ITS（BD Biosciences 社）、20 ng/mL OsM、 10^{-6} M DEX を含む William's E Medium（Invitrogen 社）（以下、Matrigel Working Solution とする）を 4°C で作製した。培養 25 日目の各 well に対して、1 mL の Matrigel Working Solution を添加し、24 時間培養した。培養 26 日目に余分な Working Solution を除去したのち、20 ng/mL Oncostatin M（OsM、R&D systems 社）、 10^{-6} M Dexamethazone（DEX、Sigma 社）を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、9 日間（培養 26 日目から培養 35 日目まで）培養した。なお、単層培養で分化誘導肝細胞を作製する場合は、我々の過去の報告（K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.）にしたがって作製した。

B-7. 定量的リアルタイム PCR

各細胞集団から ISOGEN (Nippon gene 社) を用いて Total RNA を抽出した。ヒト初代培養肝細胞(CellDirect 社 (ロット: Hu8072)) もしくは Xenotech 社 (ロット: HC2-14 および HC10-101)) は 15 μ g/cm² type I-A collagen (新田ゼラチン社) をコートした細胞培養用 12 プレートの各ウェルに 1.2×10^5 cells/cm² の細胞密度で 10% FCS (GIBCO-BRL 社) を含む HCM で播種したのち、6 時間後に一度上記培地で培地交換し、合計 48 時間培養した。各 Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen

社) を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。定量的リアルタイム PCR による解析は Taqman gene expression assays (Applied Biosystems 社) を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems 社) により定量した。

B-8. アルブミン・尿素産生能の評価

分化誘導肝細胞および 48 時間培養したヒト初代培養肝細胞について、培地交換したのち 24 時間後に培地を回収し、産生されたアルブミン量を Human Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories 社)、産生された尿素量を QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems 社) を用いて測定した。アルブミンおよび尿素産生量は総タンパク量で補正した。なお、総タンパク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific 社) を用いた。

C. 研究結果

本研究では、肝細胞への分化効率を改善するため、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変 Ad ベクター）を用いて時期特異的に一過性に過剰発現させることで、肝細胞への分化効率の飛躍的な向上を目指した（プロトコールについては Figure 1 参照）。

その結果、中内胚葉細胞への SOX17 遺伝子導入により内胚葉のマーカーの c-Kit 陽性・CXCR4 陽性の細胞 population が上昇し、肝分化能が高い HEX 陽性内胚葉の population も上昇した。また、内胚葉細胞に HEX 遺伝子を導入することで、AFP (α フェトプロテイン) 陽性細胞の出現が上昇し、さらに AFP 陽性の肝幹前駆細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することで、アルブミン陽性細胞の出現率が上昇し、約 80% の細胞がアルブミン陽性となった。また、CYP3A4、CYP2D6 をはじめとする薬物代謝酵素の活性レベルもヒト初代培養肝細胞と匹敵するレベルであった。

本研究により、機能性の高い肝細胞が分化誘導できたと考えられたので、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループと共同で、HCV 感染受容体の発現、

シュードウイルスを用いた HCV 感染能の評価、HCV ゲノム複製能の評価等を行った。これら HCV 関連研究の結果については、八木らの報告欄に記載した。

さらに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への各分化過程において、7 種類の肝関連転写因子 (SOX17、FOXA2、HEX、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、HNF6) を遺伝子導入するスクリーニングを実施した結果 (Figure 2)、FOXA2、HNF1 α 遺伝子を組み合わせることによって、さらなる肝成熟化が確認された。しかしながら、作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞における一部の肝機能 (cytochrome P450 酵素の活性など) がヒト初代培養肝細胞よりも劣っていた。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を創薬スクリーニング (新規 HCV 治療薬探索を含む) に応用するためには、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のさらなる成熟化が必要であることから、次にヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞をナノピラープレート (Figure 3A) 上に播種し、三次元培養を行うことで、さらなる肝成熟化を試みた。培養プロトコールは Figure 3B のとおり行った。単層培養系で作製した分化誘導肝細胞と三次元培養系で作製した分化誘導肝細胞を比較するために、継時的に両培養系の分化誘導肝細胞における肝マーカー遺伝子 (アルブミン) の発現量を調べた (Figure 4A)。その結果、単層培養系の分化誘導肝細胞では培養 20 日目にアルブミン遺伝子発現量がピークに達するのに対して、ナノピラープレートを用いた三次元培養系の分化誘導肝細胞では培養 20 日目以降もその遺伝子発現量は上昇し続け、培養 35 日目に最高値を示した。また、培養 20 日目の単層培養の分化誘導肝細胞と培養 35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞のアルブミン産生量 (Figure 4B) および尿素産生能を調べたところ (Figure 4C)、培養 35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞の方がいずれも高かった。以上の結果から、ナノピラープレートを用いた三次元培養を用いることで、従来の単層培養よりも各種肝機能の高い分化誘導肝細胞をヒト iPS 細胞から作製できることが示された。

次に、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞の性質を詳細に評価するため、未分化 iPS 細胞、内胚葉、肝幹前駆細胞、単層培養で作製した分化誘導肝細胞、三次元培養で作製した分化誘導肝細胞において DNA マイクロアレイを

実施した (Figure 5)。今後は、DNA マイクロアレイで得られた結果をさらに解析を行うことで、分化誘導肝細胞の性能確認を行うとともに、HCV 感染に関与する新規細胞内因子の同定に向けた研究を行う予定である。

D. 考察

時期特異的に FOXA2、HNF1 α 遺伝子をヒト ES/iPS 細胞から分化させた細胞に導入することで、極めて効率よく肝細胞へ分化誘導することに成功した。本研究では、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変 Ad ベクターを用いて遺伝子導入しているが、いずれの段階のヒト ES/iPS 細胞由来分化細胞においても、ほぼ 100% の遺伝子導入効率を示すことを確認しており、高い遺伝子導入能が優れた肝分化誘導能の一因であることが考えられた。分化誘導した肝細胞は、HCV の感染受容体を発現し、HCV 感染能、HCV ゲノム複製能を有することが判明し、本細胞系が HCV 研究に利用できることが明らかとなった。

さらに、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞をナノピラープレートを用いて三次元培養条件下で肝成熟化させることで、肝機能の高いヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製できることを明らかにした。これまでに、マウスおよびヒト初代培養肝細胞を用いた検討から、三次元培養することによって、各種肝機能が向上することが報告されている。本研究においても、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は三次元培養条件下で成熟化させることで、単層培養条件下よりも生体に近い環境になるため、肝成熟化が亢進したものだと考えられる。ヒト iPS 細胞由来肝細胞がより肝成熟化することによって、ヒト初代培養肝細胞にその遺伝子発現などが近づいたことから、HCV 感染受容体や複製に関連した遺伝子の発現量もよりヒト初代培養肝細胞に類似したものになったことが予想される。

来年度以降は、本研究において作製した新しいプロトコールで分化誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて HCV 感染能等を評価するとともに、分化状態の異なる細胞群 (内胚葉細胞や肝幹前駆細胞等) での HCV 感染能等の検討を行う。また、得られた DNA マイクロアレイを用いた網羅的な発現マイクロアレイの結果のさらなる解析を行うことで、分化誘導肝細胞の性能

確認を行うとともに、宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定を目指した研究を施行する予定である。

E. 結論

Ad ベクターを用いた機能遺伝子の導入によりヒト ES/iPS 細胞から内胚葉系細胞や肝幹前駆細胞、肝細胞への効率のよい分化誘導した肝細胞は、HCV 研究に使用可能なことが明らかとなった。

さらに、ナノピラープレートを用いた三次元培養技術の導入により、より肝機能の高いヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製できることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Rerogram.*, 12, 501-507 (2010)
- 2) 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)
- 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 M.K., 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) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M.K., 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)
- 6) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- 7) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
- 8) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawae T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 9) 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.*, S10:002 (2012)
- 10) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. *Methods Mol. Biol.*, 826, 115-124 (2012)
- 11) 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)
- 12) 水口裕之, 近藤昌夫, 八木清仁; iPS 細胞分化誘導による HCV 培養モデル、*肝胆臓*, 63, 919-924 (2011)

- 13) 水口裕之、高山和雄、長基康人、川端健二：ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用、*医薬品レギュラトリーサイエンス*、43、982-987(2012)
- 14) 早川堯夫、水口裕之：ヒト iPS 細胞の再生医療及び創薬研究への応用の現状と展望、*Brain and Nerve*、64、47-57 (2012)
- 15) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその創薬応用、*最新医学*、68、141-144 (2013)
- 16) 川端健二、高山和雄、水口裕之：ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発、*BIO INDUSTRY*、30、19-24 (2013)
- 17) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用、*組織培養研究*、印刷中
- 18) 水口裕之：iPS 細胞研究の道しるべ 遺伝子治療研究の貢献と教訓、*ファルマシア*、日本薬学会、48、827 (2012)
- 19) 高山和雄、川端健二、水口裕之；多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導、*再生医療業書*、日本再生医療学会監修、後藤満一・大橋一夫編集、朝倉書店、110-116 (2012)
2. 学会発表
- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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、長崎、2011 年 12 月 9 日
- 8) 水口裕之：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、ヒト ES/iPS 細胞：産業応用最前線セミナー ～細胞治療と創薬スクリーニング～ ダイアログ社セミナー、東京、2011 年 12 月 12 日
- 9) 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、札幌、2012 年 3 月 28-31 日
- 10) 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、広島、2011 年 11 月 16-18 日
- 11) 水口裕之：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、サイエンスエキスポ関西、大阪、2011 年 10 月 21 日
- 12) 水口裕之：創薬応用を目指したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発、第 1 回レギュラ

- トリーサイエンス学会学術大会、東京、2011年9月2-3日
- 13) 水口裕之: ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築、第31回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会、大阪、2011年9月1日
 - 14) 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、筑波、2011年7月16日
 - 15) 水口裕之: 創薬における iPS 細胞を活用した in vitro 毒性評価、サイエンス&テクノロジーセミナー、東京、2011年7月15日
 - 16) 水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発と in vitro 毒性評価系への応用、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2011年7月13日
 - 17) 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、東京、2011年6月24-25日
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by transduction of FOXA2 and HNF1 α , International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012年6月
 - 21) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Tachibana M., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012年6月
 - 22) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導、第85回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月
 - 23) 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、Swiss 3T3 細胞との積層3次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析、第85回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月
 - 24) 高山和雄、川端健二、稲村 充、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、c/EBP α および c/EBP β 遺伝子による TGFBR2 遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定、第19回大会肝細胞研究会、北海道、2012年6月
 - 25) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層3次元共培養下における成熟化・促進機構の解析、第19回肝細胞研究会、北海道、2012年6月
 - 26) 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 および HNF1 α 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導、第39回日本毒性学会学術年会、宮城、2012年7月
 - 27) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS

細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子
HEX の機能解明、第 62 回日本薬学会近畿支部総
会・大会、兵庫、2012 年 10 月

- 28) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M.,
Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK.,
Mizuguchi H., Generation of mature hepatocytes from
human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α
transduction、第 27 回日本薬物動態学会年会、千葉、
2012 年 11 月
- 29) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、
川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉
から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子
HEX の機能解明、第 35 回日本分子生物学会年会、
福岡、2012 年 12 月 11-14 日
- 30) 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井
文教、古江-楠田美保、水口裕之、Nanopillar プレ
ートをを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化
誘導法の開発とその毒性評価への応用、第 12 回日
本再生医療学会総会、神奈川、2013 年 3 月
- 31) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、
川端健二、水口裕之、転写因子 HEX によるヒト
ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化
機構の解明、第 12 回日本再生医療学会総会、神奈
川、2013 年 3 月

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法

出願番号：特願 2010-154225

基礎出願：特願 2009-247342 (2009/10/28)、

特願 2010-121282 (2010/05/27)

発明者：水口裕之、川端健二、稲村充、

古江美保.

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

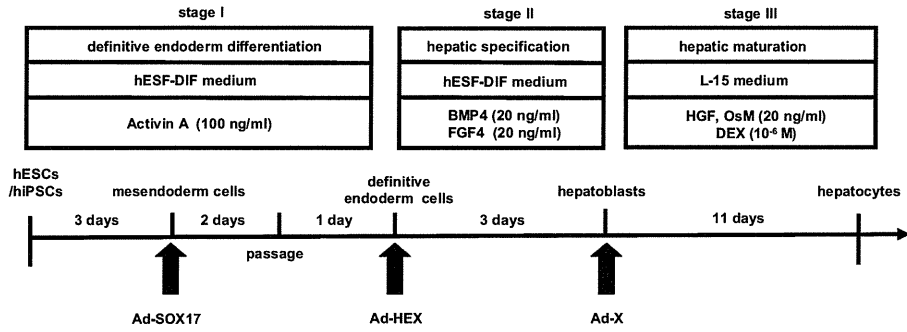


Figure 1. Hepatic differentiation of human human embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) transduced with 3 factors.

The procedure for differentiation of human ESCs and iPSCs into hepatocytes via the definitive endoderm cells and the hepatoblasts is presented schematically. The hESF-DIF medium was supplemented with 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, and 0.5 mg/ml fatty acid free BSA. The L15 medium was supplemented with 8.3% tryptose phosphate broth, 8.3% FBS, 10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate, 1 μ M insulin, and 25 mM NaHCO₃.

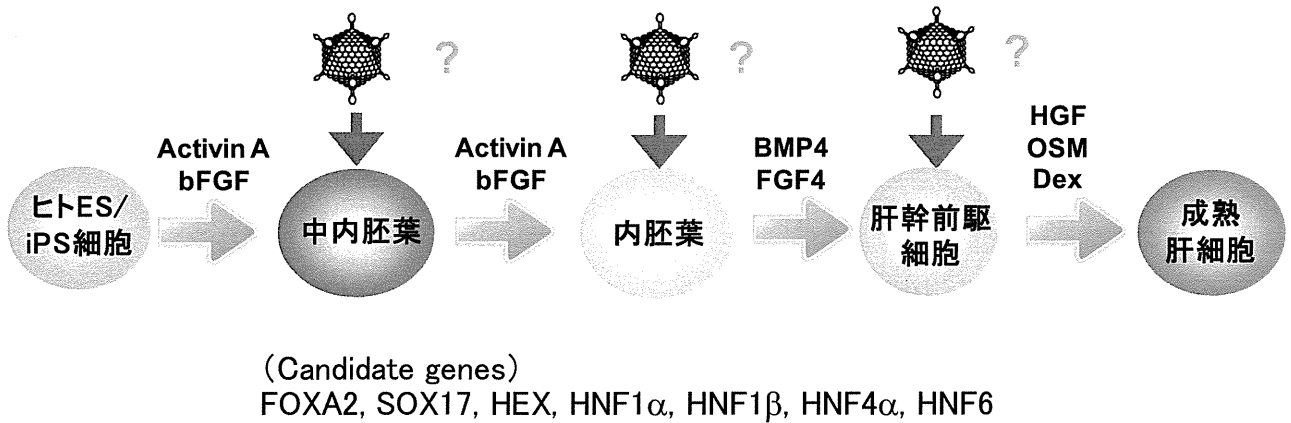


Figure 2. Screening for hepatic differentiation-promoting factors.

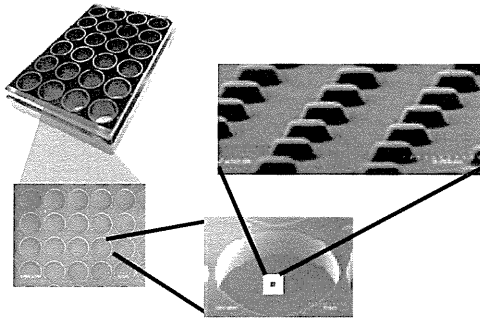
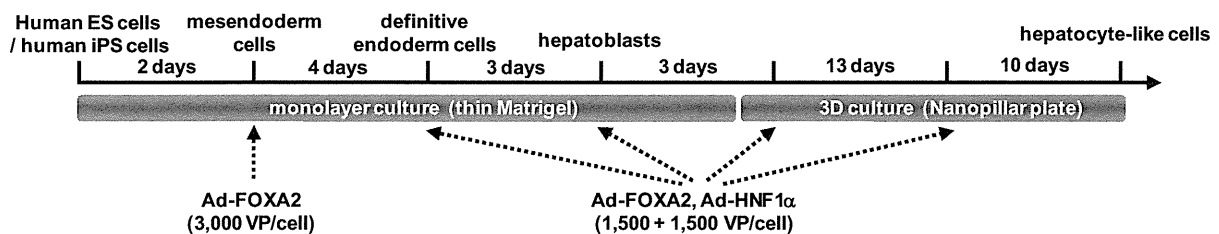
A**B**

Figure 3 Hepatocyte-like cells were differentiated from human ES/iPS cells by using Nanopillar Plate. (A) Photograph display of a 24-well format Nanopillar Plate and its microstructural appearances of the hole and pillar structure. (B) The procedure for differentiation of human ES/iPS cells into 3D-cultured human ES/iPS cell-derived hepatocyte-like cells (3D ES/iPS-hepa) via mesendoderm cells, definitive endoderm cells, and hepatoblasts is presented schematically. In the differentiation, not only the addition of growth factors but also stage-specific transient transduction of both FOXA2- and HNF1 α -expressing Ad vector (Ad-FOXA2 and Ad-HNF1 α , respectively) was performed.

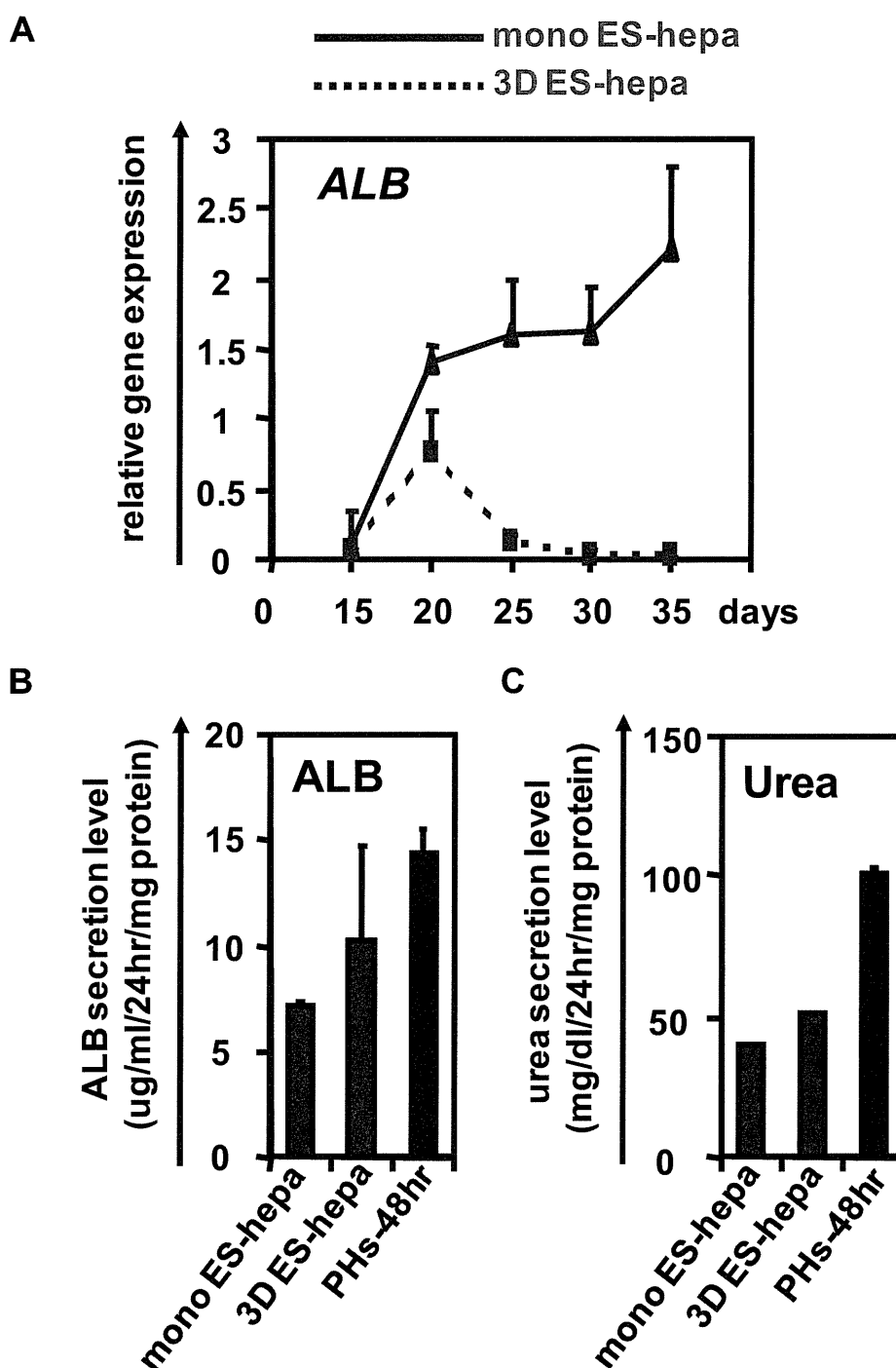


Figure 4 Hepatocyte functions in human ES cell-derived hepatocyte-like cells were enhanced by using Nanopillar Plate.

(A) The gene expression levels of *ALB* were measured by real-time RT-PCR on day 15, 20, 25, 30, and 35. On the y axis, the gene expression levels in primary human hepatocytes (three lots of primary human hepatocytes were used in all studies), which were cultured for 48 hours after plating (PHs-48hr), were taken as 1.0. (B, C) The amount of ALB (B) and urea (C) secretion were examined in the monolayer cultured human ES cell-derived hepatocyte-like cells (mono-hepa) (day 20), the 3D cultured human ES cell-derived hepatocyte-like cells (3D ES-hepa) (day 35), and PHs-48hr. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

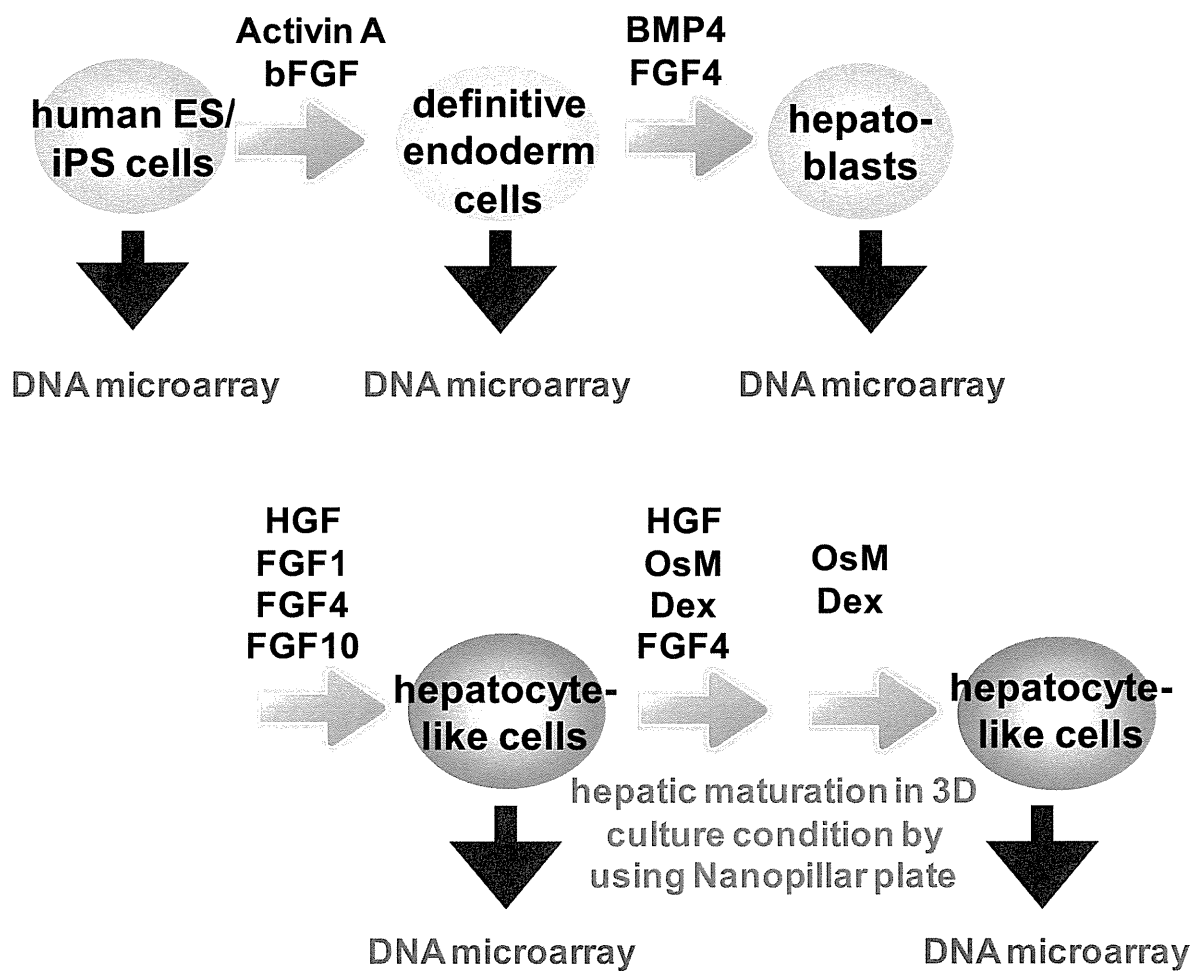


Figure 5 The gene expression profiles of human iPS cells and their derivatives were analyzed by DNA microarray.

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

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：清原知子（国立感染症研究所ウイルス第二部第五室）
研究協力者：石井孝司、李 天成（国立感染症研究所ウイルス第二部第五室）

分担研究課題：HBV 増殖系及び HEV 培養系による新規抗ウイルス療法の探索

研究要旨：ウイルス性肝炎は社会的な問題となる疾病であり、ワクチンによる予防や効果的な治療薬の開発が望まれる。本研究はB型肝炎ウイルス (HBV)、E型肝炎ウイルス (HEV) を対象とした薬剤スクリーニング系の開発を目的とし、HBV についてはウイルス産生細胞 HepG2 2.2.15 に関する基礎研究、HEV については PLC/PRF/5 (アレキサンダー) 細胞を用いた薬剤スクリーニング系の構築、抗 HEV 抗体検出 ELISA の作成を試みた。HepG2 2.2.15 細胞から HBs 抗原産生能が異なるクローン株を選択し、大量スクリーニングが可能な抗原 ELISA 系の可能性を検討したがいずれのクローン株も HBV タンパク (HBs 抗原、HBc 抗原) ELISA では HBV 増殖がモニターできず、HBV-DNA 検出系を組み合わせたアッセイ系の構築など次の課題が明らかとなった。HEV は、アレキサンダー細胞と HEV-RNA トランスフェクションを組み合わせた薬剤スクリーニング系の構築と改善に繋がる結果を示した。

A. 研究目的

B型肝炎はB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) の感染によって引き起こされる急性および慢性肝炎である。世界中で 20 億人の HBV 感染者が存在し、そのうち 3 億 5 千万人が持続感染者で、年 50 万～70 万人が B 型肝炎や B 型肝炎に起因する疾病 (肝硬変・肝がんなど) で死亡していると推定されている。主に治療に用いられる薬剤は、抗ウイルス作用のあるインターフェロン (IFN) と核酸アナログの 2 剤であるが、副反応や投与時期・期間、薬剤耐性株の誘導などの問題もあり、新たな薬剤の開発が望まれている。

一方、E型肝炎はE型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, HEV) による経口急性肝炎である。以前は輸入感染症と考えられていたが、調査が進むにつれて国内感染例が確認されるようになった。また、E型肝炎には人獣共通感染症としての側面もある。現在 E 型

肝炎ワクチンが開発中であるが、それと同時に治療薬も必要とされる。

本研究の目的は HBV および HEV の薬剤スクリーニング系の構築とその基礎研究である。現在のところ、効率よく HBV および HEV の感染環を再現できる培養細胞系は存在しない。このため、HBV については HBV 産生細胞 HepG2 2.2.15、HEV は PLC/PRF/5 (アレキサンダー) 細胞を用いた薬剤スクリーニング系の検討を行った。

B. 研究方法

<HBV>

HepG2 2.2.15 細胞のクローニングと性状解析

HepG2 2.2.15 細胞のクローニングは限界希釈法で行った。クローン株 #1、#3、#4、#21、#G4 およびクローニング前の Original population について、HBs 抗原および HBc 抗原の経時変化を測定した。各クローンを

96well 細胞培養プレートで培養し、Confluent な状態でメEDIUMを交換した。この日を 0 日とし、7~9 日後まで各抗原を測定した。測定にはそれぞれ in-house HBsAg ELISA、QuickTiter HBV Core Antigen ELISA Kit [CELL BIOLOB, INC]を使用した。また、#1、#3、#G4 および Original population の HBe 抗原量も測定した(エンザイグノスト HBe monoclonal [SIEMENS])。

ラミブジン感受性試験

HBV 産生細胞 HepG2 2.2.15 由来のクローン株#1、#3、#4、G4 の培養液中に B 型肝炎治療薬ラミブジンを加え、HBV 産生に及ぼす影響を HBs 抗原、HBc 抗原量でモニターした。ラミブジン濃度は 25 μ M、培養期間は 1、3 日を検討した。

HBV、HEV いずれも薬剤による細胞毒性の有無は MTT assay で確認した。

<HEV>

薬剤スクリーニング系の開発

アレキサンダー細胞に HEV-RNA をトランスフェクションし、96 well plate に播種した。直後に薬剤(LOPAC [SIGMA-ALDRICH]。約 1,300 種類の薬剤を含むライブラリを使用した)を終濃度 100 μ M になるように添加し、1 週間培養し、培養液中の HEV 抗原量を ELISA により測定した。HEV 抗原が陰性コントロールと比較して 30%以下になる薬剤は 5 倍階段希釈(2、10、50 μ M) で再度スクリーニング行った。

抗 HEV 抗体検出系の作成

HEV-VLP やその抗体を組み合わせて動物種にかかわらず抗 HEV 抗体を検出する

Inhibition ELISA を構築した。ELISA 用プレートに抗 HEV-VLP 抗体(ウサギ)をコーティングして HEV-VLP を結合させ、HEV プレートを作製した。このプレートに血清検体を入れて検体中の抗 HEV 抗体を結合させる。検体中の抗 HEV 抗体でマスキングされていない HEV-VLP を HRPO 標識抗 HEV-VLP 抗体で検出し

た。陰性コントロールとして抗 HEV 抗体陰性ヒト血清(NHS1、NHS2、NHS3)、陽性コントロールとして抗 HEV 抗体陽性ブタ血清(aHEVsw)及びウサギ血清(aHEVRS)を用いて感度及び特異性を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

<HBV>

HepG2 2.2.15 細胞のクローニングと性状解析

HepG2 2.2.15 細胞由来の複数のクローン株を樹立した。これらを HBs 抗原産生能でグループ分けし、代表的なクローン株#1、#3、#4、#21、#G4 を実験に用いた。クローン#1 と#3 はメEDIUM交換後 1 日目から HBs 抗原が検出されたが HBc 抗原の産生は比較的遅く、4 日目まで検出されなかった(図 1)。HBs 抗原産生量が多い#G4 も HBc 抗原産生が遅く、且つ、#1、#3 に比べて産生量は少なかった。クローン#4、#21 どちらも抗原の産生量が少なかった。HBs および HBc 抗原の産生パターンが似ているクローン#1 と#3 は HBe 抗原産生パターンが異なり、独立したクローンであると推察された(図 2)。

ラミブジン感受性試験

培養期間 3 日間の方が安定した結果を得られた。ラミブジン 25 μ M 添加による HBs 抗原及び HBc 抗原産生阻害率は低いか、または再現性が乏しい結果となった(表 1)。

<HEV>

薬剤スクリーニング系の開発

濃度依存的に HEV 抗原産生を阻害する 12 薬剤を選択した。(図 3)

抗 HEV 抗体検出系の作成

陰性コントロールは高濃度でも固相化 HEV-VLP と HRPO 標識抗 HEV-VLP 抗体の結合を

阻害しなかった（阻害率 0%）。一方、陽性コントロールは 10 万倍以上希釈しても標識抗体の結合阻害が認められた。このことから、この Inhibition ELISA が HEV 抗体を特異的に検出していることが確認された（図 4）。

D. 考察

<HBV>

HBV 感染者体内では HBs 抗原は HBV そのものの増殖とは別に大量に作られ血中の HBV 「感染」マーカーとして利用される。HepG2 2.2.15 細胞は HBs 抗原産生能が異なるクローンの集団であり、この中からいくつかのクローンを選択して薬剤スクリーニング系への適用を試みた。しかしながらラミブジン感受性試験ではいずれのクローンでも、陽性対照であるラミブジンの影響を HBs 抗原 ELISA でモニタリングすることはできず、HBs 抗原量は HBV 「増殖」のマーカーとしては不適當であるという結果になった。HBc 抗原でもラミブジンによる HBV 産生阻害をモニタリングできなかった。クローン株と HBV-DNA 検出を組み合わせた薬剤スクリーニングの検討が望ましい。一方で、各クローンの HBs 抗原産生能の違いは継代を繰り返しても固定されており、HepG2 2.2.15 細胞における HBV 遺伝子組み込み様式と HBV 抗原マーカー産生との相関など HBV 増殖過程の研究につながるツールとしての可能性が考えられる。

<HEV>

今回選択した 12 薬剤の薬理活性、構造等に特定の傾向は見られなかった。更に多くのライブラリについて研究を進めていく必要がある。アレキサンダー細胞と HEV-RNA トランスフェクションを組み合わせた薬剤スクリーニ

ング系の構築は可能であった。しかしながら、HEV 抗原が ELISA で測定できる抗原量になるまでに時間がかかるため、細胞毒性の影響、薬剤の分解などの問題が危惧される。さらに簡便で効率のよいスクリーニング系の構築が望まれる。

本研究で作製した抗 HEV 抗体検出系は感度、特異性ともに良く、実用化が可能であると考えられる。HEV は人獣共通感染症である。疫学的な背景を探るために多種の動物検体を扱う機会があり今後の HEV 対策を考える上で動物種に関係なく抗 HEV 抗体を検出するシステムは有用である

E. 結論

- 1) HBV 産生細胞 HepG2 2.2.15 から HBs 抗原産生能が異なる複数のクローン株を選択した。これらのクローンは継代を繰り返しても HBs 抗原産生能は固定されていた。
- 2) クローン株と HBs 抗原、HBc 抗原検出 ELISA を組み合わせた薬剤スクリーニング系は HBV 増殖のモニタリングに不適であった。
- 3) HEV-RNA トランスフェクションとアレキサンダー細胞を組み合わせた薬剤感受性試験を構築した。
- 4) 動物種に関係なく抗 HEV 抗体を検出できる Inhibition ELISA を構築した。

F. 研究発表

無し

G. 知的所得権の出願・登録状況

無し