

II. 分担研究報告書

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者： 調 憲 九州大学 消化器・総合外科学分野 准教授
中川原 英和 九州大学 消化器・総合外科学分野 大学院生
田口 智章 九州大学 小児外科 教授

分担研究課題：ヒト肝細胞の採取と不死化肝細胞株の樹立、HBV 感染モデル作成

研究要旨：現在、慢性 B 型肝炎の治療において、インターフェロンによる VR (Virological Response) 率は約 20～30% であり、インターフェロンによる治療効果が期待し難い症例では、ウイルス増殖持続抑制目的の逆転写酵素阻害剤の継続投与治療が行われている。しかし、この逆転写酵素阻害剤を長期間投与した場合、ウイルスの遺伝子変異（変異株）が生じ、薬剤耐性化したウイルスによる肝炎の悪化が問題となっている。また、変異が出現しない例においても 5 年から 10 年以上の長期投与が必要である。基礎的分野では、困難と言われた培養細胞における C 型肝炎ウイルス増殖系を確立するとともに、安定した感染動物モデルであるヒト肝細胞キメラマウスが世界に先駆けて日本で作成された。これを用いて、C 型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明が進み、臨床応用が今後期待される研究を実施している。一方、B 型肝炎ウイルスの培養細胞系は未だ確立されておらず、レセプターも依然として不明であり、感染複製のメカニズムが解明されていない。

今後、B 型肝炎において多剤耐性ウイルスの機序の解明を目指した研究や、VR 率の改善、及び HBs 抗原の消失を目指した新規治療法の開発等の研究を行うために、切除肝から採取した初代肝細胞からヒト不死化肝細胞株を樹立し、HBV 持続感染モデルを作成することを目的とする。

A. 研究目的

今後、B 型肝炎において多剤耐性ウイルスの機序の解明を目指した研究や、VR 率の改善、及び HBs 抗原の消失を目指した新規治療法の開発等の研究を行うために、切除肝から採取した初代肝細胞の培養、およびキメラマウスへの移植、ヒト不死化肝細胞株の樹立などにより、HBV 持続感染モデルを作成することを目的とする。

B. 研究方法

まず、ヒト切除肝において正常と思われる肝組織を採取し、病理組織学的に正常肝細胞であることを確認する。採取した肝組織に、脱血およびコラゲナーゼ灌流等の処置を行い、分散・単離された正常肝細胞を培養シャーレへ播種する。この際に、肝細胞の長期培養を行わなければならないが、本来若年者ほど肝細胞培養の成功率が高く青年期以降では極

端に成功率が低下するため、できるだけ小児の肝細胞が望ましい。また、初代肝細胞の一部に対し凍結処理を行う。この凍結肝細胞およびシャーレへ播種した初代肝細胞を、その後の研究に使用する。一部は公共交通機関を用いて共同研究施設(株式会社フェニックスバイオ)へ輸送し、uPA/SCID キメラマウスへと移植することで効率的に細胞を培養する。これら初代肝細胞やキメラマウスで培養したヒト肝細胞を用いて、種々の機能解析を行う。

C. 研究結果

平成 25 年 1 月 9 日に九州大学倫理委員会の承認を受け、同年 1 月 15 日に第 1 回目のヒト肝細胞採取を行った。方法は上記の通りで、約 10^9 個の肝細胞を採取し、初代肝細胞の培養および凍結肝細胞の保存を行った。培養初代肝細胞は約 2 週間の間培養を行ったが、肉眼的に線維芽細胞様の細胞が大勢を占め、肝細胞は死滅していった。また、凍結肝細胞を解凍して dish へ播種し培養を試みたが、dish へ接着した肝細胞は極少数のみであった。次に、同年 1 月 31 日に第 2 回目のヒト肝細胞採取を行った。方法は前回同様で、手技の習熟とともに大幅な時間の短縮が可能となり、また、遠心分離の条件を調整することで純度の高い肝細胞(約 10^8 個)の採取ができた(Fig.1)。しかし、viability は前回同様 15%前後であり、初代肝細胞の培養は十分に可能であったが、凍結肝細胞に関しては解凍後の十分量の肝細胞の dish への接着を認めなかった。

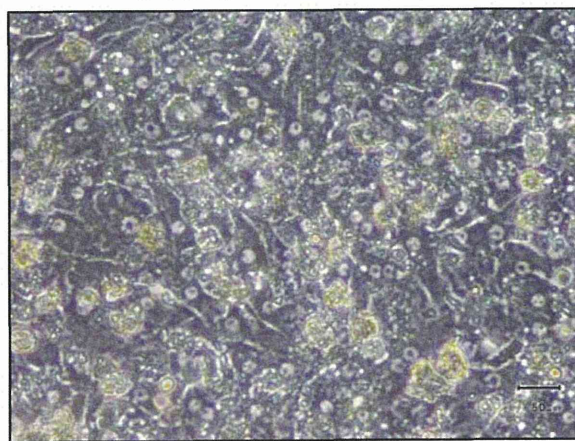


Figure 1. 初代肝細胞

D. 考察

第 1 回目にして、第 2 回目のヒト肝細胞採取の際には、肝組織採取から肝細胞の分散・保存までの時間を約 2 時間短縮できた(約 5 時間→約 3 時間)。しかしながら、採取した肝細胞の viability は 15-20%と大きな違いは見られず、その原因の一つとして第 2 回目の被験者の年齢が高かったことが考えられた(第 1 回目: 19 歳、第 2 回目: 27 歳)。また、肝細胞採取から保存までの時間短縮に加えて、コラゲナーゼ還流時の溶液温度管理や、精製時の遠心条件の調整、凍結保存・解凍方法の工夫などにより、できるだけ純度の高い肝細胞の採取や、それらの細胞の viability や細胞機能を保つことが今後の課題である。

しかしながら、20 代成人の肝臓からでも初代肝細胞の採取・培養は十分に可能であることが分かったので、小児でなく若年者の転移性肝腫瘍の症例等でも初代培養に十分に耐えうる肝細胞が採取できる可能性があると考えられる。今後はそれらの採取できた肝細胞の機能評価を行いながら、より純度や viability が高く、細胞機能が保たれた肝細胞の採取を目指していく必要がある。また、この初代肝細胞へレンチウイルスベクターを用

いて SV40,hTERT,E6,E7 などを導入し、不死化肝細胞株を作成することを念頭に、準備を進め、これら不死化した肝細胞に、HBV 感染による劇症肝炎や急性肝炎患者由来の高ウイルス量の血清や、HepG2.2.15 の上清などを投与して、B 型肝炎ウイルス感染モデルを作成し、経時的に培養上清中の HBV DNA を測定しながら持続感染モデルとして有用であるか評価を行う予定である。

E. 結論

本年度の研究においては、採取した肝細胞の viability や機能を考慮し、小児の肝切除症例を対象に肝細胞採取を検討していたが、成人症例においても十分に肝細胞採取および初代肝細胞の培養が可能であることが分かった。今後は積極的に症例数を増やしていく必要がある。また、採取した初代肝細胞を共同研究施設へ提供する体制を確立し、キメラマウスでの効率的な肝細胞培養を目指す。

一方、当施設においては不死化肝細胞株を作成し、肝細胞としての機能を評価し、B 型肝炎ウイルス持続感染モデルの作成へとつなげていく方針である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

分担研究報告書（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者：	水口 裕之	大阪大学大学院薬学研究科	教授
研究協力者：	櫻井 文教	大阪大学大学院薬学研究科	准教授
	川端 健二	(独)医薬基盤研究所	プロジェクトリーダー
	田代 克久	(独)医薬基盤研究所	研究員
	高山 和雄	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生
	長基 康人	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生
	山本 達郎	大阪大学薬学部	学部生

分担研究課題：ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いたHBV感染評価系の開発

研究要旨：現在、新規抗B型肝炎治療薬開発における最大の問題点は、B型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus; HBV）の生活環を再現可能で、簡便なin vitro培養細胞系が存在しない点である。一方で以前より我々はヒトES/iPS細胞から高効率に機能的な肝細胞への分化培養方法を確立してきた。そこで本研究では、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞に対しHBVが感染・増殖可能か検討することとした。本研究によりヒトES/iPS細胞由来肝細胞にHBVが感染・増殖可能となれば、抗HBV薬の評価などを通して新規抗HBV薬開発に大きく貢献できるとともに、HBVの感染・増殖機構の解明に向けて極めて有用な実験ツールになるものと期待される。本年度はまずヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化培養方法の改良と、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞におけるHBV感染・増殖関連因子の発現解析、遺伝子導入効率の検討、さらにマウスへの移植実験を行った。

A. 研究目的

新規B型肝炎治療薬開発ならびにB型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus; HBV）の感染・増殖機構の解明に向けた最大の問題点は、ヒト初代肝細胞と同等の性質を有するとともに、HBVの感染・増殖が可能で汎用性の高い細胞が存在しない点である。一方で、ヒトES/iPS細胞は種々の細胞に分化誘導可能であることから、再生医療における重要な細胞供給源であるだけでなく、ヒト

ES/iPS細胞より分化誘導した細胞は、創薬研究や細胞の分化発生などの基礎研究においても極めて重要な実験材料となりつつある。我々は以前より薬物の代謝毒性評価に資するヒトES/iPS細胞由来肝細胞の分化培養法の確立に取り組んできた。既に我々は、初代ヒト肝細胞に匹敵する薬物代謝酵素やトランスポーターを発現するヒトES/iPS細胞由来肝細胞を分化誘導することに成功している。またこのヒトES/iPS細胞由来肝細胞

胞に対し C 型肝炎ウイルスのレプリコンゲノムを導入したところ、レプリコンゲノムが維持されることを明らかにしている。そこで本研究では、我々が分化誘導したヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に HBV が感染・増殖可能か検討することとした。本研究によりヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に HBV が感染・増殖可能であることが明らかとなれば、初代ヒト肝細胞に代わる *in vitro* HBV 感染増殖系となり、抗 HBV 薬の創製や HBV の感染増殖機構の解明に向けて極めて有用な実験材料になるものと期待される。さらには様々な遺伝的バックグラウンドを持つヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いた HBV 感染増殖評価系が構築可能になるものと考えられる。

本年度はまず、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化培養方法の改良を行った。続いて、作製したヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞への HBV ゲノム導入に先立ち、プラスミドベクターやアデノウイルス (Ad) ベクターを用いて、遺伝子導入効率の検討を行った。また、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染・増殖関連因子の発現解析を行うことで、HBV が感染・増殖可能であるか否か、基礎的な検討を行った。さらに、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞をマウスに移植し、キメラマウスを作製することで、*in vitro* だけでなく *in vivo* HBV 感染増殖系の構築に繋がるため、キメラマウスを作製するための検討もあわせて行った。

B. 研究方法

1. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から肝細胞への分化誘導は、我々が過去に報告した、Ad ベクターを用いた FOXA2、HNF1 α 遺伝子導入法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. J Hepatol. 2012) を改良した方法で行った。

2. プラスミド DNA および Ad ベクターを用いたヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞への遺伝子導入
上記 1 の方法を用いてヒト iPS 細胞株 (Dotcom) より分化培養した肝細胞に対し、Green Fluorescence Protein (GFP) 発現プラスミド (pHMCA-GFP もしくは pHCMV-GFP) を Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて導入した。また GFP 発現 Ad ベクター (AdK7-CAGFP および AdK7-CMVGFP) を 300 vector particle (VP)/cell もしくは 3000VP/cell で 1.5 時間作用させた。遺伝子導入 48 時間後に Flowcytometry および蛍光顕微鏡を用いて GFP 陽性細胞の割合を測定した。

3. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染増殖因子の発現解析

ヒト iPS 細胞 (未分化状態)、各分化段階の iPS 細胞由来肝細胞 (分化培養開始より 4, 9, 20 日培養したもの)、ヒト初代肝細胞、HepG2 細胞、Huh-7 細胞より Total RNA を回収したのち、定量的 RT-PCR により HBV の感染・増殖に関与することが報告されている遺伝子の発現量を検討した。microRNA (miRNA) の定量に関しては、Taqman MicroRNA Assay (ABI) および Taqman Fast Universal PCR Master Mix (ABI) を用いて測定した。その他の遺伝子については、SYBR Green Realtime PCR Master MIX (Toyobo) を用いて定法に従い測定した。用いたプライマーの配列を以下に示す。Human asialoglycoprotein receptor-1 (ASGPR1)
forward; 5' -CATAGGCCCTGTGAACACCT-3' ,
reverse; 5' -GCCTTGCCAGCTCTGTCTC-3' .
Human hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α),
forward; 5' -CGTCATCGTTGCCAACACAAT-3' ,

reverse 5' -GGGCCACTCACACATCTGTC-3' .

Human HNF1 α ,

forward; 5' -GATCTCTAGACTGTGGCAGCCGAGAG-3' ,

reverse;

5' -CTAAGGAATTCCTGCTATCTTGAGGTCCTGGTC-3'.

4. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の移植実験

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 SCID を交配して得られた uPA/SCID マウスの 2~4 週齢を用いた。移植細胞は、申請者が過去に報告した、スフェロイド形成法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. Biomaterials. 2013) を用いて、ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から分化誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞に対し、X 遺伝子もしくは LacZ 遺伝子を Ad ベクターを用いて過剰発現させた細胞を用いた。この細胞を、PBS 洗浄後、5 mM EDTA 溶液によって回収し、8.3% tryptose phosphate broth, 10% FBS, 10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate, 1 μ M insulin, and 25 mM NaHCO₃ を添加した L15 medium 培地へ懸濁した。uPA 免疫不全マウスをエーテル吸入麻酔し、ヒト iPS 細胞由来肝細胞懸濁液をハミルトンシリンジにより脾臓へ 25 μ l (1 \times 10⁶ 細胞) 注入した。移植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、移植後 5 週目に移植マウスの肝臓よりパラフィン切片を作製し、HE 染色及び、抗ヒト CK8/18 抗体を用いた免疫抗体染色を行った。

C. 研究結果

1. プラスミド DNA およびアデノウイルスベクターを用いたヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞へ

の遺伝子導入

ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HBV ゲノム導入に先立ち、GFP 発現プラスミドならびに Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞における遺伝子導入効率を検討した。GFP の転写をドライブするプロモーターとしては、CA (CMV enhancer plus chicken b-actin promoter) プロモーターおよび Cytomegalovirus (CMV) プロモーターを用いた。トランスフェクション 48 時間後における GFP の発現を検討したところ、CA プロモーターの場合 (pHMCA-GFP) 8%、CMV プロモーターの場合には (pHMCMV-GFP) 11% の GFP 陽性細胞が検出された (Fig. 1)。なおトランスフェクション後、顕著な細胞毒性は観察されなかった。

プラスミド DNA のトランスフェクションにおいては十分な遺伝子導入効率を得られなかったことから、HBV ゲノムをコードしたプラスミドをトランスフェクションしても遺伝子導入効率が低くて HBV 粒子が産生されない可能性がある。そこで、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における Ad ベクターによる遺伝子導入効率を検討した。なお用いた Ad ベクターは、ファイバー領域の C 末端にポリリジン配列 (K7) を有するファイバー改変型 Ad ベクターであり、Ad 受容体 (CAR) の発現の有無にかかわらず高効率な遺伝子導入が可能である。また搭載した GFP 発現カセットは、上記のプラスミドによるトランスフェクション実験と同じものを用いた。CMV プロモーターを搭載した Ad ベクター (AdK7-CMVGFP) を 300 および 3000VP/cell で作用させた場合には、それぞれ 69% および 73% の GFP 陽性細胞が得られた (Fig. 2)。一方で CA プロモーターを搭載した Ad ベクター (AdK7-CAGFP) を 300 および 3000VP/cell で作用させた場合には、それぞれ 86% および

92%の GFP 陽性細胞が得られた。また蛍光顕微鏡を用いて GFP の発現を観察したところ、AdK7-CAGFP 作用群の方が AdK7-CMVGFP 作用群よりも強い GFP 蛍光が観察された。なお Ad ベクター作用による細胞毒性は特に観察されなかった。

2. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染増殖因子の発現解析

これまでに HBV 感染増殖に関与する種々の細胞側因子が報告されている。そこでヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染増殖に関与する細胞側因子の発現量を検討した (Fig. 3)。検討した細胞側因子は、HNF4 α 、HNF1 α 、ASGPR1、miR-1、miR-122a である。miR-122a は HBV 感染増殖を抑制し、その他の因子は促進することが報告されている。まず検討した全ての遺伝子に関して、未分化状態のヒト iPS 細胞と比較し、分化肝細胞において大きく発現量が上昇していた。miR-1 を除くすべての遺伝子について、ヒト初代肝細胞と比較し、同程度の発現が観察された。また、HepG2 や Huh-7 細胞と比較しても、その発現レベルは同等以上であった。一方で、miR-1 については、ヒト初代肝細胞や HepG2、Huh-7 細胞と比較し、培養 20 日のヒト iPS 細胞由来肝細胞では約 100 倍高い発現が見られた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (20 日間培養) は、HBV 感染増殖に重要な細胞側因子を発現していることが示された。

3. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の移植実験

in vivo における HBV 感染増殖系を目指し、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスを作製する検討を行った。また、この際に、移植細胞による置換率の向上が期待される遺伝子 X

の検討も併せて行った。ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞に、Ad ベクターを用いて X 遺伝子もしくは LacZ 遺伝子を導入した後、uPA/SCID マウスに移植した結果、移植後 1 週目において、どちらの細胞を移植したマウスの血中からも、ヒトアルブミンが検出された (Fig. 4A)。その後、どちらの細胞を移植したマウスでも血中ヒトアルブミン濃度は上昇し続け、最高約 15 $\mu\text{g/ml}$ のヒトアルブミンが検出された。この時、移植後 2 週目から 4 週目にかけて、X 遺伝子を導入した肝細胞を移植したマウスから有意に高い血中ヒトアルブミン濃度が検出された。また、X 遺伝子を導入したマウス肝切片には、ヒト CK8/18 を発現する多数のヒト肝細胞コロニーが観察された (Fig. 4B)。以上の結果から、我々が作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞はマウス肝臓に生着し、高濃度のヒトアルブミンを分泌すること、さらに、X 遺伝子が置換率の向上に寄与することが示された。

D. 考察

ヒト ES/iPS 細胞は種々の細胞に分化可能であることから、再生医療における細胞供給源としてだけでなく、近年では創薬研究における実験材料として注目を集めている。特に神経細胞や肝細胞など、ヒト初代培養細胞が得にくく、また初代培養細胞と近い性質を有する細胞株が存在しない組織に関しては、ヒト ES/iPS 細胞由来分化細胞は極めて有用と期待される。我々はこれまでに各種液性因子に加えて、ヒト ES/iPS 細胞に肝細胞分化に必須の転写因子を分化段階に合わせて、遺伝子導入効率に優れる改良型 Ad ベクターを用いて導入・発現させることにより、従来よりも短期間で高機能な分化肝細胞を誘導することに成功

している。そこで本研究では、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞において HBV が感染増殖可能か検討することとした。まず本年度は、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞への HBV ゲノム導入実験に向けて、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における遺伝子発現効率を検討した。さらにヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染増殖に関する細胞側因子の発現量を測定した。また、マウスへの移植実験を行うことで、キメラマウスを作製可能か否か、X 遺伝子が置換率向上に寄与可能か否か、検討を行った。

まずヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞におけるプラスミドによる遺伝子発現効率を検討した。その結果、CMV プロモーター、CA プロモーターともにその GFP 発現細胞は約 10%であった。これは一般的な株化細胞での遺伝子発現効率と比較すると、低いものであった。その原因としては、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞は未分化状態のヒト ES/iPS 細胞から約 20 日間培養することにより分化誘導する。そのため、プラスミドを Transfection する状態においてはほぼ Confluent であるとともに、細胞が分化し増殖しない状態になっていたためと考察された。

そこで次に非分裂細胞にも高効率に遺伝子導入可能な Ad ベクターを用いて遺伝子発現実験を行った。その結果、プラスミドによる遺伝子発現を大きく上回る GFP 陽性細胞数が得られた。また CMV プロモーターと CA プロモーターでは、CA プロモーターの方が高い GFP 発現を示した。これまでに HepG2 や Huh-7 細胞に HBV ゲノムをコードしたプラスミドを導入することにより、HBV 粒子が産生されることが報告されている。来年度は、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に HBV ゲノムを導入し HBV 粒子の産生を検討する予定であるが、本結果

より HBV ゲノムをコードしたプラスミドを用いた場合には十分な遺伝子導入効率を得られず、HBV 粒子が産生されない可能性がある。一方で、本実験により Ad ベクターを用いれば十分な遺伝子発現効率を得られることが明らかとなったので、現在 HBV ゲノムを搭載した Ad ベクターの作製を計画している。

一方で、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞において、HBV ゲノムの増幅・発現に関与する HNF4 α 、HNF1 α 、miR-1 は、HBV が増殖可能なヒト初代肝細胞や HepG2、Huh-7 と同程度の発現が得られた。従って、Ad ベクターを用いて HBV ゲノムさえ効率良く細胞内に導入できれば、HBV 粒子が産生される可能性は高いと考えられる。

近年、HBV の感染受容体として Sodium taurocholate cotransporting peptide (NTCP) が報告された。ES/iPS 細胞由来肝細胞において NTCP が十分発現していれば、HBV 粒子が内在化される可能性は高く、今後の重要な検討課題である。

続いて、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞を uPA/SCID マウスへ移植する実験を行った。その結果、高濃度のヒトアルブミンを血中に分泌できるキメラマウスを作製することができた。しかしながら、凍結ヒト肝細胞を移植した場合のマウス血中ヒトアルブミン濃度と比較すると、今回得られたヒトアルブミン濃度は低く、今後はより凍結ヒト肝細胞に近いヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を作製する必要があると考えられる。これまでに、樹立後早期においては、ヒト iPS 細胞は親細胞に由来するエピジェネティックな記憶が残存しており、親細胞となった細胞種に分化しやすいことが報告されている。そこで現在、我々が初代培養ヒト肝細胞から樹立したヒト iPS 細胞を用いることで、より高置換率なキメラマウスを作製でき

ないか検討を行っている。一方、本実験により、X 遺伝子が置換率向上に寄与し、キメラマウスの作製に有用であることが示された。今後、これらの技術を組み合わせることは重要な検討課題といえる。

E. 結論

1. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における遺伝子発現効率を検討し、Ad ベクターを用いることで十分な遺伝子発現が得られることが明らかとなった。

2. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染増殖に関与する因子の発現レベルを検討したところ、ヒト初代肝細胞と同程度発現している (mRNA レベル) ことが示された。

3. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いることでキメラマウスを作製可能で、その置換効率は X 遺伝子導入により向上可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)

5) 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)

6) 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.

7) 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

8) 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)

9) 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)

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江-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
- 4) 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
- 5) 高山和雄、川端健二、稲村 充、櫻井文教、古江-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
- 6) 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-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
- 7) 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-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
- 8) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江-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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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

12) 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. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

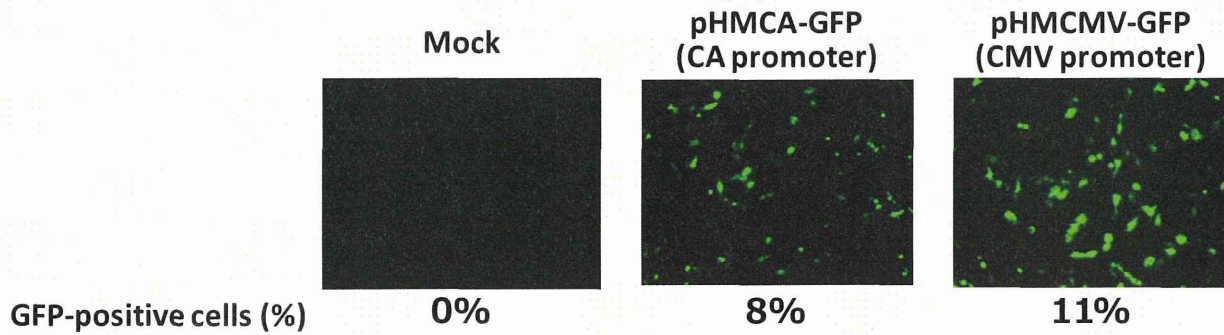


Fig. 1 Plamid DNA-mediated GFP expression in human iPS cell-derived hepaocytes. Human iPS cell-derived hepatocyte-like cells were transfected with GFP-expressing plasmids. GFP expression levels were evaluated 48 hrs after transfection by fluorecence microscopy and flow cytometry.

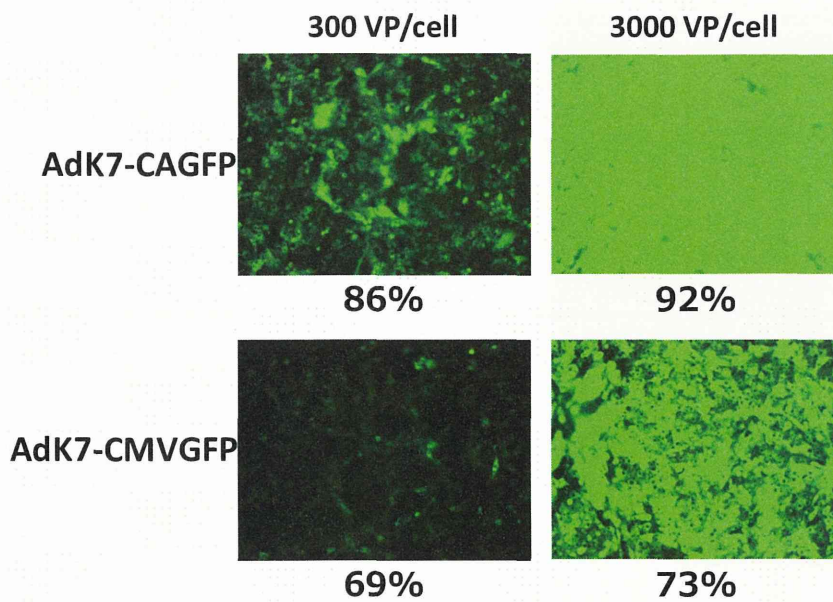


Fig. 2 Adenovirus vector-mediated GFP expression in human iPS cell-derived hepaocytes. iPS cell-derived hepatocytes were transduced with GFP-expressing Ad vectors. GFP expression levels were evaluated 48 hrs after transduction by fluorecence microscopy and flow cytometry.

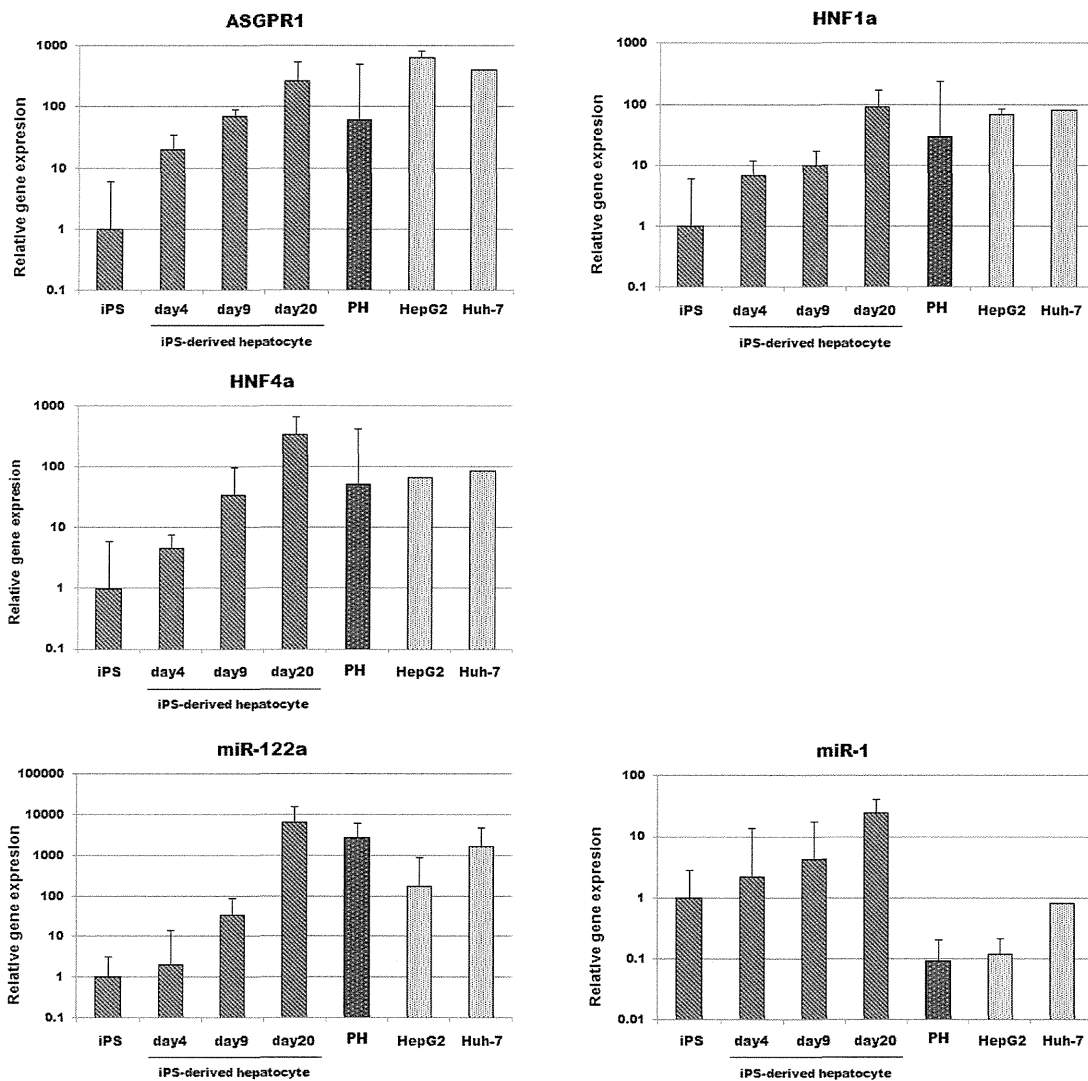


Fig. 3 Expression levels of cellular factors involved in HBV infection and proliferation in iPS cells and iPS cell-derived hepaocytes.

Total RNA was recovered from iPS cells, iPS-derived hepatocytes, primary hepatocytes, and Hepatocellular carcinoma cell lines. mRNA levels of cellular factors involved in HBV infection And proliferation was evaluated by quantitative RT-PCR. The data represents the means \pm S.D. (n=3). PH; primary hepatocytes.

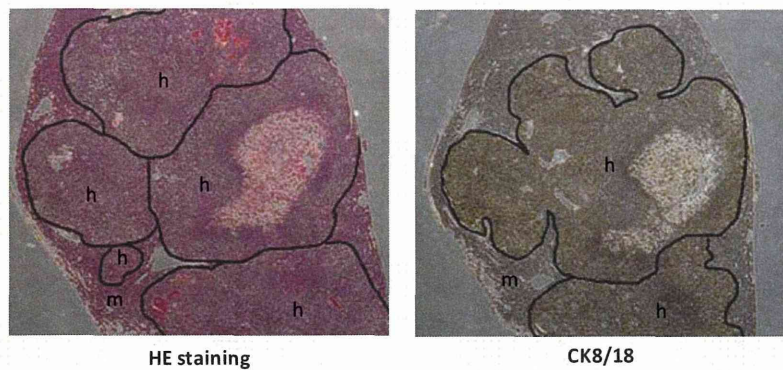
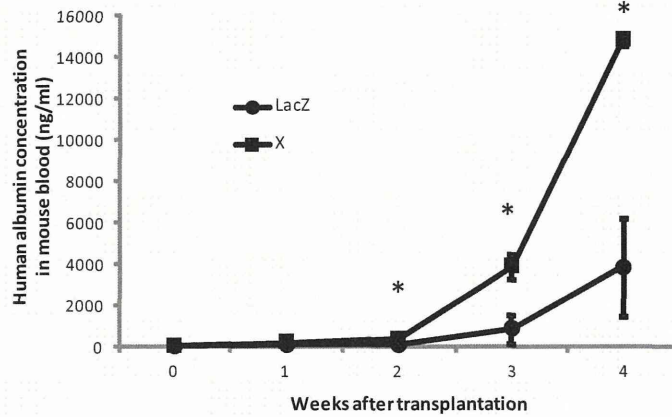


Fig. 4 Human liver chimeric mice with iPS cell-derived hepatocytes.

The iPS cell-derived hepatocytes, which were transduced with Ad vector expressing LacZ (LacZ) or Ad vector expressing X gene (X), were transplanted into uPA/SCID mice.

(A) The concentration of human ALB in blood of mouse, which was received iPS cell-derived hepatocytes, was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data represents the means \pm S.E. * $p < 0.05$ (LacZ; $n = 4$ FNK; $n = 3$).

(B) The mouse liver, which was received the iPS cell-derived hepatocytes, which were transduced with X gene expressing Ad vector, was sectioned and HE stained or immunostained with antibody against human CK8/18. h; human hepatocytes m; mouse hepatocytes

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者：石田 雄二 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 第一課 課長
研究協力者：立野 知世 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 部長
山崎 ちひろ 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 第一課

分担研究課題：ヒト肝細胞キメラマウス由来のヒト肝細胞を用いた HBV 長期感染
培養法の構築

研究要旨：これまでに我々は、キメラマウス由来のヒト肝細胞は *in vitro* において HBV に対する感染性を示すことを明らかにしてきた。本研究では、ヒト肝細胞の培養・保存条件が、HBV の感染効率にどのような影響を与えるか検討した。まずヒト肝細胞を、1、10、20日間培養してから HBV を接種した。接種後22日間培養し、上清中の HBV DNA 量を検討したところ、1日培養： 6.2×10^6 copies/mL、10日培養： 6.6×10^6 copies/mL、20日培養： 3.0×10^6 copies/mL で、10日間培養しても、HBV の感染効率に影響しないことが分かった。次に、輸送のための保存温度の条件について検討するため、ヒト肝細胞をプレートに播種してから、密閉状態で15°C、25°C でそれぞれ3、5、7日間放置した後に HBV を接種した。接種12日目に上清の HBV DNA を測定したところ、25°C では保存期間が延びてもウイルス量は1/2程度にしか低下しなかったのに対して、15°C では7日間保存したものは、3日間保存したものの1/10程度に低下しており、低温での保存は HBV への感染効率を大きく低下させることが分かった。以上の結果から、キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞は、保存条件次第で HBV に対する感染性を十分維持出来ることが分かった。

A. 研究目的

我々は以前からキメラマウス由来のヒト肝細胞は長期培養が可能で、HBV に対する感染性を示すことを明らかにしてきた。この細胞が広く一般的に基礎研究に応用されるようになるには、培養下でも HBV に対する感染性がある程度維持されるかどうか重要となる。今回我々は、ヒト肝細胞が分離されてどれくらいの期間 HBV に対する感染性を維持しているか検討した。また細胞が実際に輸送される場合を想定し、密閉した状態で25°C、15°C に数日間保存した後に、HBV に対する

感染性がどの程度維持されているかを評価した。

B. 研究方法

—キメラマウスの作製及びコラゲナーゼ灌流によるヒト肝細胞の分離—

立野らの論文（2004年）に従って、以下のようにしてキメラマウスを作製した。3週令の albumin enhancer/promoter-urokinase plasminogen activator-transgenic/SCID (uPA/SCID) マウスに対して、脾臓経由で市販の凍結ヒト肝細胞 (African American、5歳、男児)

を1匹あたり 2.5×10^5 個移植した。移植後3週目と6週目、およびそれ以降は週1回の割合で尾静脈から採血を行い、ラテックスビーズを用いた免疫比濁法により、血中のヒトアルブミン濃度を測定した。

細胞を移植して14週目以降のキメラマウスの中から、ヒトアルブミン濃度 (hAlb) 12 mg/mL 以上の個体を選択し、山崎ら (2010年) の方法に従ってコラゲナーゼ灌流を行ってヒト肝細胞を分離した。平均すると、キメラマウス1匹から約 10^8 個の細胞が分離され、そのうちヒト肝細胞の割合は95%程度で、生存率は75%以上であった。

—ヒト肝細胞の培養およびHBVの接種—

分離したヒト肝細胞は、10%FBSを添加したDMEM (DMEM10) に懸濁し、1型コラーゲンをコートした24ウェルプレートに、 2.1×10^5 cells/cm² の密度で播種された。播種した翌日に、2%のDMSOを添加した山崎ら (2006年) の培地 (dHCGM 培地) に、4%のPEG8000とHBVに持続感染したキメラマウスの血清を加え、細胞に接種した。培養期間の検討を行う場合は、細胞を播種して10日もしくは20日培養してからウイルスを接種した。保存条件の検討を行う場合は、細胞を図1に示した条件で細胞を保存した後にウイルスを接種した。15°C、25°Cで保存する場合は、シールで培養ウェルを密閉し、ガス交換が起きないようにした。

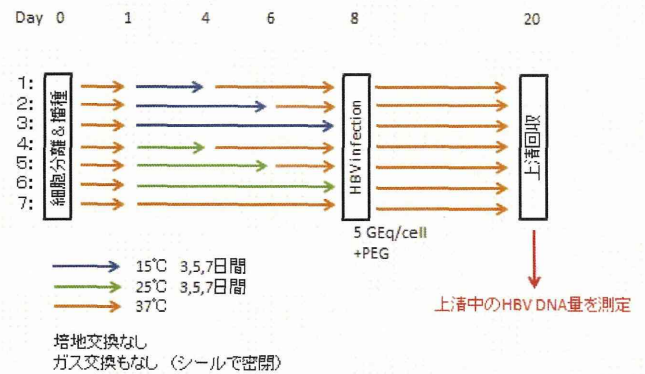
感染源には、名古屋市大の田中教授のグループから分与された、HBV (genotype C) を接種後、持続感染が確認されたキメラマウスの血清を使用した。細胞には、5 genome equivalent per cell の割合でウイルスを接種した。接種した翌日と翌々日にDMEM10で細胞を洗った後に、dHCGMを添加して培養を行った。その後は、培地交換は5

日に1回の頻度で行い、交換の際には毎回DMEM10で細胞を1回洗った後に、dHCGMを加えた。

—HBV DNA量の測定—

培養上清および細胞からのDNA抽出には、スマイテスト (株式会社医学生物学研究所、日本) を用いた。培養上清の場合は、スピンドウンした上清を抽出に使用した。抽出されたDNAを用いてABI 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン、日本) により、Abe (1999年) らの方法に基づいて定量性リアルタイムPCR (qPCR) を行い、HBV DNA量を測定した。

図1 細胞の保存条件と上清中のHBV DNA量の関係



C. 研究結果

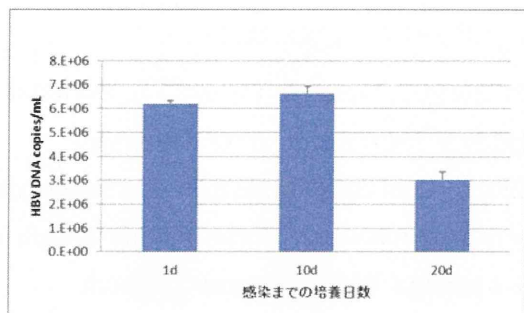
<培養期間とウイルス感染効率の関係>

ヒト肝細胞を分離して、1、10、20日間培養 (37°C, 5% CO₂) した後にHBVを接種し、更に22日間培養した上清中のHBV DNA量を測定した (図2)。培養1日目と10日目にHBVを接種した場合は、HBV DNA量に差はなかった。20日目に接種すると、HBV DNA量は1日目、10日目に接種した場合に比べて約半分に低下していた。

培養終了時点で比較すると、15°Cの場合は保存期間が長くなるほど死細胞の割合が増加していた。その一方で、25°Cではそのような変化は見

られなかった。

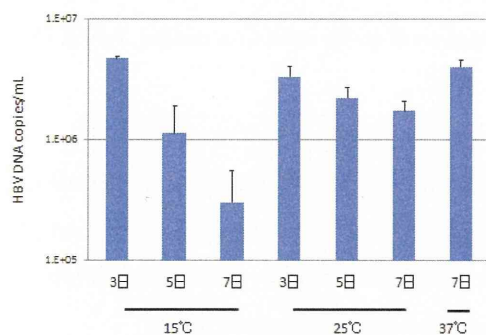
図2 感染までの培養日数と上清中のHBV DNA量の関係



<感染までの細胞の保存温度が HBV 感染に与える影響>

図 1 に示したように、15℃と 25℃でヒト肝細胞を 3、5、7 日間密閉状態で保存した後に HBV を接種し、12 日後の培養上清中の HBV DNA 量を測定した (図 3)。

図3 上清中のHBV DNA量 (感染12日目)



通常通り 37℃で 7 日間培養してから HBV を接種した場合は、上清中の HBV DNA 量は 4.0×10^6 copies/mL を示した。3 日間の保存であれば、温度に関わらず同程度の HBV DNA 量を示した (15℃: 4.7×10^6 copies/mL、25℃: 3.3×10^6 copies/mL)。25℃の場合は、5 日、7 日と保存期間を延ばすと、徐々にウイルス量が低下しものの、7 日間保存したのものでも 3 日間保存したものの約 50%程度の値を維持していた。(5 日: 2.2×10^6

copies/mL、7 日: 1.7×10^6 copies/mL)。一方、15℃で保存した場合は、5 日: 1.1×10^6 copies/mL、7 日: 3.5×10^5 copies/mL で、HBV DNA 量は 3 日間保存したものに比べて 1/10 程度に低下しており、その影響は顕著であった。

D. 考察

細胞分離後の HBV 感染までの培養期間を検討したところ、10 日間までは HBV に対する感染性に大きな変化は見られない事が分かった。20 日間培養してから HBV を接種してもウイルス量は半分程度にしか低下しておらず、ヒト肝細胞は培養下でも HBV に対する感染性を良く維持していることが分かった。更に密閉状態で 3-7 日間保存した後に HBV を接種した実験の結果からは、25℃の保存であれば、7 日間保存した後でも感染性に大きな変化は見られなかった。一方で 15℃保存の場合は 7 日間保存すると HBV DNA 量は 10%程度にまで低下しており、15℃より 25℃での保存が望ましいことが分かった。

15℃の場合は保存期間が長くなるほど死細胞の割合が増加しており、これがウイルス量が低下した主要因と考えられた。

E. 結論

以上の結果から、キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞は、培養期間中は HBV に対する感染性が大きく変化しない事が分かった。また密閉状態であっても 25℃であれば HBV への感染性はあまり大きくは低下しない事が示された。これらの結果は、キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞は、25℃付近での数日間の輸送に十分耐えうる可能性が有ることを示しており、幅広い HBV 感染の基礎研究への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, **Ishida Y**, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, Yoshizato K. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. *Laboratory Investigation* 2013 Jan;93(1):54-71.

(2) **石田雄二**、立野知世、吉里勝利、ヒト化肝臓をもつキメラマウスを用いた創薬研究、最新疾患モデルと創薬応用研究の最前線、遺伝子医学 MOOK 2012;22:38-43.

2. 学会発表

(1) Tateno C, **Ishida Y**, Kakuni M, Fukumuro M, Tanaka J, Masumori S, Nakajima M, Hayashi M. Comet assay and micronucleus test using chimeric mice with humanized liver (PXB mice®). Annual Meeting and ToxExpo, 2012, San Francisco 2012

(2) **石田雄二**、柳愛美、吉実康美、山崎ちひろ、横道博、渡士幸一、脇田隆字、茶山一彰、立野知世、キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞への HBV 感染、第 48 回 日本肝臓学会、石川、2012

(3) 柳愛美、立花亜里、山崎ちひろ、吉実康美、**石田雄二**、真下知士、芹川忠夫、立野知世、新規免疫不全ラットを用いたヒト肝細胞キメララットの作出、第 19 回 肝細胞研究会、札幌、2012.

(4) **石田雄二**、柳愛美、吉実康美、山崎ちひろ、横道博、渡士幸一、脇田隆字、茶山一彰、立野

知世、ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* HBV 感染モデル、第 8 回 広島肝臓プロジェクト研究センター、シンポジウム、広島 2012

(5) Tateno C, Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, **Ishida Y**. Induction of growth arrest and mitochondrial compromise in human hepatocytes by telomere shortening during mitosis through *in vivo* passage. FASEB Summer Research Conference, 2012, Liver Biology: Fundamental Mechanisms & Translational Applications, Snowmass Village, 2012.

(6) **石田雄二**、ヒト肝細胞キメラマウスの毒性評価への応用、2012 八ヶ岳フォーラム、長野、2012

(7) **Yuji Ishida**, Ami Yanagi, Yasumi Yoshizane, Chihiro Yamasaki, Kazuaki Chayama, Chise Tateno. Fresh primary human hepatocytes isolated from mice with humanized livers as a novel *in vitro* hepatitis B virus infection model, AASLD, Boston 2012

(8) Chihiro Yamasaki, Ami Yanagi, Yasumi Yoshizane, Yutaka Kageyama, Yumiko Iwasaki, **Yuji Ishida**, Chise Tateno. *In vitro* evaluation of the utility of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®), JSSX, Chiba 2013

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者：小原 道法 公益財団法人東京都医学総合研究所
感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

分担研究課題：肝機能維持に最適な3次元培養法の構築

研究要旨：チンパンジーやキメラマウス等を用いずに薬剤の評価ができる方法としては、これまでにヒト肝由来細胞を透過性を有する中空糸の内腔に充填された細胞に、肝炎ウイルスを感染させて培養する方法等が報告されている。しかしこの方法においては、少量の細胞で多種の試験を行うのが困難であり、より簡便で高い効率で肝炎ウイルスを感染・増殖できる系が望まれている。我々は細胞が接着する細胞接着領域がパターン状に規定された3次元培養基材に、フィーダー細胞を播種し培養した3次元培養基材に肝細胞を播種しスフェロイドを形成させ、B型肝炎ウイルス(HBV)を感染・増殖させることを目指した。これにより2D培養法に比較して5-10倍の感染増殖高率を得ることができた。

また、HBVは感染後、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症する。治療薬として逆転写酵素阻害剤が用いられているが完全閉鎖2本差DNA(cccDNA)が核内に残存することから根治する事はできず、cccDNA排除による根治療法開発が望まれている。HBVが感染しているヒト肝臓キメラマウス初代肝細胞にたいして、TELEN技術を用いてHBV cccDNAの切断・改変による完全排除を試みたところcccDNAの顕著な減少が認められた。

A. 研究目的

簡便で高い効率で肝炎ウイルスを感染・増殖できる系が望まれている。我々は細胞が接着する細胞接着領域がパターン状に規定された3次元培養基材に、フィーダー細胞を播種し培養した3次元培養基材に肝細胞を播種しスフェロイドを形成させ、B型肝炎ウイルスを感染・増殖させることを目指した。

HBVは感染後、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症する。治療薬として逆転写酵素阻害剤が用いられているが完全閉鎖2本差DNA(cccDNA)が核内

に残存することから根治する事はできず、cccDNA排除による根治療法開発が望まれている。そこで、TELEN技術を用いてHBV cccDNAの切断・改変による完全排除を試みた。

B. 研究方法

ヒト初代肝細胞と肝炎ウイルスとを混合振盪し、ヒト初代肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、ストローマ系のフィーダー細胞を培養した3次元培養基材上で培養した。頃目的に感染細胞及び培養上清をサンプリングしHBVウイルス量を定