た）。それぞれから核酸を抽出した後、HBVゲノムのpreS1領域に設定したPCR primerを用いて、PCRを行い、免疫沈降された粒子中にHBVゲノムが存在するかどうかで、目的のウイルス粒子、VSV-G HBV pseudotypeが産生されているかどうかを判定した。

2）EGFP遺伝子をコードするHBVゲノムをもつHBV粒子（rcHBV-EGFP）産生の検討.

pgRNAの複製originに相当するdirect repeat配列（DR1とDR2）やパッケージングシグナル（ε）を含む5'、3'領域を残し、その内部をEGFP-IRES-Hyg^{r}で置換した発現ベクターを構築した。pgRNAに相当するRNAは本来のpgRNAの長さに相当する3.2kb前後に揃えてある。本ベクターを各々のHBV構造遺伝子発現ベクター（core-pol、preS-S、X）とともに肝癌培養細胞株にトランスフェクションし、細胞抽出液、培養上清を回収した。それぞれ、抗HBc抗体、抗HBs抗体を用いて、免疫沈降し、コア粒子、S粒子を回収した後、核酸を抽出、1）と同じ要領でEGFPを標的としたPCRにより粒子形成の可否を判定した。

（倫理面への配慮）

本年度は、該当する実験はないものと思われる。

C. 研究結果

1）VSV-G HBV pseudotype. VSV-G(-)及びVSV-G(+)両者で、細胞内コア粒子中のHBVゲノムを検出した。培養上清からは、VSV-G(+)のみから抗VSV-G抗体で免疫沈降した産物からHBVゲノムを検出したが、抗HBs抗体を用いたサンプルでは検出しなかった。

2）EGFP遺伝子をコードするHBVゲノムをもつHBV粒子（rcHBV-EGFP）産生の検討.

コア粒子内及びHBs粒子内でともにEGFP遺伝子を検出した。

D. 考察

1）本実験結果より、VSV-G HBV pseudotypeの作製は可能であると考えられた。本pseudotypeは様々な細胞に高効率で感染性を示すと考えられるため、その感染性について検討する必要がある。また効率のよい産生システムを構築することで簡便な感染アッセイが可能になる。更に、WTのHBVゲノムを用いることで、感染後のHBV生活環を詳細に解析できると思われた。

2）rcHBV-EGFPの産生も可能であると思われた。本ベクターの開発により、肝臓を標的にした遺伝子治療用のベクターの開発に繋がると思われた。やはり、今後、感染性について検討するとともに、如何に効率の良い産生系を構築できるかが、今後の重要な課題である。本

E. 結論

.汎用性VSV-G HBV pseudotype、リコンビナントHBVベクター（rcHBV/EGFP）の産生は可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

(1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward

B cell transformation." In " Herpesviruses", Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186--4. pp93-104, 2012.

(2) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). Leukemia Research and Treatment. doi:10.4061/2011/726964

(3) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." Frontiers in Virology. 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007

(3) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." Virology 425:95-102, 2012. doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008

(4) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. "Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7." Neuroscience Res. 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.

(5) Ueda, K. "For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". An Editorial. Frontiers in Virology 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.

(6) Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirsu Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded." J.Blood and Lymph2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.

(7) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. "Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity." Biophys. Res. Comm. under revision.

(8) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集中）

(9) 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.

(10) 上田啓次. 遺伝子挿入HBVを用いた感染リセプターの探索. 肝胆膵 65：601−609、2012.

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

該当無し

2.実用新案登録

該当無し

3.その他

特に無し

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

ヒト iPS/ES 細胞由来肝細胞の作成

研究分担者　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。初期化因子が染色体へ挿入されている通常のヒト iPS 細胞では、分化誘導した肝細胞の移植時に、外来遺伝子の活性化等によりがん化する可能性がある。そこで本年度は、インテグレーションフリーのヒト iPS 細胞の樹立を試みた。その結果、センダイウイルスベクターを駆使することでゲノムインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞を樹立することに成功した。さらに、本年度は分化誘導肝細胞の移植方法の検討を行った。その結果、細胞シート工学技術を駆使したヒト iPS 細胞由来肝細胞シート移植法は、従来の細胞懸濁液を移植する方法と比較して、移植後早期の生着効率が優れていることが明らかとなった。

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

B型肝炎ウイルス（HBV）により引き起こされるB 型肝炎感染者は世界で 3 億人、本邦に限っても200万人存在するとされており、B型肝炎を克服することは大きな課題の一つとされている。しかしながら、現在行われている標準的治療法である抗ウイルス療法では、B型肝炎の根治は難しく、副作用発現や各種耐性ウイルスの出現など、解決すべき課題が多いため、新規治療法の開発が望まれている。このため、創薬応用に適した HBV 感染モデルが必要とされている。

従来は、HBV 感染モデルとしてチンパンジーなどの霊長類動物が使用されてきたが、近年、uPA トランスジェニックマウスと、SCID マウスを交配して得られた uPA/SCID マウスに、ヒト肝細胞を移植することで作出されたヒト肝臓キメラマウスが、ヒト肝炎ウイルス感染モデル応用可能であることが報告され、注目を集めている。しかしながら、このヒト肝細胞を移植して作出されたキメラマウスは、免疫系を有しておらず、HBV 感染による炎症反応などを観察することができないという欠点が存在する。これまでに、申請者は、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、肝障害誘導免疫不全マウスに、申請者が作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を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作出のための基盤技術開発を試みる。移植する肝細胞がヒト

iPS細胞由来であるため、同一のヒトiPS細胞から誘導した血液細胞を用いて免疫系を再構築することも可能であり、同じ遺伝的バックグラウンドのヒト細胞がマウス個体内で相互作用するHBV感染モデルマウスに繋がることが期待される。

一方、これまでに樹立されたヒトiPS細胞の多くはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いて山中4因子（OCT3/4、SOX2、KLF4、C-MYC）をゲノムに挿入することで樹立されている。したがって、外来遺伝子がゲノムに挿入されることで遺伝子発現に変化が生じたり、外来遺伝子が再活性化したりすることが原因となって、移植したヒトiPS細胞由来肝細胞ががん化する可能性が考えられた。そこで本年度は、ヒトiPS細胞由来肝細胞移植細胞の、ヒトiPS細胞樹立時に挿入された外来遺伝子（OCT3/4、SOX2、KLF4、C-MYC）の再活性化を考慮し、センダイウイルスベクターを用いて、ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞の作製を試みた。

また、ヒトiPS細胞由来肝細胞は、ヒト初代肝細胞と比較してレシピエントマウスへの生着率が低いことが報告されている。そこで本年度は、ヒトiPS細胞由来肝細胞の生着率向上を目的として、脾臓を経由したこれまでの肝臓への移植法ではなく、生着率が高いと考えられる細胞シート工学技術を用いた移植法の検討も行った。

B. 研究方法

B-1. ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞の樹立

ヒト皮膚繊維芽細胞（HDF）、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞移植（HUVEC）、及びヒト肝細胞を用いて、下記の方法にてゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞を樹立した。

HDFおよびHUVECは播種してからそれぞれ10% FBS及び2mM L-Glutamine（invitrogen）を含むD-MEM培地（Wako）、またはEndothelial Cell Growth Medium（EGM；Lonza）培地を用いて、24時間培養（培養1日目まで）した。培養1日目に山中4因子を発現するセンダイウイルスベクター（独立行政法人産業技術総合研究所より供与）を5 MOIで作用させ、10% FBS及び2mM L-Glutamineを含むD-MEM培地、またはEGM培地で5日間（培養6日目まで）培養した。次に、培養6日目にマイトマイシンC処理済のMEF上に継代を行い、10% FBS及び2mM L-Glutamineを含むD-MEM培地、またはEGM培地で24時間（培養7日目まで）培養した。続いて、培地を4 ng/mlのbasic fibroblast growth factor（bFGF）を含むReproStem培地に交換し、18日間（培養25日目まで）培養を行い、iPS細胞様のコロニーをサブクローニングしてHDF、もしくはHUVEC由来ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞を樹立した。

ヒト肝細胞は播種してからhepatocyte culture medium（HCM；Lonza）培地を用いて、24時間培養（培養1日目まで）した。培養1日目に山中4因子を発現するセンダイウイルスベクターを5 MOIで作用させ、HCM培地で24時間（培養2日目まで）培養した。次に、培養2日目にマイトマイシンC処理済のMEFをヒト肝細胞上に播種し、HCM培地で24時間（培養3日目まで）培養した。続いて、培地を5 ng/mlのbFGF及び化合物X、Y、およびZを含むReproStem培地に交換し、18日間（培養21日目まで）培養を行い、iPS細胞様のコロニーをサブクローニングしてヒト肝細胞由来ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞を樹立した。

B-2. アルカリフォスファターゼ（AP）染色

樹立したゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞をPBSで洗浄し、固定液（4.5 mM citric acid、2.25 mM sodium citrate、3.0 mM sodium chloride、65 % methanol、3 % formaldehyde）で

固定した後、反応液(0.1 M Tris-HCl [pH9.5] 、0.25 mg/ml Naphthol AS-BI phosphate [Sigma]、0.25 mg/ml FAST Red violet LB salt [Sigma]) を添加して室温で15分間反応させた。

B-3. ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞の免疫抗体染色

樹立したゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞をPBSで洗浄し、4 % paraformaldehyde (PFA) /PBSで固定を行った。続いて0.2 % Triton X-100及び2 % BSAを含むPBSでブロッキングを行った。続いて抗NANOG抗体、抗OCT3/4抗体、抗SSEA4抗体を4℃で一晩反応させた。次にAlexa Fluor 488で標識した2次抗体 (Molecular Probe) を室温で作用させた。その後、DAPI (Sigma) を用いて核染色を行い、4 % PFAにて固定し、蛍光顕微鏡BIOREVO (KEYENCE) にて観察した。

B-4. RT-PCR

センダイウイルスベクター作用前の細胞、センダイウイルスベクター作用7日後の細胞、および樹立後のヒトiPS細胞からISOGEN (Nippon Gene) を用いてTotal RNAを抽出した。各Total RNAをRNase-free DNase I (New England Biolabs) で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) を用いてPolymerase Chain Reaction (PCR) を行い、センダイウイルスゲノムのcDNAを増幅した。PCRに用いたプライマーを表 1に示した。

B-5. ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞株 (Dotcom) から肝細胞への分化誘導は、申請者が過去に報告した、Adベクターを用いたFOXA2、HNF1α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。

B-6. ヒトiPS細胞由来肝細胞シートの作製

ヒトiPS細胞株Dotcomから分化誘導した肝細胞をPBS洗浄後、0.05%トリプシン/EDTA (Invitrogen) を用いて回収し、20 ng/ml OsM (R&D Systems) 及び10^{-6} M DEX (Sigma) を含むHCM mediumに懸濁した後、前日からFBSでプレインキュベートしておいた24 wellプレートの温度応答性培養皿UpCell (CellSheed) 上に播種し、48時間培養を行った。その後、培地を除去し、37℃に温めた20 ng/ml OsM及び10-6 M DEXを含むHCM mediumを50 ulずつ各wellに添加し、CellShifter (CellSheed) を支持体として上から置いた。続いてUpCellを20℃に冷やし、30分間静置した。次にCellShifterの上から各wellに20 ng/ml OsM及び10-6 M DEXを含むHCM mediumを200 ulずつ添加した。最後に、滅菌したピンセットを用いて、CellShifterごとヒトiPS細胞由来肝細胞をシート状に剥離、回収し、ヒトiPS細胞由来肝細胞シートとした。

B-7. ヒトiPS細胞由来肝細胞シートおよびヒトiPS細胞由来肝細胞懸濁液の移植

レシピエントマウスとして、1週間ごとに3回、30 mg/kgのretrorsine (Sigma) を尾静脈投与した$Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}$マウス (Taconic) を用いた。レシピエントマウスをイソフルラン吸入麻酔によって麻酔し、定法に従って70%部分肝切除を行った。続いて、ヒトiPS細胞由来肝細胞シートを移植する場合には、right lower lobe (RLL) 上にヒトiPS細胞由来肝細胞シートを10分間静置した。次に、生理食塩水100 μlをCellShifter上から滴下した後、ゆっくりとCellShifterを剥がし、RLL表面に残ったヒトiPS細胞由来肝細胞シートをright middle lobe (RML) の間に挟んだ。また、ヒトiPS細胞由来肝細胞懸濁液を移植する場合には、ヒトiPS細胞由来肝細胞を0.025%のトリプシン/EDTAを用いて回

収し、ヒトiPS細胞由来肝細胞シートを移植する場合とおおよそ同じ細胞数（8×10^5cells）を 100μl のHCM培地に懸濁した。次にこのヒトiPS細胞由来肝細胞懸濁液をマウス脾臓に注入した。最後に、腹膜及び皮膚を縫合した。

B-8. マウス血中ヒトアルブミン濃度測定

ヒトiPS細胞由来肝細胞シートおよび、ヒトiPS細胞由来肝細胞懸濁液を移植したマウスから、移植後2週目に採血を実施し、Human Albumin ELISA Quantitation Set（BETHYL）を用いて血中ヒトアルブミン濃度を測定した。

B-9. ヒトiPS細胞由来細胞を移植したキメラマウス肝臓の摘出

ヒトiPS細胞由来肝細胞シートを移植したマウスを移植後2週目で解剖し、肝臓を摘出、観察を行った。

B-10. キメラマウス肝臓の免疫抗体染色法

ヒトiPS細胞由来肝細胞シートを移植したマウスから摘出したマウス肝臓を O.C.T. Compound（サクラファインテック）中でドライアイスを用いて凍結させ、その後、厚さ 10μm の切片を作製した。続いて切片を風乾させた後、4％ PFA/PBS を用いて固定し、0.2％ Triton X-100、10% FBS、2％ BSA を含む PBS でブロッキングを行った。続いて抗ヒト AAT 抗体（Dako）もしくは抗ヒト ALB 抗体（BETHYL）を 4℃で一晩作用させた。続いて Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 で標識した2次抗体（Molecular Probe）を室温で作用させた。その後、DAPI を用いて核染色を行い、4％ PFA にて固定し、蛍光顕微鏡 BIOREVO にて観察した。

C. 研究結果

ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞を樹立するため、山中4因子（OCT3/4、SOX2、KLF4、C-MYC）を発現するセンダイウイルスベクターをHDF、HUVEC、ヒト肝細胞に作用させた。その結果、全ての細胞種からiPS細胞様のコロニーが観察された（図 1A - C）。また、これらのiPS細胞様コロニーはAP陽性であり、さらにNANOG、OCT3/4、SSEA4 を発現していた。これらの結果から、得られた細胞はiPS細胞であることが確認された（図1D および E）。

続いて、樹立したヒトiPS細胞がインテグレーションフリーであることを検証するため、樹立したヒトiPS細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にてセンダイウイルスゲノムの検出を試みた。その結果、樹立後のヒトiPS細胞からはウイルスゲノムが全く検出されず、樹立したヒトiPS細胞にはセンダイウイルスベクターが残存していないことが確認された（図 1F）。

次に、移植方法の検討を行った。これまでに作出されてきたヒトiPS細胞由来肝細胞を有したキメラマウスは、初代肝細胞を移植した場合と比較して、生着効率が悪いことが問題とされている。そこで我々は細胞シート工学技術を用いて、ヒトiPS細胞由来肝細胞シートを移植する検討を行った。レシピエントマウスとして、retrorsine を事前投与することで肝細胞の細胞増殖を抑制し、かつ 70%部分肝切除で肝障害を誘導した免疫不全マウス（Rag2-/-IL2rg-/-マウス）を用いた（図 2A）。このマウスにヒトiPS細胞由来肝細胞シートもしくはヒトiPS細胞由来肝細胞懸濁液を移植し、移植後2週目のマウス血中ヒトアルブミン濃度を解析することにより、移植後早期の生着効率を比較した。その結果、ヒトiPS細胞由来肝細胞シートを移植したマウスからは平均 383 ng/ml、ヒトiPS細胞由来肝細胞懸濁液を移植したマウスからは平均 51 ng/ml のヒトアルブミンが検出された（図 2B）。

D. 考察

申請者はセンダイウイルスベクターを駆使することで、HDF、HUVEC、ヒト肝細胞から外来遺伝

子の再活性化などがないゲノムインテグレーションフリーヒト iPS 細胞を樹立することに成功した。これらのゲノムインテグレーションフリーヒト iPS 細胞を利用して、肝細胞を誘導し、マウスへ移植することでがん化などの恐れがないキメラマウス作出に繋がることが期待される。

また、本研究により、従来の細胞懸濁液を移植する方法と比較して、細胞シート工学技術を駆使したヒトiPS細胞由来肝細胞シート移植法は移植後早期の生着効率が優れていることも示された。これは移植細胞が血流を介さずに、直接肝臓に接着できることなどが寄与したものと考えられる。

今後は、これらの技術を組み合わせ、例えばゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞から誘導した肝細胞シートを移植することで、がん化などの恐れが少なく、生着効率が高いキメラマウスを作出することを試みる予定である。

E. 結論

センダイウイルスベクターを用いることで各種細胞からゲノムインテグレーションフリーヒト iPS 細胞を樹立した。また、細胞シート工学技術を駆使した移植法は、従来の細胞懸濁液を移植する方法と比較して、移植後早期の生着効率が高いことを明らかにした。

G. 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 HNF1α 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) 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)

6) 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)

7) 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.

8) 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

9) 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)

10) 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、HNF4α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 HNF1α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 HNF1α 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

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

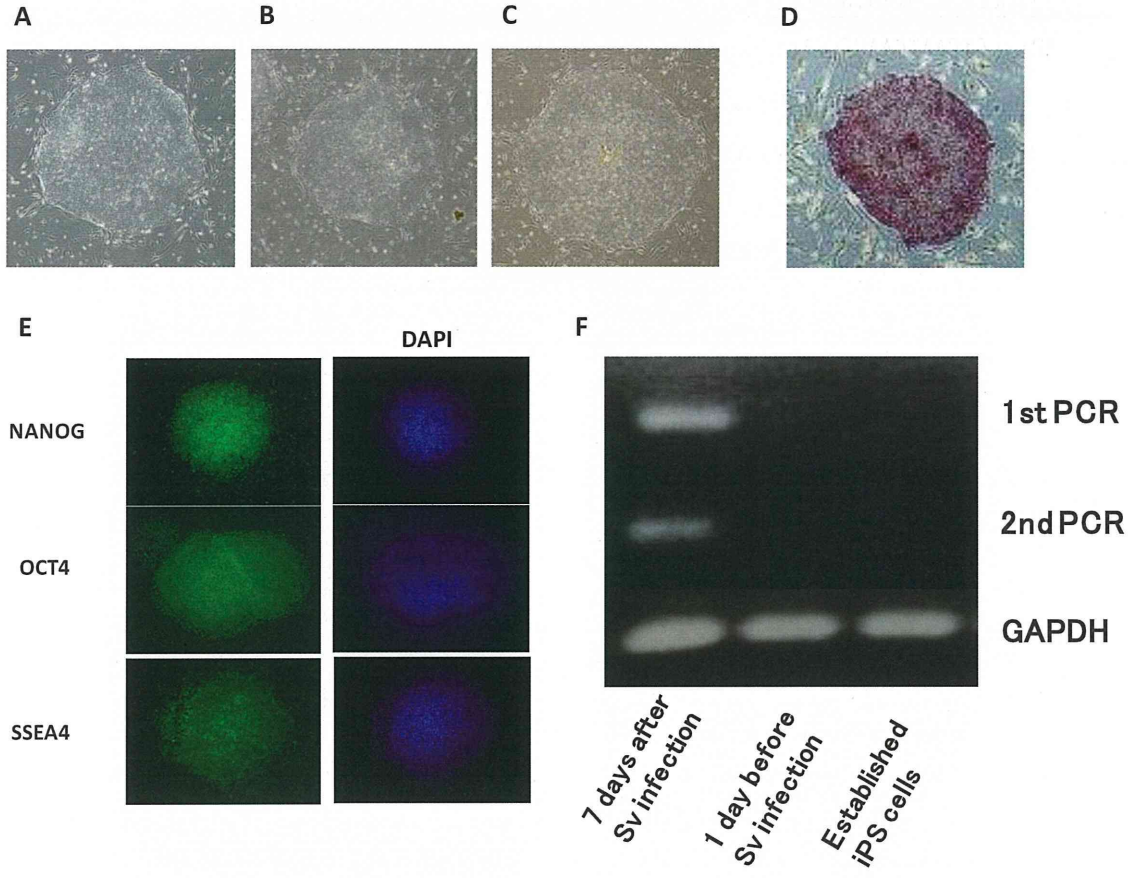


図 1　ゲノムインテグレーションフリーiPS 細胞の樹立

(A - C)　HDF (A)、HUVEC (B)、およびヒト肝細胞 (C) から樹立したゲノムインテグレーションフリーiPS 細胞
(B)　樹立したゲノムインテグレーションフリーiPS 細胞の AP 染色陽性を行った。
(C)　樹立したゲノムインテグレーションフリーiPS 細胞に対し、未分化細胞マーカーの免疫抗体染色を行った。
(D)　センダイウイルスベクター (Sv) 作用 7 日後 (7 days after Sv infection)、Sv 作用 1 日前 (1 day bfore Sv infection)、および樹立した iPS 細胞 (Established iPS cells) から RNA を抽出し、Sv ゲノムの検出を RT-PCR 法を用いて行った。

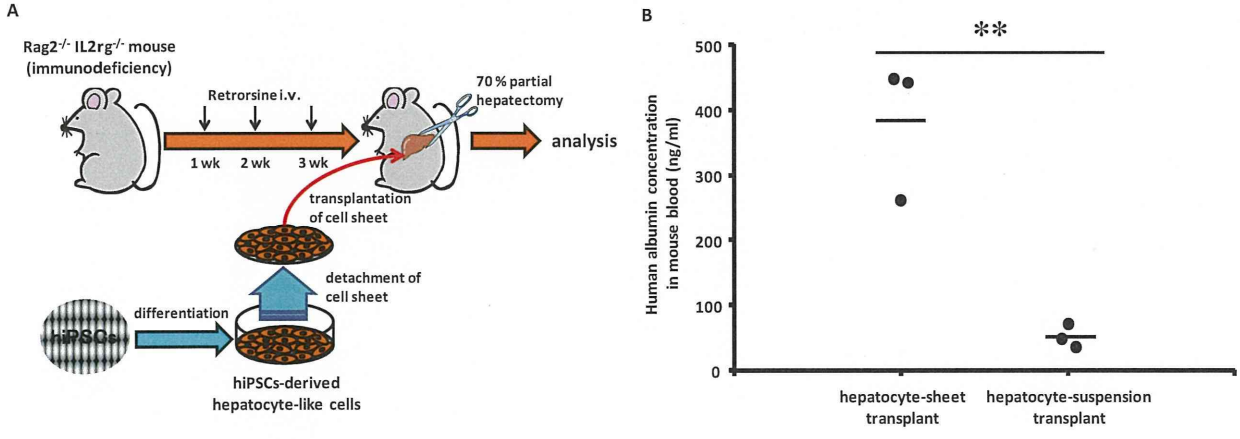


図 2　ヒト iPS 細胞由来肝細胞シート移植法の検討

(A)　70% 部分肝切除を行った Rag2$^{-/-}$IL2rg$^{-/-}$マウスにヒト iPS 細胞由来肝細胞シートもしくはヒト iPS 細胞由来肝細胞懸濁液を移植した。
(B)　ヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを移植したマウス (hepatocyte-sheet transplant)、もしくはヒト iPS 細胞由来肝細胞懸濁液を移植したマウス (hepatocyte-suspension transplant) から採血を行い、ELISA 法により血中ヒトアルブミン濃度を測定した。

	Primers (forward/reverse; 5′ to 3′)
GAPDH	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC/GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
1st PCR	AGACCCTAAGAGGACGAAGACAGA/ CCCATGGCGTAACTCCATAG
2nd PCR	AAGGAAAGGGTTCT/ CCCAACGATCTGGATGTTCT

表1　RT-PCRに用いたプライマーリスト

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

造血幹細胞移植系の確立に関する研究

研究分担者
仲野 徹（大阪大学大学院生命機能研究科・教授）、

研究協力者
北島 健二（東京都医学総合研究所・幹細胞プロジェクト・主席研究員）

研究要旨
我々は、 マウス成体造血幹細胞の体外増幅活性を有する転写因子Lhx2をマウス胚性幹細胞（ES細胞）・マウス人工多能性幹細胞（iPS細胞）に強制発現させ、OP9ストロマ細胞上において培養することにより、長期骨髄再建能を有する造血幹・前駆細胞へと分化誘導することに成功し、報告している[1]。この、Lhx2による造血幹・前駆細胞誘導の分子作用機序の解明、およびLhx2を利用したヒトiPS細胞から造血幹・前駆細胞への分化誘導システムの開発、そして、その細胞を用いた造血・免疫系ヒト化マウスの作製をおこなう。
1: Kitajima K, et al. Blood 117:3748-3758, 2011.

A. 研究目的
Lhx2による造血幹・前駆細胞誘導の分子作用機序を明らかにする。また、ヒトiPS細胞からLhx2を用いて造血幹・前駆細胞誘導を誘導できるか否かを明らかにする。ヒトiPS細胞から分化誘導した造血幹・前駆細胞誘導を免疫不全マウスに移植し、造血・免疫系ヒト化マウスの作製をおこなう。

B. 研究方法
ドキシサイクリンによる遺伝子発現制御システムを用いて、Lhx2をコンディショナルに発現するマウスES細胞株（iLhx2-ES細胞）を樹立し、このES細胞株を用いて、ES細胞から血液細胞までの各分化段階におけるLhx2強制発現の効果，およびLhx2の標的遺伝子の探索をおこなった。

ヒトiPS細胞から造血幹・前駆細胞への試験管内分化誘導をおこない、いくつかの培養条件を試行して、血液細胞に効率よく分化誘導できる条件を探索した。

C. 研究成果
マウスES細胞は、OP9ストロマ細胞との共生培養により、中胚葉系細胞を経て血液細胞へ分化する。OP9ストロマ細胞を用いたiLhx2-ES細胞の分化誘導をおこなった結果、Lhx2を中胚葉分化以前に発現させると中胚葉分化を強く阻害することが明らかとなった。一方、中胚葉分化以降にLhx2を発現させると、造血幹・前駆細胞が誘導・増幅した。得られた造血幹・前駆細胞は、Lhx2に依存して自己複製をおこない、Lhx2の発現を無くした場合、速やかに成熟血液細胞へ分化した。

Lhx2により得られた造血幹・前駆細胞において、Lhx2の発現を無くした場合に発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析により調べた。Lhx2により発現が亢進している遺伝子として、転写因子GATA3を同定し、GATA3の強制発現実験により、GATA3が成熟血液細胞分化を抑制することを明らかにした。

ヒトiPS細胞をOP9ストロマ細胞と共生培養するとCD34陽性細胞に分化すること、CD34陽性細胞は分化誘導7日目に出現し、10～14日目にかけて増加することが判明した。しかし、このCD34陽性細胞からの血液細胞の出現頻度は極めて低く、今後、さらに培養条件の改良をおこなう。

D. 考察
マウスES細胞から血液細胞への分化において、Lhx2は中胚葉分化を抑制することが明らかとなった。このことからヒトiPS細胞においても、Lhx2を発現させる分化段階が造血幹・前駆細胞誘導に重要であるものと考えられた。今後、ヒトiPS細胞から血液細胞への分化過程において、経時的に分化段階を調べ、Lhx2を発現させるのに適した分化段階を同定する。

ヒトiPS細胞の分化能は、細胞株間によって異なることが知られている。そこで、複数のヒトiPS細胞株を用いて血液細胞への分化誘導、Lhx2の強制発現をおこない、造血幹・前駆細胞への分化誘導を試みる。

E. 結論
Lhx2によるマウスES細胞からの造血幹・前駆細胞誘導は、Lhx2の発現を開始する分化段階が重要である。Lhx2はGATA3などの発現を活性化することにより、成熟血液細胞への分化を阻害し、造血幹・前駆細胞の未分化性を維持している。ヒトiPS細胞については、より効率よく血液細胞へ分化誘導できる培養条件を見つけ出すことが急務である。

F. 研究危険情報
総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許所得
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（平成24年度Ｂ型肝炎創薬実用化等研究事業）
「免疫系を保持した次世代型Ｂ型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用」班
分担研究報告書

キメラマウスの作成に関する研究

研究分担者 末水洋志 公益財団法人実験動物中央研究所バイオメディカル研究部長

研究要旨：ヒト肝臓とヒト免疫系を併せ持つモデルを開発し、ウイルス感染後の炎症反応、および、病態の進展を観察する。本目的達成のため、TK-NOG、Mcl-1 KO-NOGマウスを作製する。更にMHC class I, II 欠損TK-NOGヒト化肝臓モデルを作製し、ヒト免疫系の再構築を試みる。

末水洋志

公益財団法人 実験動物中央研究所
バイオメディカル研究部　部長

A．研究目的
従来、霊長類で行われてきたヒトウイルス性肝炎の研究を小動物で可能にするため、ヒト肝臓を保有するTK-NOGとMcl-1 KO-NOGマウスモデルを開発する。これら免疫不全マウスを基盤としたモデルでは、ウイルス感染後の炎症反応が見られないため、更に改良を加え、ヒト肝臓とヒト免疫系を併せ持つモデルの開発を行う。これにより、ウイルスの感染だけでなく、病態の進展を観察することが可能になり、新たな肝炎治療薬の開発に貢献するものと期待される。

B．研究方法
ヒト肝臓とヒト免疫系を併せ持つモデル開発のため、本年度以下の研究を実施した。1）TK-NOGマウスに市販のヒト凍結肝細胞を移植し、ヒト化肝臓マウス作製する。2）129系統由来 Mcl-1 KOマウスを免疫不全化するためにNODマウスに戻し交配を行う。3）末梢血単核球の生着が容易なMHC class I, II 両欠損NOGマウスとTK-NOGマウスを交配し、ヒト肝臓とヒト免疫系を併せもつマウスの開発を開始する。

C．研究結果
1）TK-NOGマウスにヒト肝臓細胞を移植してヒト化肝臓マウスを作製した。HBV感染試験の用途で当該マウスを研究代表者に提供した。
2）Mcl-1 KOマウス/NODマウスF1雑種をNODマウスに戻し交配し、61匹の産仔（N2世代）を得た。オスの産仔35匹を対象にPCRによりMcl-1 fl/+かつAlb-Cre/-を選別した。両陽性を示した11匹を87 STR解析（957PCR）し、NOD遺伝背景の高いマウス（理論値75%, 選抜個体80.6%）を選抜してN3世代を作出した。3）NOG IAβ KO/β2m KO♂マウスとTK-NOG♀マウスを交配し、産仔を得た。IAβ KO/β2m KOはヘテロであることからPCR genotypingにより♀TK/-を選別した。

D．考察
ヒト肝臓とヒト免疫系を併せ持つモデルMHC class I, II 欠損TK-NOGマウスの交配が進んだことから、小規模ではあるが平成２５年度から有用性の検討を開始できる見込みとなった。また、Mcl-1 KOマウスのスピードコンジェニックも順調に進み平成２５年度末には免疫不全化できる見込みである。

E．結論
NOG マウスを基盤とした免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発が着実に進んでいる。

F．健康危険情報

G．研究発表
1. 論文発表　なし
2. 学会発表　なし

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

別紙３

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

免疫系を保持した次世代型Ｂ型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用に関する研究

研究分担者　高橋　武司　実験動物中央研究所

研究要旨

ヒトB型肝炎をマウス内で再現するため、ヒト免疫細胞の発生分化および機能的ヒト免疫反応が可能な免疫系ヒト化マウスをヒト遺伝子導入を始めとする遺伝子改変技術により作出する。

高橋武司・実験動物中央研究所　実験動物研究部　免疫研究室室長

Ａ．研究目的

B型肝炎はヒト特異的ウイルスであるため、ヒトの病態を再現できる小動物モデルの開発が不可欠である。本研究ではヒト肝臓とヒト免疫系を併せ持つヒト化マウスを作製し、B型肝炎をin vivoで再現できる実験系を作製する。

Ｂ．研究方法

超免疫不全NOGマウスをヒト化マウスに遺伝子操作を加えて、ヒトの機能的免疫反応が可能なモデルの作出を行う。

具体的には

(1) ヒトHLA遺伝子の導入
(2) ヒト骨髄細胞系の分化促進
(3) NOGマウスにおけるリンパ節回復
(4) ヒトB細胞分化の促進
(5) 肝・免疫系両ヒト化マウスの作製を行う。

Ｃ．研究結果

(1) HLA-A2tg, HLA-DR0405tgマウスの作出完了
(2) GM-CSF/IL-3tgマウスにより樹状細胞、マクロファージ、顆粒球、マスト細胞などのヒト骨髄細胞分化の亢進を確認
(3) RORγt-γcBACtgマウス作製中
(4) CD11b-IL-4tg マウス作製中
(5) TK-NOGxβ2m/I-Aβ両欠損NOG作製中

Ｄ．考察

免疫系ヒト化マウスではヒトHLA遺伝子の導入および移植造血幹細胞のHLAハプロタイプを適合させることによりヒト獲得免疫系の作動が可能である。

ヒトサイトカイン遺伝子の導入により、ヒト免疫細胞の分化亢進、機能促進が可能である。現在IL-4に加え、IL-5, IL-6, IL-7, IL-23, IL-33などを樹立ずみ、もしくは樹立中である。

これらの遺伝子改変NOGマウスを用いて肝、免疫両ヒト化マウスを作製すれば、抗ウイルス免疫反応の惹起が期待できる。

Ｅ．結論

ヒト化マウスを用いたB型肝炎ウイルスの慢性感染モデルの樹立にむけ、着実に進んでいる。

Ｆ．健康危険情報

Ｇ．研究発表

1. 論文発表

PLoS One,7(6),e37892,2012
Cell Mol Immunol,9(3),208-214,2012
Int Immunol., 24, 243-252,2012

2. 学会発表

第41回日本免疫学会　12月6日
2-F-W32-4-O/P, 2-F-W32-9-P

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）なし

別紙３

厚生労働科学研究費補助金（平成24年度Ｂ型肝炎創薬実用化等研究事業）
「免疫系を保持した次世代型Ｂ型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用」班
分担研究報告書

ヒト化肝／NOGマウスの病理組織学的解析に関する研究

研究分担者　中村雅登　公益財団法人　実験動物中央研究所　病理病態研究部　部長

研究要旨：Ｂ型肝炎ウイルス感染マウスモデル作製に必要なヒト化肝／NOGマウスの肝臓を病理組織学的に解析しウイルス感染モデル作製のための病理組織学的背景を明らかにした。ヒト化肝組織は正常ヒト肝の形態を保持し、Ｂ型肝炎ウイルス感染に伴う変化を解析する適切な系となる可能性を示した。ヒト化肝／TK-NOGマウスはヒト免疫系を保持したＢ型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発に適切な母体となりうる。

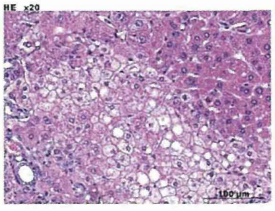
中村　雅登
公益財団法人　実験動物中央研究所
病理病態研究部　部長

Ａ．研究目的
Ｂ型肝炎ウイルス感染マウスモデル作製に必要なヒト化肝－NOGマウスの肝臓の病理組織学的解析を実施しその詳細を明らかにし、今後作製されるウイルス感染モデルの病理組織学的背景を明らかにする。

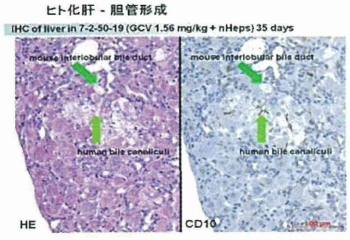
Ｂ．研究方法
誘導性肝障害を惹起し関西性刺激を継続的に発生させたTK-NOGマウスの脾門部にヒト肝細胞を移植しヒト化肝／NOGマウスを作出する。作出されたヒト化肝の病理組織学的、免疫病理学的解析を実施し、ヒト化肝の病理組織学的特徴を明らかにする。

（倫理面への配慮）
臨床材料は使用せず、倫理面への配慮は特に必要とされない。動物実験に関しては実中研の動物実験倫理に関する所内規定を遵守している。

Ｃ．研究結果
ヒト化肝細胞はマウス肝細胞と異なりグリコーゲン含有量が相対的に高く、は明澄の胞体（細胞質）を呈している。



免疫組織学的にもマウス胆管への連絡が確認され胆汁鬱滞の所見は明らかではない。NOGマウスは超免疫不全マウスで炎症性細胞浸潤は明らかではない。



Ｄ．考察
ヒト化肝細胞は安定してほぼ正常のヒト肝の形態を保持している。Ｂ型肝炎ウイルス感染に伴う変化を組織学的に解析する系として適切な系となる可能性を示している。今後、リンパ球移植などによる免疫反応の再構築が課題となる。

Ｅ．結論
ヒト化肝／TK-NOGマウスはヒト免疫系を保持したＢ型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発に適切な母体システムとなりうる。

Ｆ．健康危険情報

Ｇ．研究発表
1.　論文発表
　該当なし
2.　学会発表
　該当なし

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
1. 特許取得　　該当なし
2. 実用新案登録　　該当なし
3. その他　　該当なし

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表

別紙４

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
上田啓次（上田）	HHV-8	新居志郎	病原細菌・ウイルス図鑑	北海道大学出版会			編集中
高山和雄、（水口）	多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導	後藤満一、大橋一夫	再生医療業書	朝倉書店	日本	2012	110-116

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
Nawa T,（竹原）	Interferon-α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway.	Virology	432	452-459	2012
Kurokawa M,（竹原）	Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection.	J Gastroenterol	47	577-585	2012
Fujimoto Y,（竹原）	Hepatitis B virus reactivation associated with temozolomide for malignant glioma: a case report and recommendation for prophylaxis.	Int J Clin Oncol	17	290-293	2012
Kodama T,（竹原）	Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages.	Cell Death Diff	11	1856-1869	2012
Nishida T,（竹原）	Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic.	Hepatol Res			in press
Ohsaki, E.（上田）	Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partitioning and Maintenance in the Latency.	Frontiers in Virology	3	7-19	2012

Nakano, K., （上田）	Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.	Virology	425	95-102	2012
Ueda, K. （上田）	For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.	Frontiers in Virology	3	1-2	2012
Ueda, K. （上田）	Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded.	J.Blood and Lymph	2	3	2012
Noma, S, （上田）	Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7.	Neuroscience Res.	73	115-121	2012
上田啓次 （上田）	B 型肝炎のウイルス学	化学療法の領域	48	125-133	2012
上田啓次 （上田）	遺伝子挿入 HBV を用いた感染リセプターの探索	肝胆膵	65	601-609	2012
Takayama K, （水口）	Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1α transduction.	*J. Hepatol.*	57	628-636	2012
Nagamoto Y, （水口）	The 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
水口裕之、 （水口）	ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用	レギュラトリーサイエンス	43	982-987	2012
早川堯夫、 （水口）	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
水口裕之 （水口）	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	48	827	2012
Takayama K, （水口）	3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing.	Biomaterials	34	1781-1789	2013
Kawabata K, （水口）	Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells.	J. Stem Cell Res. Ther.			in press

高山和雄、（水口）	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			in press
高山和雄、（水口）	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
川端健二、（水口）	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
T. Nishimura, （末水）	Using chimeric mice with humanized livers to predict human drug metabolism and a drug-drug interaction	J Pharmacol Exp Ther	344	388-96	2013
R. Ito, （末水）	Efficient xenoengraftment in severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rgammanull mice is attributed to a lack of CD11c+B220+CD122+ cells	J Immunol,	189	4313-20	2012
H. Yamazaki, （末水）	In vivo Drug Interactions of the Teratogen Thalidomide with Midazolam: Heterotropic Cooperativity of Human Cytochrome P450 in Humanized Liver TK-NOG Mice	Chemical Research in Toxicology			in press
A. Tsukada, （末水）	Plasma concentrations of melengestrol acetate in humans extrapolated from the pharmacokinetics established in *in vivo* experiments with rats and chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling	Regulatory Toxicology and Pharmacology			in press
Moriya K, （高橋）	Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice.	PLoS One	7(6)	e37892	2012
Ito R, （高橋）	Current advances in humanized mouse models.	Cell Mol Immunol.	9(3)	208-214	2012
Suzuki M, （高橋）	Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γcnull mouse.	Int Immunol.	24	243-252	2012