

201228016A

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

ヒト／チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用した
B型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 研 一

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用した B型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発	----- 1
熊本大学 教授 山村研一	
II. 分担研究報告	
1. ES細胞の樹立とモデルマウスの作製	----- 6
熊本大学 准教授 荒木喜美	
2. チンパンジーの末梢血液細胞からのiPS細胞の樹立	----- 9
熊本大学 教授 江良択実	
3. エピジェネティクス解析によるHBV-cccDNAの発現制御の 検討と肝炎発症メカニズムの解析	----- 13
熊本大学 教授 佐々木裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 18

I. 総括研究報告書

ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用した
B型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発

研究代表者 山村 研一 熊本大学生命資源研究・支援センター 教授

研究要旨

チンパンジーiPS細胞とHhex遺伝子を破壊したため肝臓を欠失しているマウス由来の胚盤胞との間でキメラ胚を作製し、チンパンジー肝臓キメラマウスの作製を行うため、チンパンジーの血液を採取し、チンパンジーのiPS細胞の樹立に成功した。免疫応答系は、ヒト型とするため、ヒトβ2-microglobulin遺伝子、HLA-A2.1のα1およびα2ドメイン、マウスのMHCクラスIのDBハプロタイプのα3ドメインが融合した遺伝子(HLA-A2.1-hβ2m)が導入され、かつマウスのクラスIのDBとβ2-microglobulin(B2m)が破壊されているマウス系統「Tg(HLA-A2.1-hβ2m);H2-DB^{+/+};B2m^{-/-}」を入手し増産した。また、HLA-A2.1-hβ2m遺伝子を入手し、配列を確認した。マウスの肝細胞を完全に死滅させるため、2つのベクター、SAP-Cre-ERT2(SC)およびCAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A(CD)を構築した。キメラマウス完成後に実際に感染実験を行うためHBVの感染条件を確定した。HBVゲノム内にCTCF結合配列が存在することを見だし、エピジェネティックな調節機構が、HBVcccDNAの発現制御を通してde novo肝炎発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究分担者

- ・荒木 喜美・熊本大学生命資源研究・支援センター・准教授
- ・江良 択実・熊本大学発生医学研究所・教授
- ・佐々木 裕・熊本大学生命科学研究部・教授

A. 研究目的

HBVキャリアは本邦でも150万人存在し、治療抵抗性であるとともに10-20%に肝臓が発症することから、慢性B型肝炎発症機構の解析とそれに基づく新たな治療法の確立は急務である。そこで、HBV感染可能で免疫応答が正常な感染マウスモデルを作製し、病態解析と治療法確立の画期的なツールを開発することを目的とする。

B. 研究方法

HBVが感染可能で正常の免疫応答を持つマウスを作製することを目的とし、(1)チンパンジー肝臓キメラマウスの作製、(2)ヒト肝臓置換マウスの作製、(3)HBV肝炎モデルの確立を行う。それぞれの項目について平成24年度は、以下の研究を行う。

- (1) チンパンジー由来iPS (ciPS) 細胞の樹立 (江良)

チンパンジーの血液細胞よりセンダイウイルスベクターを用いてiPS細胞を樹立する。チンパンジーの末梢血液は京大霊長類研(研究協力者: 明里宏文先生)の協力にて採取する。樹立したiPS細胞がチンパンジー由来であるかどうかを検証するとともに、テラトーマ形成実験等を行いiPS細胞としての多分化能を有しているかどうかを確認する。

- (2) Tg(HLA-A2.1-hβ2m);H2-DB^{+/+};B2m^{-/-}およびその遺伝子の入手と確認(山村、荒木)

このマウスは、ヒトβ2-microglobulin遺伝子、HLA-A2.1のα1およびα2ドメイン、マウスのMHCクラスIのDBハプロタイプのα3ドメインが融合した遺伝子(HLA-A2.1-hβ2m)が導入され、かつマウスのクラスIのDBとβ2-microglobulin(B2m)が破壊されているマウス系統であり、すでに熊本大学生命科学研究部西村教授の管理のもと飼育されている。しかし、パスツール研Lemonnier博士の所有であるので、MTAを交わし使用できるようにする。入手後、ES細胞作製

のために必要な胚盤胞を採取するために、交配を行い多数のマウスを得る。HLA-A2.1-hβ2m を入手し、配列を確認する。

(3) マウス肝細胞死滅用のベクター構築 (荒木)

マウスの肝細胞を完全に死滅させるためには任意の時期に短い時間でマウス肝細胞が死に至る必要がある。従来モデルでは、これが不可能なため、マウス肝細胞が残像するという欠点があった。このため、タモキシフェン投与時にのみマウス肝細胞を死滅させることを計画し、2つのベクター、SAP-Cre-ERT2(SC) および CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A(CD) を構築する。SAP は肝臓特異的なプロモーターであり、Cre-ERT2 を肝臓特異的に発現させることができる。しかし、このままでは肝細胞の細胞質にとどまる。一方、CAG プロモーターにより、loxP に挟まれた EGFP が発現している。この状態で、タモキシフェンを投与すると、ERT2 と結合し、Cre が核内に運搬される。そして、loxP 間の組換えを起こし、CAG プロモーターによってジフテリア毒素の A フラグメント (DT-A) が発現し、肝細胞は死滅すると考えられる。

(4) HBV 感染と肝炎発症実験のための予備調査と実験 (佐々木)

HBV 既感染患者において免疫抑制状態で肝炎を発症する *de novo* 肝炎については研究が進んでいない。その理由の一つとして、解析に必要な実験動物が不在であったことが挙げられる。*de novo* 肝炎には、B 型急性肝炎治癒後に肝細胞内に残存する HBV-covalently closed circular DNA (cccDNA) が重要な役割を果たしている。HBV-cccDNA からの転写活性が低ければ肝炎は顕在化しないと考えられる。また、免疫抑制状態では HBV-cccDNA からの転写が活性化することにより肝炎が再燃し、*de novo* 肝炎を生じると考えられている。しかし免疫抑制により HBV-cccDNA が何故再活性化するか、そのメカニズムは解明されていない。しかし、最近エピジェネティクスの関与が示唆され、ことに宿主側の蛋白質である CTCF はクロマチン高次構造を制御する key 分子とされ、ウイルス感染も含む様々な生命現象に関与することが明らかになっている。

実際、肝炎肝癌誘導遺伝子の制御に CTCF が関与していることを報告している。HBV においてもその生活環に CTCF が関与する可能性があり、この点を明らかにすることも目的の一つである。作製されたキメラマウスに肝炎ウイルスを感染させるために必要な条件を具体的に検討する。また、HBV-cccDNA の制御メカニズムに関与と思われるエピジェネティクス関連因子について *in silico* にて解析する。

(倫理面への配慮)

本研究ではインフォームド・コンセント等の同意については該当なし。ヒト iPS 細胞は市販のヒト線維芽細胞より樹立したものか、すでに理化学研究所バイオリソースセンターにて配布している株を用いる。ヒト iPS 細胞の樹立とそれを用いた肝細胞への分化研究ならびにマウスへの移植研究についてはすでに所属機関の倫理委員会にて承認済みである。

実験動物に対する動物愛護上の配慮に関して、チンパンジーからの iPS 細胞作製は末梢血液を採取して行うために、当該機関である京都大学霊長類研究所の倫理審査委員会での承認を得て行う。採血の方法は通常チンパンジーから採血している方法に準じる。

マウス動物実験については、所属機関の委員会での承認後、機関内の指針を遵守し行う。

C. 研究結果

(1) チンパンジー由来 iPS (ciPS) 細胞の樹立 (江良)

チンパンジーの血液は、研究協力者の京都大霊長類研究所の明里教授の協力のもとチンパンジー2 個体から健康診断時に採血した。フィコールを用いて分離した単核球から活性化した T リンパ球を後の iPS 細胞誘導に用いた。初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つ非組込型センダイ・ウイルスベクター (SeV) を用いたが、1 個体目では iPS 細胞コロニーがほとんど見られなかった。原因は、抗 CD3 抗体での刺激が強すぎ、細胞状態が悪化したためと考えられた。そこで、チンパンジー 2 個体目では 1) ConA 刺激に変更、2) FGF2 の濃度をあげ 30ng/ml へ変更、3) ウイ

ルスの力価を MOI:10 から MOI:30 へ上昇等の変更を行った。その結果、多くの iPS 細胞コロニーを認めた。単離した iPS 細胞コロニーを増幅し、SeV ウイルス除去と未分化マーカーの発現を免疫染色、RT-PCR で調べ、その発現を確認した。次に、これらの iPS 細胞がチンパンジー由来の細胞であることをヒトとチンパンジーで長さに違いある遺伝子を PCR にて増幅することで確認した。加えて、染色体検査にて正常核型であること、チンパンジーであることを確認した。また、T リンパ球由来の iPS 細胞であることを、iPS 細胞の T リンパ球受容体遺伝子再構成の有無を調べ、確認した。

(2) Tg(HLA-A2.1-hβ2m);H2-DB⁺;B2m⁺およびその遺伝子の入手と確認 (山村、荒木)

Hhd マウスを入手し、繁殖を行った。このマウスは2つの内在性遺伝子のノックアウトアレルと1つのトランスジーン全てがホモ接合体の状態で維持されているが、一腹あたりの産仔数が少ない傾向にあったため、繁殖には時間を要したが、現在、体外受精のために必要な雌をコンスタントに用意できる体制が整った。Hhd 遺伝子及び薬剤耐性カセットであるハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを入手した。増やしたプラスミドを制限酵素による切断や塩基配列決定により確認を行った。さらに、このプラスミドを発現した場合に発現を確認するためのヒト HLA-A2.1 に対する抗体も入手した。

(3) マウス肝細胞死滅用のベクター構築 (荒木)

SAP-CreERT² と CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A 及び薬剤選択のための PGK-Puro を構築した。これら3種類の fragment を混合でマウス ES 細胞にエレクトロポレーションで導入した。ピューロマイシン選択後、得られたコロニーを 96 個単離し、ストック作製後、一部を植え継ぎ、EGFP 蛍光を確認後に DNA を抽出した。CreERT² と DT-A を検出する PCR 及びサザンブロットを行ったところ、2割程度は3種類の遺伝子を持つことが分った。

(4) HBV 感染と肝炎発症実験のための予備調査と実験 (佐々木)

マウスへの HBV 感染条件を文献検索した結果、茶山らは HBV 感染患者の血清を 5uL 尾静脈より静注することによりマウスへの感染をなし得たと報告している (Hepatology, 2005)。そこで該当患者の血液中の HBV-DNA 量と併せて考察すると、 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ copy の投与で作成されたキメラマウスに感染が成立しうると考えられた。

HBV-cccDNA からのウイルス RNA 転写の調節には、エピジェネティックな調節機構が働いている可能性がある。そこで NCBI に記載されている HBV-DNA のゲノム配列を用いて *in silico* 解析を行った。その結果、HBV-DNA 内にはいくつかの肝特異的な転写因子の結合配列の他に、エピジェネティックな調節機構の key 分子の一つである CTCF の結合が予想される配列が存在することを見出した。このことから HBV-cccDNA からの転写活性の制御に CTCF が関与していることが示唆された。

D. 考察

チンパンジーの単核球から T リンパ球への誘導では、CD3 抗体、IL-2 ではなく、ConA を用いることが必要だが、iPS 誘導に必要な 4 因子等はおおまかな条件はほぼヒトと同じ条件にて誘導、樹立が可能と考えられる。ヒトとチンパンジーで一部の遺伝子の長さに違いがあり、その部分を PCR にて増幅することでヒトとチンパンジー由来細胞を識別可能であった。この遺伝子の長さを利用することは、細胞の由来を識別する手段として有用と判断できる。

Hhd マウスのコロニーを順調に増やすことが出き、交配上の問題はない。Hhd 遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドは、プラスミドベクター部分を切り離すことが出来ない。従って、直鎖化した状態で導入することになるが、プラスミドベクター部分も同時に挿入されることになり、発現の低下がやや危惧される。マウス肝細胞を誘導的に死滅させるための3種類のカセットを混合してもマウス ES 細胞に効率よく導入できることが分った。この場合、プラスミドベクターは切り出しによりあらかじめ除くので、そ

の影響を気にする必要はなくなる。Hhd 遺伝子導入についても、この手法は1つの選択肢になり得る。

キメラマウス完成後に実際に感染実験を行うためのタイトレーションは必要であるが、目安となる数値は得られた。一方、HBV ゲノム内に CTCF 結合配列が存在することから、エピジェネティックな調節機構が、HBVcccDNA の発現制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

チンパンジー2 個体の末梢 T リンパ球から iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなかった。T リンパ球受容体遺伝子サザンブロット解析からこの iPS 細胞は T リンパ球由来であり、染色体検査あるいは遺伝子解析よりチンパンジー細胞由来であることが確認された。したがって、チンパンジー由来の iPS 細胞の樹立に成功したといえる。

Hhd マウスと Hhd 遺伝子のコンストラクトの入手と増殖は計画通りに達成した。また、肝細胞を欠失させるためのコンストラクト、SAP-CreERT²、CAG-loxP-EGFP-loxP-DTA、PGK-Puro も構築、マウス ES 細胞に導入できた。

キメラマウスに B 型肝炎ウイルスを感染させるために必要な条件を明らかにし、またエピジェネティクス関連因子が de novo 肝炎発生に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Park, H. J., Byun, D., Lee, A. H., Kim, J. H., Ban, Y. L., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K., Kim, I., Park, S. H. and Jung, K. C. CD99-dependent expansion of myeloid-derived suppressor cells and attenuation of graft-versus-host disease. *Molecules Cells* 33:259-267, 2012.
- (2) Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio,

T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K. and Hirao, A. mTORC1 is essential for leukemia propagatin but not stem cell self-renewal. *J. Clin. Invest.* 122:21124-2129, 2012.

- (3) Ohki, T., Sato, Y., Yoshizawa, T., Yamamura, K., Yamada, K. and Yamagata, K. Identification of hepatocyte growth factor activator (Hgfac) gene as a target of HNF1 α in mouse β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:619-624, 2012.
- (4) Abe, K., Araki, K., Tanigawa, M., Semba, K., Ando, T., Sato, M., Sakai, D., Hiyama, A., Mochida, M. and Yamamura, K. A Cre knock-in mouse line on the Sickletail locus induces recombination in the notochord and intervertebral discs. *Genesis J. Genet. Dev.* 50: 758-765, 2012.
- (5) Komatsu, Y., Yu, P.B., Kamiya, N., Pan, H., Fukuda, T., Scott, G.J., Ray, M.K., Yamamura, K. and Mishina, Y. Augmentation of Smad-dependent BMP signaling in neural crest cells causes craniosynostosis in mice. *J. Bone Mineral Res.* in press.
- (6) Araki, K. and Yamamura, K. Genetic manipulations using Cre and mutant loxP sites. (ed. Alexei Morozov), in *Controlled genetic manipulations. Neuromethods. Vol. 65, 29-45, 2012. Springer-Verlag GmbH, Berlin.*

2. 学会発表

- (1) 阿部幸一郎, 荒木喜美, 谷河麻耶, 仙波 圭, 安藤 卓, 佐藤正宏, 酒井大輔, 檜山明彦, 持田讓治, 山村研一: *Sktere* マウス系統を用いた椎間板コンディショナルノックアウトシステムの構築, 日本実験動物科学・技術九州2012 (第59回日本実験動物学会総会/第46回日本実験動物技術者協会総会, 2012.5.24-5.26, 大分 (別府国際コンベンションセンター))
- (2) 荒木喜美, 中原 舞, 作村由美, 牟田真由美,

山村研一, 荒木正健 : ヘルパーES細胞を用いることによりキメラ作製困難なES細胞から生殖系列キメラを得る手法の開発, 日本実験動物科学・技術九州2012(第59回日本実験動物学会総会/第46回日本実験動物技術者協会総会, 2012.5.24-5.26, 大分(別府国際コンベンションセンター))

- (3) 星居孝之, 仲一仁, 村口輝行, 曾我朋義, 荒木喜美, 山村研一, 平尾敦 : 急性骨髄性白血病細胞の増殖と幹細胞維持におけるmTORC1の機能解析, 第71回日本癌学会学術総会, 2012.9.19-9.21, 北海道(札幌市教育文化会館)
- (4) 荒木喜美, 中原舞, 牟田真由美, 荒木正健, 山村研一 : 単独では高寄与率のキメラを得ることが困難なES細胞からヘルパーES細胞を用いることにより生殖系列キメラを得る手法の開発, 日本遺伝学会第84会大会, 2012.9.24-9.26, 福岡(九州大学医学部)
- (5) 中村仁, 小口綾貴子, 河野憲二, 山村研一, 柳田素子 : 慢性腎臓病における腎性貧血および線維化の役割を担う神経堤由来線維芽細胞の機能解析, 第35回日本分子生物学会年会, 2012.12.11-12.14, 福岡(マリンメッセ福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化研究事業)
(分担) 研究報告書

ES 細胞の樹立とモデルマウスの作製

研究分担者 荒木 喜美 熊本大学 生命資源研究・支援センター

研究要旨

マウスにおいて、ヒトまたはチンパンジー由来の細胞を拒絶せず、かつ、炎症反応を起こさせるためには、主要組織適合抗原(MHC)が一致し、マウスの胸腺において MHC、CD8、TCR を介して行われる T 細胞の教育が正しく行われないといけない。そのため、マウス CD8 が結合するマウスの MHC の a3 domain とヒト MHC の b2m 及び a1-a2 の融合遺伝子を発現し、かつ、マウス内在性の MHC が欠損しているマウス、Hhd マウスを用いる。このマウスを入手し、繁殖させた。さらに、ヒトまたはチンパンジーの iPS に導入するため、この融合 MHC トランスジーンも入手し、コンストラクトを確認した。また、肝臓を欠失させるためのコンストラクト、SAP-CreER^{T2} と CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A を作製し、期待通りに働くかどうかの検証のため、ES 細胞への導入を行った。

A. 研究目的

HBV 肝疾患の病態の解明と新規治療法の確立を目指すために、HBV 感染可能なマウス、さらに、感染だけではなく、免疫応答により肝炎が引き起こされるマウスモデルの開発を目標とする。そのため、マウス胚操作と iPS 技術を駆使し、チンパンジー肝臓キメラマウス、ヒト肝臓置換マウスの作製を行うことが目的である。

B. 研究方法

従来のヒト化肝臓マウスには免疫不全マウスが用いられるが、炎症を起こすためには、免疫不全マウスを用いることは出来ない。そのため、ヒト MHC の b2m 及び HLA-A2.1 の a1-a2 と、マウス CD8 を結合させるためマウス MHC H2-D^b の a3 domain を融合した遺伝子(Hhd 遺伝子)を発現し、かつ、この融合遺伝子が有効に機能するためマウス内在性の MHC を欠損させた Hhd マウスを用いる。平成 24 年度はこの Hhd マウスを入手し、胚操作を行うのに十分な数までの繁殖を行う。また、将来用いるヒトやチンパンジーの細胞も同じ MHC 分子を発現する必要があるため、トランスジーンである Hhd 遺伝子を入手する必要がある。さらに、このマウスにおいて、マウス肝

細胞が誘導的に死滅させることを可能にするため、肝臓で部位特異的組換え遺伝子を発現させるコンストラクトと、組換えにより細胞死を誘導するコンストラクトを構築する。

(倫理面への配慮)

マウス動物実験については、所属機関の委員会での承認後、機関内の指針を遵守し行っている。

C. 研究結果

Hhd マウスを入手し、繁殖を行った。このマウスは 2 つの内在性遺伝子のノックアウトアレルと 1 つのトランスジーン全てがホモ接合体の状態で維持されているため、市販のマウスと交配することが出来ない。しかも、一腹あたりの産仔数が少ない傾向にあったため、繁殖には時間を要したが、現在、体外受精のために必要な♀をコンスタントに用意できる体制が整った。

Hhd 遺伝子及び薬剤耐性カセットであるハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを入手した。増やしたプラスミドを制限酵素による切断や塩基配列決定により確認を行った。さらに、このプラスミドを発現した場合に発現を確認するためのヒト HLA-A2.1 に対する抗体も入手した。

肝細胞を欠失させるためのコンストラクト、SAP-CreER^{T2}と CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A 及び薬剤選択のための PGK-Puro を構築、これらと同じプラスミドにのせるための Ligation を試みたが、うまくいかなかったので、3種類の fragment を混合して導入することとした。この計画で問題ないか検証のため、3種類の fragment を混合でマウス ES 細胞にエレクトロポレーションで導入した。ピューロマイシン選択後、得られたコロニーを 96 個単離し、ストック作製後、一部を植え継ぎ、EGFP 蛍光観察した後に DNA を抽出した。CreER^{T2}と DT-A を検出する PCR 及びサザンブロットを行ったところ、2割程度は全て陽性であることが分った。

D. 考察

Hhd マウスのコロニーを順調に増やすことが出来、今後の体外受精や交配は順調に進められると期待される。

Hhd 遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドは、プラスミドベクター部分を切り離すことが出来ない。従って、直鎖化した状態で導入することになるが、プラスミドベクター部分も同時に挿入されることになり、発現の低下が危惧される。発現のモニターのための抗体も入手したので、今後発現効率を検証する予定である。

マウス肝細胞を誘導的に死滅させるためのコンストラクトを1つのプラスミドにのせることは出来なかったが、3種類のカセットを混合して導入することでマウス ES 細胞に導入できることが分った。この場合、プラスミドベクターは切り出しによりあらかじめ除くので、その影響を気にする必要も無い。Hhd 遺伝子導入についても、この手法は1つの選択肢になり得る。

E. 結論

Hhd マウスと Hhd 遺伝子のコンストラクトの入手と増殖は計画通りに達成した。また、肝細胞を欠失させるためのコンストラクト、SAP-CreER^{T2}、CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A、PGK-Puro も構築、マウス ES 細胞に導入できた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Park, H. J., Byun, D., Lee, A. H., Kim, J. H., Ban, Y. L., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K., Kim, I., Park, S. H. and Jung, K. C. CD99-dependent expansion of myeloid-derived suppressor cells and attenuation of graft-versus-host disease. *Mol. Cells* 33: 259-67, 2012.
- (2) Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio, T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K. and Hirao, A. mTORC1 is essential for leukemia-propagation but not stem cell self-renewal. *J. Clinical Invest.* 122: 2114-2129, 2012.
- (3) Abe, K., Araki, K., Tanigawa, M., Semba, K., Ando, T., Sato, M., Sakai, D., Hiyama, A., Mochida, M. and Yamamura, K. Creknock-in mouse line on the sickle tail locus induces recombination in the notochord and intervertebral discs. *Genesis J. Genet. Dev.* 50: 758-765, 2012
- (4) Araki, K. and Yamamura, K. Genetic manipulations using Cre and mutant loxP sites. (ed. Alexei Morozov), in *Controlled genetic manipulations. Neuromethods. Vol. 65, 29-45, 2012. Springer-Verlag GmbH, Berlin.*

2. 学会発表

- (1) 荒木喜美, 中原 舞, 作村由美, 牟田真由美, 山村研一, 荒木正健: ヘルパー ES 細胞を用いることによりキメラ作製困難な ES 細胞から生殖系列キメラを得る手法の開発, 日本実験動物科学・技術九州2012(第59回日本実験動物学会総会/第46回日本実験動物技術者協会総会, 2012.5.24-5.26, 大分(別府国際コンベンションセンター))
- (2) 荒木正健, 吉信公美子, 山村研一, 荒木喜

美：EGTCマウスラインの Gene Ontology 解析，日本実験動物科学・技術九州2012（第59回日本実験動物学会総会/第46回日本実験動物技術者協会総会，2012.5.24-5.26，大分（別府国際コンベンションセンター）

- (3) 舘山浩紀，昇地高雅，中原 舞，荒木正健，荒木喜美，山村研一：C57BL/6 系統と MSM/Ms 系統マウスを用いた *Fto* 遺伝子トラップラインの比較解析，第 26 回モロシヌス研究会，2012.6.15-6.16，東京（東京大学）
- (4) 昇地高雅，舘山浩紀，荒木喜美，高橋 智，山村研一：MSM/Ms 由来 ES 細胞を用いた c-Maf トランスジェニックマウスの作出と解析，第 26 回モロシヌス研究会，2012.6.15-6.16，東京（東京大学）
- (5) 荒木喜美，仙波圭，中原 舞，牟田真由美，阿部訓也，荒木正健，山村研一：Danforth's short tail(*Sd*)変異の原因は *Ptfla* の異所性発現である，第 35 回日本分子生物学会年会，2012.12.11-12.14，福岡（福岡国際会議場）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願；モデル動等動物の作出方法及びモデル動物

出願番号：PCT/JP2012/065668

出願日：2012年6月9日

発明者：大村谷 昌樹、荒木 喜美

権利者：国立大学法人熊本大学

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型肝炎創薬実用化研究事業）
（分担）研究報告書

チンパンジーの末梢血液細胞からの iPS 細胞の樹立

研究分担者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、皮膚由来線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させることで容易に作製できる。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を作り出す能力を有する。加えて、マウス iPS 細胞の場合、胚への移植によってすべての組織に分化することができる。本研究では、キメラマウスの中で肝臓細胞をチンパンジー細胞へ置換し B 型肝炎モデルを樹立することを全体の目的とする。この全体の目的達成のために本分担研究では、チンパンジー由来 iPS 細胞を樹立する。樹立には、国内で開発されたセンダイウイルスベクターを用いる。この方法では、iPS 細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないために、外来因子に依存しない iPS 細胞を作製できる。平成 24 年度は、2 個体のチンパンジーの血液細胞から iPS 細胞の樹立に成功した。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）保有者は国内に 150 万人程度と言われ、5-10%が肝炎を発症し、肝硬変、肝癌に進行する。インターフェロン投与での中和抗体獲得例が全例ではないこと、核酸アナログ製剤の長期投与後に薬剤耐性ウイルスの出現と肝炎の再燃が起こること、が問題となっている。かかる状況において、HBV 肝疾患の病態の解明と新規治療法の確立を目指すために、HBV 感染可能な小動物（マウス等）、特に免疫応答が正常な感染マウスモデルの開発が必要である。

本研究では、HBV が感染可能で正常の免疫応答を持つマウスを作成することを全体の目的とする。HBV はヒト以外ではチンパンジーに感染する。そこで、マウスの中で肝臓細胞をチンパンジー細胞へ免疫状態が正常な状態で置換できれば、HBV 感染可能で正常な免疫応答を持つマウスを作成することができる。

一方、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、皮膚由来線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ

て作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。加えて、マウス iPS 細胞の場合、胚への移植後、体内すべての組織へ分化することができる。そこでチンパンジーから iPS 細胞を樹立し、肝臓欠失マウスとのキメラマウスを作成すれば、肝臓細胞をチンパンジー細胞へ置換したマウスが作成可能であることが予想される。平成 24 年度はチンパンジーの血液細胞から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を作成する。樹立には、国内で開発されたセンダイウイルスベクター（SeV ベクター）を用いる。この方法では、iPS 細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないために、外来因子に依存しない iPS 細胞を作製できる。

B. 研究方法

1. iPS 細胞樹立のためのチンパンジー血液の採取とリンパ球刺激

チンパンジーの末梢血液からフィコールの比重遠心法を用いて単核球を分離する。この単核球を、ヒト同様、IL-2 と抗 CD3 抗体にて 5 日

間試験管内にて刺激し、活性化した T リンパ球を得る。

チンパンジーの末梢血液は、研究協力者の京都大霊長類研究所の明里教授の協力のもと、健康診断時採取された余剰血液を用いる。

2. SeV ベクターを使った iPS 細胞の樹立

SeV ベクターによって患者由来線維芽細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ iPS 細胞の樹立を行う。

樹立した iPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現を PCR にて確認する。これらで iPS 細胞に矛盾ないデータが得られたら、染色体検査を行い、正常核型であること、またチンパンジー由来であることを確認する。加えて、T リンパ球受容体の遺伝子の再構成をサザンブロット法にて確認し iPS 細胞がチンパンジーの T リンパ球由来であることを確認する。

3. 樹立した iPS 細胞の多分化能の確認

樹立した iPS 細胞を、試験管内にて、神経外胚葉様細胞、中胚葉様細胞、内胚葉様細胞への分化を誘導する。また免疫不全マウス (NOD-Scid) へ移植し奇形種を形成させ、多分化能を調べる。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査等

血液細胞からヒト由来 iPS 細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みである。ヒト血液細胞の採取は同意のもと健常人ボランティア 1 名から行う。一般診療に用いられる方法で上腕より 10ml へパリン加採血を行う。したがって危険はない。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。また、研究の成果を学術雑誌に

投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。血液細胞、作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

C. 研究結果

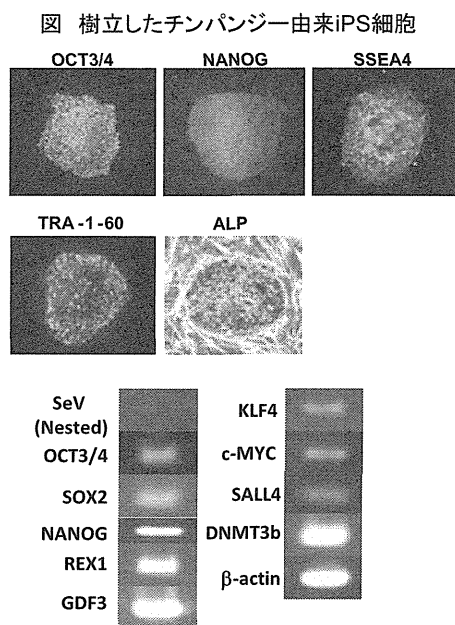
1. iPS 細胞樹立のためのチンパンジー血液の採取とリンパ球刺激

血液は、研究協力者の京都大霊長類研究所の明里教授の協力のもとチンパンジー 2 個体から健康診断時に採血した。フィコールを用いて分離した単核球をヒトと同様に IL-2 と抗 CD3 抗体にて刺激し、活性化した T リンパ球を後の iPS 細胞誘導に用いた。

2. チンパンジーの血液細胞由来 iPS 細胞の樹立

チンパンジーから末梢血液を採取し上述した作業に従い刺激した T リンパ球より、iPS 細胞誘導を行った。iPS 細胞作製には初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つ非組込型セ

ンダイ・ウイルスベクター(SeV)を用いた。このベクターは染色体に組み込まれることなく、細胞質内で遺伝子を発現することができる。チンパンジーの T リンパ球株にてセンダイウイルスが感染することは確認済である。しかし、残念なことに、1 個体目では iPS 細胞コロニーがほとんど見られなかった。原因は、抗 CD3 抗体での刺激が強すぎて細胞状態が悪化したためと考えられた。別の刺激方法にて iPS 細胞誘導が可能か、まずヒト血液細胞を用いて PHA と ConA 刺激を行ったところ、これまでと同様の効率で iPS 細胞コロニーを樹立することができた。そこで、チンパンジー 2 個体目では 1) ConA 刺激に変更 2) FGF2 の濃度を 30ng/ml へ変更 (他のサルでの樹立に高濃度を使っていたため) 3) ウイルスの力価を MOI:10 から MOI:30 へ上昇等の変更を行った。その結果、多くの iPS 細胞コロニーを認めた。単離した iPS 細胞コロニーを増幅し、SeV ウイルス除去と未分化マーカーの発現を免疫染色、RT-PCR で調べ、その発現を確認した (下図)。



次に、これらの iPS 細胞がチンパンジー由来の細胞であることをヒトとチンパンジーで長さに違いある遺伝子を PCR にて増幅することで確認した。加えて、染色体検査にて正常核型で

あること、チンパンジーであることを確認した。また、T リンパ球由来の iPS 細胞であることを、iPS 細胞の T リンパ球受容体遺伝子再構成の有無を調べ、確認した。現在、試験管内分化誘導と奇形腫形成にて多分化能をもつことを確認中である。

D. 考察

チンパンジー 2 個体より末梢血液を採取し、T リンパ球を刺激後、iPS 細胞樹立を行った。チンパンジー由来の末梢 T リンパ球では、ヒトの条件と同じ抗 CD3 抗体、IL-2 にて刺激した場合、iPS 細胞の誘導効率が極端に低かった。これは、この条件での刺激が強すぎて T リンパ球が死んでしまった可能性が高い。そこで ConA を用いる方法に切り替えてリンパ球刺激を行うとうまく誘導することができた。この場合の樹立効率は特にヒト健常者と変わりはなかった。これらの結果より、刺激条件の最適化は行う必要があるものの 4 因子やその他おおまかな条件はほぼヒトと同じ条件にて誘導、樹立が可能と考えられる。作成した iPS 細胞の未分化マーカー遺伝子発現はヒトの場合とほぼ同じであった。ヒトとチンパンジーで一部の遺伝子の長さに違いがあり、その部分を PCR にて増幅することでヒトとチンパンジー由来細胞を識別可能であった。この結果は、染色体の検査によって確認された。したがって、この遺伝子の長さを利用することは、細胞の由来を識別する手段として有用と判断できる。本研究では、末梢血液細胞より iPS 細胞の樹立に成功したが、このように皮膚生検が難しい動物からの iPS 細胞樹立にこの方法は有効である。

E. 結論

チンパンジー 2 個体の末梢 T リンパ球から iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなかった。T リンパ球受

容体遺伝子サザンブロット解析からこの iPS 細胞は T リンパ球由来であり、染色体検査あるいは遺伝子解析よりチンパンジー細胞由来であることが確認された。したがって、チンパンジー由来の iPS 細胞が樹立されたと言える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- (1) 江良 択実 ES/iPS 細胞の分化と臨床への応用 第 115 回 日本小児科学会学術集会 総合シンポジウム 2 iPS 細胞を利用した研究の展開 福岡 2012 年 4 月 20 日
- (2) 江良 択実 iPS 細胞研究の進展 第 28 回 日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 特別講演 福岡 2012 年 4 月 21 日
- (3) 江良 択実 初心者でも簡単。センダイウイルスベクターを使った外来因子フリー疾患由来 iPS 細胞の樹立とその応用 第 11 回 日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー 横浜 2012 年 6 月 13 日
- (4) Era, T. Study for iPS cells derived from intractable diseases 第 18 回日本遺伝子治療学会、Corporate Seminer II、熊本、2012 年 6 月 28 日
- (5) Era, T. Studying the intractable diseases using pluripotent stem cells 第 18 回日本遺伝子治療学会、Symposium III、熊本、2012 年 6 月 29 日

H. 知的所有権の取得状況

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

エピジェネティクス解析による HBV-cccDNA の発現制御の検討と肝炎発症メカニズムの解析

研究分担者 佐々木 裕 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 教授

研究協力者 渡邊 丈久 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 助教

直江 秀昭 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 助教

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)の慢性感染は肝炎発症や肝発癌の主要な原因の1つであるが、HBV感染の慢性化のメカニズムなど、その詳細は未だに解明されない部分が多い。またHBV既感染患者において免疫抑制状態で肝炎を発症することがあり(*de novo*肝炎)、近年その病態が注目されている。本研究では、作成されたキメラマウスにB型肝炎ウイルスを感染させるために必要な条件を具体的に検討した。また、HBV-cccDNAの制御メカニズムに関与すると思われるエピジェネティクス関連因子について*in silico*にて解析したところ、CTCFの結合が予想される配列が存在することを見出した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の慢性感染は肝炎発症や肝発癌の主要な原因の1つであるが、HBV感染の慢性化のメカニズムなど、その詳細は未だに解明されない部分が多い。またHBV既感染患者において免疫抑制状態で肝炎を発症する*de novo*肝炎については研究が進んでいない。その理由の一つとして、解析に必要な実験動物が不在であったことが挙げられる。*de novo*肝炎には、B型急性肝炎治療後に肝細胞内に残存するHBV-covalently closed circular DNA (cccDNA)が重要な役割を果たしていると考えられている。

HBVの肝細胞内の生活環ではHBV粒子は感染後に不完全2重鎖であるHBV-Relaxed circular DNA(rcDNA)から完全2重鎖のHBV-cccDNAに変換される。そこからウイルス粒子の構成蛋白質をコードするmRNAが転写され、逆転写により複製されたHBV-rcDNAとともにHBウイルス粒子を形成する。このHBV-cccDNAからの転写活性が低ければ肝炎は顕在化しないと考えられる。免疫抑制状態で

はHBV-cccDNAからの転写が活性化することにより肝炎が再燃し、*de novo*肝炎を生じると考えられている。しかし免疫抑制によりHBV-cccDNAが何故再活性化するか、そのメカニズムは解明されていない。

また活動性のB型慢性肝炎においては、HBV-RNAからHBV-rcDNAへの逆転写を抑える核酸アナログが治療に用いられているが、投与により血清中のHBV-DNAが測定感度以下になっても核酸アナログの投与中止により血清HBV-DNAが再検出される。これはHBV-cccDNAからの転写活性が高いことを示しており、この点からもHBV-cccDNAには転写活性が高い状態とほとんどない状態の、少なくとも2つ以上の状態が存在することが示唆され、そこにエピジェネティクスの関与が考えられる。

エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現の調節を行う仕組みである。DNAメチル化やヒストン修飾、およびクロマチン高次構造の変化によりゲノムからの転写活性は調節されている。その中で

CTCFはクロマチン高次構造を制御するkey分子とされ、様々な生命現象に関与することが明らかになっている。我々は既に、肝炎肝癌誘導遺伝子の制御にCTCFが関与していることを報告した(渡邊ら、2012)。CTCFは宿主側の蛋白質であるが、ウイルス感染に関与することが近年報告され、その病態が注目されている。とりわけHBVにおいてもその生活環にCTCFが関与する可能性がある。またHBV-cccDNAは肝細胞核内でスーパーコイル状の高次構造を呈しており、その転写活性の調節にHBVゲノムの高次構造が関与している可能性が示唆される。

全体研究ではHBV感染可能で免疫応答が正常な感染モデルマウス(ヒト/チンパンジー肝臓置換マウス)を作成し、病態解析と治療法確立の画期的なツールを開発することを目的しているが、その中で我々は、HBV-cccDNAの発現制御の解析を中心とした、肝炎発症メカニズムの解析を行う。

B. 研究方法

当年度は、①作成されたキメラマウスに肝炎ウイルスを感染させるために必要な条件を具体的に検討する、②HBV-cccDNAの制御メカニズムに関与すると思われるエピジェネティクス関連因子について*in silico*にて解析する、の以上2点を行った。

C. 研究成果

①マウスへのHBV感染条件を文献検索した結果、茶山らはHBV感染患者の血清を5uL尾静脈より静注することによりマウスへの感染をなし得たと報告している(Hepatology, 2005)。そこで該当患者の血液中のHBV-DNA量と併せて考察すると、 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ copyの投与で作成されたキメラマウスに感染が成立しうると考えられた。

②HBV-cccDNAからのウイルスRNA転写の調

節には、エピジェネティックな調節機構が働いている可能性がある。そこでNCBIに記載されているHBV-DNAのゲノム配列を用いて、既知のエピジェネティック関連因子について*in silico*解析を行った。その結果、HBV-DNA内にはいくつかの肝特異的な転写因子の結合配列の他に、エピジェネティックな調節機構のkey分子の一つであるCTCFの結合が予想される配列が存在することを見出した。このことからHBV-cccDNAからの転写活性の制御にCTCFが関与していることが示唆された。

D. 考察

キメラマウス完成後に実際に感染実験を行うためのタイトレーションは必要であるが、目安となる数値は得られた。実際マウスに投与する際には、患者プロファイルおよびゲノム情報の解析が進んでいるHBV株より精製したウイルスを用いる予定である。

一方、同定したHBVゲノム内のCTCF結合配列に実際にCTCFが結合するか、ゲルシフトアッセイ(EMSA)法、およびクロマチン免疫沈降ChIP法を用いて、実際にHBV内のゲノム配列とCTCFが結合するか検討を進めている。さらにHBV-DNAと宿主ゲノムとの相互作用や、HBV-DNAが宿主DNAに組み込まれることによる宿主ゲノムの高次構造の変化についての解析を、ヒトサンプルを用いて予定している。

E. 結論

キメラマウスにB型肝炎ウイルスを感染させるために必要な条件を明らかにし、またHBVcccDNAの発現制御についてエピジェネティクス関連因子が関与している可能性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y and Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human Tumor necrosis factor / Lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 32: 1529-1541, 2012.
- (2) Kawaguchi T, Komori A, Seike M, Fujiyama S, Watanabe H, Tanaka M, Sakisaka S, Nakamuta M, Sasaki Y, Oketani M, Hattori T, Katsura K and Sata M. Efficacy and safety of eltrombopag in Japanese patients with chronic liver disease and thrombocytopenia: a randomized, open-label, phase II study. *J Gastroenterol* 47:1342-1351, 2012
- (3) Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, Watanabe T, Saitoh N, Nakamoto M, Chandra T, Narita M, Shinohara M and Nakao M. Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. *Aging Cell* 11:553-556, 2012
- (4) Naoe H, Iwasaki H, Kawasaki T, Ozaki T, Tsutsumi H, Okuda A, Konoe T, Nonaka K, Kaku E, Shono T, Yokomine K, Sakurai K, Iyama K, Hirota M and Sasaki Y. Primary hepatic gastrinoma as an unusual manifestation of Zollinger-Ellison syndrome. *Case Reports in Gastroenterology* 6:590-595, 2012
- (5) Naoe H, Chiyoda T, Ishizawa H, Masuda K, Saya H and Kuninaka S. The APC/C activator Cdh1 regulates the G2/M transition during differentiation of placental trophoblast stem cells. *BiochemBiophys Res Commun* 430:757-62, 2013
- (6) 佐々木 裕. 原発性・転移性肝腫瘍 (内科)

今日の治療指針 私はこう治療している山口徹、北原光夫、福井次矢 総編集 pp486-488、医学書院、東京、2012

- (7) 渡邊 丈久、田中基彦、佐々木 裕 肝癌予防の基礎と臨床 *Medicina* 49:1230-1232, 2012.

2. 学会発表

- (1) 山添 太士、佐々木 裕、桑 昭苑 胚性幹細胞から肝細胞への分化誘導における細胞外基質の役割 ワークショップ「肝再生医療への展望」 第98回日本消化器病学会総会、2012年4月19日、東京
- (2) 渡邊 丈久、石原 宏、中尾 光善、佐々木 裕 肝炎・肝細胞癌誘導因子であるLT β の時空間的な発現制御メカニズムの解析 ワークショップ「最新の遺伝子研究からみた肝臓病の現状と個別化医療への展望」 第48回日本肝臓学会総会、2012年6月7日、金沢
- (3) 直江 秀昭、田中 基彦、佐々木 裕 酸化ストレスに対する肝細胞癌の細胞死抵抗性の検討 パネルディスカッション「消化器癌と酸化ストレス」 第54回日本消化器病学会大会、2012年10月10日、神戸
- (4) 瀬戸山 博子、田中 基彦、佐々木 裕 アルブミンの構造的・機能的変化からみたC型肝硬変における分岐鎖アミノ酸治療の意義 ワークショップ「病態栄養からみた肝・胆・膵疾患—治療への応用—」 第16回日本肝臓学会大会、2012年10月10日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

III. 研究成果の刊行一覧