

Tsukasa Kawaguchi, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara. (2013) The 17th International Symposium on Cell of the Hepatic Sinusoid. Continuous apoptosis in hepatocytes induces oxidative stress and leads to liver carcinogenesis. Osaka, Japan, September 23 - 25.

[6] Hayato Hikita, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Kawaguchi Tsukawa, Satoshi Shimizu, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2013) The rheostat regulating hepatocyte apoptosis by BH3-only proteins in developing and adult liver. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells. Osaka, Japan, September 26 - 27.

F. 知的所有権の取得状況

3. 特許取得：なし
4. 実用新案登録：なし
5. 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

HBVコンストラクトの作製とHBV増殖能の評価

大阪大学大学院医学系研究科 教授 上田啓次

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）には簡便な*in vitro*、*in vivo*感染系が存在せず、HBV感染サイクルには解明すべき不明な点が多々残されている。分担課題では、異種遺伝子を携えたりコンビナントHBVを含め、種々HBV変異体を作製し、現存の*in vitro*感染系で感染・増殖能を解析する。そして、本班の究極の目標である“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”が達成された際には、感染経路を含めた個体レベルにおけるHBVの個体侵入から肝臓への到達、肝実質細胞への付着・侵入・増殖機構、病態発症機構の解明とそれに関わるウイルス及び宿主因子の解明を目的とするものである。今年度は、それぞれ、EGFP遺伝子および分泌型ルシフェラーゼ遺伝子（NL1.3）を内在したりコンビナントHBV粒子が作製可能かどうかについて検討した。

A. 研究目的

簡便な感染増殖系が存在しないHBVは感染・増殖機構に不明な点が多い。種々のHBV変異体や異種遺伝子をコードするHBVゲノムをもつリコンビナントHBV（rcHBV）を作製し、現存するHBV肝炎系（primary human hepatocytes[PHH]、HepaRG）を駆使して、その感染・増殖能、宿主細胞へ与える影響について解析する。rcHBVの活用によるHBV受容体の分離・同定も試みる。また本rcHBVを用いて、将来的に可能になるであろう“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”に際して、感染経路を含めた様々な視点でHBVの感染・増殖機構、病態発症機構が解明されると思われる。

今年度は、それぞれ、EGFP遺伝子および分泌型ルシフェラーゼ遺伝子（NL1.3）を内在したりコンビナントHBV粒子が作製可能かどうかについ

て検討した。

B. 研究方法

1) pHBΔMCS-I. HBVプレゲノムRNAを発現するHBV1.5ゲノムの発現ベクターからコア、pol、Xを欠失させ、代わりにpBSIIMSCS（multicloning sites）で置き換えたベクター；pHBIΔMCS-Iを作製した。本ベクターのプレコア・コア翻訳開始コドンATGはACGに変異させてある。このMCSに別途作製したEGFP-IRES-hyg^R及びNL1.3-neo^Rを挿入し、それぞれpHBΔMCS-EGFP^{hyg}、pHBΔMCSNL1.3neoを構築した。

2) HBVgp（コア-pol）発現ベクターの構築とその発現細胞の樹立（パッケージング細胞）。HBVコア蛋白とポリメラーゼを発現するレトロウイルスベクターXINgp（neo^R）及びXIPgp（puromycin^R）構築

しヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2、Huh6 及び HEK293 細胞を用いて、HBVgp 発現細胞株 (HBV パッケージング細胞) を樹立した。HBV 膜タンパクを発現するベクターは pCEP LS-S として別途作製した。

3) rcHBV-EGFP_{hyg} 或は rcHBV-NL1.3neo の作製. EGFP_{hyg} 或は NL1.3neo を含むプレゲノム RNA を発現する pHB Δ MCS-EGFP_{hyg}、pHB Δ MCSNL1.3neo を pCEP LS-S とともにパッケージング細胞へトランスフェクションし、3~4 日後に培養上清を回収した。

4) rcHBV の濃縮. 上記回収した培養上清に 6%PEG8000 (polyethylene glycol 8000) を加え、4° C で一晚静置し、遠心により沈殿物を回収した。沈殿物を TEN (Tris-HCl pH7.8, 1mM EDTA, 100mM NaCl) で可溶化後、不溶物を取り除いた後、CsCl 密度勾配超遠心を行い、フラクションを得た。

5) 各フラクションの HBsAg を ELISA で測定し、また核酸を抽出して、PCR により粒子内のリコンビナントウイルスゲノムを検討した。

6) rcHBV の感染性の検討. PEG 濃縮サンプルを用いて、既存感染系 (分化誘導 HepaRG 細胞) で感染性を検討した。

(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) CsCl 密度勾配超遠心法では、HBsAg のピークは 1.18~1.22g/ml にみられ、そ

のフラクションをピークに EGFP、NL1.3 が検出された。このことはリコンビナントゲノムをもつ HBV 粒子が産生されていることを意味している。

2) rcHBV の感染性は rcHBV-NL1.3neo では検出されたが、rcHBV-EGFP_{hyg} では検出されなかった。

D. 考察

1) 組換え HBV (rcHBV-EGFP_{hyg}、rcHBV-NL1.3neo) の産生は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。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

組換え HBV の産生は可能であり、感染モニタリングや肝臓を標的にした遺伝子治療用のベクターとして有用である。

F. 研究発表

1.論文発表

1.論文発表

(1) Ueda, K. "Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?"

Medical Microbiology and Diagnosis
dx.doi.org/10.4172/2165-7866.1000e109.

doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.

(2) 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.

(3) 上田啓次. 「ウイルスの感染機構」
医学のための生命科学. 南山堂、2013 (編
集中) .

(4) 上田啓次. 「HBV遺伝子と関連抗原」
Hepatology Practice. pp2-9. 文光堂、
2013.

(5) 上田啓次. 「グルココルチコイド感受
性領域」 Hepatology Practice. pp149-
151. 文光堂、2013.

(6) 上田啓次. 「DNAウイルス」病原微生物学 東京化学同人 (編集中) .

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

分担研究者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科

本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの作出を試みる。これまでに作出されたヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウスの生着効率はヒト凍結肝細胞を利用したキメラマウスの生着効率と比較して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、移植後早期における生着効率、生着位置の制御共に優れていることが明らかとなった。これらの特性により、ヒト iPS 細胞由来肝細胞シート移植法はキメラマウス作出のみならず、再生医療への応用性も有していることが示唆された。

現や各種耐性ウイルスの出現など、解決すべき課題

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

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、uPA/SCID マウスや TK-NOG マウスといった慢性肝障害・免疫不全マウスに、ヒト肝細胞を移植することで作出されたヒト肝臓キメラマウスが、ヒト肝炎ウイルス感染モデルへ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

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

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のが期待される。

一方、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ヒト凍結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を行った。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞株から肝細胞への分化誘導は、申請者が過去に報告した 3 次元培養法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. Biomaterials. 2013) を改良した方法で行った。続いて、分化誘導した肝細胞を用いて、細胞シート工学技術によりヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを作製した。作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを肝障害モデルマウスに移植し、各種解析を行った。

C. 研究結果

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、ヒト凍結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。まず、温度応答性培養皿を利用してヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを形成できるのかを確認した。その結果、ヒト肝細胞関連タンパク質を発現したまま、単層のシート状にヒト iPS 細胞由来肝細胞を回収できることがわかった。

続いて、ヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを移植した際の安全性および、移植後早期の生着効率に関し

ての検討を行った。レシピエントマウスとして、retrotransposon を事前投与することで宿主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。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た。移植 24 時間後にレシピエントマウスを解剖、各種臓器を回収し、genomic PCR によりヒト genome DNA の検出を試みた。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肝臓のみ、ヒト genome DNA が検出された。一方、ヒト iPS 細胞由来肝細胞懸濁液を移植したマウスでは、移植標的臓器である肝臓のみならず、脾臓、胃、大腸からヒト genome DNA が検出された。

さらに、同様の移植を行い、移植後 2 週目におけるマウス血清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 241 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 92 ng/ml のヒトアルブミンが検出された。続いて、移植後 2 週目のマウス肝臓から凍結切片を作製し、免疫染色を行ったところ、肝細胞マーカーであるヒトアルブミンおよびヒト α アンチトリプシンを共発現する層状のヒト肝細胞様集団が、マウス肝臓表面に観察された。さらに、このヒト肝細胞様集団中にマウス CD31 を発現する血管様構造も多数確認された。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来肝細胞シートは初期生着効率が高く、移植標的部以外への分散も少ないことが示唆された。そこで、四塩化炭素を致死量投与した急性肝不全モデルマウスにヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを移植することで、再生医療への応用性を検討した。その結果、擬移植群と比較して、ヒト iPS 細胞由来肝細胞懸濁液移植群では生存率に有意な上昇は認められなかったのに対し、ヒト iPS 細胞由来肝細胞シート移植群では有意な生存率の改善が見られた。

由来肝細胞シート移植法はキメラマウス作製のみならず、再生医療への応用性も有していることが示唆された。

D. 考察

申請者は細胞シート工学技術を駆使することで新たなヒト iPS 細胞由来肝細胞の移植法を開発することに成功した。このヒト 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、移植後の細胞生着位置を正確に制御することが可能であり、移植後早期における生着効率も優れていることが明らかとなった。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。さらに、免疫染色の結果から、生着したヒト iPS 細胞由来肝細胞シートは移植時よりも細胞数が増えており、マウス生体内で増殖できる能力を有していることが明らかとなった。また、ヒト肝組織中にマウス血管様構造が観察されたことから、このヒト肝組織は長期的に生着することが可能であることが示唆された。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞シート移植法の高い生着効率から、再生医療への応用性を検討したところ、急性肝不全モデルマウスにおいて有意な生存率の改善が認められた。従来の細胞懸濁液移植法と比較して、移植細胞の生着部位を厳密に制御することが可能であることから、安全性が高く、この移植法は再生医療への応用も期待される。

今後は HBV 感染モデルマウスを作出するため、uPA/SCID マウスや TK-NOG マウスといった慢性肝障害モデルマウスにヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを移植することで、より大きなヒト肝組織を作製し、HBV 感染系の作製を試みる予定である。

E. 結論

細胞シート工学技術を駆使した移植法は、従来の細胞懸濁液移植法と比較して、移植後早期における生着効率、生着位置の制御共に優れていることが明らかとなった。これらの特性により、ヒト iPS 細胞

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Rep.*,1, 322-335 (2013)
- 2) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Inamura M., Ohashi K., Okuno H., Yamaguchi T., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Okano T., Furue MK., Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision. *Development*, 141, 91-100 (2014)
- 3) Higuchi M., Mizuguchi H. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro. *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application (the Springer publishing)*, in press.
- 4) 長基康人、高山和雄、水口裕之；3次元組織化技術を利用したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法、遺伝子医学 MOOK、印刷中
- 5) 水口裕之、高山和雄；iPS 細胞由来組織細胞を用いた毒性試験、実験医学、印刷中
- 6) 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、Tiss. Cult. Res. Commun, 32, 183-187 (2013)
- 7) 水口裕之、高山和雄、川端健二；ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた毒性評価、In vitro 毒性・

動態評価の最前線、シーエムシー、小島肇夫監修、63-70 (2013)

2. 学会発表

- 1) Takayama K., Nagamoto Y., Kawabata K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human pluripotent stem cells, Boston, June, 2013
- 2) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Comparative analysis of transplantation efficacy of human iPS cell-derived hepatic cells at various differentiation stages in mice. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, June, 2013
- 3) Takayama K., Nagamoto Y., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human ES/iPS cells、第 20 回大会、肝細胞研究会、大阪、2013 年 9 月
- 4) Takayama K., Morisaki Y., Furukawa N., Higuchi M., Ootaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Comparison of hepatic functions between genetically identical primary human hepatocytes and human iPS-derived hepatocyte-like cells、第 28 回日本薬物動態学会年会、東京、2013 年 10 月
- 5) 高山和雄、長基康人、田代克久、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肝幹・前駆細胞の維持と複

製、第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月

- 6) Takayama K., Nagamoto Y., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Generation of long-term expandable hepatoblasts differentiated from human iPS cells enables large-scale preparation of hepatocytes for drug discovery and development. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (iPS Cells in Drug Discovery & Development)、大阪、2014 年 1 月
- 7) 高山和雄、水口裕之、創薬研究への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014 年 3 月
- 8) 岡本 涼太、長基 康人、高山 和雄、大橋 一夫、櫻井 文教、立花 雅史、川端 健二、水口 裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の腎被膜下への移植、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014 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

造血幹細胞移植系の確立に関する研究

研究分担者

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

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)・人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) に強制発現させると、長期骨髄再建能を有する造血幹・前駆細胞を誘導できる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っている。

¹Kitajima 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。Lhx2 の強制発現により得られたマウス ES・iPS 細胞由来の造血幹・前駆細胞は自己複製能を有し、赤血球、血小板、ミエロイド、B リンパ球に分化する。一方、T リンパ球には分化しない。そこで、Lhx2 により得られた造血幹・前駆細胞を T リンパ球に分化させる方法を開発する。また、Lhx2 により、ヒト iPS 細胞から造血幹・前駆細胞の誘導が可能であるか否かを明らかにし、可能であった場合、得られた造血幹・前駆細胞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) を樹立している。この ES 細胞株を試験管内で血液細胞へ分化誘導し、Lhx2 の標的遺伝子の探索、T リンパ球分化の解析をおこなった。

ヒト iPS 細胞から血液細胞への試験管内分化誘導をおこない、Lhx2 の強制発現の効果を解析した。

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。iLhx2-ES 細胞を用いた先行研究により、中胚葉分化付近で Lhx2 の発現を開始した場合に、最も効率よく造血幹・前駆細胞へ分化誘導できることが判明している。また、Lhx2 により得られた造血幹・前駆細胞では、転写因子 GATA3 が高

発現していた。そこで、Lhx2 により得られた造血幹・前駆細胞において、short hairpin RNA により、GATA3 の発現を抑制すると、自己複製能が低下した。したがって、GATA3 の発現が Lhx2 による造血幹・前駆細胞細胞の自己複製誘導に重要であることが判明した。

さらに、iLhx2-ES 細胞から得られた造血幹・前駆細胞は、Lhx2 の発現を無くした場合、成熟 T リンパ球へ分化することを見出した。一方、Lhx2 を発現させ続けた場合、未分化 T 細胞系前駆細胞までは分化するが、それ以降の分化が阻害されていた。したがって、Lhx2 のコンディショナルな発現によって、マウス ES 細胞から、すべての血液細胞へ分化することができる造血幹・前駆細胞を得ることができた。

次に、ヒト iPS 細胞を OP9 細胞との共生培養により CD43⁺CD34⁺ 未分化血液細胞に分化誘導し、レンチウイルスベクターにより、Lhx2 の強制発現をおこなった。その結果、Lhx2 を発現させない場合、CD43⁺CD34⁺ 未分化血液細胞は、1週間の培養で、ほぼすべてが CD43⁺CD34⁻ 成熟血液細胞へ分化するが、Lhx2 を発現させた場合、CD43⁺CD34⁺ 未分化血液細胞が維持されていた。しかし、この未分化血液細胞の増殖能は低かった。

D. 考察

Lhx2 は転写補助因子 Lmo2 タンパクの不安定化を誘導することを見出している。Lmo2 は未分化 T リンパ球の増殖を亢進させることが知られており、Lhx2 により得られた造血幹・前駆細胞が T リンパ球へ分化しない理由は、Lhx2 が Lmo2 を不安定化するためであると考えられる。

また、Lhx2 は、ヒトにおいても iPS 細胞由来の未分化血液細胞の維持能があると考えられたが、マウスの場合と異なり、Lhx2 はヒト未分化血液細胞の細胞増殖を誘導することができない可能性が考えられた。今後、細胞増殖を活性化する因子と Lhx2 の共発現をおこない、ヒト iPS 細胞由来の未分化血液細胞の試験管内増幅を試みる予定である。

E. 結論

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。また、Lhx2 のコンディショナルな遺伝子発現誘導システムを用いることにより、すべての血液細胞へ分化する能力を持つ造血幹・前駆細胞をマウス ES 細胞から得られることが明らかとなった。

ヒトにおいては、Lhx2 は、未分化血液細胞の未分化性を維持できるが、未分化血液細胞をより効率よく試験管内増幅させるには、Lhx2 単独では不十分であり、他の因子との共発現が必要であると考えられた。

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

1. 論文発表

Kitajima K, Kawaguchi M, Iacovino M, Kyba M, Hara T

Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells.

Stem Cells 31:2680-9 (2013)

2. 学会発表

宮下 和也、北島 健二、原 孝彦
転写制御因子 Lhx2 は急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を抑制する
第 36 回日本分子生物学会年会
神戸、12月 3～6日 (2013)

川口 真実、北島 健二、原 孝彦
Gata2 は hemogenic endothelial cells からの血液細胞出芽を促進する
第 36 回日本分子生物学会年会
神戸、12月 3～6日 (2013)

小高 悠作、田中 貴代子、北島 健二、松田 良一、原 孝彦
Lhx2 は筋脱分化因子 Msx1, Msx2 の発現

を制御する
第 36 回日本分子生物学会年会
神戸、12月 3～6日 (2013)

Kitajima K, Kawaguchi M, Miyashita K, Hara T

In vitro induction of HSC-like cells from mouse ESCs/iPSCs by a transcription factor Lhx2

The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
Sapporo, Oct 11-13 (2013)

Kitajima K, Kawaguchi M, Iacovino M, Kyba M, Hara T.

Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic stem-like cell differentiation from mouse embryonic stem cells

The 11th Stem Cell Research Symposium
Tokyo, May 17-18 (2013)

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

TK-NOGキメラマウス作成に関する研究

研究分担者 末水洋志 公益財団法人実験動物中央研究所実験動物研究部長

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
実験動物研究部 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、前年度に引き続き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てヒト化肝臓マウス作製し、研究代表者の感染実験用途で提供する。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持つマウスを作成する。

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) 前年度、免疫不全NOGマウスに戻し交配

を開始し、N3世代まで進んだMcl-1 KOマウスは更に戻し交配を進めN5世代に達した。当該世代で38匹を取得し、Mcl-1 fl/+ (18匹)、Alb-Cre/- (16匹)を得た。そのうち、AlbCre-Tg且つMcl-1 fl/- (wild) は8匹であった。前世代で置換されずに残ったSTRマーカー3個のうち13番染色体の1マーカーのみ、当該世代でも残存し、AlbCre-Tgの遺伝子導入部位であると予想された。scid遺伝子が既にホモ化された1個体を選抜し、次年度、NOGマウスとの体外受精により免疫不全化を完了する。3) TK-NOG-IAβ KO/β2m KOマウスの繁殖成績があまり高くないため、実験に使用できるTK-NOG-IAβ/β2m KOの供給が十分でなかった。これまでの繁殖方法を改善し次年度は安定供給を目指す。

D. 考察

Mcl-1 KOマウスのスピードコンジェニックが完了し、胎児移植によるヒト肝臓とマウス免疫系を併せ持つモデル創出の可能性が生まれた。少数ではあるがMHC class I, II 欠損TK-NOGヒト化肝臓マウスの作出も行えることから有用性の検討を開始できる見込みとなった。

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
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

研究代表者又は研究分担者 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

クターを導入する実験系を組み合わせ、ヒト化マウス内でのヒトT細胞の活性化をモニターすることに成功した。

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。

(2) IL-6tg NOGマウスにおいてヒト単球系細胞の分化促進を確認した。現在そのヒトマクロファージの性状を解析しており、IL-3/GMtg NOGもしくはNOGマウス内のマクロファージとの比較をする予定である。また、M-CSFtgNOGマウス、G-CSF KI NOGマウスを作製中で、前者はマクロファージ、後者は好中球の分化が可能かを検討する。

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) ヒトNK細胞の発生分化を可能にするマウスの作製
- (4) ヒト好酸球の発生分化を可能にするマウスの作製
- (5) 肝・免疫系両ヒト化マウスの作製を行う。

現在(1)(2)を組み合わせた複合NOGマウスIL-3/GM/DR0405マウスを作製し、現在その免疫学的特性を検討している。本マウスではヒト獲得免疫系と自然免疫系の細胞が機能的に相互作用できると考えられる。またHLA-I, IIをもつA2/DR4マウスを作製中であり、その後IL-3/GMマウスと交配しIL-3/GM/A2/DR4マウスを作製する。

C. 研究結果

(1) HLA-A24, DR0901, 1502tg NOGマウスを作製中である。DR1502tgマウスについては発現マウスを確保しており、今後造血幹細胞(HSC)移植を予定している。DR0405tg(DR4) NOGマウスおよびヒト単クローンT細胞由来のTCR遺伝子をHSCにウイルスベ

(3) ヒトIL-2, IL-15遺伝子を発現するIL-2tg, IL-15tgNOGマウスを作製した。HSC移植によりこれらのマウスではヒトNK細胞の分化が優先的に起こることを明らかにした。このヒトNK細胞は機能的であり、NK感受性腫瘍細胞株の移植を拒絶できる。また、抗体によるADCC活性を生体で評価できることを明らかにした。IL-15tgマウスではさらにヒト末梢血由来のNK細胞を移植すると、長期にわたり維持されることを明らかにした。

(4) ヒトIL-5遺伝子を発現するIL-5tgNOGマウスを作製した。
HSC移植によりこれらのマウスではヒト好酸球の分化を認めた。現在、好酸球の機能性を解析中である。

(5) 肝・免疫系両ヒト化マウスの作製
TK-NOGとIL-3/GM-NOGマウスの交配を行っている。

D. 考察

免疫系ヒト化マウスで発生分化するヒトT細胞の機能を可視化、追跡できる実験系を樹立することに成功した。今後、ヒトリンパ系細胞とミエロイド系細胞を両方備えたヒト化マウスの作製を行い、ヒト免疫機能の改善を行う。
TK-NOGとの掛け合わせによりヒト肝臓細胞とヒト免疫細胞を長期にわたって併せ持つマウスを樹立することによりヒト肝炎ウイルスに対するヒト免疫応答を再現できるか検討したい。

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

1. Journal of Immunology, 191,2890-2899
2. Journal of Immunology, 190,5788-5798
3. Journal of Immunology, 190,6209-6220

2. 学会発表

1. 国際免疫学会, ミラノ, イタリア,
8月23日, 27日 3演題ポスター発表
2. 第4回国際ヒト化マウスワークショップ
9月30日, 10月2日 1演題口頭発表
1演題ポスター発表
3. 第42回日本免疫学会
12月11日 2演題口頭発表
3演題ポスター発表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
疋田隼人、 (竹原)	肝細胞死の研究と進歩	林紀夫、 日比紀文、 上西紀夫、 下瀬川徹	Annual Review 消化器 2014	中外医学社	日本	2014	179-186
上田啓次 (上田)	HBV遺伝子と関連抗原	田中栄司、 竹原徹郎、 持田 智	Hepatology Practice	文光堂	日本	2013	2-9
上田啓次 (上田)	グルココルチコイド 感受性領域	田中栄司、 竹原徹郎、 持田 智	Hepatology Practice	文光堂	日本	2013	149-151
水口裕之、 (水口)	ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた毒性評価、 In vitro毒性・動態評価の最前線	小島肇夫	In vitro毒性・動態 評価の最前線	シーエムシー	日本	2013	63-70
Higuchi M, (水口)	Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro.	Michiya Matsusaki, Takami Akagi, Mitsuru Akashi	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application	the Springer publishing	Japan	2014	in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aketa H, (竹原)	The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice	Int J Cancer	133	1126-1135	2013
Kodama T, (竹原)	The Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver.	J Biol Chem	288	30009-30018	2013
Kawaguchi T, (竹原)	Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice.	J Hepatol	59	1239-1245	2013
Nishida T, (竹原)	Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic.	Hepatol Res	43	339-346	2013
Aketa H, (巽)	The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice	Int J Cancer	133	1126-1135	2013
Kodama T, (巽)	The Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver.	J Biol Chem	288	30009-30018	2013
Kawaguchi T, (巽)	Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice.	J Hepatol	59	1239-1245	2013
Nishida T, (巽)	Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic.	Hepatol Res	43	339-346	2013

Aketa H, (厩田)	The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice	Int J Cancer	133	1126-1135	2013
Kodama T, (厩田)	The Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver.	J Biol Chem	288	30009-30018	2013
Kawaguchi T, (厩田)	Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice.	J Hepatol	59	1239-1245	2013
Ueda K. (上田)	Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?	Medical Microbiology and Diagnosis	1000e109		2013
Takayama K, (水口)	Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes.	Stem Cell Rep.	1	322-335	2013
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	Tiss. Cult. Res. Commun.	32	183-187	2013
Takayama K, (水口)	CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision.	Development	141	91-100	2014

長基康人、 (水口)	3次元組織化技術を利用したヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導法	遺伝子医学MOOK			in press
水口裕之、 (水口)	iPS細胞由来組織細胞を用いた毒性試験	実験医学			in press
Kitajima K, (北島)	Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells.	Stem Cells	31	2680-2689	2013
Yamazaki H, (末水)	In vivo drug interactions of the teratogen thalidomide with midazolam: heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 in humanized TK-NOG mice.	Chemical research in toxicology	26	486-489	2013
Tsukada A, (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.	Regul Toxicol Pharmacol	65	316-324	2013
Tomokuni A, (末水)	Effect of administration of reprogramming factors in the mouse liver.	Oncol Lett	6	323-328	2013
Suemizu H, (末水)	A versatile technique for the in vivo imaging of human tumor xenografts using near-infrared fluorochrome-conjugated macromolecule probes.	PloS one	8	e82708	2013
Kawai K, (末水)	A new in vivo model to analyze hepatic metastasis of the human colon cancer cell line HCT116 in NOD/Shi-scid/IL-2Rgamma(null) (NOG) mice by (18)F-FDG PET/CT.	Oncol Rep	29	464-468	2013

Fukusumi H, (末水)	Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells.	PloS one	8	e55226	2013
Higuchi Y, (末水)	The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice.	Xenobiotica	44	146-153	2014
Gutti T.L., (末水)	Human Hepatocytes and Hematolymphoid Dual Reconstitution in Treosulfan-Conditioned uPA-NOG Mice.	Am J Pathol	184	101-109	2014
Ito R, (高橋)	Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF-Transgenic NOG Mice	Journal of Immunology	191	2890-2899	2013
Kawabe T, (高橋)	Homeostatic Proliferation of Naive CD4+ T Cells in Mesenteric Lymph Nodes Generates Gut-Tropic Th17 Cells	Journal of Immunology	190	5788-5798	2013
S.L.Sun (高橋)	Y Chromosome-Linked B and NK Cell Deficiency in Mice	Journal of Immunology	190	6209-6220	2013
Negishi N (高橋)	Effective expansion of engrafted human hematopoietic stem cells in bone marrow of mice expressing human Jagged-1	Exp.Hematol.	in press		2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷