

1. 総括研究報告書

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）
（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

HBV 感染可能で、かつヒトと同様の免疫応答により B 型肝炎を発症するマウスモデルの開発を目的とし、(1)チンパンジー肝臓キメラマウス(CM)の作製、(2) ヒト肝臓置換マウス(HM)の作製、(3)HBV 肝炎モデルの確立を行う。このため、マウスの H-2 class I を欠損し、代わりにヒトの MHC class I を持つマウス系統「Tg(HLA-A2.1-hβ2m);H2-D^{B*/-};B2m^{-/-} (HHB と略)」を基本となるレシピエントマウスとし、このマウスから ES 細胞を樹立している。(1)については、チンパンジーの血液細胞からの iPS 細胞の樹立に成功し、幹細胞マーカーが発現し、染色体も正常で、3 胚葉系への細胞に分化する能力もあることを明らかにした。肝臓欠失マウスを作製するため Hhex 遺伝子を破壊した ES 細胞 (ES HHB:Hhex^{-/-})の樹立に成功した。マウスの肝細胞を完全に死滅させるため、2 つベクター、SAP-Cre-ERT2(SC)および CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A(CD)を導入した HHB:SCCD マウスを樹立し、タモキシフェン投与でマウス肝細胞障害が起こること、投与量によって障害の程度を任意に調節できることを明らかにした。(2)については、ヒト iPS 細胞から約 2 週間程度で肝細胞へ分化誘導させる方法を開発することに成功した。また、移植するヒト肝細胞への拒絶反応を回避するため、マウス 16.5 日目ごろの胎児の卵黄嚢血管を通して移植する方法を確立した。(3)については、CM や HM に HBV を感染させることを想定し、B 型肝炎ウイルス抗原、抗体などの各種血清学的検査、および炎症マーカーの測定法を確立した。

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
 - ・江良拓実・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
- 研究協力者
- ・明里宏文・京都大学霊長類研究所
 - ・李正花・熊本大学生命資源研究・支援センター・助教
 - ・白木伸明・熊本大学発生医学研究所・助教
 - ・渡邊丈久・熊本大学生命科学研究部・
 - ・直江秀昭・熊本大学生命科学研究部・
 - ・松本健・熊本大学生命資源研究・支援センター・研究員
 - ・仁木大輔・熊本大学生命資源研究・支援センター・研究員
 - ・アーマッド マザヘリー・熊本大学生命資源研究・支援センター・研究員

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% に肝臓がん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 感染可能でヒトのクラス I システムを持ち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ための画期的なツールを開発することを目的とする。研究の全体像を図に示した。

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 25 年度は、以下の研究を行う。

基本となるヒトHLA class Iマウスの入手とES細胞の樹立

- (1) ベクター-HLA-A2.1($h\alpha 1-h\alpha 2-m\alpha 3$)- $h\beta 2m$ (HHD)を入手、配列確認(荒木)

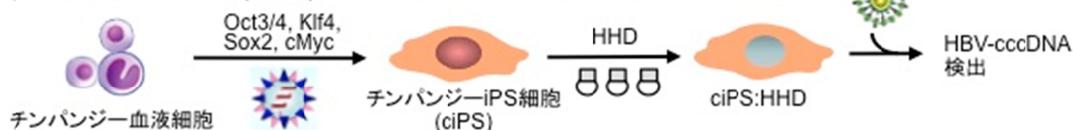


- (2) Tg(HHD;H2-D^{B*/};B2m^{-/-})(HHB)入手、繁殖、ES細胞の樹立(荒木)



1. チンパンジー肝臓キメラマウスの作製と感染実験

- (1) チンパンジーiPS (ciPS)細胞の樹立とヒトHLA遺伝子導入(江良)



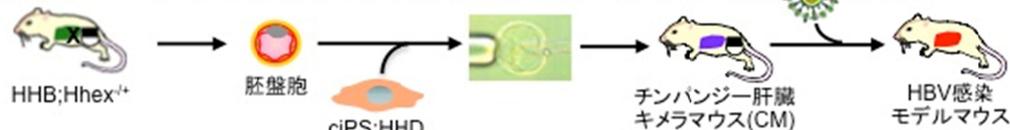
- (2) ciPSのナイーブ化(江良)



- (3) レシピエント(肝臓欠失/ヒトHLA)マウスの作製(荒木)



- (4) チンパンジーキメラマウスの作製と感染実験(山村、荒木、佐々木)

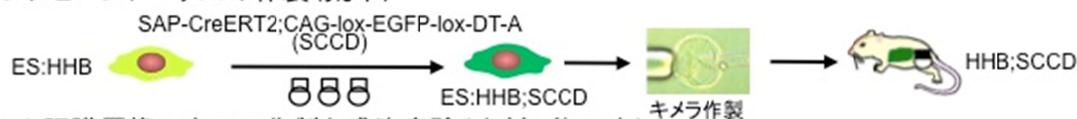


2. ヒト肝臓置換マウスの作製と感染実験

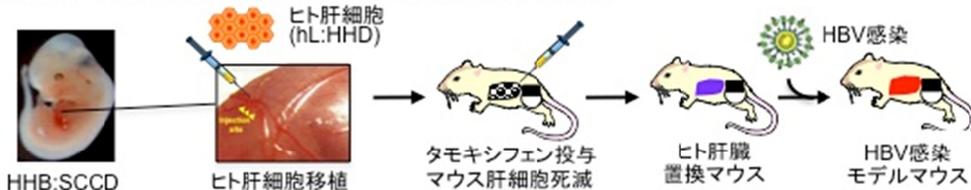
- (1) ヒトiPS細胞へのHLA遺伝子導入と肝細胞への分化誘導(山村)



- (2) レシピエントマウスの作製(荒木)



- (3) ヒト肝臓置換マウスの作製と感染実験(山村、佐々木)



HBV肝炎モデルの樹立と肝炎発症のメカニズム等の解析を行う

(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ズベクターを用いて ciPS 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、核型解析を行い染色体が正常かどうかを確認する。

(2) ciPS への HHD の導入

チンパンジー由来の肝臓において、HBV の感染後に肝炎を誘発するには、肝細胞にも同じヒト HLA クラス I を発現させる必要がある。このため、樹立した ciPS 細胞へヒト HLA 抗原遺伝子(ヒト $\beta 2$ -microglobulin 遺伝子、HLA-A2.1 の $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメイン、マウスの MHC クラス I の D^b ハプロタイプの $\alpha 3$ ドメインが融合した遺伝子(HLA-A2.1-h $\beta 2m$): HHD と略)を導入し、ハイグロマイシンによるセレクションを行う。使う薬剤の濃度決定を行うために様々な濃度で iPS 細胞の維持培養を行う。

(3) Tg(HLA-A2.1-h $\beta 2m$);H2-D^{B^{-/-}};B2m^{-/-} (HHB) からの ES 細胞の樹立(荒木)

このマウスは、HHD が導入され、かつマウスのクラス I の D^b と $\beta 2$ -microglobulin(B2m)が破壊されているマウス系統(HHB と命名)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。このマウス系統を基本として、種々の遺伝子操作を行うため、この系統から ES 細胞(ES HHB)を樹立する。

(4) ES HHB 細胞における Hhex 遺伝子の破壊
(荒木)

ciPS 細胞とマウス胚を用いて肝臓がチンパンジーとなるキメラマウスを作製するためには、マウスの肝臓をあらかじめ欠損させておく必要がある。このための手段として、Hhex 遺伝子を破壊する。また、通常の相同組換えではロックアウト ES クローンが単離できなかったため、最近開発された CRISPR/Cas9 法を用いてロックアウト ES クローンの樹立を行う。

(5) マウス肝細胞死滅用のベクター構築とそれを持つマウス系統(HHB:SCCD)の樹立

(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、アルブミンプロモーター化に urokinase 型のプラスミノーゲンアクチベーターを接続したトランスジーン(Plau)を持つマウスであり、徐々にマウス肝細胞が死滅すること、その間に Plau を失ったマウス肝細胞が再生してくること、マウスの肝細胞死を任意に制御できないこと、そもそも出血による死亡率が高く、健康状態が悪いこと等の欠点があった。このため、タモキシフェン投与時にのみマウス肝細胞を任意の時期に短期間で死滅させることを計画した。そこで、2つベクター、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。マウス系統を樹立後、タモキシフェンを投与し、肝細胞障害が生じるかどうかを検討する。

(6) ヒト iPS(hiPS)細胞からの肝細胞の分化誘導法の確立(山村)

M15 細胞をフィーダー細胞として用い、iPS 細胞から肝細胞の分化誘導系はこれまでに確立している。しかし、マウスに移植することを考慮すれば、フィーダー細胞を用いない方法が望まれる。そこで、Hannan らの論文を(Nature Protocols 8:430-437, 2013)を参考に、新たに培養期間をより短縮する方法の開発を行う。

(7) 卵黄嚢血管からの肝細胞移植法の開発(山村)

移植したヒト肝細胞の拒絶を避けるため、16.5 日の胎児の卵黄嚢血管からヒト肝細胞を移植する方法を開発する。前年度までに、マウスメラノーマ細胞を用いて胎児の卵黄静脈に移植する方法を確立しているため、マウス正常肝細胞を用い

た移植法を確立する。

(8) 肝炎発症メカニズムの解析 (佐々木)

これまでにHBV感染実験に関する報告例を基に、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した。感染後の推移を観察するため、B型肝炎ウイルス抗原、抗体などの各種血清学的検査、および炎症マーカー等の測定系を確立する。さらに、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の解析法を確立する。

(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しない。ヒトiPS細胞は市販のヒト線維芽細胞より樹立したものが、すでに理化学研究所バイオリソースセンターから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った。採血の方法は通常にチンパンジーから採血している方法に準じる。チンパンジー個体そのものは、この実験では用いる必要はないので、このことに関する倫理委員会での申請は必要がない。

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iPS細胞誘導に用いた。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みである。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が、1クローンの樹立には成功した。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細胞誘導が可能かどうかを検討した。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。この方法にて、さらに3クローンのiPS細胞を得た。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法により確認した。また、染色体検査にて正常核型であること、チンパンジー由来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、ciPSがTリンパ球由来であることを確認した。

多分化能を見るために、試験管内分化誘導と奇形腫形成を行った。作製したiPS細胞はすべて試験管内で神経外胚葉、中胚葉、内胚葉系列の細胞へと適切な誘導条件下にて分化した。また免疫不全マウスの精巣へ移植して作製した奇形腫解析でも、外胚葉、中胚葉、内胚葉系列の細胞への分化能力を持つことを確認した。

(2) ciPSへのHHDの導入

樹立したciPS細胞へHHDを導入するにあたり、使うハイグロマイシンによる薬剤の濃度決定を行った。その結果、1 μ g/ml以上の濃度ではiPS細胞が生存できないことがわかった。現在、どの方法が有効かを検討中である。

(3) Tg(HLA-A2.1-h β 2m);H2-D^B-/-;B2m^{-/-} (HHB)からのES細胞の樹立 (荒木)

HHBマウスを用いて体外受精を行い、得られた33個のプラストシストを用いてES細胞株樹立を行った。2i (2 μ M PD0325901, 3 μ M CHIR99021)

存在下で培養、内部細胞塊の増殖が見られた 28 クローンを植え継ぎ、21 クローンの樹立に成功した。うち 9 クローンは形態が良くなかったので、12 クローンについてキメラマウス作製能を検討した。ICR の 8 細胞期胚との凝集法でキメラマウスを作製、2-3 匹の仮親に移植した。その結果、3 クローン (HHB3, HHB9, HHB10) について、継代後のキメラ作製能について検討したところ、いずれのクローンからも 100% オスキメラが得られた。キメラ作製効率の良かった 9 と 10 を以下の遺伝子導入や操作に使用することとした。

(4) ES HHB 細胞における Hhex 遺伝子の破壊 (荒木)

肝臓を欠失したマウスを樹立するため、ES HHB を用いて、マウス Hhex 遺伝子の破壊を試みた。ATG のすぐ下流に target site を設定し sgRNA を構築、pX330 ベクターに組み入れてベクターを作製した。ES HHB10 に導入し、36 個のネオ耐性クローンを選別した。これらのクローンについて、5'側、および 3'側それぞれでスクリーニングしたところ、合計 27 個のクローンで破壊を確認した。破壊頻度は 75% であり、極めて効率よく Hhex 遺伝子を破壊できることが明らかとなった。

(5) マウス肝細胞死滅用のベクター構築とそれを持つマウス系統 (HHB:SCCD) の樹立 (荒木)

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 を樹立した HHB9 と HHB10 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 120 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。EGFP 蛍光、DT-A の pA signal 検出 PCR、SAP のプロモーター部検出 PCR の全てが陽性であったものは 26 クローン (21.7%) であった。サザンプロットによる解析で選択した 11 クローンでキメラマウス作製を行い、そのうち 6 系統を C57BL/6 と交配し、生殖系列伝達を確認した。得られた F1 にタモキシフェンを投与したところ、AST の上昇が見られたので、この SCCD コンストラクトは期待通り働いていると考えられた。また、タモキシフェンの

投与回数に応じて、肝細胞障害が見られた。

(6) ヒト iPS (hiPS) 細胞からの肝細胞の分化誘導法の確立 (山村)

培養開始の初期には glucose 濃度を 4500mg と高く設定することで、iPS 細胞の増殖を促進できること、内胚葉系への分化誘導には Dexamethazone と HGF を用いること、最後の肝細胞系への分化誘導では Oncostatin M を用いることで、分化効率がよくしかも通常 4 週間を要するところ 14-16 日間程度で肝細胞を誘導する方法を確立した。上記の培養では、Endoderm 系、Definitive endoderm 系、Hepatoblast/hepatocyte 系への分化段階で、培地を変更する必要があるが、従来は免疫染色を用いてそれぞれの分化マーカーを検出し、培地を変える必要があった。この方法は、そのための培養ディッシュを用意する必要があり、手間がかかっていた。Cerberus1 (Cer1) は、anterior visceral endoderm で発現し、その後 definitive endoderm で発現し分泌されるタンパクである。この分泌される CER1 の量が、SOX17 や FOXA2 陽性細胞と比例することを見いだした。したがって、この陽性細胞の培養液中への出現をマーカーとして、培地の交換の時期を決定できることが期待される。そこで、この Cer1 を ELISA で測定する方法を確立した。

一方、樹立されている iPS 細胞は必ずしも均一の性質を持つものではなく、line によって分化誘導の効率はかなり異なり、3 つの cell line をテストした範囲では HiPSclone2A が良かった。移植実験に用いる際には、これを用いる予定である。また、患者由来の iPS 細胞においても、分化誘導効率が異なること、しかし、少なくとも 3 つの cell line を樹立すれば、増殖及び分化誘導効率のよいクローンが得られることを明らかにした。

(7) 卵黄囊血管からの肝細胞移植法の開発 (山村)

全身に EGFP を発現するトランスジェニックマウス Tg(CAG-EGFP:CAG-EGFP-IRES-PURO) から初代肝細胞を単離し、胎生期の 16.5 日目頃に胎児の卵黄囊血管経由で肝細胞移植を試みた。移植を受けたマウスを生後 8 日目で肝臓を解析したところ、おおよそ 10~50% のキメラ率で、EGFP を発現す

る肝細胞が生着していた。すなわち、遺伝子や腫瘍細胞のみならず、成熟した正常肝細胞も胎仔肝に移入し生着・増殖することが確認された。

(8) 肝炎発症メカニズムの解析(佐々木)

マウスへのHBV感染条件を文献的に考察した。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の投与で感染が成立しうると考えられた。

キメラマウスを用いたHBV感染による肝炎発症実験においてはB型肝炎ウイルス抗原、抗体などの各種血清学的検査、および炎症マーカーを利用して感染の成立および肝炎の発症を判定するが各々の測定法を確立した。

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を見出している。このことはHBV-cccDNAからの転写活性の制御にCTCFが関与していることを示唆している。さらに翻訳後修飾によるCTCFの機能変化が考えられたため、蛋白2次元電気泳動法を用いた翻訳後修飾の網羅的解析が可能な環境を整え、肝炎モデルマウス完成後すぐにHBV-cccDNAとCTCFの相互作用の解析が可能な状況となった。さらに現在、CTCF以外のエピジェネティクス因子が関連していないか解析するため、エピゲノム情報を保ったままHBV-cccDNAを単離、解析する方法を検討中である。

D. 考察

チンパンジーの末梢血液からのciPSの樹立においては、ConA刺激に変更、高いFGF2の濃度(30ng/ml)、高いウイルスの力価(MOI:30)が必要ことが明らかとなった。このことは、ヒトとチンパンジーでシグナル伝達系が若干異なることを示唆している。この方法においても、3胚葉系列の分化能を有していた。分化マーカーの抗体はヒト分子を認識するものであるが、チンパンジー分子も同様に認識すること、つまり抗体の認識するエピトープがヒトとチンパンジーで類似していると考えられた。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細胞樹立には容易に行える血液からのiPS細胞誘導は有効である。

HHBマウスからのES細胞樹立は、2iの添加を必要としたものの、順調に行うことが出来た。SCCDコンストラクトの導入後のクローンにおいても生殖系列キメラを得ることが出来たため、十分全能性を保っていると考えられる。このES細胞株は、肝炎モデルだけでなく、他のヒト免疫系が必要な系においても有用と期待される。また、CRISPR/Cas9をES細胞で用いると、極めて高い頻度で組換えクローンを得ることができた。

任意の時期に肝障害の誘導が可能なマウス系統の樹立に成功した。特定のマウス系統では、タモキシフェン投与により全例死亡することから、極めて効率よくマウス肝細胞を破壊できていることを示唆している。

ヒトiPS細胞を用いて肝細胞の分化誘導法をほぼ確立した。過去の報告と異なり、培養初期の段階で、グルコース濃度を高く設定することが、iPS細胞の生存率を向上させるうえで重要であることを明らかにした。

また、胎生16.5日の胎児の卵黄嚢血管から、肝細胞を移植する方法を確立した。この時期に移植すれば、免疫寛容となることが期待され、マウスの免疫能を保ったまま肝臓ヒト化マウスを複製できる可能性が高まった。今後は、ヒト肝細胞の移植時期とタモキシフェンの投与時期を検討する予定である。

HBVの存在や血清学的検査は臨床検体を用いて既に診療に用いており、キメラマウスへの感染の判定は問題なく可能となった。

E. 結論

新たにチンパンジーの末梢Tリンパ球から2ラインciPS細胞を樹立した。

HHBマウスからのES細胞の樹立、タモキシフェンで肝障害を引き起こせるマウス系統HHB:SCCDの樹立、Hhex遺伝子を破壊したES HHB:Hhex^{-/-}の樹立に成功した。

iPS細胞から、約2週間で肝細胞を分化誘導する方法を確立した。また、胎児卵黄嚢血管に肝細胞を移植する方法も確立した

HBV感染後の状態を把握するための種々のマーカー等の検出系を確立した

F . 健康危険情報
該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Iwashita H., Shiraki N., Sakano D., Shiga M., Sasamoto K, Kume K., and Kume S. Secreted Cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of pluripotent stem cells. PLoS ONE (2013) 8(5): e64291. (doi:10.1371/journal.pone.0064291)
2. 山添太士・白木伸明・佐々木裕・桑 昭苑、肝臓の再生医療、日本医師会雑誌 142 (4) 791-795, 2013
3. Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa, K., Yamazoe, T., Kataoka, M., Umeda, K., Araki, K., Mao, D., Matsumoto, S., Nakagata, N., Andersson, O., Stainier, D., Endo, F., Kume, K., Uesugi, M. and Kume, S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta cell differentiation. Nat. Chem. Biol. 10: 141-148. 2014.

2. 学会発表

1. 山村研一:「再生医療における非臨床試験とは: ヒト iPS 細胞を用いたヒト化マウス」, 第 22 回熊本大学医学部附属病院 臨床カンファレンス, 2013.5.13, 熊本(熊本大学)

2. 白木伸明: ES/iPS 細胞から内胚葉組織への分化における細胞外環境の役割. 第 130 回熊本小児科学会 2013.6.16(熊本)
3. 山村研一, 牟彦双, 李正花: FAP のダブルヒト化モデルマウスによる前臨床実験, 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 宮城(江陽グランドホテル), 2013.11.20-11.23.
4. Li, Z., Mu, S., Shen, J., Araki, K. and Yamamura, K. Improvement of retinal function and vitamin A availability in humanized mice at retinol-binding protein locus. 第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸
5. 江良択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回熊本小児科学会 2013 年 6 月 16 日 熊本
6. 江良択実 iPS 細胞と再生医療 第 14 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 2013 年 9 月 28 日 東京

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
なし