

横山恵信、宮城琢也、田中聡司、名和誉敏、吉岡鉄平、向井香織、西尾公美子、清水聡、疋田隼人、阪森亮太郎、大川和良、巽智秀、竹原徹郎

「HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスに対するヒト末梢血単核球移入によるウイルス排除」 5月29日

中堀輔、疋田隼人、青野悟志、横山恵信、齋藤義修、田中聡司、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智秀、竹原徹郎

「マウス胎児肝への同種異系初代培養肝細胞投与による肝細胞置換法の検討」 5月30日

齋藤義修、疋田隼人、中堀輔、田中聡司、阪森亮太郎、宮城琢也、大川和良、平松直樹、巽智秀、竹原徹郎

11月7日—11日 The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston USA

「Immune system is required for HBV clearance, but not enough to explain the difference in HBV genotype A and C.」 11月11日

Yoshinobu Yokoyama, Hayato Hikita, Teppei Yoshioka, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Kazuyoshi Ohkawa, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.

Satoshi Aono, Tomohide Tatsumi, Seiichi Tawara, Yoshiki Onishi, Akira Nishio, Tadashi Kegasawa, Atsuo Takigawa, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Hiroshi Suemizu, Takeshi Takahashi and Tetsuo Takehara

「Activation of mitochondrial pathway of apoptosis in hepatocytes increases oxidative stress in hepatocytes leading to liver tumorigenesis」 11月9日

Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya

Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara.

11月20-21日 Single Topic Conference 'Hepatitis B' Hiroshima

Oral presentation Session 4 Animal model 「Allogeneic and xenogeneic transplantation of primary hepatocytes into the fetal liver in mice」 11月20日

Yoshinobu Saito, Hayato Hikita, Yasutoshi Nozaki, Yugo Kai, Yuki Makino, Tasuku Nakabori, Satoshi Tanaka, Satoshi Aono, Kaori Mukai, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

G. 知的所有権の取得状況

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

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、蛍光タンパク質やルシフェラーゼなどの異種遺伝子を携えたりコンビナントHBVや、種々HBV変異体を作製し、NTCP発現*in vitro* HBV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、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・増殖を検討することにより感染経路を解明し、病態発症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。今年度も引き続き、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（rcHBV）粒子が作製可能かどうかについて検討し、さらに感染性について検討した。

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感染系（primary human hepatocytes[PHH]、HepaRG）やNTCP発現ヒト肝癌由来培養細胞感染系を用い、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を用いることで、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粒子の産性能、感染性について検討した。

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・コア翻訳開始コードン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^R、pHBΔMCSNL1.3neo^R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 として別途構築した。

3) rcHBV-EGFPPhyg 或は rcHBV-NL1.3neo の作製。EGFPPhyg 或は NL1.3neo を含むプレゲノム RNA を発現する pHB Δ MCS-EGFPPhyg、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 で一晩静置し、遠心により沈殿物を回収した。沈殿物を TBS (Tris-HCl pH7.8, 150mM 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。また PEG 沈殿法で濃縮した rcHBV のウイルス量を digital PCR 法を用いたゲノム定量法で解析した。

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、PHH)、NTCP 発現ヒト肝癌由来培養細胞感染系で感染性を検討し

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、rcHBV-EGFPPhyg 或は rcHBV-NL1.3neo とともに 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 ゲノムが検出された。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 の感染性については、rcHBV-EGFPPhyg 或は rcHBV-NL1.3neo とともに確証を得ることはできなかった。

3) digital PCR 法を用いたゲノム定量法では、収率は~5x10⁶/ml 程度であった。

D. 考察

1) 組換え HBV (rcHBV-EGFPPhyg、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が、今後、感染性をあげる工夫が必要である。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。感染性が低い原因として、ウイルス産生・回収量が低いことが最も考えられる。通常、HBV 感染は 50~100 genome equivalent of infection (G.E.I.) 程度確保するのが理想である。今回の感染実験では、~1 G.E.I.程度と考えられ、そのことが十分な感染性を確認できなかった原因と思われた。

E. 結論

組換え HBV の産生は可能であるが、感染性を得るためには産生性の向上を図る必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

1.論文発表

(1) Xin Zheng, Eriko Ohsaki, **Keiji Ueda**.
“The Mechanism of Angiopoietin-1 Up-regulation in KSHV-infected PEL Cell Lines.”

J. Virol. *in press*

(2) **Keiji Ueda**, Hiroko Omori. “Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity.”

J. Liver 3 (5): e1000169, 2014.

(3) **Keiji Ueda**. “Change in Cellular Gene Expression by Hepatitis B virus (HBV).” pp21-231 in “Epidemiology I“, iConcept Press Ltd., 2014

(4) 上田啓次. 「感染」 プログレッシブ生命科学（米田悦啓ら編）、pp234-249. 南山堂、2014.

(5) 上田啓次. 「DNAウイルス」病原微生物学（荒川宜親ら編）、pp167-180. 東京化学同人、2014.

H. 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

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・教授）

研究要旨

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2種類の分化誘導法により作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植し、それぞれの生着効率を評価した。その結果、従来の二次元培養により分化誘導を行ったヒト iPS 細胞由来肝細胞は全く生着しなかったのに対し、三次元培養を行ったヒト iPS 細胞由来肝細胞は高効率にマウス肝臓へ生着することが明らかとなった。

研究協力者

櫻井 文教 大阪大学院薬学研究科
准教授
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
岡本 涼太 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

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

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。

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を期待される。

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、移植に適した分化誘導法を検討するため、二次元培養法と三次元培養法の二種類の方法で作成したヒト iPS 細胞由来肝細胞の TK-NOG マウスへの移植を行った。また、生着効率の向上が期待できる新たな移植方法として、腎皮膜下への移植（異所性移植）も併せて試みた。

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二次元培養法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. J. Hepatol. 2012)、もしくは三次元培養法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. Biomaterials. 2013) を改良した方法で行った。これらの細胞を Disspase/Collagenase 混合液により剥離、回収し、マウスに移植して、各種解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

C. 研究成果

C.1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導法に関する検討

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。そこで我々は移植に適した分化誘導法を検討するため、二次元培養法と三次元培養法の二種類の方法で作成したヒト iPS 細胞由来

肝細胞の TK-NOG マウスへの移植を行った。

まず、二種類の方法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を Disspase/Collagenase 混合液により剥離、回収し、ガンシクロビルにより肝障害を誘導した TK-NOG マウスへ経脾臓的に移植した。その後、マウスから経時的に血清を回収し、ELISA 法によりマウス血清中ヒトアルブミン濃度を測定した。その結果、二次元培養法により作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したマウス血清からは全くヒトアルブミンが検出されなかったのに対し、三次元培養法により作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したマウス血清からは非常に高い濃度のヒトアルブミンが検出された。以上の結果から、キメラマウス作出には、三次元培養法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞が適していることが示唆された。

C.2. 腎皮膜下移植法に関する検討

続いて、生着効率の向上が期待できる新たな移植方法として、腎皮膜下への移植（異所性移植）を試みた。肝障害を誘導していない免疫不全マウス腎皮膜下に二次元培養法により分化誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植して、経時的に血清を回収し、ELISA 法によりマウス血清中ヒトアルブミン濃度を測定した。その結果、経脾臓移植法では全くヒトアルブミンが検出されなかった二次元培養法により作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したにもかかわらず、最大 110 ng/ml のヒトアルブミンが検出されることが明らかとなった。さらに、生着組織の切片を作製し、観察を行ったところ、ヒト AAT 陽性のヒト肝細胞が多数観察され、移植したヒト iPS 細胞由来肝細胞がマウス腎皮膜下に生着できていることが確認できた。従って、腎皮膜下移植はヒト iPS 細胞由来肝細胞の生着効率向上に適した移植法であることが示唆された。

D. 考察

D.1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導法に関する検討

キメラマウス作出には、二次元培養法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞よりも、三次元培養法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞が適していることが示唆された。これは二次元培養法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞よりも、三次元培養法で作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞の方が肝関連遺伝子の発現量や代謝活性などが高く、よりヒト肝細胞に近い性質を有していることに由来していると考えられる。今後はより生着効率の高いキメラマウスを作出し、HBV 感染評価系への応用を目指し、より分化効率の高い株の探索や、我々が開発した新規移植法（肝細胞シート移植法）を試みる予定である。

D.2. 腎皮膜下移植法に関する検討

腎皮膜下移植はヒト iPS 細胞由来肝細胞の生着効率向上に適した移植法であることが示唆された。本年度は肝障害を誘導していないマウスへの移植であった。今後は TK-NOG マウスといった慢性肝障害モデルマウスの腎皮膜下へヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植することで、マウス腎皮膜下へより大きなヒト肝組織を形成させ、HBV 感染系の作製を試みる予定である。

E. 結論

本年度は、キメラマウス作出に向けて、三次元培養法により分化誘導を行ったヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞が移植に適していること、腎皮膜下移植がヒト iPS 細胞由来肝細胞の生着率向上に有用であることを確認した。

F. 健康危険情報

該当事項無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A., 2014; 111:16772-16777.
- 2) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. Cell Transplant., in press.
- 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, 147-158, 2014, In: M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki (eds.)

2. 学会発表

- 1) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞の肝障害マウスへの効率良い移植法の開発、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、

2014年6月

- 2) 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 ES/iPS 細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下移植と組織化の検討、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 3) Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation enhances the survival rate of acute liver failure mice、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014 年 6 月
- 4) 水口裕之；創薬応用を目指したヒト iPSC 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術の現状と今後の課題・可能性、第 41 回日本毒性学会学術集会、神戸、2014 年 7 月
- 5) 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 ES/iPS 細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下への移植法の検討、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 9 月
- 6) 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞由来肝細胞を用いた次世代型創薬の実現を目指した基盤技術創成、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 10 月
- 7) 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；マウス腎被膜下への分化誘導肝細胞の移植法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月
- 8) 水口裕之、高山和雄；再生医療、創薬応用を目指した多能性幹細胞由来肝細胞の創出、第 87 回日本生化学会大会、

京都、2014 年 10 月

- 9) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、神田勝弘、川端健二、水口裕之；ヒト iPSC 細胞由来肝細胞シートを用いた効率良い新規移植法の検討、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 10) 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；マウス腎被膜下への分化誘導肝細胞移植における最適なヒト ES/iPS 細胞株の探索、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。

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 は、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）・人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から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。そこで、Lhx2を利用することにより、ヒトiPS細胞から造血幹・前駆細胞に分化誘導できるか否かの検証をおこなう。

A. 研究目的

ヒトiPS細胞から効率的な血液細胞への分化誘導システムの開発をおこなう。さらに、Lhx2の強制発現をおこなうことにより、未分化血液細胞の試験管内増幅が可能であるか否かを検証する。

B. 研究方法

ヒトiPS細胞は、GSK3β阻害剤の一過的添加により、効率よく血管内皮細胞へ分化することが報告されている。血管内皮細胞と血液細胞は、共通の前駆細胞（ヘマンジオブラスト）に由来することから、GSK3β阻害剤の一過的添加により、血液細胞への分化効率が上昇するのではないかと考え、GSK3β阻害剤の一過的添加を試みた。また、得られた血液細胞に、レンチウイルスベクターにより、Lhx2などの転写因子の強制発現をおこない、得られた血液細胞の解析をおこなった。さらに、L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ヒトiPS細胞を樹立した。このヒトiPS細胞を試験管内で血液細胞へ分化誘導し、解析をおこなった。

C. 研究成果

ヒトiPS細胞は、GSK3β阻害剤の一過的添加により効率よくヘマンジオブラスト（CD34陽性・CD45陰性細胞）へ分化することを発見した。このCD34陽性・CD45陰性細胞は、赤血球・巨核球（血小板産生細胞）・ミエロイド細胞などへ分化できることを見出した。

GSK3β阻害剤の一過的添加は、ヒトiPS細胞のepithelial-to-mesenchymal transition（EMT）を誘導することが明らかとなり、EMTにより中胚葉系のヘマンジオブラストが誘導されているものと考えられた。

ついで、CD34陽性・CD45陰性細胞に

Lhx2をレンチウイルスベクターを用いて、強制発現させた結果、対照実験では、CD34陰性・CD45陽性の成熟血液細胞へと分化したのに対し、Lhx2の場合、CD34陽性・CD45陽性の未分化血液細胞が保持されることを見出した。しかしながら、この細胞の増殖能は、極めて低いものであった。

そこで、細胞増殖亢進活性を有する転写因子c-MycをLhx2と同時に発現させたところ、CD34陽性・CD45陽性の未分化血液細胞の若干の細胞増殖の亢進が認められた。

D. 考察

マウスiPS細胞の場合とは異なり、ヒトiPS細胞由来のヘマンジオブラストにLhx2の強制発現をおこなった場合、未分化血液細胞の未分化性は維持できるが、細胞増殖促進は、認められなかった。今後、未分化血液細胞の細胞増殖亢進作用のある転写因子をLhx2と共発現させ、その効果を解析する。また、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入は、効率が低いことから、今後ドキシサイクリンによりLhx2の発現を誘導できるヒトiPS細胞を用いて、実験をおこなう予定である。

E. 結論

GSK3β阻害剤を用いることにより、ヒトiPS細胞から効率よく血液細胞へ分化誘導するシステムを開発した。今後、この手法を用いて、Lhx2のみならず、他の転写因子の強制発現により、未分化血液細胞の試験管内増幅が可能であるか否かを調べる必要がある。

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

1. 論文発表

Okada Y, Funahashi N, Tanaka T, Nishiyama Y, Yuan L, Shirakura K, Turjman AS, Kano Y, Naruse H, Suzuki A, Sakai M, Zhixia J, Kitajima K, Ishimoto K, Hino N, Kondoh M, Mukai Y, Nakagawa S, García-Cardeña G, Aird WC, Doi T.

Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Jul;34(7):1531-8. doi: 10.1161

Kodaka Y, Tanaka K, Kitajima K, Tanegashima K, Matsuda R, Hara T.

LIM homeobox transcription factor Lhx2 inhibits skeletal muscle differentiation in part via transcriptional activation of Msx1 and Msx2.

Exp Cell Res. 2015 in press

2. 学会発表

Miyashita K, Kitajima K, Hara T.

Transcription factor Lhx2 inhibits proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cells. The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka, May 30 - 31, 2014

北島健二, 川口真実, 宮下和也, 鹿子田真衣, 中島 鞠乃, 原孝彦. 転写因子Lhx2による多能性幹細胞から長期骨髄再建能を有する造血幹細胞様細胞への誘導, 第 37 回・日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年 11月25日

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

TK-NOG 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実験動物研究部長

研究要旨：肝炎ウイルス感染後の炎症反応、および、進行性病変の観察に資する肝臓/免疫ヒト化モデルを開発する。本目的達成のため、ヒトサイトカイン産生免疫不全肝傷害マウスを作製する。

A. 研究目的

ヒトウイルス性肝炎研究を加速する小動物感染モデルを確立する。ヒト肝細胞が生着する肝傷害モデルとヒト免疫細胞の生着・分化が亢進するヒトサイトカインモデルが融合したNOGマウスを作製する。本モデルはウイルス感染から病態進展までが観察できる新たなツールとなり、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、およびヒト免疫系を併せ持つ以下のモデル作製を行った。1) 研究代表者の感染実験用ヒト化肝臓TK-NOGマウスの作製、2) 新規肝傷害モデルMcl-1 KOマウスの免疫不全化、3) ヒトIL-3/ GM-CSF/TK-NOGマウス、ヒトHLA-A2/TK-NOGマウス、MHC-I,II両欠損/TK-NOGマウスの作製(倫理面への配慮:ヒト肝細胞と造血幹細胞は全て市販の細胞を使用)

C. 研究結果

1) 市販の凍結ヒト肝細胞をTK-NOGマウスに移植してヒト化肝臓マウスを作製した。当該マウスは研究代表者のHBV感染試験用途に提供した。2) 戻し交配5世代(N5)の新規肝傷害モデルMcl-1 KO/Alb-CreTgマウスの戻し交配をN8世代まで継続し免疫不全化を完了した。3) MHC-I,II両欠損/TK-NOGマウスを作製し、ヒト肝細胞移植

を実施し、生着を確認した。ヒトIL-3/GM-CSF/TK-NOGマウスについては4週齢でX線照射を行い、ヒト臍帯血CD34陽性細胞を移植した。その3週間後にGCV投与による肝傷害誘導、ヒト肝細胞移植を実施し、今後両細胞の生着を確認する予定である。

D. 考察

免疫不全化が完了したMcl-1 KOマウスホモ接合体、且つAlb-Cre Tg陽性個体の出現率が極めて低いため次年度は繁殖方法の改善を試みる。ヒトIL-3/GM-CSF/TK-NOGマウスについてはCD34陽性細胞と肝細胞の両細胞が生着する移植条件を検討する。

E. 結論

ヒトIL-3/GM-CSF/TK-NOGマウスに移植したヒト臍帯血CD34陽性細胞/肝細胞の生着が確認できれば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大きく進展すると思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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 実験動物研究部 免疫研究室室長

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。

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) ヒト骨髄細胞系の分化促進
- (2) ヒトサイトカイン発現 NOG マウスの作製
- (3) NOG マウスのリンパ節再生
- (4) NOG マウスでのリンパ濾胞構築
- (5) 肝・免疫系両ヒト化マウスの作製

を行う。

C. 研究結果

(1) 従来の IL-3/GM-CSFtg に加えて IL-6tgNOG マウスを作製した。このマウスではヒト造血幹細胞移植によりヒト単球の分化の促進が認められた。また、ヒト腫瘍細胞の移植により骨髄細胞性の免疫抑制細胞 (TAM, MDSC) の誘導が可能であった。

現在 M-CSFtg マウスの作製も行っている。ヒト G-CSF とマウス G-CSF 受容体遺伝子を置換した G-CSF KINOG マウスを樹立した。造血幹細胞移植によりヒト好中球の分化が確認できた。

(2) IL-6tg マウスを樹立し、現在腫瘍の微小環境の再構築が可能か検討している。

また、活性化型 IL-1 β 、IFN β を発現する tgNOG マウスの作製を行っている。これらにより、ヒト血液免疫系への炎症性サイトカインのもたらす影響を研究する。ヒト IL-7tg マウスを作製し、血中で 1pg/ml, 10pg/ml 程度の発現を確認できるファウンダー系統を樹立した。TSLPtg マウスを作製し血中で 50-100pg/ml 程度の発現を確認できるファウンダー系統を樹立した。今後これらに造血幹細胞を移植し、免疫系への影響を研究する。

(3) NOG マウスは IL-2R g 鎖を欠損するためにリンパ節起始細胞 (LTi) の分化が阻害されており、このため全身のリンパ節の形成不全を呈する。免疫反応の起始部としてリンパ節は必須であるため、LTi に特異的に IL-2Rg 鎖を発現する RORgt-gcBACTg マウスを作製した。このマウスでは IL-2Rg 鎖欠損背景でもリンパ節が形成されることを確認した。B6 マウスで作製したため現在 NOG マウスに戻し交配している。

(4) NOG マウスではヒト造血幹細胞を移植しても脾臓内でリンパ濾胞構造が形成されない。その理由として濾胞樹状細胞とヒトB細胞の相互作用が不十分である可能性を考え、ヒトB細胞の遊走因子であるケモカイン CXCL13 を発現する BACtg マウスを作製した。脾臓内でヒト CXCL13 の発現を RT-PCR で検出することができた。

B6 マウスで作製したため現在 NOG マウスに戻し交配している。

(5) 肝・免疫系両ヒト化マウスの作製 TK-NOG と IL-3/GM-NOG マウスの交配を行い造血幹細胞移植を行った。同マウスに今後ヒト肝細胞移植を行う予定である。

D. 考察

免疫系ヒト化マウスに機能的な免疫反応を起こすための必要なパーツを順次作製しその効果を確認している。これらのマウスの利用によりヒト病態の再現に挑戦していくことが可能となると考えられる。

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の作製を始めたので、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. 194, in press
2. Biochem Biophys Res Commun. 456,219-224
3. Experimental hematology, 63,321-330

2. 学会発表

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
Keiji Ueda, (上田)	Change in Cellular Gene Expression by Hepatitis B virus (HBV)		Epidemiology I	iConcept Press Ltd	Hong Kong	2014	219-231
上田啓次 (上田)	DNAウイルス	荒川宜親、 神谷 茂、 柳 雄介	病原微生物学	東京化学同人	東京	2014	167-180
上田啓次 (上田)	感染	米田悦啓、 岡村康司、 金井好克、 西田幸二	プログレッシブ 生命科学	南山堂	東京	2014	234-249
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.	M. Akashi, T. Akagi, M. Matsuda ki	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application	the Springer publishing	Japan	2014	147-158

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
Yamada R, (竹原)	Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment of chronic hepatitis B virus infection.	J Gastroenterol			in press
Kawaguchi T, (竹原)	Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma.	Hepatol Res			in press
Yamada R, (巽)	Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment of chronic hepatitis B virus infection.	J Gastroenterol			in press
Kawaguchi T, (疋田)	Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma.	Hepatol Res			in press
Keiji U, (上田)	Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype Particle; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity	J. Liver	3	1000169	2014
Xin Zheng, (上田)	The Mechanism of Angiopoietin-1 Up-regulation in KSHV-infected PEL Cell Lines	J. Virol.			in press

Takayama K., (水口)	Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes.	Proc Natl Acad Sci USA.	111	16772-16777	2014
Nagamoto Y., (水口)	Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene	Cell Transplantation			in press
Yamashita M., (末水)	Human plasma concentrations of herbicidal carbamate molinate extrapolated from the pharmacokinetics established in in vivo experiments with chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling.	Regul Toxicol Pharmacol	70	214-221	2014
Suemizu H., (末水)	Pharmacokinetics and effects on serum cholinesterase activities of organophosphorus pesticides acephate and chlorpyrifos in chimeric mice transplanted with human hepatocytes.	Regul Toxicol Pharmacol	70	468-473	2014
Suemizu H., (末水)	Hepatocytes buried in the cirrhotic livers of patients with biliary atresia proliferate and function in the livers of urokinase-type plasminogen activator-NOG mice.	Liver Transpl	20	1127-1137	2014
Murayama N., (末水)	Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of the pregnane X receptor.	Chem Res Toxicol	27,	304-308,	2014
Katano I., (末水)	NOD-Rag2(null) IL-2Rgamma(null) Mice: An Alternative to NOG Mice for Generation of Humanized Mice.	Exp Anim	63,	321-330,	2014.
Higuchi Y., (末水)	A Novel Enhanced Green Fluorescent Protein-Expressing NOG Mouse for Analyzing the Microenvironment of Xenograft Tissues.	Exp Anim	63,	55-62,	2014.
Katano I., (高橋)	NOD-Rag2null IL-2Rnull mice: an alternative to NOG mice for generation of humanized mice.	Experimental Hematology	63	321-330	2014
Takahashi T., (高橋)	Visualization of the human CD4(+) T-cell response in humanized HLA-DR4-expressing NOD/Shi-scid/γc(null) (NOG) mice by retrogenic expression of the human TCR gene.	Biochem Biophys Res Commun	456	219-224	2015
Katano I., (高橋)	Predominant Development of Mature and Functional Human NK Cells in a Novel Human IL-2-Producing Transgenic NOG Mouse	Journal of Immunology	194	In press	2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Change in Cellular Gene Expression by hepatitis B virus (HBV)

Keiji Ueda

Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Osaka University Graduate School of Medicine,

2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Tel; +81-6-6789-3783, Fax; +81-6-6879-3789, Email; kueda@virus.med.osaka-u.ac.jp

ABSTRACT

Gene expression profiles of hepatitis B virus (HBV) producing and non-producing cells were investigated to know how HBV affects cellular gene expression profiles. In this report, we tested the gene expression profile of an HBV producing cell line called HB611 cells and its parental counterpart Huh6 cells. The HB611 cells have been confirmed to express all HBV-related gene products except X gene and produce HBV-like particles that supposed to be infectious into the medium. Gene expression profile analyses were performed using a DNA microarray and it was found that not a few genes was changed for their expression in the presence of HBV related products. Among them, 2,063 genes out of 51,000 were expressed in HB611 cells eight times or more than in Huh6 cells and 1014 genes were expressed in Huh6 cells eight times or more than in HB611 cells. Interestingly, alpha-fetoprotein (*AFP*), which is an immature hepatocyte factor, and *CD24* (a small cell lung carcinoma cluster 4 antigen) were extremely highly expressed in HB611 cells. Some cell cycle genes such as cyclin E (*CYCE*) and *cdk2* (*CDK2*) were expressed higher in HB611 cells than in Huh6 cells. This analysis was performed with the cells expressing HBV related genes and producing HBV artificially in the hepatocellular originated cell line. Therefore, the gene expression profile may be somewhat different from that of natural HBV infection to normal hepatocytes. Nonetheless, it was suggested that HBV infection and its gene expression should made the cellular gene expression change and some of them should be relevant to blastic change of differentiated hepatocytes.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is a causative agent for acute, chronic hepatitis leading to liver cirrhosis and finally to hepatocellular carcinoma, which are serious problems where HBV is prevalent such as east and south-east Asia, middle east countries, Africa, the equator of south America, Alaska, the coast area of Greenland [17].

HBV was identified as an Australian antigen firstly by Blumberg about a half century ago[1]. It is obvious that HBV infection is involved in the several diseases mentioned above [10]. The pathophysiology, however, that HBV causes, and the viral life cycle itself, have not been yet to be clarified, largely due to limited propagation system of this virus [20]. Even though there are several animal models similar to HBV such as avihepadnaviruses (duck hepatitis B virus [DHBV] and heron hepatitis B virus [HHBV] etc.,) and the other orthohepadnaviruses like grand squirrel hepatitis virus (GSHV) and woodchuck hepatitis virus (WHV), they are still inconvenient for daily research activity [17]. Of course, orthohepadnaviruses have been identified in primates; woolly monkey hepatitis B virus (WMHBV), gibbon ape hepatitis B virus (GAHBV), orangutan hepatitis B virus (OHBV) and chimpanzee hepatitis B virus (CHBV) [17], but their usage in the species are beset with ethical issues .

Molecular studies of HBV clarified many functions of HBV related gene products. Such data, however, should be verified in the natural life cycle *in vitro* and/or *in vivo* and further more, there are a lot of mysteries about HBV including the covalently closed circular DNA (cccDNA) formation and its regulation, the entry and the egress [4]. HBV infects efficiently primary human hepatocytes (PHH) *in vitro* [5, 16] and tupaia primary human hepatocytes [23]. PHH is now commercially available from human liver-uPA-SCID mouse [13], but too expensive for ordinary research. A hepatocellular carcinoma-originated cell line called HeparG was reported to become permissive for HBV several weeks after differentiation induction with 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) [6]. Nonetheless, its infectivity is limited as much as twenty to thirty percent and the HeparG is also commercially sold and restricted for its use and propagation. Therefore, more useful and convenient HBV infection system must be established.