

201423044A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業  
(B型肝炎創薬実用化研究事業)

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  
(H24-B創-肝炎-一般-017)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山村 研一

平成27(2015)年 3月

## 目 次

班員名簿	-----	1
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	-----	3
熊本大学 教授 山村研一		
II. 分担研究報告		
1. iPS細胞からの肝細胞の誘導と移植法の確立	-----	13
熊本大学 シニア教授 山村 研一		
2. ES細胞の樹立とモデルマウスの作製	-----	17
熊本大学 准教授 荒木 喜美		
3. チンパンジー由来iPS細胞の樹立、解析とナイーブ化	-----	20
熊本大学 教授 江良 択実		
4. HBV感染・肝炎モデルの樹立	-----	25
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	-----	28
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	30

班員名簿

班員一覧表

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	シニア教授
研究分担者	荒木 喜美 江良 択実 佐々木 裕	熊本大学生命資源研究・支援センター 熊本大学発生医学研究所 熊本大学生命科学研究部	教授 教授 教授
研究協力者	明里 宏文 李 正花 白木 伸明 渡邊丈久 直江秀昭 松本 健 仁木 大輔 アーマッド マザヘリー 藤江 里美	京都大学霊長類研究所 熊本大学生命資源研究・支援センター 熊本大学発生医学研究所 熊本大学大学院生命科学研究部 熊本大学大学院生命科学研究部 熊本大学生命資源研究・支援センター 熊本大学生命資源研究・支援センター 熊本大学生命資源研究・支援センター 熊本大学大学院生命科学研究部	教授 助教 助教 助教 助教 研究員 研究員 研究員 大学院 1 年

I. 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 シニア教授

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)基本となるヒト HLA class I 遺伝子 (HHD) およびマウス (HHB) の入手と繁殖、(2)チンパンジー肝臓キメラマウス (CM) の作製、(3)ヒト肝臓置換マウス (HM) の作製、(4)HBV 肝炎モデルの確立を行う。(1)については、ヒトの  $\beta 2$ -microglobulin、HLA-A2.1 の a1、a2、およびマウス a3 ドメインを連結した遺伝子 (HHD)、マウスの H-2 class I を欠損し、代わりに HHD を持つマウス系統「Tg (HLA-A2.1-h $\beta 2$ m);H2-D<sup>B\*/-</sup>;B2m<sup>-/-</sup> (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、多数のマウスを得るため体外受精の系を確立した。(2)については、新型のセンダイウイルスベクターを開発し、チンパンジーの血液細胞からの iPS (ciPS) 細胞の樹立に成功した。樹立した ciPS は T 細胞由来で、網羅的遺伝子発現パターンはヒト ES や iPS と類似していた。ciPS の HHD 遺伝子の導入に成功した。レシピエントマウスとして Hhex 欠損マウスを樹立した。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<sup>-/-</sup>) の樹立に成功した。(3)については、ヒト iPS を増殖させ、一方効率よく分化誘導する方法を確立した。ヒト iPS 細胞への HHD 遺伝子導入に成功した。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 マウスの樹立に成功した。第 2 のレシピエントマウスとしての HHB:Fah<sup>-/-</sup> マウスの樹立にも成功した。また、tamoxifen の経口投与方法および胎児の卵黄囊血管からのヒト肝細胞の移植法を確立し、免疫応答正常で、肝臓ヒト化マウスの作製に成功した。(4)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。また、iPS より分化誘導した肝前駆細胞において、HBV のリセプターとなる taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が発現していること、実際に HBV-NL 株が感染できることを明らかにした。

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・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・教授
- ・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・助教
- ・直江秀昭・熊本大学生命科学研究部・助教
- ・松本健・熊本大学生命資源研究・支援センター・

助教

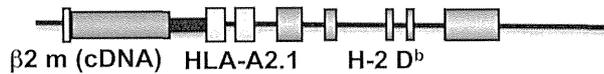
- ・仁木大輔・熊本大学生命資源研究・支援センター・研究員
- ・アーマッド マザヘリー・熊本大学生命資源研究・支援センター・研究員
- ・藤江里美・熊本大学生命科学研究部・大学院生

A. 研究目的

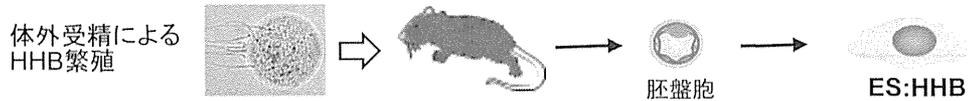
HBV キャリアは本邦でも 150 万人存在し、治療抵抗性であるとともに 10-20% に肝癌が発症することから、慢性 B 型肝炎発症機構の解析とそれに基づく新たな治療法の確立は急務である。そこで、HBV 感染可能でヒトのクラス I システムを持ち免

## 1. 基本となるヒトHLA class Iマウスの入手と繁殖

(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

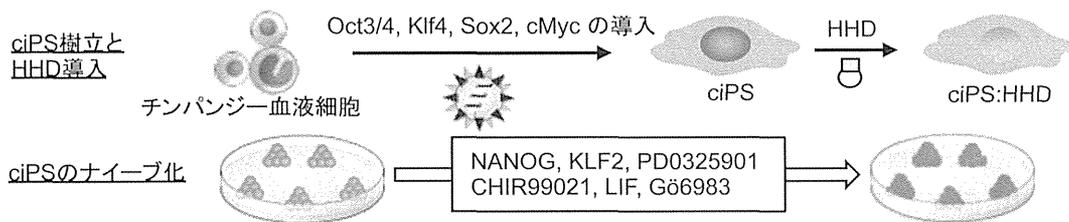


(2) Tg(HLA-A2.1( $h\alpha 1-h\alpha 2-m\alpha 3$ )- $h\beta 2m$ );H2-D<sup>B\*/</sup>;B2m<sup>-/-</sup>(HHB)入手、繁殖、ES細胞の樹立

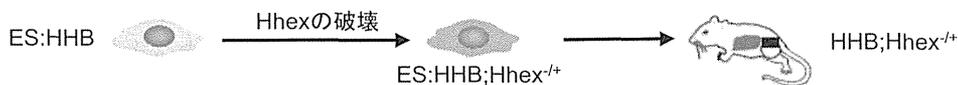


## 2. チンパンジー肝臓キメラマウスの作製

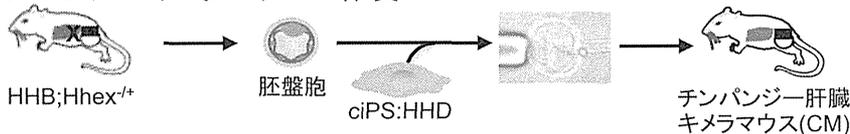
(1) チンパンジーiPS (ciPS)細胞の樹立、HHD遺伝子導入、ciPSのナイーブ化



(3) レシピエント(肝臓欠失/ヒトHLA)マウスの作製



(4) チンパンジーキメラマウスの作製

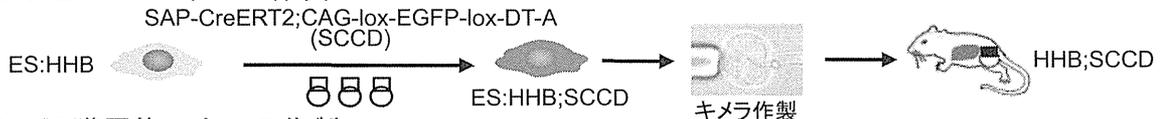


## 3. ヒト肝臓置換マウスの作製

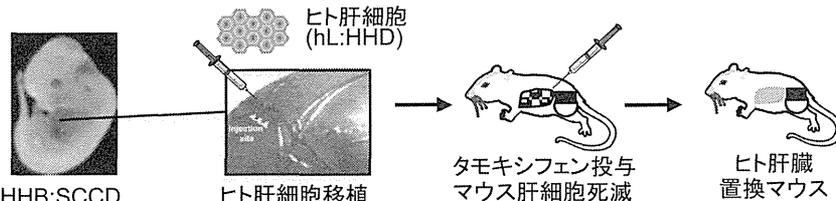
(1) ヒトiPS細胞へのHLA遺伝子導入と肝細胞への分化誘導



(2) レシピエントマウスの作製



(3) ヒト肝臓置換マウスの作製



## 4. HBV感染・肝炎モデルの樹立



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、基本となるヒト HLA class I 遺伝子 (HHD) およびマウス (HHB) の入手と繁殖、チンパンジー肝臓キメラマウスの作製、ヒト肝臓置換マウスの作製、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 26 年度は、以下の研究を行う。

### 1. 基本となるヒト HLA class I 遺伝子 (HHD) およびマウス (HHB) の入手と繁殖 (山村、荒木)

昨年度までに HHD 遺伝子および HHB マウスを入手し、ES:HHB 細胞も樹立しており、この項目は完了している。

### 2. チンパンジー肝臓キメラマウスの作製

#### (1) チンパンジー iPS (ciPS) 細胞の樹立、HHD 遺伝子導入、ciPS のナীব化 (江良)

##### 1) チンパンジー iPS 細胞の樹立 (江良)

###### ① 新型 SeV の開発

昨年度までに通常のセンドライウイルスベクター (SeV) を用いて ciPS の樹立に成功している。体細胞から iPS 細胞の誘導効率を向上させ、樹立早期にウイルス除去を可能とする新型 SeV を開発するために、Sox2、KLF4、Oct3/4 の初期化因子が 1 つのウイルスベクター上にタンデムに並んだベクターを作製する。そして、iPS 細胞の誘導効率やウイルスの除去率等を調べる。

###### ② 樹立した ciPS 細胞の起源の解析 (江良)

ciPS 細胞の起源が T リンパ球かどうかを、T リンパ球受容体 (TCR) の再構成が生じているかどうかで解析する。

###### ③ ciPS 細胞の網羅的発現遺伝子の解析 (江良)

ヒト ES やヒト iPS における遺伝子発現パターンを比較するため、RNA を抽出後、DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の網羅的解析を行なう。

##### 2) 樹立した ciPS 細胞への HHD 導入 (江良) HHB マウスと同じヒト class I を発現させる

ため、樹立した ciPS 細胞へ HHD 遺伝子を導入する。

### 3) 樹立した iPS 細胞のナীব化 (江良)

マウス胚とのキメラ作製を行うためには、ciPS 細胞をよりマウス ES 細胞の状態に近づけることが必要である。この作業をナীব化と呼ぶ。最近発表された方法 (Cell, 158: 1254-1269, 2014) を参考にナীব化の条件を検討する。

### (2) レシピエントマウスの作製 (荒木)

ナীব化したチンパンジー由来 iPS 細胞とマウス胚との間でキメラマウスを作製することで、チンパンジー細胞由来の肝細胞を持つマウスを作製するため、肝臓発生のマスター遺伝子である Hhex 欠損マウスを作製する。

### (3) チンパンジーキメラマウスの作製 (荒木) 平成 27 年度の実施予定である。

## 3. ヒト肝臓置換マウスの作製

### (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)

#### 1) ヒト iPS から肝細胞への分化誘導 (山村)

昨年度までにヒト iPS から肝細胞への分化誘導方法を確立している。しかし、iPS 細胞の多分化能を失うことなく維持する方法や、その iPS 細胞からの成熟肝細胞への分化誘導法について、まだ開発の余地があるので、その開発を試みる。

#### 2) ヒト iPS 細胞への HLA 遺伝子導入 (山村)

ヒト肝細胞を誘導するヒト iPS にも、この HHD 遺伝子を導入し iPS:HHD を作製する。これにより、胸腺で発現するヒトクラス I と移植予定のヒト肝細胞で同じ HHD が発現していることとなる。

### (2) レシピエントマウスの作製 (山村、荒木)

#### 1) ES:HHB 樹立 (荒木)

昨年度までに HHB マウスより ES 細胞の樹立に成功している。

#### 2) HHB:SCCD マウス樹立 (荒木)

tamoxifen 投与時に、マウス肝細胞を死滅させるため、ES:HHB に SCCD を導入し、それを用いてマウス系統 (HHB:SCCD) の樹立を行う。SC:SAP-CreER<sup>T2</sup> と CD:CAG-loxP-EGFP-loxP-DT はそれぞれ別の遺伝子である。

3) HHB:SCCD におけるマウス肝細胞死 (山村)  
HHB:SCCD に tamoxifen を投与し、マウス肝細胞を死滅させることができるかどうかを解析する。

4) Fah 欠損マウスの樹立 (荒木)

Fumaryl acetoacetate hydrolase (Fah) 欠損ホモ個体は、NTBC を飲用させれば正常に生育するが、その飲用を止めると肝障害を発症することが知られている。このマウス系統もレシピエントとして樹立する。

(3) ヒト肝臓置換マウスの作製 (山村)

1) tamoxifen 投与法の確立 (山村)

早期にマウス肝細胞の死滅を起こすため、胎児期つまり妊娠マウスあるいは出生後から tamoxifen を投与することを考えている。この場合、通常の腹腔投与は望ましくない。そこで、経口投与法の開発を試みる。

2) ヒト肝細胞移植法 (山村)

肝細胞を移植するより良い方法を開発することを目指し、胎児期の卵黄囊血管から細胞を移植する方法は昨年度完成した。そこで、ヒト肝細胞及び hiPS より分化誘導した肝細胞 hHep を移植し、肝臓ヒト化マウスを作製できるかどうかを検討する。

4. HBV 感染・肝炎モデルの樹立 (佐々木)

(1) HBV 感染の条件の検討 (佐々木)

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。

(2) HBV 感染状態の解析 (佐々木)

HBV の感染状態を解析するために必要な実験系を確立する。

(3) HBV の iPS 細胞への感染 (山村、佐々木)

キメラマウス作成に先行し、iPS 細胞から分化させた肝細胞に HBV が感染可能か検証する。

(4) HBV-cccDNA の発現制御メカニズムの解析 (佐々木)

HBV-cccDNA の発現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の解析を行う。

(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か、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されており、機関内の指針を遵守し行う。

C. 研究結果

1. 基本となるヒト HLA classI 遺伝子 (HHD) およびマウス (HHB) の入手と繁殖 (山村、荒木)

HHD および HHb は入手済みである。HHB マウスは、自然交配では繁殖が悪いので、体外受精の方法を確立した。

2. チンパンジー肝臓キメラマウスの作製

(1) チンパンジー iPS (ciPS) 細胞の樹立、HHD 遺伝子導入、ciPS のナイーブ化 (江良)

1) チンパンジー iPS 細胞の樹立 (江良)

① 新型 SeV の開発

Sox2、KLF4、Oct3/4 の3つの初期化因子をタンデムにつないだセンダイウイルスベクターを作成した。このベクターを使い、4%という高効率で iPS を作製することができた。この新型 SeV は温度感受性があるミュータントで 38 度では増殖できない。そこでコロニーを分離後すぐに培養温度を 37 度から 38 度に変更することにより、80%以上の高い割合でウイルスを除去することができた。

② 樹立した ciPS 細胞の起源の解析 (江良)

T リンパ球受容体 (TCR) の再構成が生じているかどうかで解析する。樹立したすべての ciPS 細胞で、TCR の再構成バンドが検出されたので、樹立した ciPS 細胞はすべて末梢血液に存在する T リンパ球由来であることが

わかった。

### ③ciPS 細胞の網羅的発現遺伝子の解析 (江良)

ciPS 細胞は、Principle Component Analysis (PCA) およびクラスター解析において、ヒトの ES 細胞、ヒト iPS 細胞のデータの近傍にマッピングされた。このことは、作製した ciPS 細胞がヒトの ES 細胞や iPS 細胞に近い、すなわち分化状態が一步進んだプライムタイプの多能性幹細胞 (胚の epiblast に類似する細胞) であることを示唆している。

### 2) 樹立した ciPS 細胞への HHD 導入 (江良)

HHD 遺伝子が導入された ciPS 細胞クローンの樹立に成功した。

### 3) 樹立した iPS 細胞のナイーブ化 (江良)

平成 25 年度に発表された方法 (Nature, 504:282-286, 2013) を数回施行したが、全く ciPS 細胞コロニーを得ることができなかった。そこで、平成 26 年度 Cell 誌に報告された Takashima らの方法 (Cell, 158: 1254-1269, 2014) の追試を行なっている。

### (2) レシピエントマウスの作製 (荒木)

HBB ES 細胞と CRISPR/Cas9 法を用い、肝臓発生のマスター遺伝子である Hhex 欠損マウスの作製に成功した。

### (3) チンパンジーキメラマウスの作製 (荒木)

平成 27 年度に実施予定である。

## 3. ヒト肝臓置換マウスの作製 (山村、荒木)

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

#### 1) ヒト iPS から肝細胞への分化誘導 (山村)

ヒト iPS 細胞では、多分化能を維持するために高い濃度の methionine とその代謝産物である S-adenosylmethionine を必要とすること、この methionine が低下すると、分化は促進されることを明らかにした。また、synthetic nanofiber を用いると、分化誘導を促進することを明らかにした。

#### 2) ヒト iPS 細胞への HLA 遺伝子導入 (山村)

HHD の検出には Anti-HLA-A2mAb (clone BB7.2) を使用することがわかった。HHD を iPS にエレクトロポレーションすることにより、iPS:HHD の樹立に成功した。

### (2) レシピエントマウスの作製 (山村)

#### 1) ES:HBB 樹立 (荒木)

昨年度までに HBB マウスより ES 細胞の樹立成功している。

#### 2) HBB:SCCD マウス樹立 (荒木)

ES:HBB に SCCD を導入し、6 系統 (HBB:SCCD) の樹立を行った。

#### 3) HBB:SCCD におけるマウス肝細胞死 (山村)

樹立した 6 系統のうち、1 系統において、tamoxifen 投与により劇症肝炎が生じ、マウスが全例死亡することがわかり、任意の時期にマウス肝細胞を死滅させることのできる系統樹立に成功した。

#### 4) Fah 欠損マウスの樹立 (荒木)

ES HBB および CRISPR/Cas9 法を用い、Fah 欠損マウスの樹立に成功した。

### (3) ヒト肝臓置換マウスの作製 (山村)

#### 1) tamoxifen 投与法の確立 (山村)

tamoxifen 0.1g を粉末餌 200g によく混ぜ、Y 式マウス用粉末給餌器を用いて投与することにより、効率よく CreERT2 が核内に移行し、通常の腹腔内投与とほぼ同じかよりよい効率で、loxP 間の組換えを起こすことを確認した。したがって、経口投与法を確立した。

#### 2) ヒト肝細胞移植法 (山村)

胎児期の卵黄囊血管から、ヒト肝細胞及び hiPS より分化誘導した肝細胞 hHep を移植し、肝臓ヒト化マウスを作製する方法を確立した。

### 3) ヒト肝臓置換マウスの作製

上記の 1) と 2) の技術を用い、免疫応答正常で、ヒト肝臓置換マウスの作製に成功した。

## 4. HBV 感染・肝炎モデルの樹立 (佐々木)

### (1) HBV 感染の条件の検討 (佐々木)

文献的な考察から、マウス 1 体当たり  $1 \times 10^5 \sim 10^6$  copy の投与で感染が成立しうると考えられる。

### (2) HBV 感染状態の解析 (佐々木)

実臨床において、ELISA 法による HBs の定量、qPCR 法による HBV-DNA の定量等行っており、これらを用いてその判定を行うこととした。

### (3) HBV の iPS 細胞への感染 (佐々木)

iPS 由来肝芽様細胞において HBV の感染に

必要な taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が発現していることを確認した。また、HBVに luciferase 遺伝子を組み込んだ HBV-NL 株(下遠野先生より供与)が iPS 由来肝芽様細胞に感染することを確認した。

#### (4) HBV-cccDNA の発現制御メカニズムの解析 (佐々木)

HBV-DNA 内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

#### 1. チンパンジー肝臓キメラマウスの作製

ciPS 細胞に関しては、樹立および HHD の導入に成功し、残された問題は、ナイーブ化だけとなった。マウス ES や iPS の分化状態は、胚盤胞の内部細胞塊と同じで、キメラ形成能と生殖系列への伝達率が極めて良く、naïve state にあると言われている。一方、ciPS やヒト iPS は、分化状態が一步進んで円筒胚の epiblast と同様で、primed state にあると言われている。このままではキメラ形成能が極めて低い。このため、primed state から naïve state にする必要がある。すでに naïve 化の方法はいくつか報告されており、その中でも高島らの方法は再現性が高いと考えられており、この方法を用いて行う予定である。naïve 化されれば、すでに作製済みの HHB:Hhex<sup>-/-</sup>マウスの胚との間でキメラ作製を行う予定である。HHB:Hhex<sup>-/-</sup>マウスでは、肝臓が全く形成されないため、その部分を ciPS 由来の細胞が分化誘導され、肝臓形成を行うことを期待している。

#### 2. ヒト肝臓置換マウスの作製

ヒト iPS 細胞からの肝細胞の分化誘導、HHD 遺伝子の導入法については完了した。また、HHB:SCCD マウスも樹立に成功している。そして、ヒト肝臓置換マウスについても、卵黄嚢血管経路でヒト肝細胞移植すれば、免疫応答が正常かつヒト化したマウスにおいて、ヒト肝臓置換マウスを作製できることを明らかにした。現在、ヒト肝細胞による高置換率のヒト肝臓置換マウスを得る

ため、tamoxifen 等の投与時期の決定を行っているところである。今後の課題は、HBV を感染させ、HBV の抗原を標的とした肝炎が発症するかどうかである。このためには、細胞障害性 T 細胞が、胎児期にヒトクラス I 抗原で教育されている必要があるが、HHB を使用しており、この点は問題がないと考えている。

#### 3. レシピエントマウスの供給体制

HHB マウスは、もともと自然交配による繁殖があまりうまくいっていない。そこで、精子表面よりコレステロール分子を引き抜く活性の高い精子前培養液(FIRTIUP)と卵子の透明帯を薄くする効果のある体外受精用培地(CARD medium)を用いたところ、体外受精により高い受精率を得ることが出来た。これにより、レシピエントマウスの供給体制についても目処が立った。

### E. 結論

チンパンジー肝臓キメラマウスの作製については、ciPS のナイーブ化とそれを用いたキメラ作製を残すのみとなり、予定どおり研究計画を達成した。

ヒト肝臓置換マウスの作製については、ヒト肝細胞による高置換率のヒト肝臓置換マウスの作製の直前まで研究は進行し、予定どおり計画を達成した。

今後、HBV 感染・肝炎モデルの樹立を行う予定である。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Yamazoe, T., Shiraki, N. and Kume, S. Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds. *Methods Mol. Biol.* Nov 20. 2014 (Doi なし).
- (2) Shiraki, N., Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F. and Kume, S. Methionine metabolism regulates

maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 19:780-794, 2014 (Doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.017).

- (3) Mu, Y., Jin, S., Shen, J., Sugano, A., Takaoka, Y., Qiang, L., Imbimbo, B.P., Yamamura, K. and Li, Z. CHF5074 (CSP-1103) stabilizes human transthyretin in mice humanized at the transthyretin and retinol-binding protein loci. *FEBS Lett.* 589: 849-856, 2015. (Doi:10.1016/j.febslet.2015.02.020)
- (4) Nakagawa, Y., Yamamoto, T., Suzuki, K., Araki, K., Takeda, N., Ohmuraya, M. and Sakuma, T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp. Anim.* 63: 79-84, 2014.
- (5) Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS One.* 9 :e113052, 2014. (Doi: 10.1371/journal.pone.0113052)
- (6) Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., Yokoyama, S., Sasaki, Y. and Nakao, M. Lysine-specific demethylase 2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. *Mol. Cell Biol.* 35: 1068-1080, 2015. (Doi: 10.1128/MCB.01404-14)

## 2. 学会発表

- (1) 山村研一: ヒト疾患モデルを用いた病因・病態解析と治療法の検証: 第61回日本実験動物学会総会、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014年5月16日
- (2) Nobuaki Shiraki, Yasuko Shiraki., Tomonori Tsuyama, Fumiaki Obata, Masayuki Miura, Genta Nagae, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Kume, Fumio Endo, and Shoen Kume, Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells、第12回幹細胞シンポジウム。九州大学医学部 百年講堂, 2014年5月31日.
- (3) 白木伸明, 白木恭子, 津山友徳, 小幡史明, 三浦正幸, 永江玄太, 油谷浩幸, 糸和彦, 遠藤文夫, 糸昭苑、ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割、日本アミノ酸学会第8回学術大会。(東京農業大学(世田谷キャンパス)), 2014年10月9日
- (4) 山村研一: ヒトiPSを活用した肝臓ヒト化マウスの作製と応用, 日本人類遺伝学会第59回大会シンポジウム, 東京(タワーホール船堀), 2014年11月22日
- (5) 白木伸明、ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割、第18回アミノ酸セミナー、東京、2014年7月4日
- (6) 白木伸明、白木恭子、津山友徳、小幡史明、三浦正幸、永江玄太、油谷浩幸、糸和彦、遠藤文夫、糸昭苑。ヒト多能性幹細胞の未分化能維持および分化におけるメチオニン代謝の役割、第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月26日
- (7) 白木伸明、ヒトES/iPS細胞の内胚葉分化における細胞外環境の役割、第2回細胞凝集研究会、福岡、2014年12月6日
- (8) 荒木喜美, 牟田真由美, 仙波圭, 竹田直樹, 仁木大輔, 松本健, 武田伊世, 山村研一, 大村谷昌樹, 荒木正健: CRISPR/Cas9による2本鎖切断・1本鎖切断を利用した場合のマウスES細胞における相同組換え効率の比較, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25-11.27, 神奈川県(パシフィコ横浜)
- (9) Soga M, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo M, Irie T, Endo F and Era T. Establishment of disease model using induced pluripotent stem cells derived from Niemann-Pick disease type C INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESERCH 12th annual meeting. Vancouver, June 18th, 2014.
- (10) 江良扱実 骨・代謝性疾患由来iPS細胞を使

った疾患モデルと治療薬開発 第 35 回日本  
炎症・再生医学会年会 教育講演 2014 年 7  
月 2 日 沖縄

- (11) 江良択実 iPS 細胞研究の進展 難治性疾患  
由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化、  
第 87 回日本生化学会大会シンポジウム 疾  
患 iPS 細胞 2014 年 10 月 15 日京都
- (12) 江良択実 iPS 細胞を使った難病研究 第  
27 回日本動物実験代替法学会大会シンポジ  
ウム ヒト iPS 細胞を用いた創薬研究の新た  
な展開 2014 年 12 月 7 日横浜
- (13) 藤江康光、房木ノエミ、片山朋彦、浜崎誠、  
副島由美、曾我美南、伴浩志、長谷川護、山  
下賢、木村重美、鈴木沙織、松沢哲郎、明里

宏文、江良択実 新型センドライウイルスを用  
いたチンパンジー血液由来 iPS 細胞の作製  
第 14 回日本再生医療学会総会 一般口演  
2015 年 3 月 21 日 横浜

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

## 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

iPS細胞からの肝細胞の誘導と移植法の確立

研究分担者 山村 研一 熊本大学生命資源研究・支援センター シニア教授

研究協力者 李 正花 熊本大学生命資源研究・支援センター 助教

研究協力者 白木 伸明 熊本大学発生医学研究所 助教

研究協力者 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

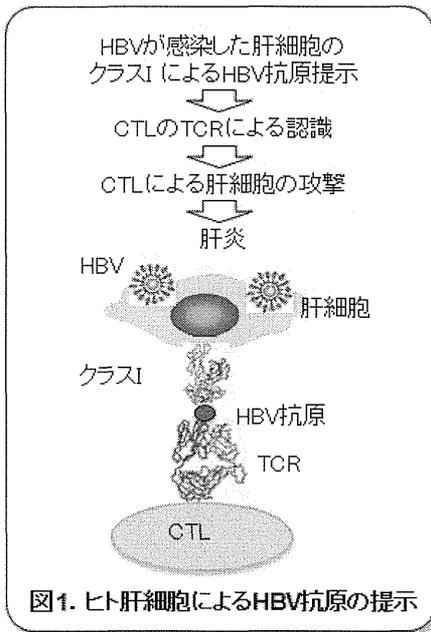
研究要旨

免疫応答正常で、かつヒト免疫応答系を持ちHBVに対する免疫応答により肝炎を発症するマウスの樹立を目標としている。この目的達成のため、以下の研究を行った。(1) iPS細胞の多能性維持にメチオニンが重要であること、分化誘導において synthetic nanofiber を用いることにより効率化できることがわかった。(2) HHD をヒト iPS に導入し、iPS:HHD の作製に成功した。HHD の検出には Anti-HLA-A2mAb (clone BB7.2) を使用できることがわかった。(3) Tamoxifen の妊娠マウスや新生児マウスへの腹腔内投与を回避するため、ほぼ同じ効率で組換えを起こせる経口投与法を開発した。(4) 胎児の卵黄囊血管経由でヒト肝細胞を移植する方法を開発した。その結果、ヒトクラス I 免疫応答系を持ち、免疫応答正常なヒト肝臓置換マウスの作製に成功した。

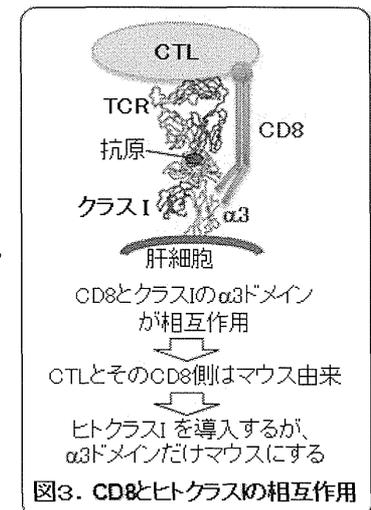
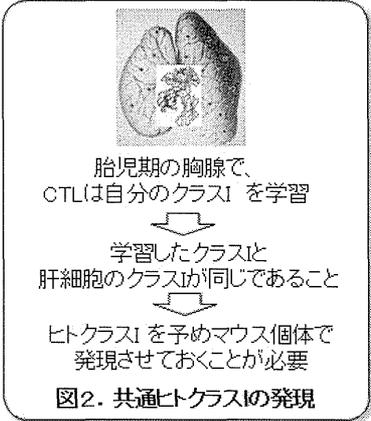
A. 研究目的

HBV 肝疾患の病態解明と治療法の確立を目指すために、HBV が感染可能で、かつ、ヒトと同様の免疫応答により、HBV の抗原をターゲットとして肝炎を引き起こされるマウスモデルの開発を目標とする。

そのために、マウス細胞障害性 T 細胞 (CTL) が、HBV に感染したヒト肝細胞を攻撃する必要がある。これが成立するためには3つの条件が必要である。第1は、HBV が感染したヒト肝細胞のクラス I 分子による HBV 抗原の細胞障害性 T 細胞 (CTL) への提示である。この HBV 抗原が CTL の T 細胞リセプター (TCR) により認識され肝細胞の破



壊が起こる (図1)。このとき、CTLは、自己のクラス I 分子も認識しており、自己のクラス I 分子による抗原提示でないと、免疫応答は起こらない。第2は、ヒト肝細胞で発現するクラス I 分子と同じものがマウス胎児の胸腺で発現し、CTLに対して自己のクラス I を教育しておくことである (図2)。同じクラス I が発現していないと HBV 抗原特異的な免疫応答による肝炎は生じない。教育されていない



CTL を移入すると、自己と異なったクラス I に対する拒絶反応による肝炎が生じる。この肝炎と HBV 抗原特異的な肝炎を混同してはならない。ここが重要なポイントである。第 3 は、マウス由来の CTL の CD8 分子とヒト肝細胞クラス I 分子の間での相互作用が免疫応答において必要なことである。この相互作用は CD8 分子とクラス I  $\alpha$ 鎖の $\alpha$ 3ドメインで行われるため、クラス I を構成する $\beta$ 2-microglobulin と  $\alpha$ 鎖の $\alpha$ 1 および $\alpha$ 2 ドメインはヒト由来であるが、 $\alpha$ 3 ドメインはマウス由来であること(図 3)が必要である。上記の理由から、②と③のためレシピエントマウスとしてヒトクラス I 「ヒト $\beta$ 2m 及び HLA-A2.1 の $\alpha$ 1・ $\alpha$ 2 とマウス MHC H2-D<sup>b</sup>の $\alpha$ 3 domain を融合した遺伝子(HHD)」(図 4)を発現している HHB マウスを、ヒト肝細胞移植のためのレシピエントマウスとして用いている。①のためには、移植するヒト肝細胞も HHD を発現させておくことが必要である。また、移植するヒト肝細胞が、ヒトの免疫系を持つマウスに拒絶されないように胎児期に移植するなど新しい移植方法を確立すること、tamoxifen の経口投与法の開発が必要であり、これらの開発が目的である。

## B. 研究方法

### (1) iPS の多能性維持と分化誘導

移植に用いるヒト肝細胞を、iPS 細胞からの分化誘導により得る場合には、2つの方法論が必要である。第 1 は、iPS 細胞の多分化能を失うことなく維持する方法であり、第 2 は、その iPS 細胞からの成熟肝細胞への分化誘導法である。これらの点について、まだ開発の余地があるので、その開発を試みる。

### (2) iPS:HHD の作製

HHB マウスでは、HHD を発現しているとともに、マウスクラス I-D<sup>b</sup> $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2-microglobulin が破壊されている。ヒト肝細胞を誘導するヒト iPS にも、この HHD 遺伝子を導入し iPS:HHD を作製する。これにより、胸腺で発現するヒトクラス I と移植予定のヒト肝細胞で同じ HHD が発現していることとなる。

### (3) マウス肝細胞死を誘導するために、SCCD

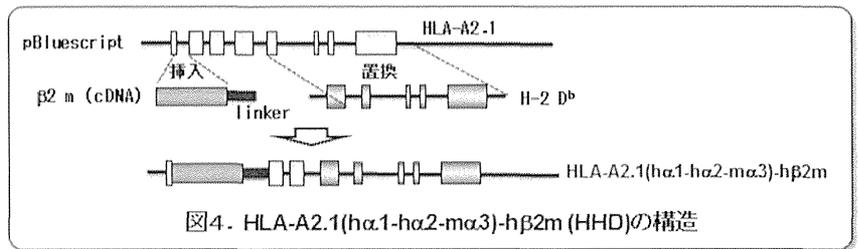


図4. HLA-A2.1(h $\alpha$ 1-h $\alpha$ 2-m $\alpha$ 3)-h $\beta$ 2m (HHD)の構造

(SAP-CreERT2:CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A) を導入した HHB マウスを樹立している。このマウスの胎児期つまり妊娠マウスあるいは出生後から tamoxifen を投与することを考えている。この場合、通常の腹腔投与は望ましくない。そこで、経口投与法の開発を試みる。

(4) 肝細胞を移植するより良い方法を開発することを目指し、胎児期の卵黄嚢血管から細胞を移植する方法は昨年度完成した。そこで、ヒト肝細胞及び hiPS より分化誘導した肝細胞 hHep を移植し、肝臓ヒト化マウスを作製できるかどうかを検討する。

(倫理面への配慮)

本研究の範囲では必要としない。

## C. 研究結果

### (1) ヒト iPS 細胞の維持

ヒト iPS 細胞では、多分化能を維持するために高い濃度の methionine とその代謝産物である S-adenosylmethionine を必要とすること、この methionine が低下すると、分化は促進されることを明らかにした(図 5)。また、synthetic nanofiber を用いると、Rac1 の活性化を通して分化誘導を促進することを明らかにした。

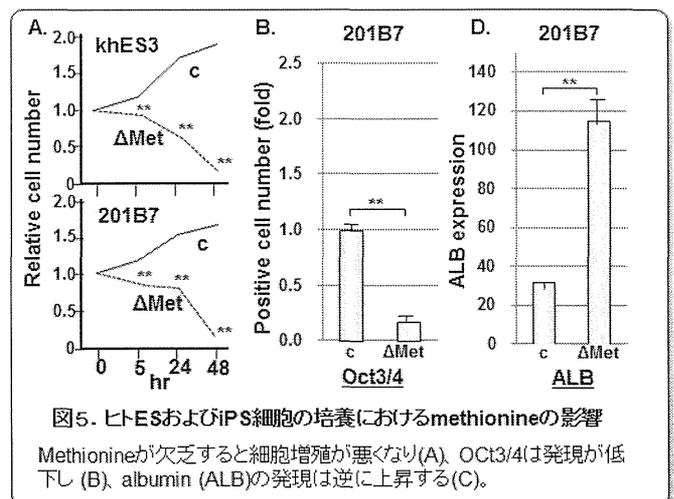


図5. ヒトESおよびiPS細胞の培養におけるmethionineの影響

Methionineが欠乏すると細胞増殖が悪くなり(A)、Oct3/4は発現が低下し(B)、albumin (ALB)の発現は逆に上昇する(C)。

## (2) iPS:HHD の作製

HHD の検出には Anti-HLA-A2mAb (clone BB7. 2) を使用できることがわかった。HHD を iPS にエレクトロポレーションし、RT-PCR およびヒト HLA クラス I に対する抗体で免疫染色することにより発現を解析した。その結果、いずれにおいても検出されたので、iPS:HHD の樹立に成功した。

## (3) tamoxifen 経口投与法の開発

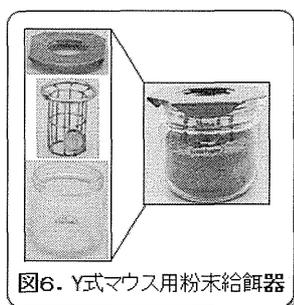


図6. Y式マウス用粉末給餌器

tamoxifen 0.1g を粉末餌 200g によく混ぜ、Y 式マウス用粉末給餌器 (図6) を用いて投与することにより、効率よく CreERT2 が核内に移行し、通常の腹腔内投与とほぼ同じかよりよい効率

で、loxP 間の組換えを起こすことを確認した。

## (4) 卵黄囊血管経由肝臓ヒト化マウス作製

HHB:SCCD マウスを交配し妊娠マウスをまず得た。そして、市販されているヒト肝細胞もしくはヒト iPS から分化誘導したヒト肝細胞を、胎生期 16.5 日 (E16. 5) あるいは E17. 5 に胎児の卵黄囊血管経由で移植した (図7)。tamoxifen は、E18. 5 より投与を開始した。生後約 2 週間および 4 週間に解析したところ、ヒト肝細胞が生着していることがわかった。また、妊娠マウス一腹の 5 つの胎児に移植可能であること、したがって多数の肝臓ヒト化マウスの作製が容易に可能であることがわかった。

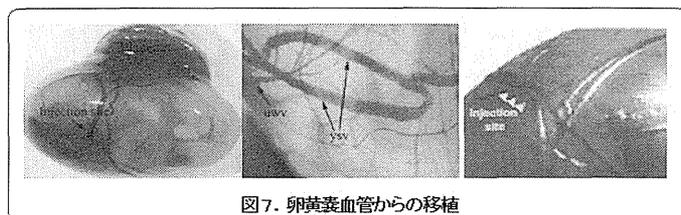


図7. 卵黄囊血管からの移植

## D. 考察

tamoxifen は通常腹腔投与されるが、妊娠マウスや出生直後のマウスの腹腔内への投与は流産や死亡のリスクが高い。そこで、粉末餌に混ぜる方法を試みたが、充分効果を発揮することがわかった。Tet-On/Off 系では、doxycyclin を飲用水に入れて投与でき、腹腔内投与に比し利点とされていた。しかし、本研究の結果、tamoxifen も経

口投与できることがわかり、欠点を克服できた。

また、E16.5 または E17.6 の胎児の卵黄囊血管から、ヒト肝細胞を移植する方法を確立した。この時期に移植することにより、ヒト肝細胞は少なくとも生後 1 ヶ月までは生着し、したがって免疫寛容となることがわかった。すなわち、マウスの免疫能を保ったまま肝臓ヒト化マウスを作製できること、免疫不全マウスは不要であることを明らかにした。

## E. 結論

iPS 細胞から分化誘導した肝細胞をマウス胎児の卵黄囊血管経由で移植することにより、免疫応答が正常な肝臓ヒト化マウスを作製する方法を確立した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- (1) Taiji Yamazoe, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume, “Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds”, *Methods Mol. Biol.* Nov 20. 2014 (Doi なし).
- (2) Nobuaki Shiraki, Yasuko Shiraki., Tomonori Tsuyama, Fumiaki Obata, Masayuki Miura, Genta Nagae, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Kume, “Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells”, *Cell Metab*, vol.19, No. 5, pp. 780-794, 2014 (Doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.017).
- (3) Yanshuang Mu, Shoude Jin, Jingling Shen, Aki Sugano, Yutaka Takaoka, Lixia Qiang, Bruno P Imbimbo, Ken-ichi Yamamura and Zhenghua Li, “CHF5074 (CSP-1103) stabilizes human transthyretin in mice humanized at the transthyretin and

retinol-binding protein loci”, FEBS letters, in press  
(doi:10.1016/j.febslet.2015.02.020)

## 2. 学会発表

- (1) 山村研一: ヒト疾患モデルを用いた病因・病態解析と治療法の検証: 第 61 回日本実験動物学会総会、北海道 (札幌コンベンションセンター)、2014 年 5 月 16 日
- (2) Nobuaki Shiraki, Yasuko Shiraki., Tomonori Tsuyama, Fumiaki Obata, Masayuki Miura, Genta Nagae, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Kume, Fumio Endo, and Shoen Kume, Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells、第 12 回幹細胞シンポジウム. 九州大学医学部 百年講堂, 2014 年 5 月 31 日.
- (3) 白木伸明, 白木恭子, 津山友徳, 小幡史明, 三浦正幸, 永江玄太, 油谷浩幸, 糸和彦, 遠藤文夫, 糸昭苑、ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割、日本アミノ酸学会 第 8 回学術大会. (東京農業大学 (世田谷キャンパス) ), 2014 年 10 月 9 日
- (4) 山村研一: ヒト iPS を活用した肝臓ヒト化

マウスの作製と応用, 日本人類遺伝学会第 59 回大会シンポジウム, 東京 (タワーホール船堀), 2014 年 11 月 22 日

- (5) 白木伸明、ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割、第 18 回アミノ酸セミナー、東京、2014 年 7 月 4 日
- (6) 白木伸明, 白木恭子、津山友徳, 小幡史明, 三浦正幸, 永江玄太, 油谷浩幸, 糸和彦, 遠藤文夫, 糸昭苑、ヒト多能性幹細胞の未分化能維持および分化におけるメチオニン代謝の役割、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 26 日
- (7) 白木伸明、ヒト ES/iPS 細胞の内胚葉分化における細胞外環境の役割、第 2 回細胞凝集研究会、福岡、2014 年 12 月 6 日

## 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

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 教授  
研究協力者 松本 健 熊本大学生命資源研究・支援センター 助教  
研究協力者 仁木 大輔 熊本大学生命資源研究・支援センター 研究員

研究要旨

B型肝炎のモデルマウス作製のため、細胞免疫系をヒト化したマウス、ヒトHLA Class Iとβ2-microglobulinを発現し、かつマウスのClassIとβ2-microglobulinを欠損しているマウス [Tg(hβ2m-HLA-A2.1(α1-α2)-H2-D<sup>b</sup>(α3));H2-D<sup>b</sup><sup>-/-</sup>;B2m<sup>-/-</sup>、略称HHB]から樹立したES細胞を用い、(1)ヒト肝細胞移植のレシピエントとなる肝障害誘発可能なHHB:SCCDマウス系統、(2)もう一つのレシピエントマウスとして、やはり肝障害誘発可能なFah<sup>-/-</sup>系統、(3)異種キメラ作製のレシピエントとなるマウス肝臓を欠失するマウス系統を樹立した。しかし、HHB系統は通常の飼育では繁殖効率が悪く、また、通常の体外受精でも受精率が極端に低いという問題点があった。熊本大学生命資源研究・支援センターで開発された精子前培養液(FIRTIUP)と体外受精用培地(CARD medium)を用いることで、受精率が劇的に改善され、樹立したマウス系統を体外受精後胚凍結し、計画的に供給できるシステムの構築に成功した。

A. 研究目的

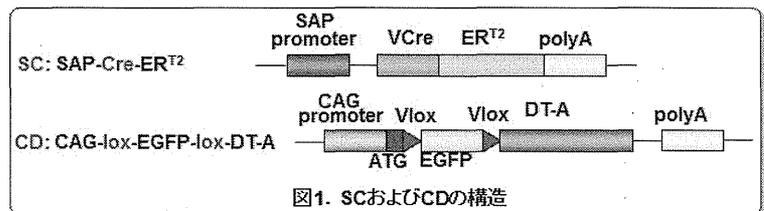
HBV 肝疾患の病態解明と治療法の研究には、HBV が感染するだけではなく、さらに免疫応答により肝炎を発症する小型モデル動物が必須である。そこで、本研究では、炎症を発症しない免疫不全マウスでは無く、細胞免疫系をヒト化したマウスを用い、(1)ヒト肝細胞移植のレシピエントとなる肝障害誘発可能なマウス系統、(2)異種キメラ作製のレシピエントとなるマウス肝臓を欠失するマウス系統、の2種類のマウス系統樹立と供給システムの樹立を目的とする。

B. 研究方法

細胞免疫系をヒト化したマウスとして、マウス内在性のMHCを欠損し、ヒトβ2m及びHLA-A2.1のα1・α2とマウスMHC H2-D<sup>b</sup>のα3 domainを融合した遺伝子が発現しているHHBマウスから昨年度樹立したES細胞(ES HHB)を用い、以下の3種類の遺伝子改変マウス系統を樹立する。

(1)SCCD マウス系統の樹立

肝臓で部位特異的組換え遺伝子が発現させるコンストラクト SAP-CreER<sup>T2</sup>と、組換えにより細



胞死を誘導するコンストラクト CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A (SCCD) (図 1)をもつ SCCD 系統を作製する。

(2)Fah 欠損マウスの樹立

Fumaryl acetoacetate hydrolase (Fah)ホモ個体は、NTBCを飲用させれば正常に生育するが、その飲用を止めると肝障害を発症することが知られている。SCCDと組み合わせることで補完的に働き、より高いヒト肝細胞置換率が期待できる。

(3)Hhex 遺伝子破壊による肝臓欠損マウス樹立

ナイーブ化したチンパンジー由来iPS細胞とキメラマウスを作製することで、チンパンジー細胞由来の肝細胞を持つマウスを作製できると期待される。Hhexは、foregut endodermからliver bud形成に必須の遺伝子で、これを破壊することにより肝臓欠損マウスを作製できる。

(4)レシピエントマウス供給体制の構築

上記の遺伝子操作を行った HHB ES 細胞から、キメラマウス作製と交配によるマウス系統の樹立と、次年度以降の研究のために体外受精と胚凍結によるマウス供給体制を確立する。

(倫理面への配慮)

本研究の範囲では必要としない。

## C. 研究結果

### (1) SCCD マウス系統の樹立

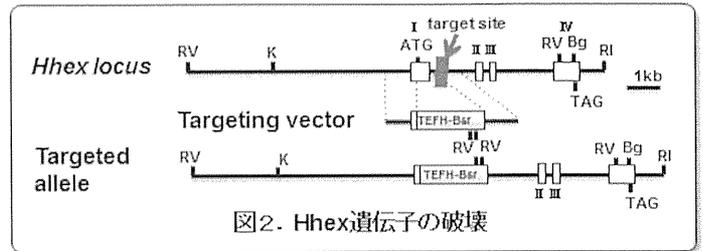
図 1 に示したコンストラクトを導入したクローンを PCR とサザンブロットによる解析で 13 クローン (No. 6, 23, 42, 43, 48, 49, 69, 73, 80, 103, 106, 112, 116) 選択しキメラマウスを作製、そのうち 7 系統 (No. 6, 23, 42, 49, 80, 106, 116) で C57BL/6 との体外受精により生殖系列伝達を確認できた。得られた F1 にタモキシフェンを投与し、AST の上昇が観察された SCCD-116 系統を今後の研究に用いることに決定した。HHB 系統でのマウス増殖を行うため、再度 SCCD-116 でキメラを作製し、キメラの成熟とタイミングを合わせて体外受精で増やしておいた 28 日齢の HHB 母を用いて体外受精を行い、HHB;SCCD-116 の樹立と凍結胚保存に成功した。HHB;SCCD-116 は耳パンチ片の EGFP 蛍光観察でタイピング可能であることも確認でき、ヘミ接合体の同定が容易に行えるようになった。

### (2) Fah 欠損マウスの樹立

CRISPR/Cas9 システムを用い、HHB ES 細胞において Fah 遺伝子の第 5 エキソンに 2 本鎖切断 (DSB) を加え、非相同組換え修復による遺伝子破壊を行った。48 クローンを PCR で解析したところ、18 クローンにおいてバンドのサイズ変化を検出できた。塩基配列解析により 17 塩基欠損の No. 15, 34 クローンと 11 塩基欠損の No. 47 クローンを選択、キメラマウスを作製、No. 47 よりライン樹立に成功した。

### (3) Hhex 遺伝子破壊による肝臓欠損マウス樹立

肝臓を欠失するマウスを樹立するため、HHB ES 細胞を用い、マウス Hhex 遺伝子の破壊を行った (図 2)。ホモ・ヘテロ判定を容易かつ確実にを行うため、ネオマイシン耐性遺伝子をもつター



ゲティングベクターを用いてノックアウトを行った。ターゲティングの際には、ゲノム上に DSB もしくは Nick を加える CRISPR/Cas9 ベクターも同時に用いた。PCR による解析の結果、Nick の場合には 47% の効率で Targeting が起こり、DSB の場合には 75% というさらに高い効率で Targeting に成功した。しかしながら、サザンブロットによる解析では、Nick の場合は Target allele も WT allele も全て予想サイズだったのに対して、DSB の場合、WT allele が予想外のサイズを示すクローンが多かった。そこで、Nick を加えた相同組換えクローンから得られた No. 4, 9, 10 の 3 クローンをを用いてキメラマウスを作製、No. 4 クローンから生殖系列キメラを得ることが出来た。

### (4) レシピエントマウス供給体制の構築

HHB マウスは自然交配では妊娠効率も低く、産仔数も少ない。♂の精巣を観察したところ、野生型 B6 に比べ小さいので、精子側の原因と考えられた。体外受精でも、精子は採取出来るものの、受精率が 20% 以下と非常に低率であった。そこで生命資源研究・支援センターで開発された精子前培養液 (FIRTIUP) と体外受精用培地 (CARD medium) を用いて体外受精を行ったところ、9 割以上という高率で受精卵を得ることが出来、また、移植成績も良好であった。胚移植により得られた♀の産仔を 28 日齢で過排卵を誘発することで卵子を大量に得ることもできた。これにより、樹立したラインを胚凍結により保存、実験の必要に応じて解凍・移植を行って供給できる体制が確立できた。

## D. 考察

SCCD 系統の樹立では、SCCD コンストラクトをもつ ES 細胞クローンから 7 系統ものマウス系統を樹立したが、トランスジーンが安定に伝わり、かつタモキシフェン投与による肝障害の誘導に再現性よく成功したのは、HHB;SCCD-116 の 1