

11. 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

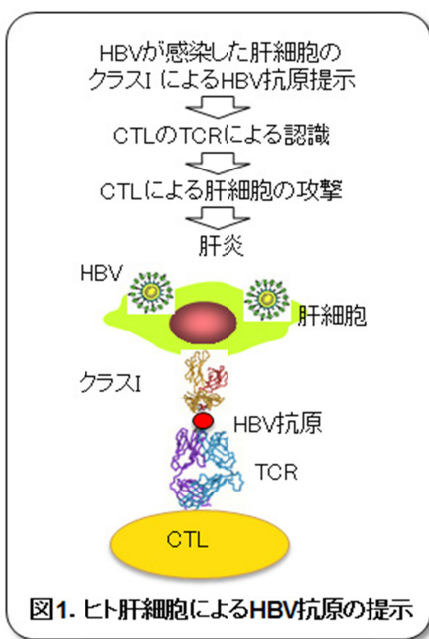
研究要旨

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-A2 mAb (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路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。

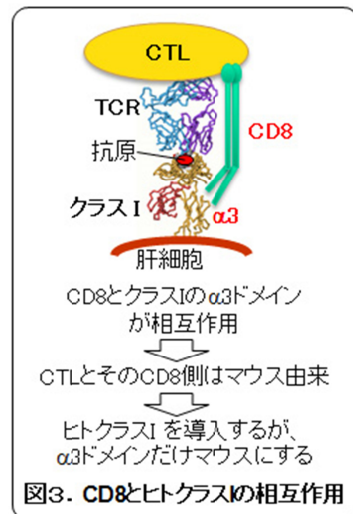
A. 研究目的

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 α 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 α 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、こ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^b 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。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

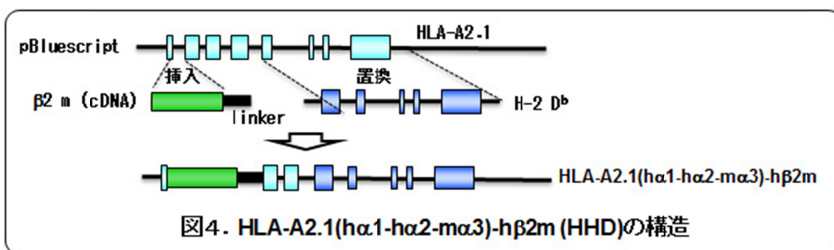
(1) iPS の多能性維持と分化誘導

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^b α 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



(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。

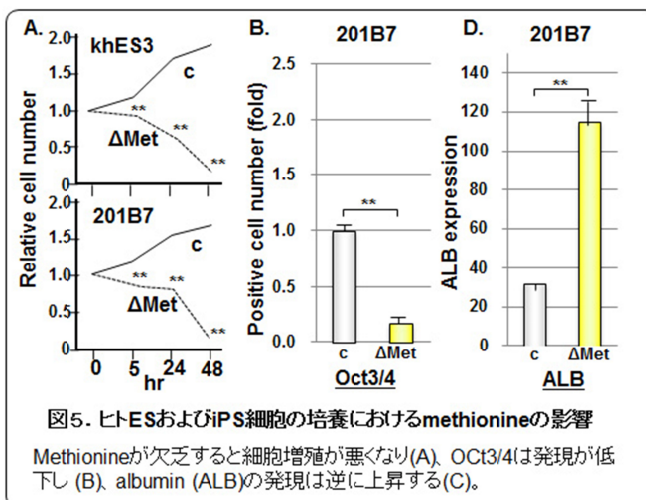
(倫理面への配慮)

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。



(2) iPS:HHD の作製

HHD の検出には Anti-HLA-A2 mAb (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

HHD: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。

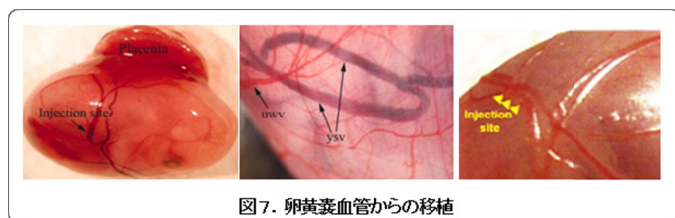


図7. 卵黄囊血管からの移植

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Class Iとβ2-microglobulinを欠損しているマウス [Tg(hβ2m-HLA-A2.1(α1-α2)-H2-D^b(α3));H2-D^b^{-/-};B2m^{-/-}; 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^{-/-}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

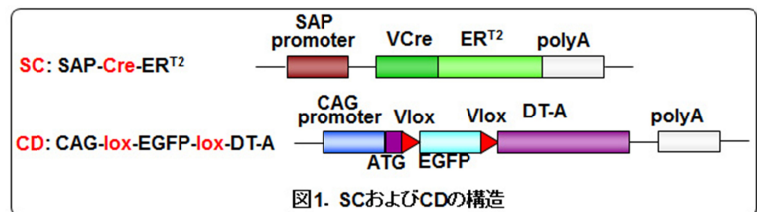
HBV 肝疾患の病態解明と治療法の研究には、HBV が感染するだけではなく、さらに免疫応答により肝炎を発症する小型モデル動物が必須である。そこで、本研究では、炎症を発症しない免疫不全マウスではなく、細胞免疫系をヒト化したマウスを用い、(1)ヒト肝細胞移植のレシピエントとなる肝障害誘発可能なマウス系統、(2)異種キメラ作製のレシピエントとなるマウス肝臓を欠失するマウス系統、の2種類のマウス系統樹立と供給システムの樹立を目的とする。

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α1α2とマウスMHC H2-D^bのα3 domainを融合した遺伝子を発現している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を発現させるコンストラクト SAP-CreER^{T2}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

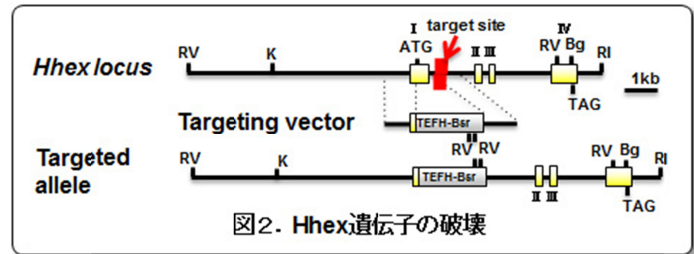
図 1 に示したコンストラクトを導入したクローンを PCR とサザンプロットによる解析で 13 クローン (No. 6, 23, 42, 43, 48, 49, 69, 73, 80, 103, 106, 112, 116) 選択しキメラマウスを作製、そのうち 7 系統 (No. 6, 23, 42, 49, 80, 106, 116) で C57BL/6 との体外受精により生殖系列伝達を確認できた。得られた F1 にタモキシフェンを投与し、AST の上昇が観察された SCCD-116 系統を今後の研究に用いることに決定した。HHB 系統でのマウス増殖を行うため、再度 SCCD-116 でキメラを作製し、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 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、サザンプ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

系統のみであった。ノックアウトマウスと異なり、過剰発現コンストラクトの場合には導入遺伝子がゲノム上に組み込まれても発現する確率は2-3割であるから、7分の1という確率は妥当であると言える。この系統のヘミ接合体はEGFP 蛍光によって容易に遺伝子型判定が可能で、また、外見上正常に生育し、体外受精効率においても親系統のHHBと全く同様であるので、今後のヒト肝細胞移植研究に大いに貢献すると期待される。

また、SCCD コンストラクトのように、発現したものが細胞死を起こす系では、発現が失われた細胞が増殖する危険が常に存在する。今回、Fah 欠損マウスの樹立にも成功したので、SCCD を Fah 欠損バックグラウンドにすることにより、より高率でヒト肝細胞置換ができるかどうかを検討する。

Hhex 欠損マウスも予定通りに樹立に成功した。キメラマウス作製の際には、ヘテロ接合体同士の体外受精で得られた胚を用いる必要があり、しかもその中でホモ接合体である確率は4分の1であるから、かなり多くの胚を凍結する必要がある。今後、体外受精でヘテロ接合体の数を増やし、キメラマウス作製に用いるモルラ胚での凍結を行う予定である。

HHB マウスでは、低い繁殖効率が問題であったが、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)を用いた体外受精により、高い受精率を得ることが出来た。本研究では、ヒト肝細胞のレシピエントマウス供給や、チンパンジーiPS とのキメラマウス作製のレシピエント胚供給のために、計画的かつ大量に胚を得る必要があり、市販されていないHHB マウスでそれを行うためには、体外受精と胚凍結による計画的マウス生産体制の構築が必須であった。今後は、樹立できた系統を用いて体外受精を繰り返し、保存凍結胚の数を増やし、移植やキメラマウス作製の実験計画に応じて、マウスや胚を供給できるようにする。

E . 結論

HHB マウスから樹立したES細胞を用い、肝細胞を欠失させるためのコンストラクトであるSCCDを導入したトランスジェニックマウス系統の樹立、Fah 遺伝子欠損マウスの樹立に成功した。また、肝細胞を欠損するマウスであるHhex 遺伝子欠損マウスの作出にも成功した。さらに、これらのマウス系統を体外受精で計画的に増殖させる体制も確立した。

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) 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.

2. 学会発表

(1) 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)

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

チンパンジー由来 iPS 細胞の樹立、解析とナীব化

研究分担者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授
研究協力者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所 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 (ciPS) 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 26 年度は、新型ベクターによりチンパンジーの血液細胞から ciPS 細胞を樹立するとともに、その起源や網羅的遺伝子発現について解析を行なった。さらに、ヒト HLA コンストラクトを導入する条件を検討して至適条件を確立し、このコンストラクトの導入を行った。キメラ化するには iPS 細胞のナীব化が必要である。その条件についても検討を行なった。

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。インターフェロンの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 26 年度は、チンパンジーの血液細胞から樹立した ciPS 細胞についてその起源や遺伝子発現についての解析を行なう。さらにヒト HLA コンストラクトを導入する条件を検討し、コンストラクトを導入する。また、ナীব化についても条件検討を行なう。

一方、チンパンジーの血液からの iPS 細胞の樹立では従来のセンダイウイルスベクターでは、著しく作成効率が悪く樹立が困難であったために新たなセンダイウイルスベクターについても開発を

行う。

B. 研究方法

1. 新型センダイウイルスベクター (SeV) の開発
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 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成する。このベクターを用いて、ヒト線維芽細胞や血液細胞からの iPS 細胞の誘導効率やウイルスの除去率等を調べる。さらにチンパンジー血液からの作成を行なう。

2. 樹立した ciPS 細胞の解析

(1) ciPS 細胞の起源の解析

樹立した ciPS 細胞を、試験管内にて増殖させゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を制限酵素にて処理した後、電気泳動を行なう。電気泳動後のゲルをナイロンメンブレンにトランスファー後、T リンパ球受容体 (TCR) のプローブにてサザンブロットを行い、TCR 遺伝子の再構成の解析を行なう。

(2) ciPS 細胞の網羅的発現遺伝子の解析

ciPS 細胞から 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 細胞への遺伝子導入

樹立した ciPS 細胞へ HHD (ヒト MHC の $\beta 2m$ 及び HLA-A2.1 の $\alpha 1-\alpha 2$ と、マウス MHC H2-D^b の $\alpha 3$ domain を融合した遺伝子)を導入する。導入後ハイグロマイシンによるセレクションを行なうためのハイグロマイシン濃度決定を行うため様々な濃度で iPS 細胞の維持培養を行う。

3. 樹立した iPS 細胞のナীব化

ヒトおよび ciPS 細胞から in vivo にて効率よく様々な組織を構築するには、これらの iPS 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。平成 25、26 年度に発表された方法(Nature, 504: 282-286, 2013; Cell, 158: 1254-1269, 2014)を参考にナীব化の条件を検討する。

(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康人ボランティア 1 名から行う。一般診療に用いられる方法で上腕より 10ml ヘパリン加採血を行う。したがって危険はない。iPS 細胞作製にあたり、チンパンジーからのサンプルは、愛知県犬山市にある京都大学霊長類研究所に飼育中のチンパンジーから、健康診断で行う採血の余剰血を用いる。研究所内での共同研究申請を行い承認のもと行っている。

(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

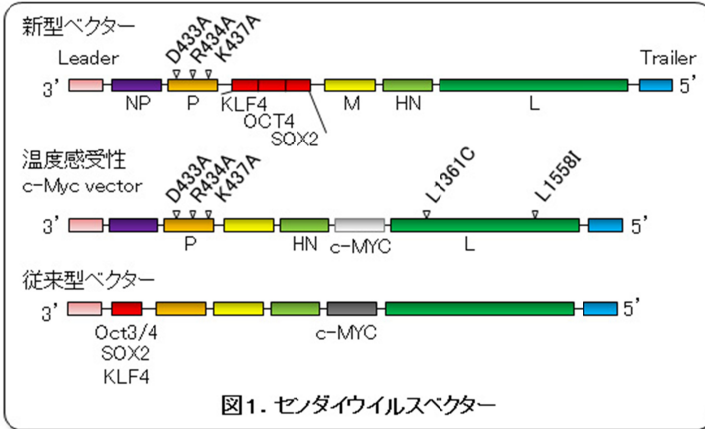
サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

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。

4) 利益相反について

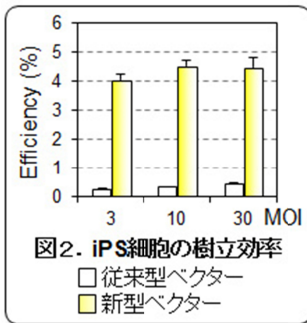
本研究での利益相反関連事項はない。

C. 研究結果



1. 新型ベクターの開発

Sox2、KLF4、Oct3/4 の3つの初期化因子をタンデムにつないだ新型センダイウイルスベクターを作成した(図1)。従来型ベクターと温度感受性



c-MYCベクターおよびこの新型ベクターと温度感受性 c-MYCベクターのそれぞれの組合せで、正常ヒト線維芽細胞から iPS 細胞を作製すると、前者ではせいぜい0.5%程度である

が、後者では4%という高効率で iPS 細胞を作製することができた(図2)。このベクター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度に変更し、5日間培養し、ウイルス除去率を調べた。これまでのベクターではほとんど除去できない場合でも、80%以上の高い割合でウイルスを除去することができた(表1)。

| | Time of temperature shift | |
|---------------------|---------------------------|---------------|
| | Passage 1 | Passage 2 |
| Conventional vector | 0/22 (0%) | 0/22 (0%) |
| TS12KOS vector | 19/23 (84.7%) | 15/23 (65.2%) |

表1. SeVの除去率

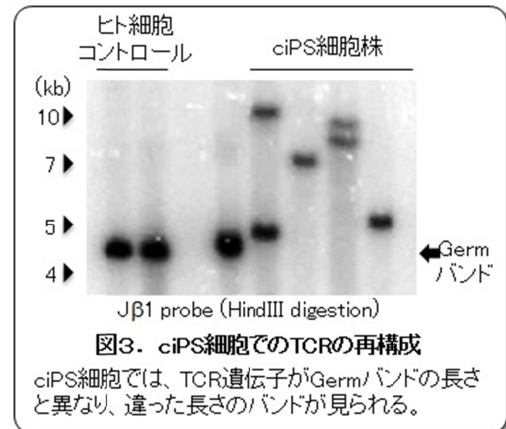
2. 樹立した iPS 細胞の特徴

(1) ciPS 細胞の起源

ciPS 細胞の由来細胞を明らかにするために T リンパ球レセプター(TCR)の再構成を調べた。TCR 遺伝子に特有なプローブを用いたサザンブロット解析では、樹立したすべての ciPS 細胞で再構成バンドが検出された(図3)。したがって樹立した 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明らかとなった。

(2) ciPS 細胞の網羅的発現遺伝子解析

ciPS 細胞の細胞生物学的特徴をより深く解析するために、DNA マイクロアレイを使って網羅的な発現遺伝子の解析を行った。ciPS 細胞は、Principle Component Analysis (PCA) 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。クラスター解析においてもヒトの ES 細胞、iPS 細胞と同じクラスターに分けられた。以上のことから、ciPS 細胞株の遺伝子発現パターンはヒトの ES 細胞や iPS 細胞株のパターンと類似していることが示唆された。これは、作成した細胞がヒトの ES 細胞や iPS 細胞に近い、すなわち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。



3. 樹立した ciPS 細胞への遺伝子導入

平成25年度にヒト HHD 遺伝子導入のために決定したハイグロマイシン濃度は1μg/ml以上の濃度であった。そこでエレクトロポレーション法にて、ヒト HHD 遺伝子を導入した ciPS 細胞をハイグロマイシン 10 μg/ml にて培養し、20 個以上の ciPS

細胞コロニーをピックアップした。ピックアップした ciPS 細胞を増幅後、ゲノム DNA を抽出し、導入した遺伝子の特異的に認識するプライマーを用いて PCR を行った。その結果、6 個のコロニーにおいて HHD 遺伝子が導入されていることが確認された。

4. ciPS 細胞のナীব化

効率よくキメラマウスを作製するためには、ciPS 細胞をよりマウス ES 細胞の状態に近づける、いわゆるナীব化が必要である。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、この方法によるナীব化をあきらめて、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。現在、Nanog と Klf2 の cDNA を ciPS 細胞に導入してコロニーの形態を観察中であるが、通常のプライム型のコロニー形態がこれらの遺伝子導入によってより未分化なコロニータイプに変化しているのが観察された(図 4)。この方法によるナীব化を引き続き行なっていく予定である。

D . 考察

線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、コロニーが肉眼で確認でき、ピックアップできるまでに約 1 ヶ月かかる。従来型の SeV では、そこからウイルス除去までさらに 3 か月程度を要していたが、新型ではコロニーピックアップ直後に 80%以上のコロニーでウイルスが除去される。これは、従来型は Myc のみが温度感受性ウイルスであったが、新型では 1 つの温度感受性ウイルスに 3 つの初期化因子を挿入したためと考えられる。さらにこのベクターを用いると血液細胞からも容易に iPS 細胞の樹立が可能である。血液細胞由来の細胞を iPS 細胞作製のソースとすることで、ヒトの場合、皮膚生検を行わずに末梢血液で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

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 細胞樹立を樹立した。この ciPS 細胞は、予想通り末梢 T リンパ球由来であることがサザンプロット法にて確認できた。また網羅的な発現遺伝子の結果から、ciPS 細胞はヒトの ES/iPS 細胞らと同じく、プライムタイプの多能性幹細胞であった。そのためによりキメラ作成能力を獲得させるために、ナীব化を行なっている。しかしながら、平成 25 年度に発表された方法では全くナীব化させることはできなかった。現在、平成 26 年度に発表された方法を試している。

新しく作成したセンダイウイルス・ベクターは、ヒトあるいはヒト類縁の霊長類の末梢血液細胞より 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ケースの iPS 細胞樹立には非常に有用であると考えられる。

E . 結論

ヒトあるいはチンパンジーの末梢 T リンパ球から簡単に iPS 細胞を樹立できる新型ベクターを開発した。このベクターを使って樹立した iPS 細胞は末梢 T リンパ球由来で、網羅的遺伝子発現パターンよりプライムタイプの iPS 細胞であった。ナীব化は発表された方法どれもが容易に追試できる技術ではなく、その技術の実行に様々なノウハウがあると考えられる。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- (1) 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.

2. 学会発表

- (1) 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.
- (2) 江良択実 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
- (3) 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
- (4) 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
- (5) 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 新型センダ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. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

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

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 感染・肝炎モデルの樹立

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
研究協力者 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
研究協力者 藤江里美 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 大学院 1 年

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)はヒトとチンパンジーにしか感染せず、慢性化のメカニズムや治療法の開発が困難であった。またHBV既感染患者は免疫抑制時に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HBVが感染し、かつ免疫応答により肝炎が発症するキメラマウスモデルを確立し、B型肝炎ウイルス(HBV)の慢性化や*de novo*肝炎発症のメカニズム、治療法の開発に貢献する。マウス開発に先行してiPS由来肝芽様細胞がHBV感染能を備えていることを確認した。また、キメラマウスを用いたHBV感染実験に必要なHBV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た感染成立および肝炎発症の測定法を確立した。

A. 研究目的

B型肝炎は肝炎、肝癌の主要な原因の1つであるが、HBV感染の慢性化のメカニズムなど、その病態は未だに解明されない部分が多い。なかでもキャリア患者からのHBV再活性化やHBV感染既往患者から免疫抑制時に発症する*de novo*B型肝炎については研究が進んでいない。HBV再活性化の解析には免疫機能は破綻していないことが必要であるが、その解析に適した実験動物が不在であったことがその理由の一つである。

*de novo*肝炎は、B型急性肝炎治療後に肝細胞内に存在するHBV-covalently closed circular DNA(cccDNA)がその原因と考えられている。

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るHBV-cccDNAの再活性化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、転写活性の調節にはエピジェネティクスの関与が考えられる。

その中でCCCTC-binding factor(CTCF)はエピジェネティックな要因の1つであるクロマチン

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わかっている。私達は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)。また、HBV と同様に逆転写酵素を用いる他のウイルスにおいても CTCF がヒトへの感染様式に関与することを現在報告中であり(佐藤らと共同研究、in revise)、HBV においてもその生活環に CTCF が関与する可能性は十分にある。加えて、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、その形態からも転写活性の調節に 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。

本研究では、HBV 感染による急性肝炎、慢性肝炎のみならず、キャリア再活性化、*de novo* B 型肝炎など、想定するすべての病態を再現しうるマウスが開発される予定である。これにより慢性肝炎の再活性化、*de novo* B 型肝炎発症などの、免疫不全マウスや培養細胞系のみでは解析しえなかったメカニズムの解析が可能となる。得られた結果に基づき HBV-cccDNA の排除を目指す新たな創薬に寄与する。

この中で私達の担当は、作成されたキメラマウスへの HBV 感染実験系を確立すること、並びにそれを用い HBV-cccDNA の解析を中心とした肝炎発症メカニズムの解析を行うことである。

B . 研究方法

平成 26 年度は(1)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の検討、(2)キメラマウス完成後に HBV 解析に必要な実験系の確立、(3)キメラマウス作製に先行し、iPS 細胞から分化させた肝細胞に HBV が感染可能かどうかの検証、(4)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の解析を行う。

C . 研究結果

(1) 完成したキメラマウスに対する感染のシュミレーション

マウスへの HBV 感染条件を文献的に考察した。茶山らは HBV 感染患者の血清を 5 μ L 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)。該当患者の血液中の HBV-DNA 量と併せて考察するとマウス 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 感染の確認法、慢性肝炎等各肝炎モデルの診断

本研究課題の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する。具体的には、マウス血清を用いて、ELISA 法による HBs の定量、qPCR 法による HBV-DNA の定量によりその判定を行う。なお、肝炎の各病態の判断は血清学的検査に基づき、実臨床で実際に行っているため、十分に習熟している。

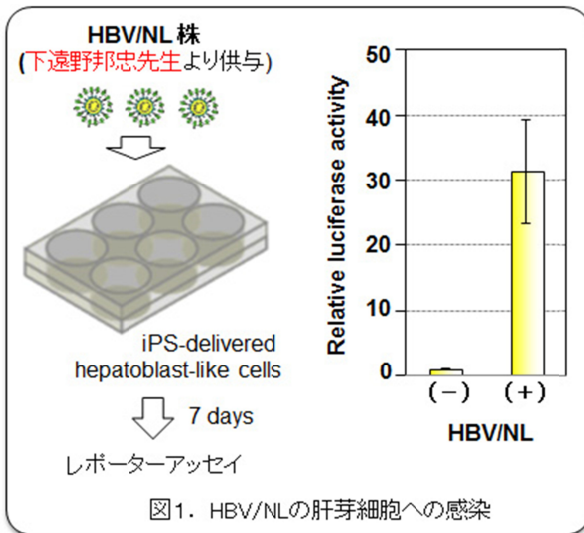
(3) 感染実験を行うための HBV および感染細胞の準備

本研究課題のマウス作製に先行して、実際に肝臓置換に用いる予定の iPS 由来肝芽様細胞に HBV が感染しうるか解析した。これには HBV に luciferase 遺伝子を組み込んだ HBV-NL 株(下遠野先生より供与)を用いた。その結果、iPS 由来肝芽様細胞は HBV 感染能を備えていることが確認された(図 1)。

さらに iPS 由来肝芽様細胞には HBV の感染に必要な taurocholate cotrans -porting polypeptide (NTCP) が発現することが確認された。

(4) HBV 転写制御に関与するエピジェネティックメカニズムの解析

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。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 の結合配列が存在する



こと、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。さらに翻訳後修飾による CTCF の機能の変化が関与する可能性が考えられたため、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た。実際 CTCF には複数の翻訳後修飾が関与しており、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である。さらに CTCF 以外のエピジェネティクス因子の関連を調べるため、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

(1) 感染実験のための HBV 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。実際にマウスに投与する際には、プロファイルが十分に解析された HBV 株を用いる。

(2) 血清学的検査は臨床検体で実際に行い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である。

(3) iPS 由来肝芽様細胞に HBV が感染することを確認した。これは本研究のキメラマウスが完成し

た際のヒト由来肝臓に HBV が感染しうることを担保するものであり、本研究における意義は大きい。(4) 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、CTCF の翻訳後修飾の影響があるか、などエピゲノム解析の体制を整えている。さらに HBV-DNA と宿主ゲノムとの相互作用および HBV-DNA が宿主 DNA に integrate されることによる宿主ゲノムの高次構造の変化についても解析を検討している。

E. 結論

肝炎発症実験において必要な 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検出系を確立した。iPS 由来肝芽細胞に HBV が感染することを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし