

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究 (A)
研究期間：2006～2008
課題番号：18200028
研究課題名 (和文) ヒト型臓器を持つマウスの樹立とヒト疾患制御法の開発
研究課題名 (英文) Trial of human tissue-substituted mice and its application to human diseases.
研究代表者
米川 博通 (YONEKAWA HIROMICHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：30142110

研究成果の概要：体内にヒトの肝臓を持つことのできる遺伝子改変マウスの作製を行った。ヒト細胞を移植できる SCID マウスに標的細胞ノックアウト法を施し、マウス肝細胞を部分的に除去した後、ヒトの培養肝細胞を移植した。その結果、ヒトの肝臓がマウスの肝臓内で生着し、血液中にヒトのアルブミンが放出されたことを確認した。しかし、高い頻度でのヒト肝細胞への置換には至らず、現在その条件をさらに検討している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2007年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2008年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：複合領域・実験動物学

キーワード：標的細胞ノックアウト法、TRECK 法、SCID マウス、ヒト細胞置換マウス、肝実質細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト疾患モデルマウスを利用したヒトの疾患研究、特に感染症研究で、最も問題となるのはヒト・マウス間における種差の問題である。種差を規定しているのも遺伝子であることは明らかではあるが、その遺伝子の実体に迫ることは、非常に困難である。

この弱点を改良するために、これまでマウスにおいては、免疫不全のミュータント系統 (例えば、SCID マウスなど) を用いて、マウスの体内にヒトの細胞、組織などを移植した後、それらヒト由来の細胞を標的にした開発が広く行われてきた。これらの代表に、これまで多くの研究者によって行われてきた

SCID-Hu マウスがある。SCID-Hu マウスとは SCID マウスの体内にヒトの細胞、組織、器官を移植し、それらヒト由来の細胞、組織等を研究の対象とするものである。しかしながら、肝臓においては、単に SCID マウスの体内にヒトから摘出した肝臓片を移植し、その移植片を標的にウイルス感染を起こして、その感染過程を見るなどの研究は行われているが、移植片自体がマウス体内にあるというだけで、マウスの各臓器と有機的につながっているわけではない (特に血液) ため、実際にヒトの体内と同じようにその組織片が機能しているか否かはかなり疑問視されていた。そこで、これらの点を解決するために、以下の

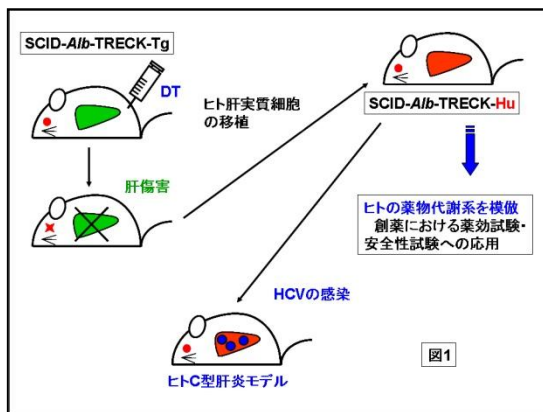
研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。我々が遂行した課題も SCID-Hu のアイデアを引き継いでいるが、原理な点で非常に異なっている。すなわち、肝臓の機能をつかさどる中心的な役割を持つものは肝実質細胞であることから、我々はヒトの肝実質細胞のみをマウスの肝臓に移植し、マウスの肝臓をヒトの肝実質細胞で置換する系の開発を試みた。その後、この移植された肝実質細胞がマウス体内で正常に機能するか否かの検討を行うことにした。また、これらの肝細胞を標的にして、ヒトの代表的ウイルス感染症である C 型肝炎ウイルスの宿主となりうるか否かの検討も計画に加えた。

3. 研究の方法

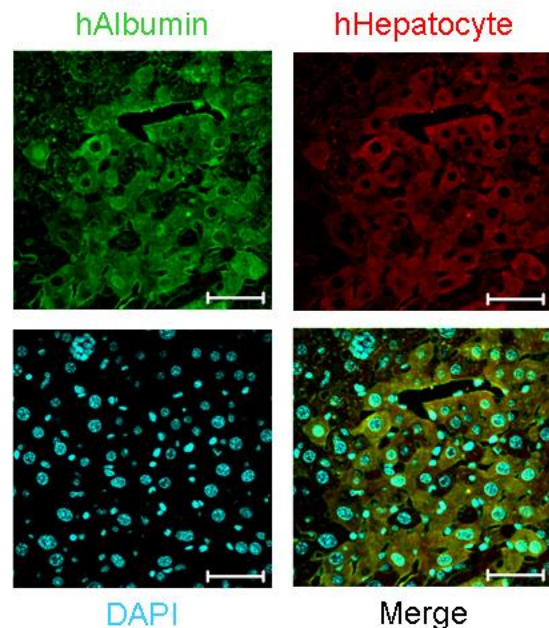
本研究では、SCID マウスを遺伝背景とした 2 種類の Tg マウスを樹立し、そこにヒトの培養肝実質細胞を移植することにした。2 種類のうちの 1 つはこれまでに樹立した SCID-Alb-TRECK-Tg マウスであり、もう一方は今回新たに樹立する SCID-HSVTK-Tg マウスである。前者は、ジフテリア毒素の投与によって、後者はガンシクロビル投与によって、それぞれ肝実質細胞を特異的に傷害することができる。また、障害の程度は、それらの毒素の投与量によって調節することができる。それ故、まず毒素投与によって 7 割程度の肝実質細胞を除去した SCID-Tg マウスに、凍結ヒト肝実質細胞を移植し、肝細胞の生着状態と機能的解析を行うことにした(図 1 参照)。



4. 研究成果

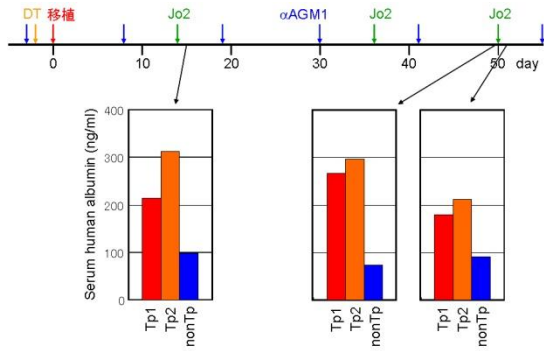
これまでのヒトの未分化臍帯血細胞を用いた基礎研究から、移植されたヒト細胞はマウスの肝臓に生着・分化し、ヒトアルブミンを産生することが確かめられた。我々が開発した移植方法は、まず SCID-alb-TRECK-Tg マウスにジフテリア毒素を投与し、2 日後に約

7 割程度の肝実質細胞を傷害した後、ヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞を移植、その後移植された NK 細胞の除去のための抗アシアロ GM1 抗体とマウスの肝実質細胞を傷害死させるための抗 Fas 抗体(Jo2)を投与した。こうすることにより、肝実質細胞に分化した移植されたヒト細胞をマウス肝臓内でその細胞数を十分なまでに増加しようと考えた(図 2)。しかし、ヒト臍帯血を利用したヒト肝置換マウスモデルは、材料供給の面での制約も大きく、また生着率も非常に低いため実用には至らないと結論した。しかし、ここで開発した移植技術は、今後ヒト培養肝細胞を用いた移植技術に十分応用可能なことが期待できた(図 2)。



そこで、ヒト培養肝細胞を用いた移植系に研究の主力を移した。ヒト臍帯血の場合と同様、まず SCID-alb-TRECK-Tg マウスにジフテリア毒素を投与し、その 2 日後に凍結ヒト肝細胞を移植した。その後、抗 Fas 抗体 (Jo2) で処理した。その結果、凍結ヒト肝細胞を移植しなかった Tg マウス個体では、抗 Fas 抗体 (Jo2) 投与後、肝実質細胞の損傷の程度指標である AST の活性上昇がみられるのに対し、凍結ヒト肝細胞を移植した Tg マウス個体ではそのような AST の活性上昇はみられなかった。このことは、抗 Fas 抗体 (Jo2) により、マウスの肝実質細胞のみが傷害を受けたため、ヒト肝細胞を移植されなかった Tg マウスにのみ、強い AST 活性上昇が起こったものと考えられた。従って、この結果は、Tg マウスにヒト臍帯血でみられたと同様、ヒト肝細胞が生着し、機能していると思われた

(図3)。



このとき同時に Tg マウス血液中のヒトのアルブミンの産生を調べてみた。その結果、ヒト凍結肝細胞を移植した群では、その上昇がみられた。この結果は、移植されたヒト凍結肝細胞がマウス体内で機能していると考えられた。しかしながら、産生されたヒトアルブミンの濃度は、期待されたものより低い濃度であり、生着した肝細胞の細胞数が期待より少ないことが伺えた。

Tg マウスの肝臓内でのヒト由来の肝実質細胞数を増加させるために、肝細胞増殖因子 (HGF) の投与などの条件検討を行ったが、現在までのところ、有効な条件は得られていない。今後、細胞数を増加させる条件のさらなる検討、また NOG マウスなどより移植に適したマウスを利用した TRECK 法により、本研究を引き続き継続して行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, E. Seike, S. Tōne, Y. Hayashi, Y. Kasama, M. Shimizu, H. Takahashi, C. Taya, H. Yonekawa, N. Tanaka, M. Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* (2009) in press. 査読あり
- ② L. Weng, J. Du, J. Zhou, J. Ding, T. Wakita, M. Kohara, T. Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 154:765-773. (2009). 査読あり
- ③ Y. Ueno, Y. Watanabe, A. Shibata, K. Yoshikawa, T. Takano, M. Kohara, Y. Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing

universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17:1974-81. (2009). 査読あり

- ④ K. Ogata, T. Kashiwagi, J. Iwahashi, K. Hara, H. Honda, T. Ide, R. Kumashiro, M. Kohara, M. Sata, N. Hamada. A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy. *Arch Virol.* 153(8):1575-9. (2008). 査読あり
- ⑤ F. Yasui, C. Kai, M. Kitabatake, S. Inoue, M. Yoneda, S. Yokochi, R. Kase, S. Sekiguchi, K. Morita, T. Hishima, H. Suzuki, K. Karamatsu, Y. Yasutomi, H. Shida, M. Kidokoro, K. Mizuno, K. Matsushima, M. Kohara. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunology* 181: 6337-48 (2008). 査読あり
- ⑥ N. Sakamoto, Y. Tanabe, T. Yokota, K. Satoh, Y. Sekine-Osajima, M. Nakagawa, Y. Itsui, M. Tasaka, Y. Sakurai, C.-H. Chen, M. Yano, S. Ohkoshi, Y. Aoyagi, S. Maekawa, N. Enomoto, M. Kohara, M. Watanabe. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology.* 23: 1437-47 (2008). 査読あり
- ⑦ T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Compar. Immu. Microbio. Infect. Dis.* 31: 435-448 (2008). 査読あり
- ⑧ S. Inubushi, M. Nagano-Fujii, K. Kitayama, M. Tanaka, A. Chunying, H. Yokozaki, H. Yamamura, H. Nuriya, M. Kohara, K. Sada, H. Hotta. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008). 査読あり
- ⑨ T. Watanabe, T. Umehara, M. Kohara. Therapeutic application of RNA interference for Hepatitis C Virus. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 1263-1276 (2007). 査読あり
- ⑩ T. Watanabe, T. Umehara, F. Yasui, S.

- Nakagawa, J. Yano, T. Ohgi, S. Sonoke, K. Inoue, M. Yoshiba, M. Kohara. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J. Hepatology* 47: 744-750 (2007). 査読あり
- ⑪ T. Totsugawa, C. Yong, J.D. Rivas-Carrillo, A. Soto-Gutierrez, N. Navarro-Alvarez, H. Noguchi, T. Okitsu, K.A. Westerman, M. Kohara, M. Reth, N. Tanaka, P. Leboulch, N. Kobayashi. Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination. *J. Hepatology* 47: 74-82 (2007). 査読有り
- ⑫ T. Mashiba, K. Udaka, Y. Hirachi, Y. Hiasa, T. Miyakawa, Y. Satta, T. Osoda, S. Kataoka, M. Kohara, M. Onji. Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. *Immunogenetics* 59: 197-209 (2007). 査読有り
- ⑬ K. Inoue, T. Umehara, U. T. Ruegg, F. Yasui, T. Watanabe, H. Yasuda, M. Yoshiba, J.-M. Dumont, P. Scalfaro, M. Kohara. Evaluation of a Cyclophilin Inhibitor in Hepatitis C Virus-Infected Chimeric Mice In Vivo. *Hepatology* 45: 921-928 (2007). 査読有り
- ⑭ S. Nakagawa, T. Umehara, C. Matsuda, S. Kuge, M. Sudoh M. Kohara. Inhibition of Hsp90 suppresses HCV replication in replicon cell lines and in chimeric mice with humanized liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 882-888 (2007). 査読有り
- ⑮ M. Kitabatake, S. Inoue, F. Yasui, S. Yokochi, M. Arai, K. Morita, H. Shida, M. Kidokoro, F. Murai, M. L. Quynh, K. Matsushima, M. Kohara. SARS-CoV spike protein recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in spite of pre-immunization with vaccinia virus. *Vaccine* 25: 630-637 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 6件)

- ① 米川博通、松岡邦枝：ヒト肝置換 Tg マウスの作製方法。第7回研究交流フォーラム、2008.2.27、東京
- ② 松岡邦枝、土屋真衣子、設楽浩志、松尾

- 千古、河野憲二、米川博通：標的細胞ノックアウト法の胎仔組織への応用。日本実験動物科学技術 2008 (第55回日本実験動物学会総会・第42回日本実験動物技術者協会総会)、2008.5.15-17、仙台
- ③ Yonekawa, H., Shibata, K., Sekine, M., Matsuoka, K., Shitara, H., Taya, C., Amano, T.: Improvement of a tissue-specific gene expression for TRECK method using a BAC clone. The 22nd International Mammalian Genome Conference (IMGC2008). 2008.11.2-5. Prague, Czech
- ④ 松岡邦枝、土屋真衣子、設楽浩志、松尾千古、河野憲二、米川博通：標的細胞ノックアウト法の胎仔組織への応用。BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会)2008.12.9-12、神戸
- ⑤ 関口 敏、飛田良美、千代智子、小原道法：新規 HCV 持続感染モデルマウスの作製とその病態解析 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008.10.26-28 岡山
- ⑥ Umehara T., Sudoh M., Yasui F., Nakagawa S. and Kohara M. : Suppression of serine palmitoyltransferase inhibits HCV replication in mice with chimeric human liver. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 2006.6.18-23. Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA HIROMICHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：30142110

(2) 研究分担者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：10250218

(3) 連携研究者

多屋 長治 (TAYA CHOJI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：90175456
設楽 浩志 (SHITARA HIROSHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：90321885
石井 里絵 (ISHII RIE)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨

床医学総合研究所・研究員
研究者番号：00425688
習田 昌裕 (SHUDA MASAHIRO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・研究員
研究者番号：10356256
(2007年度まで)