

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390347
 研究課題名（和文） 肝臓ヒト化マウスの作製とその応用
 研究課題名（英文） Generation of mice in which the mouse hepatocytes are replaced with the human hepatocytes and its application

研究代表者
 三浦 直行 (MIURA NAOYUKI)
 浜松医科大学・医学部・教授
 研究者番号：40165965

研究成果の概要(和文): Alb-uPA トランスジェニックマウスに免疫不全 scid マウスを交配し、Alb-uPA をトランスジーンにもつ免疫不全マウスを作製した。Alb-uPA ホモ免疫不全マウスの生後3週目にヒト肝細胞を脾臓経由で移植すると4週後には、マウスの肝臓の50-100%がヒト肝細胞で置換されたマウスができた(肝臓ヒト化マウス)。肝臓ヒト化マウスに肝化学発癌剤であるジエチルニトロサミンとフェノバルビタールを投与すると、肝細胞腫(アデノーマ)が高頻度で発生した。腫瘍部のRNA解析では、c-Myc, FoxM1, c-Jun, c-Fos, Bmi1, Skp2 mRNAが増加していることが判明した。

研究成果の概要(英文): We crossed the Alb-uPA mice with the scid/scid mice and made the Alb-uPA/+; scid/scid mice. We obtained the Alb-uPA/Alb-uPA;scid/scid mice by crossing the male and female Alb-uPA/+;scid/scid mice. We transplanted the 5×10^5 human hepatocytes into the spleen of 3 week-old Alb-uPA/Alb-uPA;scid/scid mice and obtained the mice in which the more than 50 % of mouse hepatocytes are replaced with human hepatocytes. Then we treated the mice with diethylnitrosamine and phenobarbital and found that the liver had human hepatocellular adenomas. The reverse-transcriptase-PCR experiment showed that the c-Myc, FoxM1, c-Jun, c-Fos, Bmi1 and Skp2 mRNAs were upregulated in the tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：ヒト肝細胞、マウス

1. 研究開始当初の背景

Alb-uPAホモマウスでは生後3週目にトランスジーンによるuPA産生が増加し、肝細胞が自ら分泌するuPAのために死滅する。この時に、外来性のマウス肝細胞を移植すると、外来性細胞はuPAを産生しないので、肝臓で増殖し最終的に肝臓の半分以上が外来性肝細胞で置換される。ヒト肝細胞で置換するには、免疫不全マウスを用いる。我々は、Alb-uPAマウスとscid/scidマウスを交配し、トランスジーンをもつマウスとscid/scidマウスを再度交配し、Alb-uPA免疫不全マウスを作製した。

2. 研究の目的

肝細胞をヒト肝細胞に置換したマウスに肝化学発癌剤を投与して、ヒト肝細胞癌を誘導する。また、C型肝炎ウイルスを感染させて、肝細胞腫瘍が発生するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

化学発癌剤としては、Diethylnitrosamine (DEN)を腹腔内投与して、次週からフェノバルビタール含有の水を飲水させる。肝細胞腫瘍は、HE染色およびCYP免疫抗体染色を行う。

4. 研究成果

移植条件を検討するために、外来性肝細胞を供給するマウスとして、我々は肝細胞でGFP蛋白を発現するAlb-uPAマウスを作製した。また、全身でDsRed2蛋白を発現するCAG-DsRed2マウスを東京工業大学 田川精一博士から分与を受けた。この2種類のマウス肝臓からコラーゲナーゼ還流法で肝細胞を単離した。得た肝細胞の多くは2核をもつ典型的な肝細胞であった。

そして、いよいよヒト肝細胞を生後3週目のAlb-uPA/Alb-uPA免疫不全マウスの脾臓に移植したところ、血清ヒトアルブミン値が5-8mg/mlとなり、肝臓の80%以上がヒト肝細胞

に置換されたマウスが作製できた。

化学発癌剤の濃度を決定するために、Alb-uPA免疫不全マウス腹腔にジエチルニトロサミン (DEN) を90mg/kg注射したところ、全マウスとも死んでしまった。野生型マウスに比し、Alb-uPA免疫不全マウスはDENに対する感受性が高いことが明らかになった。そこで、90mg/kg, 45mg/kg, 22mg/kg, 11mg/kg, 5mg/kgのDENを腹腔内注射して、様子を見たところ、11mg/kgでマウスが生きていることが判明した。

本実験として、肝臓ヒト化マウスの腹腔にジエチルニトロサミン (DEN) を11mg/kg注射し、1週後から500ppmのフェノバルビタール含有水を飲み続けた。25週後、マウスの肝臓を観察すると、肉眼的肝臓腫瘍が観察された。組織学的には、肝細胞腫(hepatocellular adenoma)と判断された。

腫瘍部から、RNAを抽出し、定量的RT-PCR解析を行なった結果、c-Myc, FoxM1, c-Jun, c-Fos, Bmi1, Skp2 mRNAが増加していることが判明した。

ヒト初代肝細胞への遺伝子導入法には、電気穿孔法、ウイルスベクター法が現実的である。まず、電気穿孔法で、act-LacZ 遺伝子を初代肝細胞に遺伝子導入してみたところ、X-gal 染色で染まるのは5%程度と効率がよくないことが判明した。そこで、ウイルスベクターによる遺伝子導入を検討した。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスとレンチウイルスがある。まず、LacZ 遺伝子を含むレトロウイルスを試みたが、導入効率は低かった。そこで、レンチウイルスによる遺伝子導入が初代肝細胞には適当であると結論した。

ヒトc-Myc, FoxM1, c-Jun, c-Fos, Bmi1, Skp2 蛋白を発現させるレンチ

ウイルスを作製した。現在、これらの遺伝子の組み合わせでヒト肝細胞癌が誘導できることを実証する実験を計画している。

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 10 件) 全て査読あり。

- ① Yang, Z., Hikosaka, K., Sharkar M.T.K., Tamakoshi, T., Chandra, A., wang, B., Itakura T., Xue, X-D., Uezato, T., Kimura W. and Miura, N.: The mouse forkhead gene Foxp2 modulates expression of the lung genes. **Life Sciences**, (in press).
- ② Xue, X-D., Kimura W., Wang, B., Hikosaka, K., Itakura, T., Uezato, T., Matsuda, M., Koseki, H. and Miura, N.: A unique expression pattern of Tbx10 in the hindbrain as revealed by Tbx10(lacZ) allele. **Genesis** 48, 2010, 295-302.
- ③ Harada, K., Yamazaki, T., Iwata, C., Yoshimatsu, Y., Sase, H., Mishima, K., Morishita, Y., Hirashima, M., Oike, Y., Suda, T., Miura, N., Watabe, T. and Miyazone, K.: Identification of Prox1 targets during in vitro vascular differentiation from embryonic stem cells: functional roles of HoxD8 in lymphangogenesis. **J. Cell Sci.**, 122, 2009, 3923-3930.
- ④ Mouta-Bellum, C., Kirov, A., Micelli-Libby, L., Mancini, M.L., Petrova, T.V., Liaw, L., Prudovsky, I., Thorpe P.E., Miura, N., Cantley L.C., Alituro, K., Fruman, D.A. and Vary, C.P.H.: Organ-specific lymphangiectasia, arrested lymphatic sprouting, and maturation defects resulting from gene-targeting of the PI3K regulatory isoforms p85a, p55a and p50a. **Dev. Dyn.** 238, 2009, 2690-2699.
- ⑤ Takai, T., Kanaoka, S., Yoshida, K., Hamaya, Y., Ikuma, M., Miura, N., Sugimura, H., Kajimura, M. and Hishida, A.: Fecal COX-2 plus MMP-7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening. **Can. Epidemiol. Biomarkers Prev.** 18, 2009, 1888-1893.

- ⑥ Bazigou, E., Xie, S., Chan, C., Weston, A., Miura, N., Sorokin, L., Adams, R., Muro, A.F., Sheppard, D. and Makinen, T.: Integrin- α 9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. **Dev. Cell** 17, 2009, 175-186.
- ⑦ Norrmen, C., Cheng, J., Miura, N., Puolakkainen, P., Yla-Herttuala, S., Alituro, K. and Petrove, T.V.: FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. **J. Cell Biol.** 185, 2009, 439-457.
- ⑧ Jochumsen, U., Werner, R., Miura, N., Richter-Unruh, A., Hiort, O. and Holterhus, P-M.: Mutation analysis of FOXF2 in patients with disorders of sex development (DSD) in combination with cleft palate. **Sex. Dev.** 2, 2008, 302-308.
- ⑨ Itakura, T., Chandra, A., Yang, Z., Xue, X-D., Wang, B., Kimura, W., Hikosaka, K., Inohaya, K., Kudo, A., Uezato, T. and Miura, N.: The medaka FoxP2, a homologue of human language gene FOXP2, has a diverged structure and function. **J. Biochem.** 143, 2008, 407-416.
- ⑩ Mani, S.A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J.L., Hartwell, K.H., Richardson, A.L. and Weinberg, R.A.: Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 2007, 10069-10074.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 三浦直行、待井将志、ニシヤットサルタナ、モハマドシャーカー、木村航：心臓形成におけるIrx遺伝子の発現と役割、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜（ワークショップ）
- ② 楊志、彦坂圭介、木村航、上里忠良、三浦直行：マウスフォークヘッド遺伝子Foxp2は肺分化遺伝子の発現を制御する。第82回日本生化学会大会、2009年10月、神戸

③王博、彦坂圭介、薛晓東、三浦直行：変異Rbトランスジェニックマウス肝臓において、リン酸化抵抗性Rbタンパクは肝臓腫瘍を促進する。第61回日本細胞生物学会、2009年6月、名古屋

④王博、福本和彦、彦坂圭介、三浦直行：変異Rb蛋白を肝細胞に発現させると肝臓腫瘍を効率におこす、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年12月、神戸

⑤薛晓東、木村航、板倉達郎、彦坂圭介、三浦直行：The Tbx10 gene is expressed in the superior olivary nucleus in the medulla oblongata、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年12月、神戸

⑥板倉達郎、楊志、薛晓東、木村航、彦坂圭介、三浦直行：The medaka FoxP2, a homologue of human language gene FOXP2, has a diverged structure and function. 第60回日本細胞生物学会、2008年6月、横浜

⑦薛晓東、彦坂圭介、木村航、三浦直行：Tbx10遺伝子は上部唾液分泌神経の有用なマーカーである、第41回日本発生生物学会、2008年5月、徳島（ワークショップ）

⑧板倉達郎、Abhishek Chandra、楊志、三浦直行：メダカFoxP2タンパクの発現と機能について、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、2007年12月、横浜

⑨Abhishek Chandra、板倉達郎、三浦直行：Characterization of the N-terminal signal sequence of Neurogenin-1 and its role in early bone development、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、2007年12月、横浜

⑩楊志、Abhishek Chandra、板倉達郎、三浦直行：フォークヘッド遺伝子Foxp2の肺と消化管における発現と機能について、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、2007年12月、横浜

⑪三浦直行：フォークヘッド遺伝子Foxj1の欠損により心臓大血管の左右は腹部臓器の左右とは独立に決定される、第30回日本分子生物

学会年会・第80回日本生化学会大会、2007年12月、横浜（ワークショップ）

⑫佐藤英二、柴田清、藤江三千男、呉一心、上里忠良、三浦直行：Double axis formation in *Xenopus laevis* embryos by early perturbation just after insemination. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、2007年12月、横浜

⑬Tomoki Tamakoshi, Tatsuo Itakura, Abhishek Chandra, Tatsuhiko Yokoyama, Naoyuki Miura：Roles of the Foxj1 and Inv genes in the left-right determination of internal organs in mice、第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会、2007年5月、福岡

⑭Tao Wang, Tomoki Tamakoshi, Peter Carlsson, Naoyuki Miura：The Foxf2 gene controls murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会、2007年5月、福岡

⑮王滔、玉越智樹、薛晓東、三浦直行：フォークヘッド遺伝子Foxf2の腸管における上皮-間葉相互作用について、日本分子生物学会フォーラム「分子生物学の未来」、一般口演、2006年12月、名古屋

〔図書〕（計1件）

①Miura, N., Xue, X-D. and Itakura, T. : Chapter 88 Introduction to Forkhead (Fox) Genes, in "Inborn Errors of Development: Molecular basis of clinical disorders of morphogenesis" 2nd edition, (Eds. Epstein, CJ, Erickson, RP, and Wynshaw-Boris A) pp.826-833. Oxford University Press, San Francisco. 2008.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/bio2/index-j.html>

(1) 研究代表者

三浦 直行 (MIURA NAOPYUKI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：40165965

(2) 研究分担者

上里 忠良 (UEZATO TADAYOSHI)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40115465

新村 和也 (SHINMURA KAZUYA)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40321880