

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293176

研究課題名(和文) iPS細胞を活用したヒトキメラマウス肝炎発症モデルの開発とその臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical evaluation of hepatitis onset model of chimeric mice with iPS-derived human hepatocytes

研究代表者

田中 靖人 (Tanaka, Yasuhito)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90336694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞の肝細胞への分化において、サイトカイン類に加えバルプロ酸を添加することにより分化効率及び成熟化が促進することが明らかとなった。さらに、三次元培養法によって肝細胞はスフェロイドを形成し、肝細胞マーカー及び主要な薬物代謝酵素であるCYP3Aの遺伝子発現は、二次元培養法と比較し顕著に高かった。このスフェロイドを浮遊培養し、高度免疫不全のTK-NOGマウスにガンシクロビルを投与、肝障害が確認されたのちに、分化した肝細胞(スフェロイド)を門脈経由で移植した。その結果、ヒトiPS細胞由来肝細胞単独を移植した群で一過性のヒトアルブミンの分泌を確認できた。

研究成果の概要(英文)：In the differentiation to hepatocytes from human iPS cells, it was revealed that the HDAC inhibitor valproic acid in combination with cytokines induce differentiation cells into hepatic progenitor cells followed by maturation into functional hepatocytes. The hepatocytes formed a spheroid by the three-dimensional culture, and the gene expression of CYP3A which is hepatocytes marker and drug metabolizing enzyme is markedly higher than that in 2D cultures. The 3D-cultured iPS-hepatocyte spheroids were transplanted into the portal vein of highly immunodeficient NOG mice (TK-NOG) that is induced liver injury by ganciclovir treatment. At one week post-injection of hepatic spheroids, human albumin levels elevated temporarily.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝炎ウイルス HBV iPS細胞 キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎ではC型肝炎ウイルス(HCV)が血中に存在しても肝炎を発症しない無症候性キャリア症例が存在することから、ウイルス自体が肝障害を引き起こすのではなく、免疫学的機序により肝障害が引き起こされるものと理解されている。通常の慢性肝炎の肝組織ではCD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)が多数浸潤していることより、CTLが炎症誘導の中心的役割を果たしている。一方、B型肝炎ウイルス(HBV)も免疫寛容の無症候性キャリアが存在し、その後の肝障害発症には免疫応答が必須と考えられている。特に急性肝不全の発症には、強いHBV特異的なCTLの誘導が病態形成に深くかかわっている。肝炎ウイルスの研究をする上で、ウイルス生活環を理解するための感染実験は必須といえる。動物を用いた感染実験系では、チンパンジーをはじめ小型のツパイまで哺乳類を用いた系が利用されてきたが、コストや感染効率の面で問題があり、広く実験に使われるところまで至っていない。そのような中で2001年にヒト肝細胞を持ったuPA/SCIDマウス(キメラマウス)が報告され、その後、本邦でもキメラマウスの作製方法が確立され量産化が可能となった。これにより、組織化されたヒト肝臓を標的とした*in vivo*感染実験を行うことが可能となった。

2. 研究の目的

(1) iPS細胞由来ヒト肝細胞置換キメラマウスにHBV、HCVを感染後、iPS細胞由来の同一個体から採取した末梢血単核球(PBMC)を投与し、慢性肝炎モデルを作製する。あるいは同一個体から採取したPBMCなどからiPS細胞を樹立した上で、T細胞やNKT細胞などへ分化させ投与する。

(2) 全ての血液細胞の元となるCD34陽性ヒト造血幹細胞(iPS細胞あるいは臍帯血由来)をuPA/SCIDマウスに400radのX線照射後、移植することにより、ヒト免疫応答を担う血液

細胞を有したマウスを作製する。さらに、同一個体のiPS細胞由来の成熟肝細胞を移植して免疫機能を有するヒト肝細胞キメラマウスを作製する。

3. 研究の方法

(1) ヒトiPS細胞由来肝細胞キメラマウスの作製: ヒトiPS細胞→成熟肝細胞への分化成熟肝細胞特異的に発現する転写制御因子及びmiRNAの探索、三次元培養(共培養)による成熟化→uPA/SCIDマウスへの移植→HBV、HCV感染に伴う遺伝子プロファイルを経時的に確認。

(2) 同一個体に由来した免疫担当細胞と肝細胞を同時に有するハイブリッドキメラマウスの作製: ヒトiPS細胞由来成熟肝細胞と、同一個体から採取する末梢血単核球、iPS細胞由来造血幹細胞あるいはCD34陽性造血幹細胞由来リンパ球などを移植することにより、同一個体に由来した免疫担当細胞と肝細胞を同時に有するハイブリッドキメラマウスを作製。①初代培養ヒト肝細胞の簡便な取得化、②免疫学的側面から肝炎病態解明の解析(肝炎ウイルス感染に伴うIFN λ の役割など、各病態に応じた免疫担当細胞の機能解明)、③ノックアウトキメラマウスの作製と機能解析、④担癌患者より採取した肝癌細胞を移植したハイブリッドキメラマウスを作成し、樹状細胞による癌免疫療法やT細胞移入療法の応用と開発→患者個人の細胞を使うことで、オーダーメイド医療を実現する。

4. 研究成果

(1) 共培養による成熟化

ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化を促進するいくつかの低分子化合物は大量かつ安定的に、高純度で合成することが可能であり、組換えタンパク質やウイルスベクター、共培養用細胞を用いる方法よりもリスクやコストが低く、ロット間差が少ないため、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化に用いる分化

誘導因子として有益であると考えられ、本研究では、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化において、サイトカイン類に加えバルプロ酸を添加することにより分化効率及び成熟化が促進することが明らかとなった(図1)。

ヒトiPS細胞の肝細胞への分化誘導に対するバルプロ酸添加の影響

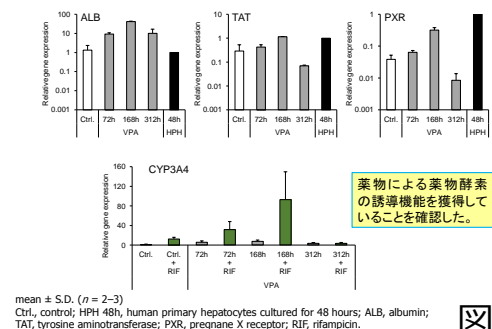


図1

また、肝細胞分化及び成熟化の促進作用は、バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害作用によるものであることが示唆された(図2)。さらに、トランスパレント社が開発した立体培養可能なプレート (Cell-able®) 及び培地を用いて三次元培養を行い、成熟化に対する影響について検討した結果、三次元培養法によって肝細胞はスフェロイドを形成し、その遺伝子発現は、二次元培養法と比較し高かった。また、三次元スフェロイド外膜は NTCP や OATP1B1 を高発現し、肝臓血管側極性を示した。Cell-able においては 3T3 細胞と共培養を行うことで、細胞の接着率の向上するため、肝実質細胞と非実質細胞との共培養も可能であり、生体に近い肝臓構造を形成し、肝機能が向上することが期待された(図3)。

ヒトiPS細胞の肝細胞への分化誘導に対するバルプロ酸の作用機序

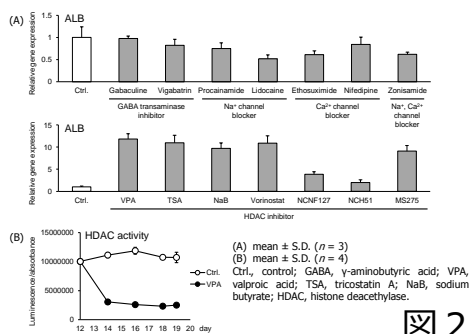


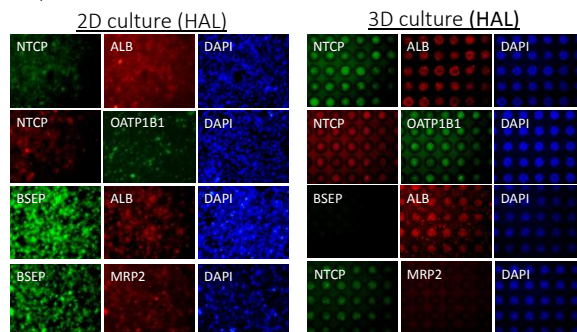
図2

2D及び3D培養における肝細胞極性

HAL; Human adult liver cells

血管側: NTCP, OATP1B1

胆管側: BSEP, MRP2



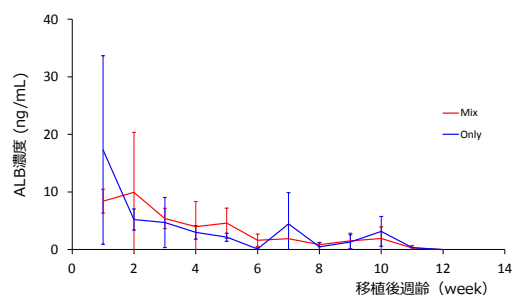
2D培養では比較的広範囲に血管側、胆管側の極性が分布しているのに対し、3D培養 (Cell-able®) ではスフェロイド側面に血管側の極性を示す。

図3

(2) ヒト iPS 細胞由来肝細胞移植

10週齢時にTK-NOGマウス門脈よりヒトiPS細胞由来肝細胞単独と血管内皮細胞、間葉系幹細胞、ヒトiPS細胞由来肝細胞を混合した細胞塊をそれぞれ移植した。22週齢時に開腹手術を行ったところ、混合細胞塊を移植したマウスにおいて腫瘍と思われる塊が観察されたが、肝細胞のみを移植した群では外見上の変化は特に観察されなかった。また、移植1週間後はヒトiPS細胞由来肝細胞単独を移植した群または血管内皮細胞、間葉系幹細胞を加え移植した群でヒトアルブミンの分泌を確認できたが、徐々に低下し、移植後12週齢では全く見られなくなった。混合細胞移植群において細胞の塊が認められたのは、血管内皮細胞において不死化細胞を用いたことによることが推察された(図4)。

マウス血中ヒトアルブミン濃度 図4



移植1週間後はヒトiPS細胞由来肝細胞単独を移植した群 (Only) または血管内皮細胞、間葉系幹細胞を加え移植した群 (Mix) でヒトアルブミンの分泌を確認できたが、徐々に低下し、移植後12週齢では全く見られなくなった。

(3) 異種動物間キメラ動物の作出

ヒト肝臓を有するキメラ動物作成の基盤的研究として、異種動物間キメラ動物の作出を行

った。すなわち、tdTOMATO遺伝子を導入したラットES細胞をアグリゲーション (8-cell aggregation) 法及びインジェクション

(8-cell injection) 法の2つの方法を用いてマウス受精卵に導入した。アグリゲーション法では、導入するラットES細胞の数がキメラマウス作成に影響すると考えられたため、現在導入するラットES細胞数の検討を行っている。インジェクション法では、キメラマウスの作出率が高く、肝臓においてラットES細胞由来のtdTOMATOによる蛍光が部分的に観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① Hayashi S, Murakami S, Tanaka Y(9人中9番目). Characterization of novel entecavir resistance mutations. *J Hepatol*. 査読有. 2015;63(3):546-53. doi:10.1016/j.jhep.2015.03.020.
- ② Tsuzuki Y, Tanaka Y(14人中14番目). Virological characteristics of hepatitis B genotype G/A2 recombination virus in Japan. *Hepatol Res*. 査読有. 2015 in press. doi:10.1111/hepr.12612.
- ③ Kishk R, Tanaka Y, Ragheb M(12人中11番目). Hepatitis B surface gene variants isolated from blood donors with overt and occult HBV infection in north eastern Egypt. *Virol J*. 査読有. 2015;12:153. doi:10.1186/s12985-015-0389-y.
- ④ Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Tanaka Y(6人中6番目). Postexposure Prophylactic Effect of Hepatitis B Virus (HBV)-Active Antiretroviral Therapy against HBV Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有. 2015;59(2):1292-8. doi:10.1128/AAC.04459-14.
- ⑤ Hamada-Tsutsumi S, Tanaka Y(14人中14番目). Validation of cross-genotype neutralization by

hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One*. 査読有. 2015; 10(2):e0118062. doi:10.1371/journal.pone.0118062. eCollection 2015.

- ⑥ Okamoto Y, Tanaka Y, Kondo Y(18人中11番目). Hepatitis Virus Infection Affects DNA Methylation in Mice with Humanized Livers. *Gastroenterology*. 査読有. 2014 ;146(2):562-72. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.056.
- ⑦ Shinkai N, Matsuura K, Tanaka Y(10人中10番目). Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. *J Clin Microbiol*. 査読有. 2013;51(11):3484-91. doi: 10.1128/JCM.00726-13.

[学会発表] (計21件)

- ① Hayashi S, Tanaka Y(12人中12番目). Novel 4'-modified nucleoside analogs exert antiviral replication against hepatitis B virus with drug resistance mutations. 25th Conference of the Asian Pasific Association for the Study of the Liver. 2016年2月22日. International Convention Center Pamir(東京都・港区).
- ② 松永民秀, 栗木駿輔, 坂本栄, 岩尾岳洋. ヒト iPS 細胞から肝細胞への低分子化合物を用いた分化誘導. シンポジウム細胞アッセイ技術の現状と将来. 2016年1月19日. 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京都・目黒区).
- ③ 阿武志保, 岩尾岳洋, 金井達郎, 松永民秀. Differentiation of human pluripotent stem cells to hepatocytes by suspension culture using a novel medium for a three-dimensional culture. 日本分子生物学会. 2015年12月3日. 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).
- ④ Hayashi S, Tanaka Y(13人中13番目). A novel entecavir resistance mutation

- rtA186T causes viral breakthrough in chronic hepatitis B patients. The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2015年11月16日. サンフランシスコ(アメリカ).
- ⑤ 坂本栄, 松永民秀(8人中8番目). ヒト人工多能性幹細胞から肝細胞様細胞への分化促進機構の解明と毒性試験への応用. 第42回日本毒性学会学術年会. 2015年6月29日. 石川県立音楽堂(石川県・金沢市).
- ⑥ 林佐奈衣, 田中靖人(9人中9番目). エンテカビル治療中に viral breakthrough をきたした B 型慢性肝炎の 1 例～新規耐性変異 rrt1163V/A 186T の同定. 第 25 回抗ウイルス療法学会総会. 2015 年 5 月 23 日. 国立感染症研究所(東京都・新宿区).
- ⑦ 林佐奈衣, 田中靖人(9人中9番目). 新規エンテカビル耐性株の同定とその特徴. 第 51 回日本肝臓学会総会. 2015 年 5 月 21 日. ホテル日航熊本(熊本県・熊本市).
- ⑧ 権田草達, 松永民秀(6人中6番目). ヒト iPS 細胞から成熟した肝細胞への分化誘導法の最適化. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25 日. 神戸学院大学他(兵庫県・神戸市).
- ⑨ Hamada-Tsutsumi S, Tanaka Y(10人中10番目). Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. 2014年11月20日. ホテルグランヴィア広島(広島県・広島市).
- ⑩ Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y(5人中4番目). Cross-Presentation by Bone Marrow Derived Cells is Required, but not Sufficient, for the Induction of HBV-specific CD8+ T Cell Responses. The 11th JSH Single Topic Conference. 2014年11月20日. ホテルグランヴィア広島(広島県・広島市).
- ⑪ 五十川正記, 村田泰洋, 田中靖人. HBV 特異的 CD8+T 細胞の増殖と細胞傷害能は肝細胞による内因性抗原提示に依存する. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日. パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市).
- ⑫ Watanabe T, Tanaka Y(11人中11番目). Pre- and Post-Exposure Prophylaxis against Hepatitis B Virus Infection by HBV-active Antiretroviral Therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2014年11月7日. ボストン(アメリカ).
- ⑬ 松永民秀. ヒト iPS 細胞の創薬研究への応用. 製剤機械技術学会第 24 回大会一般講演, 2014 年 10 月 8 日名古屋ウインクあいち(愛知県・名古屋).
- ⑭ Matsunaga T. Utility of iPS Cells for Drug Metabolizing Enzyme Expression: Differentiation of human iPS cells into hepatocytes and enterocytes. 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting. 2014 年 10 月 19 日. サンフランシスコ(アメリカ).
- ⑮ Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y, Chisari F. Endogenous antigen presentation by hepatocytes plays an essential role in the induction of HBV-specific CD8+ T cell responses. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2014 年 9 月 3 日. ロサンゼルス(アメリカ).
- ⑯ Tsutsumi S, Tanaka Y(8人中8番目).

Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2014年9月3日. ロサンゼルス (アメリカ) .

- ⑰ 堤進, 田中靖人(10人中10番目). 大量調整可能なヒト肝細胞を用いた HBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 2014年5月29日. ホテルニューオータニ (東京都・千代田区).
- ⑱ Watanabe T, Tanaka Y(10人中10番目). Incomplete prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues using in vitro hepatitis B virus infection model. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014. 2014年3月12日. ブリスベーン(オーストラリア).
- ⑲ Shinkai N, Tanaka Y(11人中11番目). Clinical evaluation of a newly developed high-sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by a semi-automated immune complex transfer chemiluminescent enzyme immunoassay. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014. 2014年3月12日. ブリスベーン(オーストラリア) .
- ⑳ Murakami S, Tanaka Y(10人中10番目). A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B

Viruses. 2013年10月20日. 上海(中国).

〔図書〕(計1件)

- ① 松永民秀, 岩尾岳洋. 南江堂. 多能性幹細胞 (ES細胞, iPS細胞) の利用「薬剤学実験法 必携マニュアル -Pharmaceutical Scientist のために-」. 2014年. 423(299-311).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 靖人 (TANAKA, Yasuhito)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90336694

(2) 研究分担者

松永 民秀 (MATSUNAGA, Tamihide)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40209581