

山村 研一

熊本大学 生命資源研究支援センター・教授

iPS 細胞による肝臓ヒト化モデルの構築と治療実験

## § 1. 研究実施体制

### (1) 「山村」グループ

- ① 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、教授)
- ② 研究項目
  - ・ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立
  - ・ヒト iPS 細胞由来ヒト肝細胞の機能解析
  - ・FAP 患者由来 iPS 細胞からの変異肝細胞分化誘導

### (2) 「宮崎」グループ

- ① 主たる共同研究者: 宮崎 徹 (東京大学 大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立
  - ・ヒト iPS 細胞由来ヒト肝細胞の機能解析
  - ・PA 患者由来 iPS 細胞からの変異肝細胞分化誘導

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

全体としては 4 つの研究項目、a)ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立、b)ヒト iPS 細胞からのヒト肝細胞の分化誘導と肝臓ヒト化マウスの樹立、c) ヒト変異 iPS 細胞からのヒト変異肝細胞の分化誘導と変異肝臓ヒト化マウスの樹立、d) 変異肝臓ヒト化マウスの検証と病態モデルとしての確立であるが、平成23年度は、a)と b)について研究を行った。

### a) ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立

BRJ (BALB/c;Rag2<sup>-/-</sup>;Jak3<sup>-/-</sup>)の ES 細胞を樹立した。また、SAP-Dre-ERT2 (SDE)および

CAG-rox-EGFP-rox-DT-A(CED) の2つのコンストラクトも作製した。Dre-ERT2がタモキシフェン投与により、核内に移行し、rox 配列を切断できるかどうかを、H19 insulator-CAG-lox71-rox-bsr-pA-loxP-rox-beta-gal-pA-H19 insulator を導入してあるES細胞を用いて検討したところ、Cre-ERT2 とほぼ同等の作用を持っていることを明らかにした。そこで、この2つのコンストラクトをBRJ ES細胞に導入し、BRJ ES:SDE;CED細胞を樹立した。さらに、このBRJ ES:SDE;CED細胞を用いて、キメラマウスを作製した。これらのキメラマウスをC57BL/6あるいはBRJ系統と交配し、それぞれのマウス系統、B6:SDE;CSD および BRJ:SDE;CED の樹立に成功した。これらのマウスにおいて、SDE および CSD の発現を確認した。

### b) ヒト iPS 細胞からのヒト肝細胞の分化誘導と肝臓ヒト化マウスの樹立

平成 23 年度までに、未成熟肝細胞を除去する培養法の開発、成熟肝細胞の選別方法を開発した。また、ヒト iPS 細胞から M15 支持細胞および擬似基底膜 sBM を用いて、効率的な内胚葉及び肝臓細胞の分化誘導方法を構築することに成功した<sup>1)</sup>。また、スフェロイド培養を目的として開発された培養プレート Cell-able を用いることにより、alpha-fetoprotein や albumin だけでなく Cyp3a4 を指標にして発現をみると、比較的機能を保ったまま培養できることが分かった。他肝細胞を移植する簡単な方法として、通常成体の脾臓に細胞を注入する方法がある。この方法は、簡単ではあるが、成体を用いるので、ヒト肝細胞の場合は拒絶を受ける。したがって、ヒト肝細胞の移植においては免疫不全マウスを用いている。しかし、免疫不全マウスは繁殖能力が、通常のマウスと比較し弱い。そこで、胎児の間に移植するほうが、ヒト肝細胞が自己とみなされる可能性があり、拒絶反応の阻止という観点からは優れていると思われる。そこで、マウス肝臓に効率よく iPS 由来肝細胞を導入する方法について、GFP 発現ベクターを封入したグリセロールミセルを胎生期 17 日目の羊膜上に存在する血管(yolk sac vessel)を経由して導入する試験系を用いて最適化した。その結果、デリバリー効率と導入した遺伝子の発現持続性への効果、およびレシピエント胎児に対するダメージの少なさの面で、最適である注入量および速度を決定した。

マウス遺伝子座にヒト遺伝子を置換するとき、どのような構造が最適であるかどうかを検討した。その結果、薬剤耐性遺伝子の PGK-puro カセットが存在すること、IRES 配列は除去した方がよいことが分かった<sup>2)</sup>。

### c) 変異肝臓ヒト化マウス

FAP 患者からの iPS 細胞については、平成 23 年度までに iPS 細胞(iPS:FAP)を樹立している。PA 患者については、島根大学医学部小児科(山口清次教授)の協力を得、PA 患者より樹立した患者繊維芽細胞を入手し、東京大学で増殖・一部保存したのち、熊本大学(江良教授)において iPS 細胞の作製を試み、2系統について iPS 細胞を樹立した。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Shiraki N, Yamazoe T, Qin Z, Ohgomori K, Mochitate K, Kume K and Kume S, "Efficient Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hepatic Cells In Vitro Using a Feeder-Free Basement Membrane Substratum.", Plos One, 6, e24228, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0024228)
2. Li Z, Zhao G, Shen J, Araki K, Haruna K, Inoue S, Wang J and Yamamura K, "Enhanced expression of human cDNA by phosphoglycerate kinase promoter-puromycin cassette in the mouse transthyretin locus" Transgenic Res., 20, 191-200, 2011 (DOI: 10.1007/s11248-010-9389-2)
3. Kurokawa J, Nagano H, Ohara O, Kubota N, Kadowaki T, Arai S, and Miyazaki T, "AIM is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue" Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108, 12072-12077, 2011 (DOI: 10.1073/pnas.1101841108)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)