

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. 研究実施の概要

ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立のため、BALB/c;Rag2<sup>+/+</sup>;Jak3<sup>+/+</sup> (BRJ)マウス胚から ES 細胞株の樹立を行い、マウス系統も確立した。ヒト iPS 細胞からのヒト肝細胞の分化誘導方法をほぼ確立し、マウス肝細胞死の誘導のためのコンストラクトの作製も行った。iPS 由来ヒト肝細胞を胎生期 17 日目のマウス胎仔の羊膜上に存在する血管 (yolk sac vessel) を経由して導入する方法の予備的検討を行った。FAP および PA のモデルマウスの繁殖を行った。なお、iPS 細胞からの肝細胞の誘導やヒトプロピオン酸血症の患者からの iPS 細胞の樹立、誘導したヒト肝細胞を用いてのマウスへの移植実験等に関して、倫理委員会、動物実験委員会、換え DNA 実験安全委員会に申請し、すべて認可された。

### § 2. 研究実施体制

#### (1)「山村」グループ(熊本大学)

①研究分担グループ長: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

・BALB/c;Rag2<sup>+/+</sup>;Jak3<sup>+/+</sup> (BRJ)マウス胚からの ES 細胞株の樹立

・BRJ ES 細胞株を用いたキメラマウス作製と BRJ Rag2<sup>+/+</sup>;Jak3<sup>+/+</sup>マウス系統の樹立

・ヒト遺伝子を挿入時に、効率よく発現させるための条件検討

○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

・ヒト iPS 細胞からのヒト肝細胞の分化誘導

・マウス肝細胞死の誘導のためのコンストラクトの作製

○FAP モデルマウスの繁殖

#### (2)「宮崎」グループ(東京大学)

①研究分担グループ長: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 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
  - ・ヒトプロピオン酸血症の患者からの iPS 細胞の樹立
  - ・iPS 由来ヒト肝細胞の移植法の検討
- PA のモデルマウスの繁殖

### §3. 研究実施内容

#### 1. ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立

- BALB/c;Rag2<sup>-/-</sup>;Jak3<sup>-/-</sup> (BRJ)マウスの樹立とその ES 細胞株の樹立。

BRJ マウスを Rag2 欠損および Jak3 欠損マウスを交配して、ダブル欠損マウスBRJを樹立した<sup>1)</sup>。その BRJ を用いて、体外受精を行い、64個の胚盤胞胚を得、従来用いている GMEM-KSR 培地 (14% KSR, 1%FBS, 1000U/ml LIF in GMEM)培地にて培養を行い、樹立を試みたが、増殖の非常に悪い2系統しか樹立できなかった。これらを用いてキメラマウスを作製したが、50%程度のキメリズムしか得られず、germline にも寄与しなかった。そこで、ES の未分化状態維持のために有効とされる GSK3 のインヒビターの CHIR99021 と MEK のインヒビターの PD0325901 を培地に加え (GMEM-KSR-2i 培地)、再度 ES 樹立を試みた。BRJ マウスの胚盤胞64個を GMEM-KSR-2i 培地で培養したところ、増殖速度・形態とも全く問題のない ES 株を 28 系統樹立することが出来た。

- BRJ ES 細胞株を用いたキメラマウス作製と BRJ Rag2<sup>-/-</sup>;Jak3<sup>-/-</sup>マウス系統の樹立

2回目に樹立できた ES 株から、8系統を用い、B6 メスと BDF1 オスの交配により得られたモルラ胚とアグリゲーションを行うことで、キメラマウス作製を行った。3つの ES ライン (BRJ-5, BRJ-8) で得られた 100%キメラから、生殖系列への伝達を確認した。また、BRJ-6 からも 100%キメラが得られたので、生殖系列への伝達を確認中である。

- ヒト遺伝子を挿入時に、効率よく発現させるための条件検討<sup>2)</sup>。

PGK-puromycin カセット、IRES のそれぞれ有るかに無いかのときに、どれが最も発現効率が良いかを解析し、結果的に PGK-puromycin が存在し、しかし IRES はない組み合わせが最も良いことを明らかにした。

#### 2. 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

- ヒトプロピオン酸血症 (PA) の患者からの iPS 細胞の樹立

ヒト変異肝細胞を樹立するのに必要なヒト変異 iPS 細胞を樹立するため、島根大学医学部小児科 (山口清次教授) の協力を得、ヒト PA 患者細胞から iPS 作製につき島根大学倫理委員会に申請書を提出し審議のうえ承認された。そこで、PA 患者より樹立した患者繊維芽細胞を4種類入手し、東京大学で増殖・一部保存したのち、現在、熊本大学 (江良教授) にて iPS 細胞の作製中である。

#### ○ヒト iPS 細胞からのヒト肝細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞から、支持細胞や細胞外マトリックスを用いて効率的な内胚葉および肝臓分化誘導方法を構築した。分化肝臓細胞の純化および分化誘導効率の評価のために、アルブミン-レポーター遺伝子導入ヒト iPS 細胞株を樹立し、分化誘導方法の開発に利用した(梅田ら、投稿準備中)。培養基材に関しては、支持細胞である M15 細胞、人工基底膜(synthesized Basement Membrane: sBM)、マトリゲルなどを利用した。

#### ○マウス肝細胞死の誘導のためのコンストラクトの作製

肝細胞を特異的に死滅できる遺伝子改変マウスを作製するため、2 種類のコンストラクトを作製した。コンストラクト 1 (CAG-ATG-rox-EGFP-rox-DT-A)は CAG promoter の直下に ATG、rox で挟まれた EGFP、DT-A (diphtheria toxin fragment A)を接続している。EGFP の開始コドンと rox 上流の ATG はフレームが合うように設計した。また、DT-A の開始コドンは除去し rox 上流の ATG とフレームが合うように設計した。コンストラクト 2 (puro-SAP-DreER<sup>T2</sup>)は肝細胞特異的な血清アミロイド P 成分 (serum amyloid P component: SAP)のプロモーター直下に Dre-ER<sup>T2</sup>を接続している。加えて、SAP promoter の上流には puromycin 耐性遺伝子を接続している。これらを共導入することにより、タモキシフェン投与後部位特異的組み換えがおこり、肝細胞特異的にジフテリア毒素を発現し細胞死を誘導することが期待される。

#### ○iPS 由来ヒト肝細胞の移植法の検討

肝臓ヒト化のために必要な、マウス肝臓に効率よく iPS 由来肝細胞を導入する方法の確立を目的として、胎生期 17 日目のマウス胎仔の羊膜上に存在する血管(yolk sac vessel)を経由して導入する方法の予備実験を行った。(A)色素(blue-dye)および(B) GFP 発現ベクターを封入したグリセロールミセル、の2通りで導入効率を確かめたところ、注入物が肝臓に集中して局在し、かつ肝臓全体に散在することを確認した。また、この処置を行った後も胎児の生存や分娩に影響はなく、(A)、(B)とも肝臓に効率よく導入された新生児マウスが誕生している。

#### ○ FAP および PA のモデルマウスの繁殖

iPS 由来肝細胞のレシピエントとなる、FAP および PA のモデルマウスである Tg(6.0-hTTRVal30Met)および Pcca<sup>+</sup>マウスを繁殖した。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H, Suzu S, and

Okada S. Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into Balb/c and C57BL/6 strain of Rag-2/Jak3 double-deficient mice. J Biomed Biotechnol 2011;539748, 2011. doi:10.1155/2011/539748

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

#### (4-2) 知財出願

- ① 平成22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)