

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24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

SAP-Dre の有効性を確認するため、SAP-Dre マウスと以前作製したレポーターマウス (CAG-rox-bsr-rox- $\beta$ -galactosidase を持つマウス: 71RLR-26) を交配し、肝臓を X-gal 染色したところ、ほぼ全部の肝細胞で  $\beta$ -gal が発現することを確認した。今度は、Sap-Cre-ERT2 の有効性を確認するため、SAP-Dre-ERT2 (SDE) および CAG-rox-EGFP-rox-DT-A (CRD) の 2 つのコンストラクトを導入した BRJ (BALB/c:Rag2<sup>+/+</sup>;Jak3<sup>+/+</sup>) ES 細胞を用いて、キメラマウスを作製した。このマウスに tamoxifen を投与したところ血中 GPT の急上昇がみられ、肝細胞障害が起きていることを確認した。そこで、5 種類の BRJ:SD;CD マウス系統を樹立した。肝臓における Dre の発現を解析したところ、SD マウスに比し、すべての系統において非常に低下していることが分かった。tamoxifen を投与したが、血中 GTP は上昇せず、肝細胞障害は発生しなかった。SAP プロモーター中での変異を解析したが、生じていなかった。そこで、GC 配列における C のメチル化を解析したところ、5 カ所とも強いメチル化を受けていることが分かった。これが発現低下の原因であると推察された。Dre ではなく、実績のある Cre<sup>1,2</sup>を用いて Sap-Cre-ERT2(SC)を、また rox に代えて loxP を入れた CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A (CLD)のコンストラクトを作製した。

マウス成長ホルモン遺伝子をヒト成長ホルモン遺伝子で置換するためのコンストラクトを構築した。

#### 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

ヒト iPS 細胞から M15 支持細胞を用いて、効率的な内胚葉及び肝臓細胞の分化誘導方法の開発に成功している。iPS 細胞由来の肝細胞を生体内で簡単にモニターできれば、マウスを殺さずにその動態を観察できる。このような iPS 細胞の樹立を試みた。高効率な遺伝子相同組換え技術であるヘルパー依存型アデノウィルスを用いて、アルブミン (ALB) 遺伝子座に橙色蛍光タンパク質 (mKO1) 遺伝子を導入した iPS 細胞株を樹立した<sup>6)</sup>。この細胞株由来の分化細胞では、mKO1 の蛍光が内在の ALB 遺伝子の転写活性を反映するため、レポーターの蛍光を指標に、肝細胞の分化や維持状態を可視化、定量化することが可能である。また、樹立した細胞株は、成熟肝細胞への分化誘導法の改良等にも有用な資源となりうる。

ヒト肝細胞は、通常マウスの脾臓内へ注入する方法を用いている。一方、上腸間膜静脈は腸からの血流が肝門脈へと直結し、注入した細胞が注入後直ちに肝臓へ到達すると考えられ、脾臓への移植よりも優れていると思われる。そこで、上腸間膜静脈からマウス肝癌細胞 (Hepa1-6) を注入した。細胞を移入後、2 週間目に肝臓において Hepa1-6 細胞のコロニーが形成されていることを確認した。この方法により、成体においても肝細胞の導入が可能であることが考えられる。上記の方法では、免疫不全マウスを用いることが必須条件である。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。この意味では、正常マウスにヒト肝細胞を移植できれば、よりよいモデルが構築できるとと思われる。そこで、14.5 日から 17.5 日の胎児に移植する方法を開発すれば、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、移植方法の確立のため、B6F10 メラノーマ細

胞を用いて、胎生期 17.5 日目の卵黄囊上に存在する卵黄静脈(yolk sac vessel) 経路で移植した。その結果、移植方法を確立することができた。

#### c) 変異肝臓ヒト化マウス

FAP 患者から樹立した iPS (iPS:FAP)細胞を用いて、前述した方法を用いて肝細胞へと効率よく分化誘導することができた。また、その肝細胞において変異トランスサイレチンが発現していることを確認した。また、PA 患者の線維芽細胞を用いて、iPS 細胞2系統を樹立した。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

1. Araki, K. and Yamamura, K. Genetic manipulations using Cre and mutant loxP sites. (ed. Alexei Morozov), in Controlled genetic manipulations. *Neuromethods*. **65**, 29-45, 2012. (DOI:10.1007/978-1-61779-533-6\_2)
2. Abe, K., Araki, K., Tanigawa, M., Semba, K., Ando, T., Sato, M., Sakai, D., Hiyama, A., Mochida, M. and Yamamura, K. A Cre knock-in mouse line on the Sickle tail locus induces recombination in the notochord and intervertebral discs. *Genesis* **50**: 758-765, 2012. (DOI:10.1002/dvg.22035.)
3. Saheki, T., Inoue, K., Ono, H., Tushima, A., Katsura, N., Yokogawa, M., Yoshidumi, Y., Furuie, S., Kuroda, E., Ushikai, M., Inui, A., Eto, K., Kadowaki, T., Sinasac, D. S., Yamamura, K., and the late Kobayashi, K. Effects of supplementation on food intake, body weight and hepatic metabolites in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse model of human citrin deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **107**(3), 322-329, 2012. (DOI:10.1016/j.ymgme.2012.07.021.)
4. Iwamura, Y., Mori, M., Nakashima, K., Mikami, T., Murayama, K., Arai, S. & Miyazaki, T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**: 476-481. 2012. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.018.)
5. Petrakis, I., Mavroei, V., Stylianou, K., Efthymiou, G., Perakis, K., Vardaki, E., Stratigis, S., Giannakakis, K., Kourouniotis, K., Amoiridis, G., Plaitakis, A., Saraiva, M. J., Yamamura, K. and Daphnis, E. Human TTRVal30Met internalization by podocytes in a transgenic mouse model of transthyretin related amyloidosis: does the environment play a role?. *Transgenic Res.* **22**: 101-106, 2013. (DOI:10.1007/s11248-012-9632-0.)

6. Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Higuchi Y, Tokieda K, Kume K, Mitani K, Kume S. Albumin gene targeting in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vector to monitor hepatic differentiation. *Stem Cell Res.* **10**: 179-194, 2013. (DOI:10.1016/j.scr.2012.11.003.)