

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発
2. 研究開発代表者： 山村研一（国立大学法人熊本大学生命資源研究・支援センター）
3. 研究開発の成果

チンパンジー肝臓キメラマウスの作製に関しては、以下の成果が得られた。チンパンジーiPS (ciPS) へHHD および赤色の蛍光マーカーである WR1 を導入し、ciPS:HHD;WR1 を樹立することに成功した。チンパンジーiPS 細胞のナイーブ化については、高島らの方法(Ce11158, 1254-1269, 2014)に準じて行い、ナイーブ化した。ナイーブ化の確認は以下の方法で行った。すなわち、1) naive marker である NANOG 等の発現上昇、2) 抗 5mC 抗体等による染色がうすく低メチル化状態、3) H3K27me3 染色による X 染色体の不活性化によるクロマチンの凝集像の消失、4) 代謝系転換解糖系を阻害する 2-deoxyglucose による AP 陽性のコロニーの確認であり、ナイーブ化が達成できたと考えている。レシピエントマウスである HHB:Hhex^{-/-}マウスの供給体制を確立するため、Hhex^{+/-}のマウス同士の体外受精で得られたモルラ胚 (286 個) の凍結保存を行った。また、Hhex^{-/-}の ES 細胞を用いてキメラを作製し、その精子と Hhex^{+/-}マウス由来の卵子とで体外受精を行い、265 個のモルラ胚を得て凍結を行った。

ヒト肝臓置換マウスの作製に関しては、以下の成果が得られた。レシピエントマウスへの移植のために 1 回の実験で 2×10^7 個の細胞が必要である。このためヒト iPS 細胞 (hiPS) からの肝細胞 (iHep) への初期の段階ではフィーダー細胞上で培養し、その後フィーダフリーで培養することにより多数の成熟した肝細胞を得ることのできる方法の開発に成功した。HHB:SCCD 胎児を妊娠しているマウスを計画的に作出するため、体外受精によって得られた 2 細胞期胚を凍結し、移植計画に合わせて解凍と移植を行い、レシピエントマウスを供給する体制を確立した。チロシン代謝経路の酵素である Fah を欠損させるとマウス肝細胞を死滅させることができる。このマウスの利点は、NTBC を投与することで、正常に発育することである。そこで HHB ES 細胞を用い、CRISPR/Cas9 法により ES:HHB:Fah^{+/-}の作製に成功した。そして、キメラ作製を通して、HHB:Fah^{+/-}及び交配により HHB:Fah^{-/-}マウスの樹立に成功した。HHB:SCCD マウスにヒト成熟肝細胞または iPS 由来の肝細胞を移植し、移植後 3 ヶ月以上を経過したが、ヒト肝細胞が拒絶されずに生着していること、肝がんも発生していないこと、したがって免疫応答が正常なマウスを用いての肝臓ヒト化マウスの作製に成功した。マウス Gh 遺伝子座にヒト GH 遺伝子をノックインしマウス系統 Gh^{hGH} を樹立した。この Gh^{hGH} マウスでは hGH が発現し十分機能していることを確認した。

HBV 感染・肝炎モデルの確立については、以下の成果が得られた。iPS 細胞から分化させた肝細胞で NTCP が発現すること、HBV が感染することを確認した。ノムの高次構造に関与する CCCTC-binding factor (CTCF) が HBV ゲノムに結合することから、転写調節を通して再活性化に関与することを示唆するデータを得た。患者血清由来 B 型肝炎ウイルス (HBV 遺伝子型 A, C, J) をヒト肝臓キメラマウスで増殖させた。ウイルス量は $10^6 \sim 10^9$ コピー/mL に達しており、今後の実験には十分な量が得られた。C 型肝炎ウイルス抑制に有効であるフランス松の樹液であるピクノジェノールが、用量依存性に HBV ウイルスの量も低下させることを、HBV 持続発現細胞を用いて明らかにした。