

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製・制御等の医療基盤技術
2. 研究開発課題名： iPS 細胞による肝臓ヒト化モデルの構築と治療実験
3. 研究開発代表者： 山村研一（熊本大学生命資源研究・支援センター）
4. 研究開発の成果

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。以下、4 つの項目ごとに、本年度の実施内容及び成果を記載する。

a) ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立

BRJ:Fah^{-/-}マウス系統を樹立した。NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione)投与下で、マウスは生存しているが、NTBC 除去したところ、1日目より GPT は上昇が始まり、3日目には全例死亡することを確認した。BRJ:Gh^{hGH1} マウス系統との交配により BRJ:Fah^{-/-};Gh^{hGH1g} マウス系統を樹立し、ヒト肝細胞移植に最適なヒト化最適マウスの確立に成功した。

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

ヒト成熟肝細胞あるいは iPS から分化誘導した肝細胞を用いての卵黄囊血管経由の移植法を確立した。移植できる細胞数を検討した結果、50ul 中に 1.5x10⁵までは、移植可能で、それ以上では胎児が死亡することがわかった。おそらく、肝臓の中で、塞栓を形成するためであると思われる。現在、妊娠メスマウスの胎児のうち最大5匹に移植することが可能となった。

タモキシフェン投与のタイミングについて検討した。その結果、E18.5 から投与するが、投与は2日間にとどめないと、生まれたマウスは死亡することがわかった。

市販のヒト成熟肝細胞および iPS より分化誘導したヒト肝前駆細胞を卵黄脳血管経由で移植し、それらの肝細胞が生着することを確認した。生着した肝細胞は、現時点ではがん化しておらず、安全性が確認された。

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

FAP の患者より樹立した iPS 細胞を用いて分化誘導した変異肝細胞(fiHep)を樹立した。この fiHep を用いて、卵黄の血管経由で移植を行い、肝臓ヒト化マウスの作製を行った。

PA の患者より樹立した iPS 細胞を用いて分化誘導した変異肝細胞(piHep)を樹立した。この piHep を用いて、卵黄の血管経由で移植を行い、肝臓ヒト化マウス

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

作製した変異肝臓ヒト化マウスを用いて、ヒト疾患モデルとして確立する予定である。このことを検証するコントロール実験として以下のことを行った。マウス Ttr 遺伝子をヒト正常(Val30)または変異 (Met30) TTR 遺伝子で、マウス Rbp4 遺伝子をヒト RBP4 遺伝子で置換したマウスをそれぞれ作製し、交配によりダブル遺伝子ヒト化マウス(Ttr^{hVal30/hVal30}:Rbp4^{hRBP4/hRbp4}, Ttr^{hVal30/hMet30}:Rbp4^{hRBP4/hRbp4}, Ttr^{hMet30/hMet30}:Rbp4^{hRBP4/hRbp4})を作製した。これらのダブルヒト化マウスに CHF5074 の投与実験を行ったところ、血中ヒト TTR が上昇すること、これは4量体の増加によること、その増加は TTR 4 量体の安定性が増すことによることを明らかにした。このことは、FAP 肝臓ヒト化マウスが、病態解析や薬剤の治療効果判定にさらにより優れたモデルになりうることを示唆している。