

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 肝炎等克服実用化研究事業  
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名： (日本語) 人工転写因子を用いた肝再生療法開発  
(英語) Differentiation of mesenchymal stem cells to hepatic cells by artificial transcriptional factors

研究開発担当者 (日本語) 石坂幸人  
所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Director,  
Dept. of Intractable Diseases, Yukihiro Ishizaka

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 動物実験による細胞移植の効果検証  
開発課題名： (英語) Animal experiment for investigation of effect of cell transplantation

研究開発分担者 (日本語) 霜田雅之  
所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Project Leader,  
Pancreatic Islet Cell Transplantation Project, Masayuki Shimoda

分担研究 (日本語) 人工転写因子のデザインと機能評価  
開発課題名： (英語) Design of artificial transcription factor and its functional validation

研究開発分担者 (日本語) 広島大学大学院理学研究科・特任講師・佐久間 哲史  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Hiroshima University・Lecturer  
(Special Appointment)・Tetsushi Sakuma

分担研究 (日本語) 肝疾患マウスマネジメントモデルの作成  
開発課題名： (英語) Development of hepatic disorder models with common marmosets  
研究開発分担者 (日本語) 井上貴史  
所属 役職 氏名： (英語) Central Institute for Experimental Animals  
Laboratory head, Takashi Inoue

分担研究 (日本語) ポソームを用いた人工転写因子デリバリーシステムの開発と肝臓での  
MMP1/8 発現誘導

開発課題名: (英語) Development of Artificial Transcription Factor Delivery  
System Using Functional Liposomes and Induction of MMP1/8 Expression

研究開発分担者 (日本語) 弓場 英司

所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University,  
Assistant Professor, Eiji Yuba

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本課題では、研究開発代表者が見いだしたペプチドベクターと分担研究者が改良した人工転写因子を組み合わせることで、組み換え蛋白質による安全な形質転換法を開発することを目標としている、このシステムによって、間葉系幹細胞から肝臓様細胞への速やかな分化誘導や、肝線維症を改善するための新しい肝再生療法の可能性が明らかになるものと期待される。

### 1) 肝炎・肝線維症モデル中動物の作製(霜田、井上、石坂)

実験動物中央研究所の施設内審査委員会の承認を受けた後、マーモセットを用いた実験を行った。即ち、8頭の4-6歳のメス個体に対して、肝毒性薬剤チオアセトアミド (TAA) の間歇持続投与を行い、肝臓線維症モデルを作製した。投与開始後、最短で120日の肝生検により、組織学的に顕著な肝線維化病変が認め、その後、投与を休止しても肝生検において2ヶ月間以上肝線維化病変が継続した。また、肝線維化を示した個体は、血液検査においても肝機能の低下傾向が認められた。

### 2) リポソームを用いた肝臓でのMMP1/8発現誘導システムの構築(弓場)

人工転写因子を肝臓組織へ送達し、細胞内で機能させることを目的として2つの要素を搭載するリポソームを作製した。即ち、肝細胞に発現するアシアロ糖タンパク質レセプターに結合性を示すガラクトース (Gal-DL-G1) を結合させるとともに、細胞内に導入された後、低いpHに対する応答性を付与させるため、CHexPG-PEを含むリポソーム (Gal-DL-G1/CHexPG-PE リポソーム) を作製した。Gal-DL-G1を導入したリポソームは、マンノースを導入したリポソームと比較して、肝細胞株に高い取り込み能を示す一方、この効果はフリーのガラクトース共存下でキャンセルされた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、Gal-DL-G1/CHexPG-PE リポソームが細胞内部に局在していることが確認された。今後、項目3)で同定したIGF-1発現用人工転写因子を包埋したリポソームを作製し、*in vitro*での有効性を検証した後、項目2)で作製するマーモセット肝線維症モデルに投与し、有効性を検証することで、新しい肝再生療法療法の可能性を明らかにする。

### 1) Development of hepatic fibrosis model using common marmosets (Inoue, Shimoda, Ishizaka)

Experiments using common marmosets were conducted based on the experimental protocol that was certified by IRB of the Central institute for experimental animals. Intermittent continuous administration of hepatotoxic agent thioacetamide (TAA) was applied on 8 female marmosets aged 4-6 years old, and a liver fibrosis model was produced. TAA was administered subcutaneously 2-3 times a week at a dose of 2.5 - 40 mg/kg. The optimal administration dose and administration interval were examined. Liver biopsy revealed histologically significant hepatic fibrosis at as early as 120 days after starting administration. Liver fibrosis continued for more than 2 months in liver biopsy even after administration was stopped. In addition, we observed abnormalities of blood tests, suggesting that hepatopathy was induced by TAA administration in the marmosets and hepatic fibrosis was induced. We are currently evaluating the side effects of the immunosuppressant protocol, and in the next fiscal year we plan to administer in vitro differentiated hMSCs into the hepatic fibrosis model marmosets with immunosuppressant.

### 2) Development of liposome-based induction system of MMP1/8 expression in liver (E. Yuba)

Two types of functional molecules were introduced to liposomes for precise delivery of artificial transcription factors to liver and induction of their functions at inside of cells. One is dendron-bearing lipid having galactose moieties (Gal-DL-G1), which bind to asialoglycoprotein receptor expressing in hepatocytes, and another is CHexPG-PE, which can destabilize liposomal membrane at low pH after internalization to cells.

Gal-DL-G1/CHexPG-PE-introduced liposomes were taken up by human liver cancer cell line (HepG2 cells) more efficiently than Man-DL-G1/CHexPG-PE-introduced liposomes, which have mannose moieties on the liposome surface. In addition, cellular association of Gal-DL-G1/CHexPG-PE-introduced liposomes was inhibited in the presence of excess amounts of galactose. Observation using confocal laser scanning microscopy revealed that Gal-DL-G1/CHexPG-PE-introduced liposomes internalized to the cells.

Next year, liposomes containing ATF for expressing IGF-1 identified in section 3) will be produced, and in vitro evaluation of these liposomes will be examined. Furthermore, these liposomes will be administered to Marmosets Hepatitis model prepared in 2) and their effectiveness will be investigated.

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌0件、国際誌17件)

1. Shimura M, Shindou H, Szyrwiell L, Tokuoka SM, Hamano F, Matsuyama S, Okamoto M, Matsunaga A, Kita Y, Ishizaka Y, Yamauchi K, Kohmura Y, Lobinski R, Shimizu I, Shimizu T. Imaging of intracellular fatty acids by scanning X-ray fluorescence microscopy. *FASEB J*, 30(12):4149-4158, 2016.
2. Ueno M, Okamura T, Mishina M, Ishizaka Y. Modulation of long interspersed nuclear element-1 in the mouse hippocampus during maturation. *Mob. Genet. Elem.*, 6(4):e121198, 2016.
3. Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H, Hiroshi Sakagami. Morphine and Fentanyl Citrate Induce Retrotransposition of Long Interspersed Element-1. *In vivo*, 30(2):113-8, 2016.
4. Shimoda M, Matsumoto S. Methods for Microencapsulated Porcine Islet Production. *Methods Mol Biol*. 2017;1479:347-356.
5. Shimoda M, Matsumoto S. Microencapsulation in Clinical Islet Xenotransplantation. *Methods Mol Biol*. 2017;1479:335-345.
6. Aida T, Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T, Tanaka K. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics*. 2016, 17, 979.
7. Tochio N, Umehara K, Uewaki JI, Flechsig H, Kondo M, Dewa T, Sakuma T, Yamamoto T, Saitoh T, Togashi Y, Tate SI. Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL

- repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy. *Scientific Reports*. 2016, 6, 37887.
8. Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes to Cells*. 2016, 21, 1253-1262.
  9. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biology Open*. 2016, 5, 1142-1148.
  10. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. 2016, 19, 127-138.
  11. Yamazaki N, Sugimoto T, Fukushima M, Teranishi R, Kotaka A, Shinde C, Kumei T, Sumida Y, Munekata Y, Maruyama K, Yuba E, Harada A, Kono K. Dual-stimuli responsive liposomes using pH- and temperature-sensitive polymers for controlled transdermal delivery. *Polymer Chemistry*. 2017, 8, 1507-18.
  12. Teranishi R, Matsuki R, Yuba E, Harada A, Kono K. Doxorubicin delivery using pH and redox dual-responsive hollow nanocapsules with a cationic electrostatic barrier. *Pharmaceutics*. 2017, 9, 4.
  13. Yuba E, Yamaguchi A, Yoshizaki Y, Harada A, Kono K. Bioactive polysaccharide-based pH-sensitive polymers for cytoplasmic delivery of antigen and activation of antigen-specific immunity. *Biomaterials*. 2017, 120, 32-45.
  14. Shimizu Y, Iwasaki T, Tajima T, Yuba E, Kono K, Watarai S. Induction of antibody response in the oral cavity of dogs following intraocular (eye drop) immunization with *Porphyromonas gingivalis* cell lysate incorporated in pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes. *J. Vet. Med. Sci*. 2017, 79, 290-8.
  15. Yoshizaki Y, Yuba E, Komatsu T, Udaka K, Harada A, Kono K. Improvement of peptide-based tumor immunotherapy using pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes. *Molecules*. 2016, 21, 1284.
  16. Fujiwara D, Kitada H, Oguri M, Nishihara T, Michigami M, Shiraishi K, Yuba E, Nakase I, Im H, Cho S, Jung JY, Kodama S, Kono K, Ham S, Fujii I. A cyclized helix-loop-helix peptide as a molecular scaffold for the design of inhibitors of intracellular protein-protein interactions by epitope and arginine grafting. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2016, 55, 10612-5.
  17. Chechetka SA, Yuba E, Kono K, Yudasaka M, Bianco A, Miyako E. Magnetically- and near infrared light-powered supramolecular nanotransporters for the remote control of enzymatic reactions. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2016, 55, 6476-81.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of small non-human primate diabetes model (Common marmoset). 口頭, Masayuki Shimoda, Laboratory Animal Research Center Symposium in Samsung Medical Center. Seoul, South Korea, August 12, 2016.
2. Analysis of post-transplant islet by organ transparency and macro three-dimensional image. 口頭, Koya Shinohara, Masayuki Shimoda, 26th International Congress of The

Transplantation Society, August 17-23, 2016, Hongkong, China.

3. The availability of marmoset diabetes modeling as a transplantation model. Wenji Yuan, Satsuki Fukuda, Takashi Inoue, Hitoshi Okochi, Erika Sasaki, Masayuki Shimoda, 口頭, 26th International Congress of The Transplantation Society, August 17-23, 2016, Hongkong, China.
4. iPS 細胞を用いた次世代型膵島移植療法の開発. 口頭, 霜田雅之、矢部茂治、篠原孝也、元文姫、福田沙月、渡邊亜美、渡邊貴一、篠原満利恵、井上貴史、伊吹将人、酒井康行、竹内昌治、道上達男、大河内仁志、佐々木えりか、加藤智久、宮島篤, 2016年5月21日 第59回日本糖尿病学会年次学術集会、京都市
5. Cell-derived vesicles modified with pH-sensitive polymers for intracellular delivery of autologous antigen, ポスター, Yuba E, Sakano T, Kato T, Urasaki T, Harada A, Kono K, 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, 2016/5/17-22, 海外.
6. TGF- $\beta$  受容体阻害剤包埋リポソームの併用による pH 応答性多糖修飾リポソームのがん免疫誘導機能の増強, 口頭, 弓場英司, 上杉慎也, 原田敦史, 河野健司, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/25-27, 国内.
7. pH 応答性多糖修飾リポソームと TGF- $\beta$ 1 型受容体阻害剤包埋リポソームを併用したがん免疫誘導システムの構築, 口頭, 弓場英司, 上杉慎也, 原田敦史, 河野健司, 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016/6/30-7/1, 国内.
8. 機能性高分子の表面修飾による細胞特異的リポソーム DDS の設計, 口頭, 弓場英司, 粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム, 2016/8/8-9, 国内.
9. カルボキシ基導入多糖修飾リポソームの pH 応答性・抗原デリバリー機能に及ぼす側鎖構造の影響, 口頭, 弓場英司, 上杉慎也, 原田敦史, 河野健司, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/14-16, 国内.
10. 弱酸性 pH で構造転移するデンドロン脂質集合体の調製とサイトゾルデリバリーシステムへの展開, 口頭, 弓場英司, 堂浦智裕, 山田めぐみ, 原田敦史, 河野健司, 第 65 回高分子討論会 2016/9/14-16, 国内.
11. Simultaneous delivery system of antigenic protein and cytokine gene using hybrid complexes of pH-sensitive polymer-modified liposome and lipoplex, ポスター, Yuba E, Kanda Y, Harada A, Kono K, 4<sup>th</sup> Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery, 2016/9/23-26, 海外.
12. Liposome engineering for efficient cancer immunotherapy, 口頭, Yuba E, Kono K, 12<sup>th</sup> IUPAC International Conference NMS-XII, 2016/10/14-19, 海外.
13. Preparation of polysaccharide derivatives having pH-sensitivity and immune activation function, ポスター, Yuba E, Yamaguchi A, Harada A, Kono K, Biomaterials International2016, 2016/10/30-11/2, 海外.
14. サイトカイン遺伝子と抗原の同時送達による pH 応答性リポソームワクチンの高活性化, ポスター, 弓場英司, 神田雄平, 原田敦史, 河野健司, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/21-22, 国内.
15. Development of effective immune-inducing system using pH-sensitive polysaccharide-modified liposomes and TGF- $\beta$  signal inhibitor-embedded liposomes, ポスター, Yuba E, Uesugi S, Harada A, Kono K, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016), 2016/11/28-30, 国内.
16. 免疫を活性化する・抗原をはこぶ機能性多糖を利用した免疫誘導システム, 口頭, 弓場英司, メディカルジャパン 2017, 2017/2/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し

(4) 特許出願  
該当無し