

201125034A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

創薬と新規治療法開発に資する
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

創薬と新規治療法開発に資する
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 24 年 (2012 年) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた 1
肝炎ウイルス制御に関する研究
茶山 一彰

II. 分担研究報告

1. ヒト肝細胞キメラマウスの改良およびキメララットの開発 9
-肝炎ウイルスに in vivo で相互作用するタンパク質の解析-
吉里 勝利
2. 分泌型ルチフェラーゼを用いた C 型肝炎ウイルス複製測定系の確立と . . . 14
NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの特性解析
金子 周一
3. レプリコンを用いた C 型肝炎ウイルス増殖に関する宿主分子の網羅的 . . . 18
解析、リバーシジェネティックスの構築
土方 誠
4. 細胞表面付着型インターフェロン- γ 発現ベクターの開発 21
高倉 喜信
5. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 . . . 27
前川 伸哉
6. IL28B 遺伝子の Allele 特異的ノックアウト技術の確立 31
松浦 善治
7. C 型肝炎感染肝癌に対する抗腫瘍免疫細胞療法の開発 35
大段 秀樹

8. In vitro, in vivo 増殖系を用いた C 型肝炎ウイルス増殖のメカニズムの 解析と創薬への応用 脇田隆宇	40
9. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗 H C V 薬の効果判定 今村道雄	46
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	63

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究
平成23年度総括報告書

研究代表者 茶山 一彰 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：われわれはこれまでヒト肝細胞キメラマウスを使用した肝炎ウイルスの感染系を確立して研究を行ってきた。本研究は、このヒト肝細胞キメラマウスを用いて、ウイルス性肝炎の根治と病状緩和に有用な治療法を開発することを目的とし、創薬のシーズの探索、開発された薬剤の応用、肝炎モデルの創生、の3点を中心に行い以下の知見を得た。

● 創薬のシーズの探索

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) の阻害剤であるエゼチミブやプロスタグランジンI受容体アゴニストのC型肝炎ウイルス(HCV)感染阻害効果が見いだされた。また IL28B 遺伝子とインターフェロン(IFN)治療効果の関連あるいは Zinc-finger nuclease (ZEN) を用いて肝癌細胞株における IL28B 遺伝子のアレル特異的なノックアウト方法を確立した。B型肝炎ウイルス(HBV)あるいは HCV 感染マウスに対する IFN 投与による肝臓内遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に検討し、IFN シグナルの反応性低下と共に、HBV 感染では細菌やウイルスの認識機構に関わる遺伝子、HCV 感染では抗原呈示反応に関与する遺伝子の IFN 反応性の低下を認めた。

● 開発された薬剤の応用

新規抗 HCV 療法として、NS5A 阻害剤および Protease 阻害剤あるいは NS5B 阻害剤を併用し IFN 製剤を使用しない経口剤のみによるウイルス排除法、あるいはヒト末梢血単核球分画から培養・増殖させた NK/NKT 細胞を用いた HCV 感染阻害法の開発を行った。

● 肝炎モデルの創生

HBV を感染させたマウスでは肝細胞表面の Fas 発現が更新していた。このモデルにヒト血球細胞を移入することにより、樹状細胞を介して NK 細胞が Fas Ligand (FasL) を発現し肝細胞のアポトーシスを促進させることを見いだした。またこれまでの uPA-SCID マウスのみならず uPA-NOG マウスもヒト肝細胞を移植することにより HCV 感染モデルとなり得ることを見いだした。

【研究分担者】	吉里勝利 (株) フェニックスバイオ	学術顧問
	金子周一 金沢大学大学院医歯薬保健研究域医学系	教授
	土方 誠 京都大学ウイルス研究所	准教授
	高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科	教授
	前川伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部	特任講師
	松浦喜治 大阪大学微生物研究所	教授
	大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
	脇田隆字 国立感染研究所ウイルス第二部	部長
	今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科	助教

A. 研究目的

難治性のウイルス性肝炎患者に対する安全かつ有効な新規治療法の開発，あるいは問題となっている耐性ウイルスに対する対策が必要とされている．その克服のため，われわれはこれまでヒト肝細胞キメラマウスを使用した肝炎ウイルスの感染系を確立して研究を行ってきた．本研究は，このヒト肝細胞キメラマウスを用いて，ウイルス性肝炎の根治と病状緩和に有用な治療法を開発することを目的とし，(1) 創薬のシーズの探索，(2) 開発された薬剤の応用，(3) 肝炎モデルの創生，の3点を中心に行う．

B. 研究方法

(1) 創薬のシーズの探索に関する研究では，これまでに行ってきた研究である新規候補となる薬剤の抗ウイルス効果の検証あるいは肝炎ウイルスの感染による transcriptome の変化を網羅的に解析し，創薬のターゲットとなり得る分子の同定を行う．これらの発現解析には最近可能となった次世代シーケンサーによる網羅的発現解析を応用する．また，様々な IL28B の多型の提供者から得られた肝細胞を移植したキメラマウスを使用して，ウイルスの変異と IL28B の多型との関連について，ウイルス増殖，インターフェロン応答性の面からの解析を行う．(2) 開発された薬剤の応用に関する研究では，キメラマウスを使用して HBV の細胞接着に必要とされる分子に関しても検討を加える．HCV に関しては，これまでで作製した KT-9 クローンのリバーシジェネティックスの系を利用して各種 DAA 製剤に対する耐性ウイルスを作製し，それぞれに対してどのような薬剤が有効か，また，多剤併用でウイルスの完全な排除が可能かどうかについて検討し，IFN を使用しない治療法の確立を目指す．また有効な drug delivery 技術の開発も試みる．(3) 肝炎モデルの創生に関する研究では，キメラマウスにヒトリンパ球が生着できる条件について検討を加える．さらに，リン

パ球が生着しうる条件下での肝細胞障害の成立を目指して検討を行う．

C. 結果および考察

(1) 創薬のシーズの探索に関する研究

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて種々の薬剤の抗ウイルス効果を検討し，新規抗 HCV 薬の候補として以下の薬剤を同定した．Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) が HCV の receptor であり，その阻害剤であるエゼチミブが HCV の感染阻害に有効であることを見いだした(茶山，今村班員)．またアラキドン酸カスケードの産物であるプロスタノイドの各受容体に対するアゴニストあるいはアンタゴニストを用いて感染性組換え体 HCV 産生系を処理することで PGI₂ の受容体である IP のアゴニストの一部がこの系によって産生される組み換え体 HCV 粒子の感染性を抑制することを見出し，このアゴニストが，感染した HCV の感染伝播を抑制する効果があることを見出した(土方班員)．

HBV あるいは HCV 感染マウスに対する IFN 投与による肝臓内遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に検討した．IFN シグナルの反応性低下と共に，HBV 感染では細菌やウイルスの認識機構に関わる遺伝子，HCV 感染では抗原呈示反応に関与する遺伝子の IFN 反応性の低下を認めた．これらの結果は，肝炎ウイルスの感染は，ヒト肝細胞内の mRNA 発現を大きく変化させるとともに，IFN 応答能を低下させていることを示すものであった(茶山，今村班員)．またヒト肝細胞キメラマウスに HCV 血清を接種，早期(3, 7, 14 日後)の肝細胞の遺伝子発現 PCR アレイを用いて解析したところ，その発現パターンは接種した HCV によって大きく異なっていることを見出した．また肝臓中のウイルス量が非常に少ない感染初期段階でも多数の遺伝子発現が有意に変化していた事が判明しており，以上の事から HCV は感染

の早い時期からヒト肝細胞の遺伝子発現に大きく影響している事が示された(吉里班員)。

IL28B 遺伝子型は IFN の治療効果に関与していることが明らかとなっている。本年度、IL28B 遺伝子型(rs8099917)の異なる肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを用いて、rs8099917 TG の肝臓は TT の肝臓に比べ、IFN 投与後の肝内 IFN 誘導遺伝子発現量が低いため、抗ウイルス効果が弱いことを見いだした(茶山, 今村班員)。さらに詳細に IL28B 遺伝子の生物学的特徴を明らかにするため、Zinc-finger nuclease (ZEN) を用いた肝癌細胞株 (Huh7 細胞) における IL28B 遺伝子のアレル特異的なノックアウト方法を確立した(松浦班員)。

次世代シーケンサーを用いた deep sequencing によって、HCV の解析を行った。HCV 感染マウスに telaprevir を単独投与すると投与前、ごくわずかに存在していた耐性株が増加し breakthrough が生じたが、HCV クローンを感染させたマウスからも耐性株の出現による breakthrough が生じた。これらの結果は薬剤耐性株がウイルスの mutation によっても生じ得ることを示すものである(茶山, 今村班員)。また多数の C 型肝炎患者の解析により、HCV コア 70 番アミノ酸変異の quasispecies は γ -GTP 等の臨床背景因子とともに肝発癌と密接に関連していることが明らかとなった(前川班員)。

(2) 開発された薬剤の応用に関する研究

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて新規治療法の開発を試みた。HCV 感染マウスに NA5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤あるいはポリメラーゼ阻害剤を併用投与することにより、マウス血中および肝臓内 HCV が消失した。これらの結果は、C 型肝炎患者に対する IFN 製剤を使用しない経口薬のみの治療法の可能性を示すものである(茶山, 今村班員)。またリンパ球を用いた HCV 感染阻害法の開発も試みた。ヒト末梢血単核球分画

から培養・増殖させた NK/NKT 細胞をマウスに投与することで HCV 感染が抑制されることを見いだした(大段班員)。

キメラマウスを用いて有効な drug delivery の開発を試みた。長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを HCV 感染マウスに hydrodynamic injection 法を用いて投与することにより、持続的に IFN- γ を遺伝子発現することが可能となり、高い抗 HCV 効果を得られることに成功した。さらに遺伝子導入組織に IFN- γ を滞留化することでより安全な IFN- γ 遺伝子治療に成功した(高倉班員)。

細胞培養・チンパンジー感染クローンである遺伝子型 Ia H77 株の p7 と NS2 の間に分泌型ルチフェラーゼを挿入し、簡便な RNA 複製モニタリング、および抗ウイルス剤スクリーニングシステムを構築した。この系を基に、既知の NS3/4A 阻害剤耐性に関わる NS3 プロテアーゼ領域の変異を含む計 25 種類の変異体ウイルスを作成した。25 種類の変異体ウイルスに関して、4 種類の変異体ウイルス、Ciluprevir (BILN2061), Boceprevir (SCH 503024), Danoprevir (ITMN-191), Vaniprevir (MK7009) に対する感受性を測定した(金子班員)。

(3) 肝炎モデルの創生に関する研究

HBV を感染させたマウスでは肝細胞表面の Fas の発現が亢進していた。このモデルにヒト血球細胞を移入することにより、樹状細胞を介して NK 細胞が Fas Ligand (FasL) を発現し、肝細胞のアポトーシスを促進させることを見いだした(茶山, 今村班員)。この系はこれまでに例のない、人の炎症をマウスで再現したものであり、免疫学的に、また炎症、自然免疫に関して膨大な新規研究のテーマやシーズを提供することとなる。このため、この系を発展させる研究は、本研究版とは別個に実施することが好ましいと考えられた。また、これとは別に、これまで用いていた

uPA-SCIDマウスとは異なるuPA-NOGを用いた肝炎ウイルス感染モデルの作製を試みた。uPA-NOGマウスに経脾臓的にヒト肝細胞を移植したキメラマウスにHCVを接種することにより感染が成立した(脇田班員)。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて新規候補となる抗ウイルス剤あるいは新規治療法の開発を行った。IL28B遺伝子型がどのような機序でIFN治療効果と関与しているのかは難治性の遺伝子型を有する症例に対する今後の治療法開発につながるものと思われる。また肝炎モデルのマウスの作製は難治性ウイルス性肝炎に対する治療法開発につながるものとして期待される。特にB型肝炎をマウスの体内で再現する系に関しては、この研究班とは別個の研究としてさらに発展させることが必要であると考えられた。

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスによる肝炎ウイルス感染モデルを用いて、創薬のシーズの探索、開発された薬剤の応用、肝炎モデルの創生、の検討が可能となった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 1. Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol

absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18:281-5, 2012.

(2) Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tatenno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 54:764-71, 2011

(3) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tatenno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo. *Hepatology* 54:781-8, 2011

(4) Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(1):13-18.

(5) Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J Infect* 204:224-8, 2011

(6) Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. Hepatitis C virus response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. *PLoS One* 6:e23856, 2011

(7) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M,

Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54;425-33, 2011

(8) Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. *J Hepatol* 54; 827-8, 2011

(9) Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol* 55;11-8, 2011

2. 学会発表

(1) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi T, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Rapid Emergence of Telaprevir Resistant Hepatitis C Virus Strain From Wild Type Clone in Vivo. 12th AASLD, San Francisco. November 4, 2011

(2) Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

(3) Chayama K, Takahashi S, Kawakami Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y,

Ohmura T, Ishikawa H, Watanabe H, Guo T, McPhee F, Hughes EA, Kumada H. Dual Oral Combination Therapy with the NS5A Inhibitor Daclatasvir (DCV; BMS-790052) and the NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (ASV; BMS-650032) Achieved 90% Sustained Virologic Response (SVR12) in Japanese HCV Genotype 1b-Infected Null Responders. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

II. 分担研究報告

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎
ウイルス制御に関する研究

研究分担者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問

研究要旨： ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV 感染の初期における、ヒト肝細胞での遺伝子発現パターンを解析した。まず、ヒト肝細胞キメラマウスに対して、増殖スピードの異なる 2 種類の感染源（共に genotype 1b）を接種した。その後、接種 3、7、14 日目に肝臓を採取し、HCV RNA 量と各種の遺伝子の発現パターンを、リアルタイム PCR と PCR アレイを用いて解析した。その結果、感染源 1 と 2 に感染したヒト肝細胞の遺伝子発現パターンは、大きく異なっている事が明らかになった。また肝臓中のウイルス量が非常に少ない感染初期段階でも、多数の遺伝子発現が有意に変化していた事が判明した。以上の事から、HCV は感染の早い時期から、ヒト肝細胞の遺伝子発現に大きく影響している事が示された。

A. 研究目的

慢性的な HCV 感染は、ヒト肝細胞の遺伝子発現パターンを大きく変化させる事が示されている。HCV はこのような変化を誘導することで、自身の増殖に有利な環境を作り出していると考えられている。一方で、HCV 感染の初期の段階では、持続感染を成立させようとするウイルスと、感染を排除しようとするヒト肝細胞の攻防が起きていると予想されるが、その詳細は不明である。私達は、HCV 感染初期におけるヒト肝細胞の遺伝子発現パターンを明らかにする事で、そのような攻防の分子メカニズムを解明し、新たな治療薬・治療法の開発に貢献することを目的として、本研究を実施した。

B. 研究方法

African American (5y, boy) 由来のヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞キメラマウス（キメラマウス）を作製した。作製されたキメラマウスを 2 つのグループに分け、それぞれのグループに対して、異なる HCV 感染源（感染源 1 と 2、共に genotype 1b）を、1 匹あたり 10^4 コピーずつ接種した。接種後 3、7、14 日目に剖検を行い（感染源 1：各時点 4 匹ずつ、感染源 2：各時点 3 匹ずつ）、血液と肝臓を採取した。得られた血液と肝臓中の HCV RNA 量を、リアルタイム PCR で定量した。GRP78, IRF7, HIF1 α , PPAR γ , PGC1- β , TFAM については、GAPDH を内部標準として、

リアルタイム PCR で発現量を定量した。各遺伝子のプライマーは、ヒト特異的に設計されており、マウスとヒト cDNA ライブラリーを鋳型とした際、ヒト cDNA ライブラリー特異的に増幅断片が得られる事を確認した。また PCR アレイにより、酸化ストレスに関連する遺伝子群の発現を検討した。使用した PCR アレイには酸化ストレスと関係の深い脂質代謝関連遺伝子も含まれており、これらもあわせて解析した。なお、PCR アレイでは、プライマーはヒト特異的ではないためヒト/マウスキメラ（混合）系全体のレスポンスを観察する目的で実施した。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、遺伝子発現解析を実施した。キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外から正式な手続きをもって購入した凍結ヒト肝細胞を用いた。

動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、実験動物の生理、生態や習性等を理解し、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

C. 結果

肝臓中と血中の HCV RNA 量を調べたところ、感染源 1 と 2 の増殖スピードは大きく異なっていた（図 1）。感染源 1 の場合は、接種

後 14 日目になってようやくウイルスが検出されたのに対して、感染源 2 では接種 3 日目で既にウイルスが検出され、接種 7 日目にはほぼプラトーに達していた。またリアルタイム PCR の結果から、ヒト肝細胞の遺伝子発現に対する影響も、感染源 1 と 2 で異なっている事が明らかとなった。感染源 1 の場合は、感染 14 日目で上昇する遺伝子 (GRP78, PPAR γ , PGC1- β , TFAM) が多かった一方で、HIF1 α は変化がなく、IRF7 は 14 日目で著しく低下していた (図 2)。

感染源 2 の場合は、接種 3 日目から 7 日目にかけて増加傾向を示す遺伝子が多かった (IRF7, HIF1 α , PPAR γ , PGC1- β , TFAM) もの、接種 14 日目になると IRF7 と HIF1 α 以外は感染前の発現レベルに戻っていた (図 2)。PCR アレイの結果も同様に感染源 1 と 2 では経時的変化のプロファイルが異なる遺伝子がみられ、とくに感染源 2 では、SOD, Catalase, ApoE, Proteasome などの酸化ストレス対応遺伝子に加え、脂質代謝関連遺伝子が、先述のヒト特異的リアルタイム PCR にて得られた遺伝子群と同様に、接種 3 日目から 7 日目にかけて増加傾向を示し、14 日目には接種前と同レベルに戻ることが観察された (図 3)。これらとは逆に、Cytoglobin (STAP), Glutathione peroxidases は、接種 3 日目から 7 日目にかけて減少傾向を示し、14 日目には接種前と同レベル以上の発現レベルに達することが観察された。

D. 考察

今回の感染実験において、感染源 1 と 2 でキメラマウスにおける増殖スピードが明らかに異なっていた。使用したキメラマウスには、同じドナー由来のヒト肝細胞を移植しており、その原因は感染源にあると考えられる。感染源 1, 2 共に genotype は 1b であり、今回のような増殖スピードの違いを明らかにするには、詳細な塩基配列の比較と配列をスワップさせたキメラウイルスの作製等を行う必要があると考えられる。

またウイルス感染によって誘導されるヒト遺伝子発現の変化も、接種した感染源によって大きく異なっていた。ヒトに特異的なリアルタイム PCR の結果では、増幅の遅い感染源 1 では接種 14 日目に顕著な変化が見られたのに対して、増幅の早い感染源 2 では接種 3 日目の時点で幾つかの遺伝子発現が

変化していた。PPAR γ , PGC1- β , TFAM の 3 つの遺伝子は、いずれもミトコンドリア代謝や脂質代謝に関連する遺伝子であり、感染源 1 では 14 日目に上昇、感染源 2 では 3 日目と 7 日目に上昇し 14 日目には元のレベルに低下と、感染源毎にその 3 つの遺伝子の変化のパターンは一致していた。ウイルス粒子の産生と細胞の脂質代謝は密接に関連している事が分かっているが、今回の結果から HCV は感染初期の段階から細胞の脂質代謝に影響を与えている可能性が示された。

感染源 1 を接種して 14 日目と、感染源 2 を接種して 3 日目のキメラマウスでは、いずれも HCV RNA の量は低く、大部分のヒト肝細胞は HCV に非感染であると考えられる。それにも関わらず、それらの時点で既に幾つかの遺伝子発現が顕著に変化している事が、今回の実験から明らかになった。どのような分子がこれらの変化を誘導しているかは不明だが、感染細胞が放出するウイルスタンパク質を含む因子あるいは、感染細胞が周囲の細胞にウイルス感染を知らせる因子による誘導と推測された。

E. 結論

以上の結果から、ホストとなるヒト肝細胞の遺伝的背景が一緒であっても、HCV の増幅スピードは感染源依存的に大きく異なる事が示された。また HCV は感染の極く初期からヒト肝細胞の遺伝子発現変化を誘導するが、そのパターンも感染源によって大きく異なっている事が示された。

本研究は、石田雄二、大房健、立野知世、及び吉里勝利によって行われた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012 Feb 13.
2. Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with

- Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing. *Curr Drug Discov Technol.* 2012, 9, 63-76.
3. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 19; 412(1):74-9.
 4. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol.* 2011 Oct; 226(10):2535-42.
 5. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol.* 2011 Aug; 179(2):1050-60.
 6. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology.* 2011 Sep 2;54(3):781-8.
 7. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology.* Sep 2;54(3):764-71.
 8. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res.* 2011 May 1;167(1):e29-37.
 9. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology.* 2011 Apr;152(4):1479-91.
 10. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol.* 2011 Jul;55(1):11-8.
 11. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 2011 May; 54(5):872-8.
2. 学会発表 なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

図1 肝臓中のHCV量の測定結果

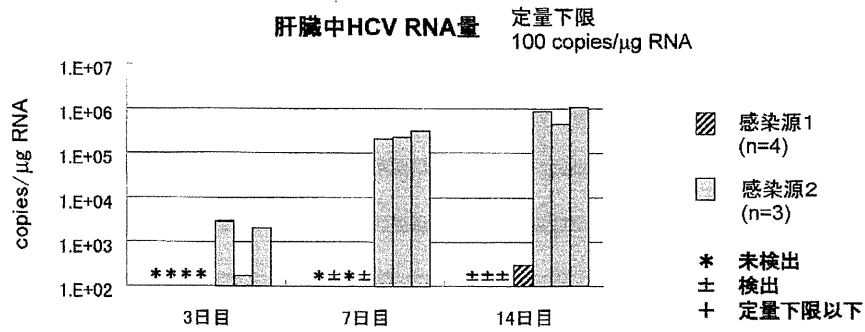


図2 ヒト特異的なリアルタイムPCRの結果

感染源1 : ■ 感染源2 : □

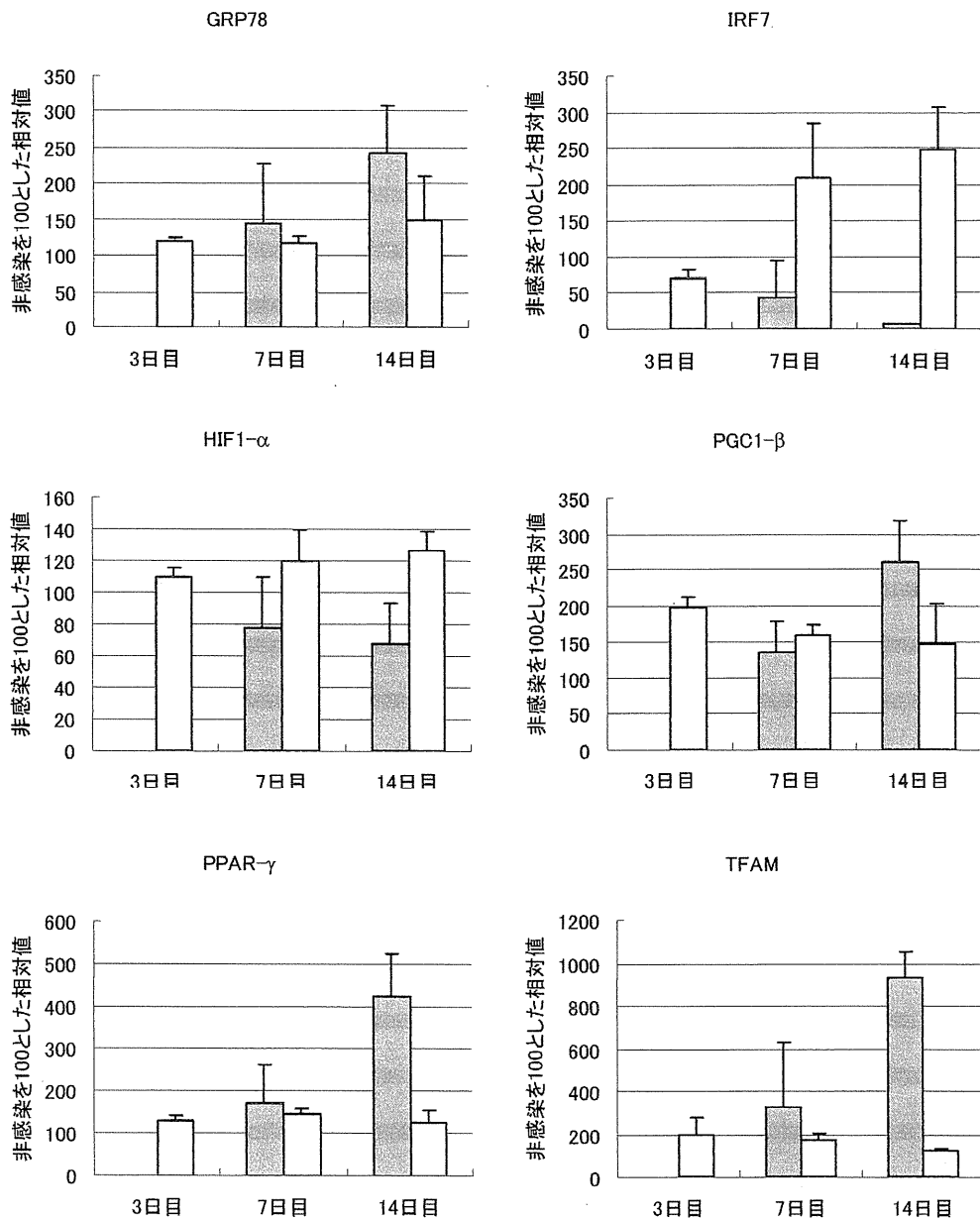
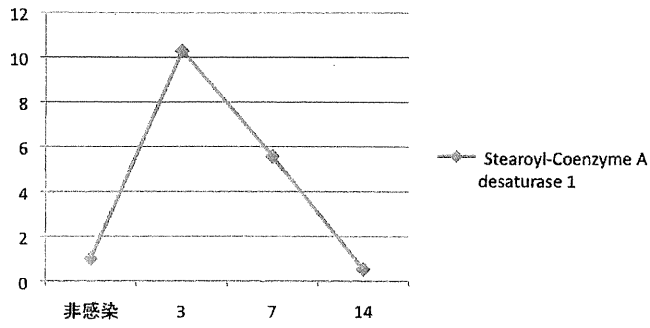
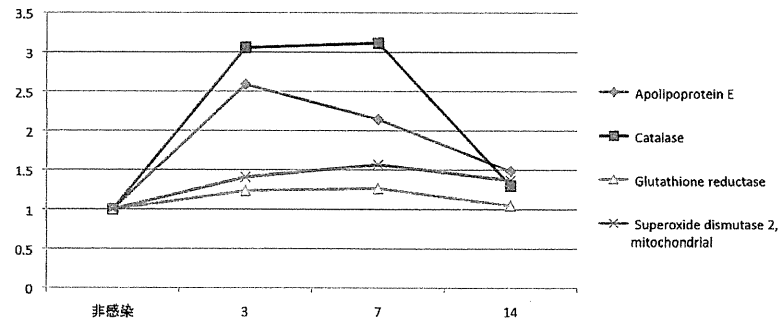


図 3 PCR アレイで変化が見られた遺伝子 (感染源 2)

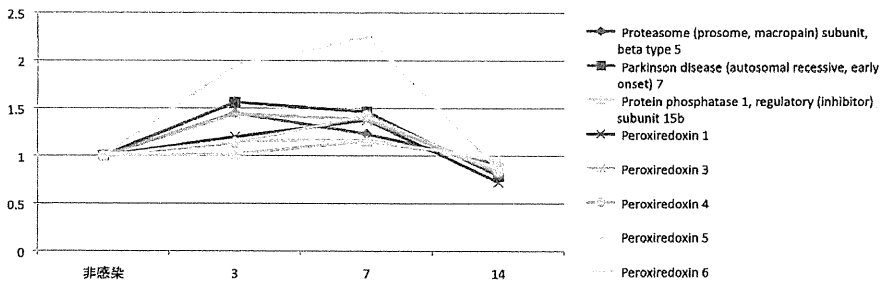
a: もっとも大きい変動が見られた遺伝子



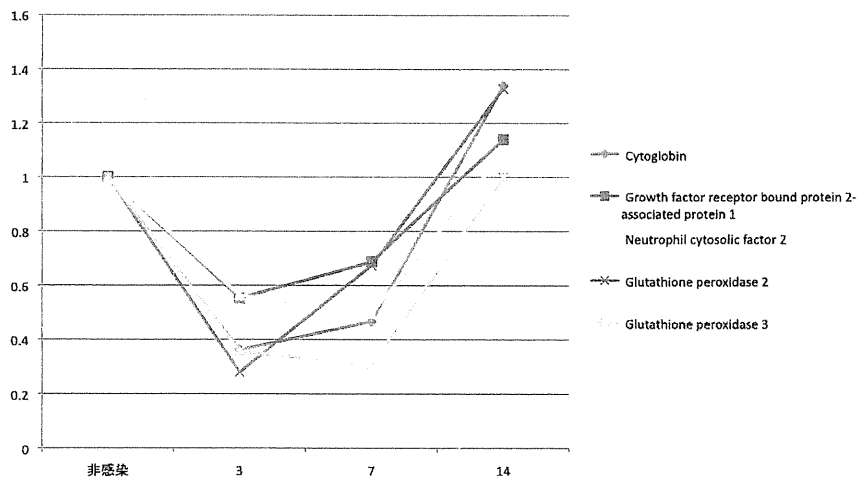
b: 感染により上昇し 14 日後に非感染時を下回らない遺伝子



c: 感染により上昇するが、その後減少し 14 日後には非感染時を下回る遺伝子



d: 感染により減少し 14 日後には非感染時と同等かそれ以上まで上がる遺伝子



厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書(平成23年度)

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

「分泌型ルチフェラーゼを用いた C 型肝炎ウイルス複製測定系の確立と NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの特性解析」

研究分担者 金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨: C 型慢性肝炎の治療薬として, NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の使用が開始されるが, 薬剤耐性ウイルスによる breakthrough 肝炎の発症が懸念される. Breakthrough 肝炎の病態を考える際, 耐性ウイルスの NS3/4A プロテアーゼ阻害剤への感受性, 複製能, 感染性粒子産生能を理解することが極めて重要である. 今回我々は, これらを評価するために, 分泌型ルチフェラーゼを培養細胞感染クローンである遺伝子型 Ia の H77 遺伝子中に挿入し, 細胞培養系での簡易的な薬剤耐性, および複製能モニタリングシステムを構築した. さらに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性に関わることが報告されている合計 25 個の変異体ウイルスを作成し, 複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する感受性, および複製能を検討した. これらの耐性ウイルスは, 既報のごとく, 様々な程度で薬剤耐性を示した. また耐性ウイルスの多くは, 野生型に比べて, 低い複製能を示した.

A. 研究目的

本邦でも C 型慢性肝炎の治療薬として, NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の使用が開始される. ペグインターフェロンとリバビリンとの併用により, 高い治療効果が期待される反面, NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの出現, 選択による breakthrough 肝炎の発症が懸念される. breakthrough 肝炎の病態を考える際, 個々の耐性ウイルスの NS3/4A プロテアーゼ阻害剤への感受性, 複製能, 感染性粒子産生能を理解することが極めて重要である.

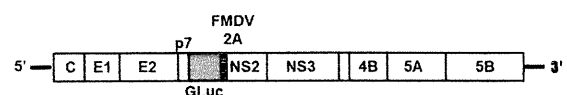
今回我々は, 複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐ウイルスの特性を明らかにするために, まず, 培養細胞感染クローンである遺伝子型 Ia H77 株を用いた, 簡易的な薬剤感受性, 複製能モニタリングシステムの構築を行なうこととした. さらに同系に, NS3/4A プロテアーゼ阻害

剤耐性に関わることが報告されている変異を挿入し, NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスを作成し, これらのウイルスの複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する感受性, RNA 複製能を検討した.

B. 研究方法

培養細胞感染クローンである H77 株の p7 と非構造蛋白 NS2 の間に分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (以下 GLuc), さらに GLuc の C 端側での切断のために Foot Mouse Disease Virus 2A (FMDV2A) 蛋白を挿入した. (H77S.3/GLuc2A, 図 1)

図 1



H77S.3/GLuc2A RNA をヒト肝癌細胞株に導入し、その良好な複製を GLuc assay および qRT-PCR, Northern Blot 法, core 蛋白抗体を用いた Western Blot 法において確認した。

次に既報から、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性に寄与することが報告されている NS3 プロテアーゼ領域の変異 25 種類を個別に H77S.3/GLuc2A に挿入し、合計 25 個の耐性ウイルスを作成した。これらの耐性ウイルスに関して、4 種類の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 Boceprevir, Danoprevir, Vaniprevir, Ciluprevir に対する薬剤感受性を、EC50 を算出することで検討した。また耐性ウイルスの複製能を、野生型と比較検討した。

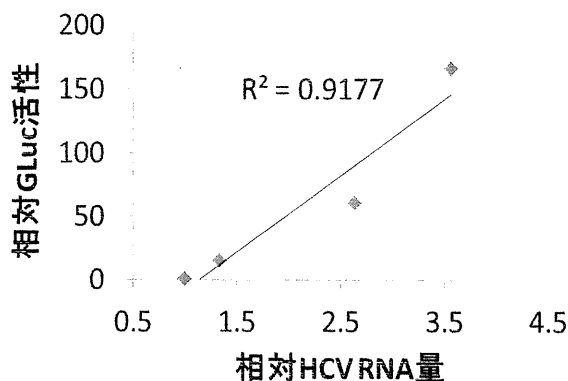
(倫理面への配慮)

本検討は、全て培養細胞系を用いた検討であり倫理上の問題は特にないと考えられる。

C. 研究結果

H77S.3/GLuc2A を肝癌細胞株に遺伝子導入したところ、良好な複製を示した。また 24 時間ごとに測定した GLuc 活性は、qRT-PCR 法にて測定した HCV RNA 量と良好な相関を示したことから (図 2), GLuc 活性は、HCV 複製の指標になりうると考えられた。

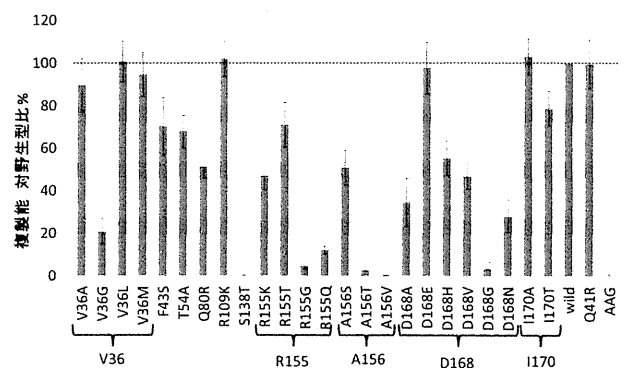
図 2



次に合計 25 個の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性変異をこの GLuc を含んだウイルスに挿入し、耐性ウイルスを作成した。

これらの耐性ウイルスに対して、4 種類の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する感受性を検討した所、ほぼ既報と一致するような薬剤耐性が確認された。さらに、これらの耐性ウイルスの複製能を GLuc assay を用いて測定し、野生型に対して比較検討した (図 3)。V36A/L/M, Q41R, R109K, D168E, I170A の変異体ウイルスに関しては、野生型と同等の複製能を示したが、他のウイルスに関しては、野生型に比べて弱い複製能であった。

図 3



D. 考察

今回我々が確立した GLuc を用いた、HCV 複製モニタリングシステムは極めて簡便な方法であり、単に NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの特性解析ではなく、新たな抗ウイルス剤のスクリーニングに極めて有用と考えられた。

今回の耐性ウイルスの複製能に関する検討では、耐性ウイルスの複製能は、野生型を上回ることはなかった。しかし、NS3 領域はウイルスの感染性粒子産生能に関わることも報告されており、今後は NS3/4A 阻害剤耐性変異の、感染性

粒子産生能に対する影響も検討すべきと考えられた。

E. 結論

分泌型ルチフェラーゼGLucをHCV遺伝子中に挿入することで、簡易的なHCV複製モニタリングシステムを構築した。この系を用いた解析からは、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの複製能は、野生型を上回ることはなく、大部分の耐性ウイルスは野生型に比べて弱い複製能を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y Iwasaki, Y Shiratori, S Hige, S Nishiguchi, H Takagi, M Onji, H Yoshida, N Izumi, Y Kohgo, K Yamamoto, N Sato, A Shibuya, H Saito, M Sata, K Suzuki, S Kaneko, M Moriyama, and M Omata. A randomized trial of 24 versus 48 weeks of peginterferon α -2a in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 2 or low viral load genotype 1: a multicenter national study in Japan. *Hepatol Int* (in press)
- 2) H Sunagozaka, M Honda, T Yamashita, R Nishino, H Takatori, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, S Kaneko. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011,129(7):1576-85
- 3) Y Takata, Y Nakamoto, A Nakada, T Terashima, F Arihara, M Kitahara, K Kakinoki, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. Frequency of CD45RO(+) subset in CD4(+)CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2011,307(2):165-73
- 4) M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 2011,141(1):128-140
- 5) T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2011, 26(6):960-4
- 6) E Mizukoshi, Y Nakamoto, K Arai, T Yamashita, A Sakai, Y Sakai, T Kagaya, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses

in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology 2011, 53(4):1206-16

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし