

201227017A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 25 年 (2013 年) 4 月

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 25 年 (2013 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. 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・・・ 9
肝炎ウイルス制御に関する研究
吉里 勝利
2. C型肝炎ウイルス NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの複製能と・・・ 15
感染性粒子産生能に関する検討
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与する宿主分子の・・・ 19
網羅的解析、リバースジェネティックスの構築に関する研究
土方 誠
4. HCV 感染モデルマウスに対するインターフェロン- γ 遺伝子治療効果の・・・ 23
検討とインターフェロン- γ 肝臓ターゲティング法の開発
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、・・・ 28
HBV 遺伝子変異の解析
前川 伸哉
6. HCV 感染における遺伝子多型の意義・・・ 31
松浦 善治
7. C型肝炎肝移植における IL-28B SNP 解析と肝および末梢血 NK 細胞評価・・・ 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・・・ 39
解析と創薬への応用
脇田 隆字

9. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗 HCV 薬の効果判定	42
今村道雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	55

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24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保健学総合研究院 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。

1. 創薬のシーズの探索

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。また次世代シーケンサーシステムを用いて、HCVのコア領域、HBVのPreS/S領域に注目して deep sequence 解析を行い、これらのウイルスが単一の宿主内で顕著な quasispecies を形成すること、さらにこの quasispecies が病態の進行や肝発癌と密接に関連することを明らかにした。

2. 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を構築しHCV genotype別の治療効果を検討した。さらにHCV薬耐性変異に対する治療法開発のため、耐性HCVが増殖する培養系およびキメラマウスを構築し、抗HCV薬の治療効果および耐性株発現を検討した。

3. 肝炎モデルの創生

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスにNK細胞を投与することにより肝炎モデルマウスの作製を試みている。またマウスよりいくつかの利点を持つラットの肝臓をヒト化する技術の開発を行い、ラット肝芽細胞に特異的に障害を与えることが可能なトランスジェニックラットのファンダーを作製した。

【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
	金子周一	金沢大学大学院医歯薬保健研究域医学系	教授
	高倉喜信	京都大学大学院薬学研究科	教授
	松浦喜治	大阪大学微生物病研究所	教授
	脇田隆字	国立感染研究所ウイルス第二部	部長
	大段秀樹	広島大学大学院医学系研究科	教授
	土方 誠	京都大学ウイルス研究所	准教授
	前川伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部	講師
	今村道雄	広島大学病院	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.(2) 開発された薬剤の応用に関する研究では,HCV 培養系およびキメラマウスを使用して,野生型あるいは薬剤耐性型 HCV クローンを感染させ,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.さらに生体肝移植後の HCV 再感染のメカニズムの解明および治療法開発を試みる.(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 uPA/SCID マウス以外の肝炎モデル動物の構築も試みる.

C. 結果および考察

(1) 創薬のシーズの探索に関する研究

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).

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). 次世代シーケンサーシステムを用いて, HCV のコア領域, HBV の PreS/S 領域に注目して deep sequence 解析を行い, これらのウイルスが単一の宿主内で顕著な quasispecies を形成すること, さらにこの quasispecies が病態の進行や肝発癌と密接に関連することを明らかにした (前川班員).

(2) 開発された薬剤の応用に関する研究

HCV 培養系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて, in vitro および in vivo による DAA 製剤の治療効果および耐性株出現の検討, 耐性株に対する治療法開発を行う. HCV 培養系に関しては, プロテアーゼ阻害剤耐性変異体ウイルス計 25 種を作成し, 複製能および感染性粒子産生能を検討した所, 大部分の変異体は野生型に比べて複製能および感染性粒子形成能が低下していることを見出した (金子班員). また genotype 1b 型 HCV 培養系を用いてプロテアーゼ阻害剤あるいは NS5B 阻害剤の治療効果を検討するため, genotype 1b 型の Con1 株の NS3 プロテアーゼ領域および NS5b 領域をそれぞれ遺伝子型 2a の JFH-1 株に組換えたキメラレプリコンおよびウイルス構築を作成した (脇田班員). ヒト肝細胞キメラマウスに関しては, DAA 耐性 HCV 感染マウスを用いて telaprevir あるいは NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウスを作製し薬剤治療効果を検討した. Telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する 2 重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ, さらに NS5B 阻害剤の投与により, 3 重耐性型 HCV

が出現した. DAA 製剤を sequential に使用すると, 多剤耐性変異型 HCV が出現するため注意が必要であることが示された. NS5A 阻害剤+第二世代 protease 阻害剤あるいは NS5A 阻害剤+非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の併用療法は genotype 1b 型 HCV には有効であるが, genotype 2a または 2b 型では有効性は低かった (茶山, 今村班員). 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. HCV の除去が確認されたマウスの肝臓において, 肝細胞の傷害はほとんど認められず, IFN- γ 遺伝子の持続的供給による安全かつ有効な HCV 治療法の開発の可能性が示された (高倉班員). 生体肝移植後の HCV 再感染のメカニズム解明およびその治療開発も検討した. HCV の実験室株 (HCVcc) を Huh7.5.1 細胞と Hep3B/miR-122 細胞で継代して作製した HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B は, 特徴的な遺伝子多型を保持しており, HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に, また, HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感受性を示した. また, Huh7.5.1 細胞に感染する前後での HCVcc/Hep3B の遺伝子配列を評価したところ, 細胞に馴化する過程で特異的な変異が同定され, HCV の遺伝子多

型は細胞親和性に関与しており、ドナーグラフトへの感染にも重要な役割を演じている可能性が示唆された（松浦）。

これまで生体肝移植後の HCV 再感染に対し、肝由来 NK 細胞をレシピエントに投与することにより、ウイルス量の減少が得られることを報告していった。今年度、このウイルス量減少とレシピエントの IL28B 遺伝子型の関係を検討したところ、IL28B 遺伝子型が TT の症例では、NK 細胞投与簿の HCV 量がより減少することを見出した（大段班員）。

(3) 肝炎モデルの創生に関する研究

HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに NK 細胞を投与することにより肝炎モデルマウスの作製を試みている（茶山、今村班員）。また創薬開発のツールとしてマウスよりいくつかの利点を持つラットの肝臓をヒト化する技術の開発を行った。その結果、ラット肝芽細胞に特異的に障害を与えることが可能なトランスジェニックラットのファンダーを作製することができた（吉里班員）。

D. 考察

HCV 培養系および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。また野生型あるいは種々の薬剤耐性型 HCV クローンを用いることにより、各種 DAA 製剤に対する感受性あるいは耐性株出現の検討を *in vitro* および *in vivo* で行った。さらに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。

E. 結論

HCV 培養系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて、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) Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M, Imamura M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2012;19(2):e126-e133
- 2) Chayama K, Hayes CN, Imamura M. Impact of interleukin-28B genotype on *in vitro* and *in vivo* systems of hepatitis C virus replication. *Hepatol Res.* 2012;42(9):841-53
- 3) Hayes CN, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(7):406-17
- 4) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K,

Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. Gut. 2013 Jan 15.

2. 学会発表

(1) Michio Imamura, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Masataka Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Shoichi Takahashi, Kazuaki Chayama. Deep sequencing analysis of hepatitis C virus quasipieces in patients treated with telaprevir in combination with peginterferon and ribavirin. The 10th JSH Single Topic Conference, Tokyo. November 21, 2012

2) 今村道雄, 阿部弘美, 平賀伸彦, 越智秀典, 茶山一彰. C型肝炎ウイルスの感染および IFN 治療における IL28B 遺伝子多型の影響. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 1 日、神戸

3) 大野敦司、今村道雄、平賀伸彦、柘植雅貴、相方浩、高橋祥一、茶山一彰. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HCV genotype 1 および 2 型に対する DAA 併用療法の有効性の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年 6 月 8 日、東京

4) 平賀伸彦, 今村道雄, 柘植雅貴,

河岡友和, 阿部弘美, 相方浩, 高橋祥一, 越智秀典, 茶山一彰 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた IL28B 遺伝子多型と HCV 感染・IFN 効果の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年 6 月 8 日、東京

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

II. 分担研究報告

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
分担研究報告書（平成 24 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

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：本研究では次の2つの研究を行った。1つは既に実用化されているヒト肝細胞キメラマウス（ヒト肝細胞で置換された肝臓を有するマウス）を用いて、HCV 感染の初期における、ウイルスの増殖動態とヒト肝細胞での遺伝子発現パターンの変動を調べた。その結果、同一感染源（共に genotype 1b）でも、同一のヒト肝細胞中で異なる速度で増殖する可能性があること、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することが再現性良く示され、HCV はタイターの低い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。他の1つは、創薬開発のツールとしてマウスよりいくつかの利点を持つラットの肝臓をヒト化する技術の開発を行った。その結果、ラット肝芽細胞に特異的に障害を与えることが可能なトランスジェニックラットのファンダーを作製することができた。

A. 研究目的

HCV の感染と感染を起因とする肝臓疾患の発症は、ウイルスと肝細胞の相互作用の結果であり、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。それら相互作用の実体は、感染に起因する宿主細胞の遺伝子発現パターンの変動というかたちでとらえることが出来る。ウイルスと肝細胞のこのような攻防の仕組みを明らかにするためにはこの現象を正確に再現できるモデル実験系が必須である。私達は、この様なモデル系として既にヒト肝細胞で置換された肝臓を有するマウス（キメラマウス）を作製し、このマウスが上記仕組みの解明に有用・有効であることを明らかにして来た。本研究は、次の2つの目的を持って実施された。

目的1. 感染に起因するヒト肝細胞の

遺伝子発現パターンの変動を明らかにし、ウイルスと縮細胞の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。

目的2. 創薬開発の視点に立てば、ラットはマウスと比較して、実験動物としていくつかの優れた特性を持つことから、ヒト肝細胞で置換された肝臓を有するキメララットの開発を目指す。

B. 研究方法

目的1に関する研究方法。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

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, BAK, BAX, BclXL, PPAR α 及び g, PGC1 α 及び b 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 RT-PCR アレイ (Reverse Transcription-PCR アレイ) を用いて、酸化ストレス関連及び脂質代謝関連の 87 遺伝子の発現を検討した。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。

目的 2 に関する研究方法。トランスジェニック (Tg) ラットを作成するために、次の 2 つのを行った。(1) albumin/ α -fetoprotein 遺伝子座に由来するラットゲノム由来プロモーターを利用して、肝芽細胞特異的に diphtheria toxin のドメイン A (DTA) 遺伝子を発現させる BAC Tg ラットを作製した。albumin_ α -fetoprotein 遺伝子座をコードするラット由来の BAC クローン、CH230-239P9 を入手した。Red/ET Recombination (大腸菌内での能動型相同組み換え反応) を利用して、ラット ALB 遺伝子の全コード領域を削除し、flox-cLuc レポーターカセット、DTA 遺伝子、2A peptide、および Gluc レポーターをタンデムに連結させたトランスジーンにより置換させて、組換え BAC 型肝芽細胞特異的 DTA 発現ベクターを構築した。制限酵素によりこの組換え BAC 型 DTA 発現ベクターを直鎖化させた後、パルスフ

ィールドゲル電気泳動により直鎖化された DNA フラグメントを分離させ、受精卵へのマイクロインジェクションに適した高純度の BAC 発現コンストラクトを精製した。過排卵誘起した Wistar 系統ラット (日本チャールスリバー社) の交配により得られた受精卵前核期胚にマイクロインジェクション法により BAC 発現コンストラクトを注入した。この受精卵を偽妊娠ラットに移植した。これらの仮親ラットが分娩した産子を仮親に離乳期まで育成させた。離乳した全ての個体の尾部組織から抽出したゲノム DNA 断片と [³²P]ラベル化プローブのハイブリダイゼーションにより、Tg ラットファウンダーを同定した。(2) CAG カセットを利用してユビキタスに Cre 遺伝子を発現する Cre deleter ラットを作製した。CMV エンハンサー、 β アクチンプロモーターを組み込んである CAG 発現カセットに、NLS-Cre 遺伝子をコードする cDNA 配列を挿入し、ユビキタスに Cre 発現する発現ベクターを構築した。制限酵素によりこの Cre 発現ベクターを直鎖化させた後、アガローゲル電気泳動により直鎖化された DNA フラグメントを分離させ、受精卵へのマイクロインジェクションに適した高純度の Cre 発現コンストラクトを精製した。上記と同様の方法で、Wistar 系統ラット由来の受精卵前核期胚に Cre 発現コンストラクトを注入した後、偽妊娠ラットに移植した。

(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

社の観点から、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

1. 感染源の異なる同一HCVゲノタイプウイルスの増殖について

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。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。同じドナー由来の肝細胞に対して、同じgenotype1bである感染源1と感染源2を接種した際に、増殖スピードが大きく異なるという結果は、平成23年度の研究でも得られており再現性が確認できた。しかしながら、遺伝子発現の変動に関しては、平成23年度の結果と異なり、調べた遺伝子に関する限り、感染ウイルス量と有意な変動を示さなかった。これら遺伝子の中でも、私達が特に注目して来たHSP90

(GRP78)に関しては、この遺伝子発現を抑制させた肝細胞を作製して、ウイルス感染過程におけるその機能を調べる実験を実施中である。

2. マイクロアレイによる酸化ストレス/脂質代謝関連遺伝子の発現動態の調査について

平成23年度に引き続き、発現しているmRNAを対象としたRT-PCRアレー (Reverse Transcription-PCRアレー) を用いて、酸化ストレス関連及び脂質代謝関連の87遺伝子の解析を行

った。HCV感染後の発現が、非感染個体に対して2倍以上に増加もしくは0.5倍以下に減少した遺伝子産物は18であった。これらについてプロファイル別に4つのカテゴリーにタイピングした。(1)感染後少なくとも2週間発現が持続的に上昇する遺伝子：ApoE, Cat。(2)期間中持続的に発現が減少する遺伝子：Cyba, Ctsb, Dnm2, Ercc2, Gpx3, Idh1, Prdx6, Ptgs1, Sod1, Sod3, Txnip。(3)感染後一週間までは発現が亢進するが、その後低下する遺伝子：Aass, Gstk1, Scd1。(4)感染後1週間までは発現が増加するが、その後、上昇する遺伝子：Gpx2, Ncf2。このRT-PCRアレーは、ヒト検体用であるが、ヒト特異的に増幅するものではないため、ヒト・肝細胞キメラマウスの肝臓では、ホストであるマウス細胞の遺伝子発現変動が合わせて観察されている可能性が高い。このためRT-PCRアレーで変動が見られた遺伝子の転写産物の中でヒトとマウスの配列をそれぞれ特異的に増幅可能なプライマー設計が可能で、かつ、キメラマウスに由来しないヒト及びマウスの鋳型を用いて特異性が確認出来た遺伝子産物であるHSP90及びCytoglobinについて、ヒト・マウスそれぞれの遺伝子産物量とHCVタイトーの関連を定量的RT-PCRにて解析した。その結果、ヒトHSP90は非感染群と比較して有意な変動を示さなかったが、Cytoglobinは、ヒト及びマウスのいずれのCytoglobinも、HCV感染群において非感染群に比べて発現が減少することが分かった。

3. キメララットの作製について

(1) albumin/ α -fetoprotein遺伝子座に由来するラットゲノム由来プロモータを利用して、肝芽細胞特異的に diphtheria toxin のドメインA (DTA) 遺伝子を発現させるBAC Tg ラットの作製。過排卵誘起したWistar系統ラットの交配により得られた受精卵前核期胚、合計314個にマイクロインジェクション法によりBAC発現コンストラクトを注入した。マイクロインジェクションを受けたラット受精卵を顕微鏡下で観察してダメージなく発現コンストラクトを注入できた受精卵、264個を得、これらを偽妊娠ラットに移植することができた。これらの仮親ラットが分娩した産子を仮親に哺育させることにより、合計98頭の個体を離乳まで育成することができた。BAC発現コンストラクトを導入した初期胚からの産子数、離乳数が良好であったことから、組換えBAC型DTA発現コンストラクト自体による、ラット受精卵の発生、分化への悪影響はなかったと考えられる。これらの離乳した個体から、導入遺伝子を持つTgラットファウンダーとして合計10頭を得ることができた。これらのトランスジェニックラットファウンダーに導入した発現コンストラクトのコピー数は、1コピーから30コピーであった。

(2) Cre deleterラットの作出。研究方法で述べたように、受精卵へのマイクロインジェクションに適した高純度のCre発現コンストラクトの精製物を調整した。これを(1)と同様の方法で、Wistar系統ラット由来の受精卵前核期胚、合計254個に注入し、159個を偽妊娠ラットに移植することができた。その結果、合計46頭の個体を離乳まで育成することができたが、サザンブロットハイブリダイゼーション

によりTgラットファウンダーのスクリーニングを行ったが、1頭もファウンダーを得ることができなかった。

D. 考察

本研究によって、同一ゲノタイプのHCVが、クローンが異なると同一ヒト肝細胞から構築されているキメラマウス肝臓中で異なるスピードで増殖することを示した。この結果は平成23年度での研究結果と同じであり、再現性が高い現象である。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と2は共にgenotype 1bであり、これらウイルスがどのような仕組みで異なる増殖スピードを示すのかは不明である。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が、今後の課題である。これらキメラマウスを用いて、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を、平成23年度と同様に調べたが、これに関しては再現を得ることは出来なかった。非再現性の原因は現時点で不明であり、今後、特に私達の観点から関心の高い遺伝子に関して調査したいと考えている。

平成23年度に引き続き発現しているmRNAを対象としたRT-PCRアレー (Reverse Transcription-PCRアレー) を用いて、ウイルス感染後の酸化ストレス関連及び脂質代謝関連の遺伝子の発現動態を調べた。得られた結果は、ほぼ、平成23年度の結果を支持するものであった。ウイルス感染初期(3日)では、HCV RNAのタイトルは低く、大部分のヒト肝細胞はHCVに非感染であると考えられるにも関わらず、かなりの遺伝子(本実験

では18遺伝子)がその発現レベルを変動させていると考えられる。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、軽度の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、軽度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が、軽度感染肝細胞が、低量のウイルスそのもの、あるいは、少数の感染細胞が発する異常を知らせるシグナルを感知し“準備”していることを窺わせ興味深い。このウイルスに対する肝細胞の“preconditioning (priming)”の仕組みに関しては、今後、研究を展開したいと考えている。

創薬開発のツールとしてキメラマウスは研究者の間で高い評価を得ている。今後、肝炎ウイルス感染の仕組みの解明のみならず、その感染予防医薬の開発、或は肝炎発症阻害医薬の開発ツールとしてニーズがさらに大きくなることが期待される。一方、医薬品開発のための実験動物では、候補化合物の代謝パターンを調べるために充分量の血液サンプルを採取できることが望ましい。この観点から見るとマウスはラットに劣る。この問題解決のために本研究では新たにキメララットの作製法の開発を始めた。今年度の研究によって、肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA (DTA) 遺伝子を発現するファンダーラットを作製することができたが、Cre deleter Tgラットのファンダー作製には成功できなかった。このファンダーラット作製に再度取り組む予定である。

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現象の再現性を確認できた。また、少なくともマイクロアレイ法で調べた限りにおいては、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現象も再現性があることが分かった。新たに開始したキメララットの作製もほぼ予定通り進行させることができた。

本研究は、石田雄二、大房健、塩田明、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. Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. Gut. 2013 Jan 15. [Epub ahead of print]

2. Cytoglobin May Be Involved in the Healing Process of Gastric Mucosal Injuries in the Late Phase Without Angiogenesis.

Tanaka F, Tominaga K, Sasaki E, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Kawada N, Yoshizato K, Arakawa T.

Dig Dis Sci. 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]

3. Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T,

Tsunoda T, Yoshizato K. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. *Lab Invest.* 2013;93:54-71.

4. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg.* 2013;257(3):542-7.

5. Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, Taniguchi K, Ito M, Ohishi H, Utoh R, Ishibashi H, Kanematsu T, Yoshizato K. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis. *World J Gastroenterol.* 2012 Aug 7;18(29):3875-82.

6. Izuka M, Ogawa T, Enomoto M, Motoyama H, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012 Aug 1;5(1):12.

7. Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anticoagulation factors. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):437-45.

8. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocytes propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):429-36.

9. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, 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 cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology.* 2012 Aug;56(2):555-66.

10. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N.

MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut.* 2012 Nov;61(11):1600-9.

11. 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 Mar;9(1):63-76. Review.

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

C型肝炎ウイルスNS3/4Aプロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの複製能と
感染性粒子産生能に関する検討

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型慢性肝炎に対して、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤の使用が開始されたが、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、その複製能、感染性粒子産生能を理解することが重要である。昨年度我々は、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変異体ウイルス計25種を作成し、複製能を検討した所、大部分の耐性ウイルスの複製能は、野生型より低く、野生型を上回ることにはなかった。今年度、培養細胞感染系を用いて、これらの耐性変異体ウイルスの感染性粒子産生能を検討した。その結果大部分の変異体は、複製能と同様に野生型に比べて低い感染性粒子産生能を示し、野生型を上回ることにはなかった。耐性ウイルスの複製能・感染性粒子産生能が、野生型を上回らないことを示した今回の結果は、breakthrough 肝炎患者の病態を考慮する際極めて重要と考えられた。

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た。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、耐性ウイルスのRNA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。

昨年度我々は、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株に分泌型ルチフェラーゼを挿入することで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った。さらに同系に、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤耐性に関わるもの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計25種を作成し、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。その結果大部分の耐性ウイルスの複製能は、野生型より低く、野生型を上回ることにはなかった。

今年度は、これらの耐性ウイルスの感染性粒子産生能を培養細胞感染系にて検討した。

B. 研究方法

1) 培養細胞感染クローンである H77 株に、

NS3/4A 阻害剤耐性に関わることが報告されている変異を一つずつ挿入した耐性変異体ウイルス 25 種類を作成した。尚昨年度測定した RNA 複製能は分泌型ルチフェラーゼを含んだウイルスを用いて測定したが、感染性粒子産生能は極めて低く感染性粒子産生能の評価は困難と考えられた。そのため耐性変異は、分泌型ルチフェラーゼを含まないウイルスに挿入した。

- 2) これら変異体ウイルス RNA をヒト肝癌細胞株 (Huh7.5) 細胞に遺伝子導入し、96 時間後にメディウムを回収し, naïve Huh7.5 に感染させた。さらにその 72 時間後に FFU assay を行い, 1ml あたりの感染性粒子産生能を算出した。
- 3) 昨年度測定した各々の耐性ウイルスの RNA 複製能と今年度測定した感染性粒子産生能を比較した。
- 4) 有意に RNA 複製能と比較して感染性粒子産生能が低下した変異体に関して、分泌型ルチフェラーゼを含まないウイルスを用いて, RNA 複製能と感染性粒子産生能を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より

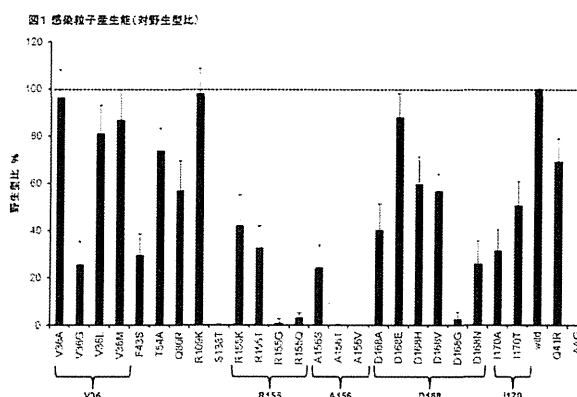
機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行う。

C. 研究結果

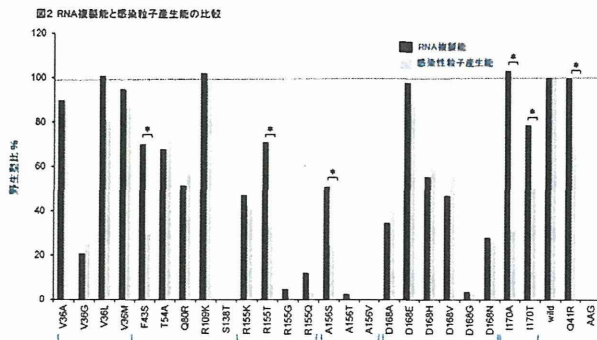
1) FFU assayにて測定した各変異体ウイルスの感染性粒子産生能を測定し、野生型との比較を行った。その結果、V36A/L/M, Q41R, R109K, D168E, I170A に関しては野生型と同等の感染性粒子産生能を示したが、他の大部分の変異体ウイルスは、野生型に比べて低い感染性粒子産生能を示した(図1)。

2) 各変異体ウイルスのRNA複製能と感染性



粒子産生能を比較した。その結果大部分の変異体ウイルスではRNA複製能と感染性粒子産生能は相関した。しかしながら、6つの変異体、Q41R, F43S, R155T, A156S, I170A/Tに関しては、感染性粒子産生能は有意にRNA複製能に比べて低下した(図2)。

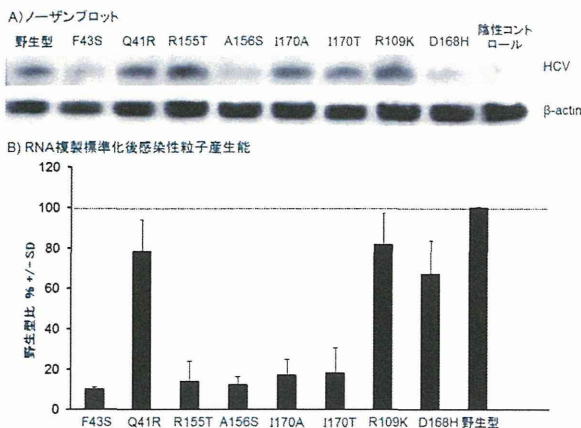
3) RNA複製能に比べて有意に感染性粒子産



生能の低下を認めた6つの変異体ウイルスに関して、分泌型ルチフェラーゼを含まない変異体ウイルスを用いて、ノーザンブロットにてRNA複製能を評価して、RNA量にて同時に測定した感染性粒子産生能を標準化後比較した。その結果図2同様に6つの変異体ウイルス、Q41R, F43S, R155T, A156S, I170A/Tに関しては、感染性粒子産生能は有意にRNA複製能に比べて低下した(図3)。

D. 考察

図3 RNA複製能と感染性粒子産生能の比較(RNA複製能標準化後)



臨床的にbreakthrough肝炎を発症し、NS3/4A阻害剤耐性ウイルスが出現しても、治療終了後自然消失し、野生型が優位になることが知られている。大部分のNS3/4A阻害剤耐性ウイルスのRNA複製能と感染性粒子産生能は野生型より低いという今回の培

養細胞系を用いた検討は、この臨床的知見に合致するものであった。

従来、HCVのNS3プロテアーゼ領域は、HCVのRNA複製において重要な役割を果たすが、感染性粒子産生能に関わるかどうかは不明であった。今回のNS3阻害剤耐性ウイルスを用いた解析からは、NS3プロテアーゼ領域の阻害剤耐性変異の一部は、感染性粒子産生にも関わることを示唆された。

E. 結論

- 1) NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤耐性変異体ウイルスは、野生型のRNA複製能や感染性粒子産生能を上回ることはなく、大部分は、野生型より低いRNA複製能や感染性粒子産生能を示した。
- 2) NS3のプロテアーゼ領域は、従来認識されていたようにRNA複製に関わるのみではなく、感染性粒子産生にも関わることを明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology (in press)
- 2) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-