

201228013A

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス
感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス
感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成25(2013)年3月

ツパイ全ゲノム解析に基づく B 型肝炎ウイルス

感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

研究組織

<u>研究代表者</u>		
小原 道法	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・感染制御プロジェクト	プロジェクトリーダー
<u>研究分担者</u>		
保富 康宏	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	センター長
小原 恭子	国立大学法人鹿児島大学・越境性動物疾病制御研究センター	教授
石井 健	独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・アジュバント開発プロジェクト	プロジェクトリーダー
押海 裕之	国立大学法人北海道大学・大学院医学研究科	講師
村上 周子	公立大学法人名古屋市立大学・大学院医学研究科	助教
原島 秀吉	国立大学法人北海道大学・大学院薬学研究院	教授

目次

I. 総括研究報告

ツパイ全ゲノム解析に基づく B 型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

小原 道法1

II. 分担研究報告

1. ツパイ全ゲノムの解析、免疫学的解析系の確立、治療薬を用いた動物モデルの評価
小原 道法9

2. HBV 高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析
保富康宏14

3. ツパイ免疫学的解析系の確立、感染・発症評価系の改良、効率の良い HBV-ツパイ感染実験モデルの確立
小原恭子19

4. ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価
石井 健23

5. ツパイ全ゲノム解析に基づく B 型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究
押海裕之26

6. ツパイ高感染性 HBV の馴化・選択
村上周子29

7. B 型肝炎ツパイ肝臓を標的としたリポゾーム型核酸送達システムの開発
原島秀吉32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表37

IV. 研究成果の刊行物・別刷43

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

総括研究報告書

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの
開発に関する研究

研究代表者：小原 道法 東京都医学総合研究所
感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっているが、有効な治療法は確立されていない。これまで、HBV感染感受性を示すモデル動物としては、チンパンジーのみが知られていたが、近年、ヒトの肝臓細胞を持つ免疫不全マウスが開発され、HBV研究の様々な領域で威力を発揮している。しかし、このマウスは獲得免疫系が機能しておらず、ウイルスの病原性解析や治療効果の判定に用いることはできない。

これに対しかつて原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）が、HBVと同様の宿主特異性を示すC型肝炎ウイルス（HCV）に感染し1～3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症することを見出した（JV 2010）。また、ツパイ由来の初代肝細胞ならびに個体レベルのツパイもHBV感染感受性を示すことが報告されている。ツパイはラット程度の小型動物で、性成熟期は約半年・寿命も4-7年と短く、短期間で結果を得ることができる。そのためツパイは、HCVならびにHBV研究分野において、チンパンジーに代わる優れた感染実験動物モデルとして期待されている（The turn of the shrew. Nature 2011）。しかし、ツパイの実験動物としての研究は進んでおらず、HBV感染動態や治療効果を解析する上で不可欠な免疫系に関する知見もほとんど得られていない。

そこで本研究では、ツパイの全ゲノムを解析し、この配列情報を基にcDNAクローニング、抗体作製を進めることで、短期間にツパイ免疫系の解析ツールを樹立する。さらに、より効率・感度の高い動物実験モデルの確立を目指し、ツパイ馴化HBV株とHBV高感受性ツパイ系統を樹立することで、ウイルス・宿主の両面からHBV-ツパイ感染実験系を改良する。これらの実験を通じて、正常な免疫機能を持つツパイをHBV感染モデル動物として確立する。

研究分担者：

保富康宏：独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター センター長

小原恭子：鹿児島大学・共同獣医学部 教授

石井健：（独）医薬基盤研究所・アジュバント開発プロジェクトリーダー

押海裕之：北海道大学・大学院医学研究

科 講師

村上周子：名古屋市立大学・大学院医学研究科 特任助教

原島秀吉：北海道大学・大学院薬学研究 院 教授

A. 研究目的

HBV感染を防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な実験動物モデルが必要であるが、

これまでに感染感受性が報告された動物モデルはチンパンジーのみである。しかしチンパンジーは、動物愛護の観点から、実験動物としての使用が制限されており、安楽殺が禁止されているため実験終了後も飼育が必要である。以上の点から、チンパンジーに代わる実験動物モデルの確立が急務となっている。

原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）にHCVが感染する事を見いだし報告してきた。ツパイは中国・雲南省原産とされ、ラット程度の大きさで寿命は4-7年である。HCVがツパイに感染すると1~3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事を確認しており（JV 2010）、飼育コストも低い事からチンパンジーに変わる感染実験動物モデルとして期待されている（The turn of the shrew. Nature 2011）。また、HBVのツパイ初代肝臓細胞における増殖効率はヒト初代肝細胞のそれに匹敵し、個体としてのツパイもHBVに感受性である事が報告されている（Hepatology 1996）。

その一方で、ツパイを実験動物とする医学的研究はほとんど行われていないため、ウイルス感染動態の解析ならびに治療効果の評価を行う上で不可欠な免疫系に関する知見は、ほとんど得られてない。このように、ツパイはHBV感染実験モデルとして高いポテンシャルを持つが、実際の応用には、ツパイの免疫系ならびにHBV感染に対する免疫応答の解明と、効率の良いHBV感染の成立と、安定的な発症を可能とするためのHBV-ツパイ感染実験系の改良が必要である。

B. 研究方法

研究代表者（小原道法）

本研究では、①次世代シーケンズを用いてツパイの全ゲノム解析し、②この情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定と、③その応答解析に必要な実験ツール（免疫系宿主因子の cDNA や特異抗体など）を調製した上で、④HBV 感染ツパイの免疫応答を解

析する。さらに、⑤より効率の良いHBV 感染法（母子感染等）と感染・発症評価系を検討しながら、その一方で、⑥ツパイ馴化HBV 株と、⑦HBV 高感受性ツパイ系統を各々樹立し、両者を組み合わせることで、⑧HBV 感染ツパイが、慢性肝炎や肝がんをより高頻度に発症する実験条件を確立する。さらに、上記で確立した免疫学的解析手法と HBV-ツパイ感染実験系を用いて、⑨抗ウイルス活性を持つ化合物や治療ワクチンなどの効果を見ることで動物モデルとしての資質を評価し、⑩前臨床試験への応用へとつなげる。

研究分担者（保富康宏）

(1) 特殊ケージの作製

ツパイは希少な原猿類であるためにその生体に応じた特殊ケージの作製を試みた。

(2) ウイルス株の選定

持続感染を示す動物モデルの作製のためにヒト血漿中に高い力価で持続感染を示す、ウイルス株の選定を行った。

(3) 繁殖計画の作製

雌 20 匹と雄 10 匹を中国より輸入することとし、それによる垂直感染モデルの作製計画を樹立した。

研究分担者（小原恭子）

ツパイの飼育、繁殖、感染実験に必要な実験用設備の整備を行った。また、ツパイのゲノム DNA を肝臓などの組織から分離し、次世代シーケンサーで全ゲノム配列の決定を行った。独自のコンピューターソフトを利用して免疫反応に重要な分子の ORF 配列を 100 種以上決定し、この中で抗原性の高いアミノ酸配列を抽出して合成ペプチドを作成し、ウサギに免疫して特異的なポリクローナル抗体の作成を進めた。

研究分担者（石井健）

上記ゲノム配列から得られた情報から、ツパイの免疫反応を制御する遺伝子群の解析を試みる。まず、

- (1) ツパイ自然免疫関連遺伝子のクローニング
- (2) 同上遺伝子群の発現系の構築、蛋白の発現、抽出、精製の準備
- (3) ヒト、マウスとのオルソログの遺伝子発現実験にてその機能比較試験をするための準備

研究分担者（押海裕之）

リン酸化した TBK1 分子に特異的な抗体を用い、TBK1 の活性化状態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。使用した細胞は、ヒトの細胞としては、HeLa 細胞や肝実質細胞由来の HuH7 や HepG2 細胞を使用し、マウス細胞としては、Raw 細胞や L929 細胞に加え、マウス肝臓より新たに株化した細胞を使用した。

Lup1e 遺伝子を、ヒト細胞よりクローニングし、p125luc レポータープラスミドや NF- κ B レポータープラスミドを用いシグナル活性化機構を解析した。HBV としては全ゲノムをコードしたプラスミドを使用し、HepG2 細胞へ形質導入することで細胞に感染粒子を形成させ解析を行った。

研究分担者（村上周子）

ツパイへの HBV 感染源の作成、およびツパイにおける HBV 感染の評価系の確立について検討を行う。

- (1) HBV 接種後の感染評価において、実験動物より経時的に採取可能な血液量は限られており、極めて少量である。そこで、微量の血清による HBV 感染評価系を検討した。
- (2) 旧世界サルに感染するギボン HBV 感染血清からウイルス DNA を抽出し、ウイルス遺伝子分子系統解析を行った。
- (3) ギボン由来 HBV をキメラマウスに接種し、感染を試みた。

研究分担者（原島秀吉）

ツパイ肝臓へ核酸医薬を送達するリ送達システムの開発を最終目的として、多機能

性エンベロープ型ナノ構造体 MEND (Multifunctional envelope-type nano device) による siRNA のマウス肝臓への送達とヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染ヒト肝臓キメラマウスにおける治療への応用を試みた。

新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を独自に設計・合成し、YSK05 を MEND の脂質膜に含む YSK05-MEND への siRNA の効率的封入法を構築した。次に標的遺伝子として第 7 因子に対する siRNA を封入した YSK05-MEND を、健康マウスへ静脈内投与し、血清第 7 因子タンパク質量からノックダウン活性を評価し、YSK05-MEND の脂質組成などの最適化を計った。蛍光標識 siRNA を封入した YSK05-MEND を投与し、肝臓における YSK05-MEND の送達性を評価した。さらに、YSK05-MEND に小原博士（研究代表者）らが見出した HCV に対する高効率 siRNA を封入し、HCV トランジェニックマウス、また HCV を感染させたヒト肝臓キメラマウスへ静脈内投与し、治療効果について検討した。

（倫理面への配慮）

患者由来の組織や血清の使用に当たっては各研究機関の倫理委員会において承認を受ける。提供者には「インフォームド・コンセント」を書面で行う。動物の管理は法律に従って行い、各研究機関の動物実験委員会の承認を得る。

C. 研究結果

研究代表者（小原道法）

(1) 次世代シーケンズを用いてツパイの全ゲノム解析し、95%とほぼすべての遺伝子を解析することに成功した。

(2) ツパイの全ゲノム解析情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定をすすめ、CD81, SR-B1, Claudin1, Ocudin, STAT1, STAT3 などのヒト遺伝子と 90%以上相同性の高い

分子と TLR1, -2, -3, IRF1, -2, -3 等のヒトとは 70-90%と中程度の相同性のものと、IL1, IL6, IFN-a, -b 等のように 70%以下と低い相同性の分子群の 3 群に分かれた。これらの解析から、ツパイはマウスよりもほとんどの分子の配列がヒトに近い事が明らかとなった。また、IL-29 の様にヒトにあってマウスにない分子をツパイは持っていた。

(3) 免疫応答系解析に必要な実験ツールを作製するために、免疫系宿主因子の特異抗体ライブラリーを作製した。本年度は 85 種類の免疫関連分子を選択し、それぞれ 2 カ所の細胞外ドメインで免疫抗原最適候補領域を探索した。この領域をペプチド合成し、それぞれ 2羽のウサギに免疫し抗血清を得た。さらに、ペプチドカラムでアフィニティー精製を行った。

研究分担者 (保富康宏)

(1) ケージの作製

ツパイ専用ケージは当センターの経験と特色を生かし、ツパイの生体に適するものを作製した。新世界ザルのケージを基本とし、ツパイが閉所を好み閉所で出産することから一部に小箱を置く形とした。また、ツパイは前肢で物をつかむ能力が低いことから浅い皿用の餌箱を作製した。

(2) ウイルス株の選定

ヒト血漿中に高力価で長期間認められたウイルスが認められた血漿をヒト肝細胞移植キメラマウスに接種し、高力価のものを選別した。その結果 15 検体の候補から Genotype A のものを 1 株用いることとし、クローニングを開始した。

(3) 繁殖計画の策定

雌 20、雄 10 頭の繁殖ペアを作製し、新生ザルに感染をさせ、ウイルス力価の高いものを高感受性ペアとしてコロニー化することとした (図 1)。また、感染個体においても繁殖を行い、垂直感染系の樹立を検討することとした (図 2)。

研究分担者 (小原恭子)

ツパイの飼育・繁殖・感染実験に必要な飼育棚やアイソレーター、ケージなどを受注して飼育環境を整えた。また、実験に必要な動物実験等の承認申請も進めた。

ツパイ全ゲノム解析も進め、55%以上が終了した。ゲノム配列に基づく免疫関連分子 (TLR, CD マーカー、サイトカイン、ケモカインなど) の ORF 配列をヒト、マウス間で相同性を比較すると、ツパイはマウスよりもほとんどの分子の配列がヒトに近い事が明らかとなった。また、IL-29 の様にヒトにあってマウスにない分子をツパイは持っていた。

また、ヒトとマウスで機能が異なる事が知られている TLR9 のツパイ由来遺伝子をクローニングし、本班の研究分担者 石井教授とともに解析の準備を進めた。

研究分担者 (石井健)

本年度はツパイの自然免疫関連の遺伝子の選定、クローニング、蛋白発現系の構築を目標とした。小原恭子先生のご協力の下、ツパイ TLR9 の約 3000 塩基の配列を同定、3 つのフラグメントに分けクローニングを行い、蛋白発現系の構築に成功した。また、TLR7 等ほかの自然免疫遺伝子群のクローニング、発現系実験の準備を開始した。

その他の成果として、B 型肝炎予防、治療に向けた新たな免疫療法の可能性を持つ、免疫制御物質、アジュバントのスクリーニングを開始した。

研究分担者 (押海裕之)

HBV 感染時の自然免疫応答のメカニズムはヒトに於いてもまだ十分に解明されていない。ウイルスの DNA による I 型インターフェロン産生には、TBK1 分子のリン酸化による活性化が必須である。まず、TBK1 のリン酸化を指標に研究を進めたところ、TBK1 活性化の様式が、ヒト細胞とマウス細胞で異なることを発見した。特に、ヒト

肝細胞に於いては、ミトコンドリア外膜上に存在する IPS-1 が重要な役割を果たすのに対し、マウス肝細胞に於いては、小胞体上に存在する STING 分子が重要であった。これは HBV 感染時の自然免疫応答には種特異性があることを示唆している。

また、HBV 感染時の自然免疫応答に関する新規分子として Luple と名付けた新規 DNA ヘリケース分子を同定した。Luple はウイルス感染時には、主に細胞質内に局在することを共焦点顕微鏡による観察により明らかになった。また、N 末端領域に存在するアンキリンリピート部位が、NF- κ B 活性化を誘導する領域であることを発見した。ウイルス感染実験からは、Luple は I 型インターフェロン産生には関与せず、主に、IL-6 の産生を誘導することを発見した。IL-6 は HBV の排除に働くことが報告されている。

TLR3 分子はこれまで RNA ウイルスのみならず DNA をゲノムに持つ DNA ウイルス感染時の自然免疫応答に非常に重要な働きをすることが知られている。TLR3 のアダプター分子である TICAM-1 のノックアウトマウスを使用し、ウイルス感染時の自然免疫応答に重要な樹状細胞によるクロスプレゼンテーションに、TLR3-TICAM-1 経路が非常に重要であることを証明した。これは、HBV 感染時の CTL 誘導やそれによる肝炎発症のメカニズムの解明、さらに、ワクチン開発に繋がることを期待される。

ウイルス由来の RNA を認識する RIG-I 分子は、ユビキチン化を受け活性化する。我々が発見した Riplet ユビキチンライゲースは RIG-I 分子をユビキチン化することをこれまでに発見していたが、あらたに、Riplet により RIG-I のリプレッサー部位が K63 鎖を介したポリユビキチン化を受け、これが、RIG-I 依存的な I 型インターフェロン産生に必須であることを解明した。これは、HBV 由来の RNA が宿主自然免疫を活性化するかどうかの検討を行う上での重要な知見となる。

研究分担者（村上周子）

- 1) HBV-DNA の定量は、血清 5 μ l より DNA を抽出し、高感度リアルタイム PCR により測定が可能となった。HBs 抗原、HBcr 抗原なども高感度測定系を確立し、AST、ALT、アルブミン等の生化学的評価は、それぞれ約 2 μ l の血清を希釈して測定することが可能であることを確認した。
- 2) ギボン HBV は、ウイルス遺伝子分子系統解析の結果、S 領域において、ヒト HBV 遺伝子型 J に近いことが示された。
- 3) 血清中 HBV-DNA、HBs 抗原、HBcr 抗原および肝細胞内 cccDNA を検出した。キメラマウス血清より抽出した HBV-DNA 配列は、接種したギボン HBV-DNA 配列と同一であった。以上のことから、ギボン HBV はヒトに感染しうるということが明らかとなった。

研究分担者（原島秀吉）

(1) YSK05-MEND の最適化と健常マウス肝臓におけるノックダウン評価:

脂質の種類や組成比を検討した。その結果、健常マウスへ静脈内投与後に血清第 7 因子量を指標にノックダウン活性を評価したところ、50% 抑制可能な投与量 (ED₅₀) が、0.06 mg/kg で、最適化前 1.0mg/kg から 10 倍以上活性を向上させることに成功した。また、蛍光標識 siRNA の分布を肝臓切片で観察した結果、YSK05-MEND により肝実質細胞に広く siRNA が送達されている様子が観察された。

(2) HCV 治療への応用:

In vivo 肝臓において高いノックダウン活性を示す最適化 YSK05-MEND に、小原博士（研究代表者）らが見出した、HCV に対する高効率 siRNA を封入した。小原らによって樹立された Cre/lox/HCV-MxCre トランスジェニックマウスによる慢性肝炎発症モデルに対して静脈内投与 (1 mg siRNA /kg) 後、肝臓切片を作成し観察したところ、非治療群で観察されて

いたリンパ球等の炎症細胞の浸潤し慢性肝炎の症状が抑制され、正常化している様子が観察された。さらに HCV を感染させ6週間を経たヒト肝臓キメラマウスへ YSK05-MEND (1mg/kg×2回) を静脈内投与したところ、投与後2週間まで、血中の HCV mRNA 量の抑制が持続していることを確認した。

D. 考察

本年度は計画通りに研究を実施した。得られた結果をさらに発展させ以下の研究を進める。

研究代表者 (小原道法)

ゲノム解析の遺伝子情報からツパイはマウスよりもヒトに近い事が推測された。本研究を遂行することで、免疫機能が正常でチンパンジーに比較して取扱いも容易なツパイを、HBVの感染から発症に至るまでのトータルな免疫学的変化を解析可能な小型実験モデルとして確立することができると思える。

研究分担者 (保富康宏)

HBV 感染制圧において必要な命題となるのはウイルスを制御する免疫系の機構解明とそれに基づく予後の予測、治療法の確立である。それには免疫系が確立されている動物モデルを用いる必要がある。本研究では正常の免疫系を持つ動物であるツパイを用いることで、従来までの免疫不全マウスを用いる系を凌駕するモデルとなり得ると考えられた。

肝細胞に感染し HBV と同じく肝炎を誘発する HCV において、HCV 肝炎モデルを模倣するものとしてマーモセットを用いた HCV と近縁ウイルスである GBV のモデルが存在する。近年このモデルの有用性が検討されてきた。しかしながらウイルス自身が近縁とされるのみで他種であること、また、マーモセットの個体間において病態に大きな違いがあることからモデル動物としての

広がりはない。本研究では本来の感染病原体である HBV を用い、持続感染する実験動物をコロニーとして作製するというものを行っており、今後大きく期待できるものとなっている。

以上の事から本研究では世界で初めて HBV 病原体ならびに高感受性感染動物モデルの作製を行う先進的な研究であると考えられた。

研究分担者 (小原恭子)

ツパイはかつて原始的な霊長類に分類されていたが、現在は分離されツパイ科ツパイ目に分類されている。ゲノム解析の遺伝子情報からもツパイはマウスよりもヒトに近い事が推測された。

研究分担者 (石井健)

TLR9 遺伝子は全長が長く、クローニング、発現系、蛋白精製も含め非常にチャレンジングであるが、初年度中に今後のマウス、ヒトとの比較実験にめどがついたことは良いスタートが切れたと考えている。

研究分担者 (押海裕之)

DNA をゲノムに持つ DNA ウイルス感染時の自然免疫応答で主要な役割を持つ TBK1 分子の活性化を指標に研究を進めたところ、TBK1 の活性化機構には種特異性があり、ヒトとマウスに於いて異なっていることが示唆された。今後、ツパイとヒト、マウスを比較することで、ツパイの自然免疫システムがヒト型かどうかの検証をすることで、ツパイを用いた小型動物モデルの有用性を評価できると期待される。

我々が同定した Luple 分子は、自然免疫で働き、DNA ウイルス感染時の IL-6 産生に関与する。IL-6 は HBV の排除に働くことが示唆されており、Luple 分子が新たな治療薬の標的の候補分子の一つになりうると期待される。

研究分担者 (村上周子)

微量血清サンプルにおける HBV 感染評価系は、約 15 μ l の血清サンプル量で評価に必要な HBV-DNA 測定および生化学検査が可能である。

ギボン HBV からヒト肝細胞キメラマウスへの異種間感染が成立することを確認した。ツパイは進化学的にヒトよりもギボンに近いことから、ギボン由来の HBV はツパイに感染する可能性が示唆された。今後、ツパイに HBV を感染させた肝炎モデルを確立し、HBV 遺伝子型や各種変異体における感染効率の違い、HBV に起因する肝線維化や肝発癌メカニズムの解析、さらには新規抗ウイルス薬のスクリーニングなどへの応用を検討したい。

E. 研究分担者（原島秀吉）

脂質組成の最適化により健常マウス肝臓におけるノックダウン活性が ED50 を指標に 0.06 mg/kg を示す YSK05-MEND を構築することに成功した。これは、世界で最も強力な siRNA キャリアである pH 応答性リポソーム（Lipid nanoparticle; LNP）のノックダウン活性（0.02mg/kg; Semple SC, et al. *Nat. Biotech.*, 28, 172-, 2010）に近い値を示しており、YSK05-MEND は強力なノックダウン活性を有することを示唆している。これらの結果は、YSK05-MEND が HBV に対する核酸医薬の送達にも有用であることを示唆している。またヒト肝臓と類似構造を有するヒト肝臓キメラマウスにおいて HCV 抑制効果が認められたことは、YSK05-MEND がヒト肝臓において有用である可能性を示している。今後はツパイ肝臓への核酸送達に向け、YSK05-MEND のツパイにおける有用性の評価が課題である。

E. 結論

HBV そのものを用いた感染動物モデルの作製であり、HBV 制圧に大きく貢献すると考えられた。さらに、ツパイ馴化ウイル

ス株とウイルス高感受性ツパイ系統の樹立などを通じて、HBV-ツパイ感染実験系の精度を高め、ウイルスの病原性や種々の治療法の効果を、より効率よく詳細に解析できる様にしていく。ツパイは、チンパンジーよりも小型で寿命が短く、マウスよりもヒトに近い遺伝情報を持っており、今後 HBV 研究並びに各種治療薬の効果判定に威力を発揮する可能性が期待できる。

また、新規 pH 応答性脂質 YSK05 を含む YSK05-MEND は、最適化によりマウス肝臓で従来より 10 倍以上高いノックダウン活性を示した。ツパイ肝臓への核酸医薬の導入に効果を発揮することが期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究報告書を参照

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

（1）出願日：平成24年12月12日、出願番号：特願2012-270987

発明の名称：肝線維症の予防または治療剤
発明者：公益財団法人東京都医学総合研究所；小原道法、株式会社PRISM Pharma；小田上剛直、小路弘行

出願人：公益財団法人東京都医学総合研究所、株式会社 PRISM Pharma

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

分担研究報告書

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの

開発に関する研究

ツパイ全ゲノムの解析、免疫学的解析系の確立、治療薬を用いた動物モデルの評価

小原 道法 東京都医学総合研究所

感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっているが、有効な治療法は確立されていない。これまで、HBV感染感受性を示すモデル動物としては、チンパンジーのみが知られていたが、近年、ヒトの肝臓細胞を持つ免疫不全マウスが開発され、HBV研究の様々な領域で威力を発揮している。しかし、このマウスは獲得免疫系が機能しておらず、ウイルスの病原性解析や治療効果の判定に用いることはできない。

これに対し、かつて原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）が、HBVと同様の宿主特異性を示すC型肝炎ウイルス（HCV）に感染し1～3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症することを見出した（JV 2010）。また、ツパイ由来の初代肝細胞ならびに個体レベルのツパイもHBV感染感受性を示すことが報告されている。ツパイはラット程度の小型動物で、性成熟期は約半年・寿命も4-7年と短く、短期間で結果を得ることができる。そのためツパイは、HCVならびにHBV研究分野において、チンパンジーに代わる優れた感染実験動物モデルとして期待されている（The turn of the shrew. Nature 2011）。しかし、ツパイの実験動物としての研究は進んでおらず、HBV感染動態や治療効果を解析する上で不可欠な免疫系に関する知見もほとんど得られていない。

そこで本研究では、ツパイの全ゲノムを解析し、この配列情報を基にcDNAクローニング、抗体作製を進めることで、短期間にツパイ免疫系の解析ツールを樹立する。さらに、より効率・感度の高い動物実験モデルの確立を目指し、ツパイ馴化HBV株とHBV高感受性ツパイ系統を樹立することで、ウイルス・宿主の両面からHBV-ツパイ感染実験系を改良する。これらの実験を通じて、正常な免疫機能を持つツパイをHBV感染モデル動物として確立する。

A. 研究目的

HBV感染を防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な実験動物モデルが必要であるが、これまでに感染感受性が報告された動物モデルはチンパンジーのみである。しかしチンパンジーは、動物愛護の観点から、実験動物としての使用が制限されており、安楽殺が禁止されているため実験終了後も飼育

が必要である。以上の点から、チンパンジーに代わる実験動物モデルの確立が急務となっている。

原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）にHCVが感染する事を見いだして報告してきた。ツパイは中国・雲南省原産とされ、ラット程度の大きさで寿命は4-7年である。HCVがツパイに感染すると1～3

年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事を確認しており (JV 2010)、飼育コストも低い事からチンパンジーに変わる感染実験動物モデルとして期待されている (The turn of the shrew. Nature 2011)。また、HBVのツパイ初代肝臓細胞における増殖効率はヒト初代肝細胞のそれに匹敵し、個体としてのツパイもHBVに感受性である事が報告されている (Hepatology 1996)。

その一方で、ツパイを実験動物とする医学的研究はほとんど行われていないため、ウイルス感染動態の解析ならびに治療効果の評価を行う上で不可欠な免疫系に関する知見は、ほとんど得られてない。このように、ツパイはHBV感染実験モデルとして高いポテンシャルを持つが、実際の応用には、ツパイの免疫系ならびにHBV感染に対する免疫応答の解明と、効率の良いHBV感染の成立と、安定的な発症を可能とするためのHBV-ツパイ感染実験系の改良が必要である。

B. 研究方法

本研究では、①次世代シーケンスを用いてツパイの全ゲノム解析し、②この情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定と、③その応答解析に必要な実験ツール (免疫系宿主因子のcDNAや特異抗体など) を調製した上で、④HBV感染ツパイの免疫応答を解析する。さらに、さらに、確立した免疫学的解析手法とHBV-ツパイ感染実験系を用いて、⑤抗ウイルス活性を持つ化合物や治療ワクチンなどの効果を見ることで動物モデルとしての資質を評価する。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 次世代シーケンスを用いてツパイの

全ゲノム解析し、95%とほぼすべての遺伝子を解析することに成功した。

2. ツパイの全ゲノム解析情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定をすすめ、CD81, SR-B1, Claudin1, Ocudin, STAT1, STAT3などのヒト遺伝子と90%以上相同性の高い分子とTLR1, -2, -3, IRF1, -2, -3等のヒトとは70-90%と中程度の相同性のものと、IL1, IL6, IFN- α , - β 等のように70%以下と低い相同性の分子群の3群に分かれた。これらの解析から、ツパイはマウスよりもほとんどの分子の配列がヒトに近い事が明らかとなった。また、IL-29の様ヒトにあってマウスにない分子をツパイは持っていた。

3. 免疫応答系解析に必要な実験ツールを作製するために、免疫系宿主因子の特異抗体ライブラリーを作製した。本年度は85種類の免疫関連分子を選択し、それぞれ2カ所の細胞外ドメインで免疫抗原最適候補領域を探索した。この領域をペプチド合成し、それぞれ2羽のウサギに免疫し抗血清を得た。さらに、ペプチドカラムでアフィニティー精製を行った。

D. 考察

ゲノム解析の遺伝子情報からツパイはマウスよりもヒトに近い事が推測された。本研究を遂行することで、免疫機能が正常でチンパンジーに比較して取扱いも容易なツパイを、HBVの感染から発症に至るまでのトータルな免疫学的変化を解析可能な小型実験モデルとして確立できると考える。

E. 結論

さらに、ツパイ馴化ウイルス株とウイルス高感受性ツパイ系統の樹立などを通じて、HBV-ツパイ感染実験系の精度を高め、ウイルスの病原性や種々の治療法の効果を、より効率よく詳細に解析できる様にしていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shin-ichiro Nakagawa, Yuichi Hirata, Takeshi Kameyama, Yuko Tokunaga, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Kazuaki Inoue, Akinori Takaoka and Michinori Kohara. Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. PLoSONE(2013) in press.

2) Tsunamasa Watanabe, Fuminaka Sugauchi, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Hiroshi Yatsuhashi, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Etsuko Iio, Masaya Sugiyama, Takashi Shimada, Masakazu Kakuni, Michinori Kohara, Masashi Mizokami. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut (2012) in press.

3) Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. J. Med. Virol. 85:241-249 (2013).

4) Tsunamasa Watanabe, Fuminaka Sugauchi, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Hiroshi Yatsuhashi, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Etsuko Iio, Masaya Sugiyama, Takashi Shimada, Masakazu Kakuni, Michinori Kohara, Masashi Mizokami. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut (2012) in press.

5) Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. Virus Res. 163: 405-409 (2012).

6) Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol. 84:733-746 (2012).

7) Leiyun Weng; Michinori Kohara; Takaji Wakita; Kunitada Shimotohno; Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. Gene 496:79-87 (2012).

8) Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. Sci. Comm. 2: 259:1-9 (2012).

9) Naoko Kubota, Yasutaka Inayoshi, Naoko Satoh, Takashi Fukuda, Kenta Iwai, Hiroshi Tomoda, Michinori Kohara, Kazuhiro Kataoka, Akira Shimamoto, Yasuhiro Furuichi, Akio Nomoto, Akira Naganuma and Shusuke Kuge. HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. FEBS letter 30:586(16):2318-2325 (2012).

10) Qiang Wang, Shijian Zhang, Hongbing Jiang, Jinalan Wang, Leiyun, Weng, Yingying Mao, Satoshi Sekiguchi, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Philippe Buchy, Vincent Deubel, Ke Xu, Bing Sun and Tetsuya Toyoda. PA from an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus activates viral transcription and replication, and induces apoptosis and interferon expression. Virology Journal 8;9:106-118 (2012).

11) Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi

Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS Pathog.* 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).

12) Jun Aoki, Yuka Kowazaki, Takahiro Ohtsuki, Rumiko Okamoto, Kazuteru Ohashi, Seishu Hayashi, Hisashi Sakamaki, Michinori Kohara and Kiminori Kimura. Kinetics of Peripheral Hepatitis B Virus-specific CD8+ T Cells in Patients with Onset of Viral Reactivation. *J. Gastroenterology* (2012) in press.

13) Leiyun Weng, Xiao Tian, Yayi Gao, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1820(12):1886-92 (2012).

14) Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshihara and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 428(4):494-499 (2012).

15) Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE* 7(12):e51656 (2012).

2. 学会発表

1) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The International Liver Congress 2012. 4. 18-22 Barcelona (SPAIN)

2) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in C cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012. 9. 11-14. 兵庫

3) 小原恭子, 佐藤正明, 小原道法: C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子BGT-1. 第71回日本癌学会学術総会 2012. 9. 19-21. 札幌

4) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012. 10. 4-11. Venice (Italy)

5) Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T., Tokunaga Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the Hepatitis C Virus suppresses viral protein level in mouse liver. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012. 10. 4-11. Venice (Italy)

6) Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Itoh Y., Ogasawara K., Kohara M.: Development of recombinant H5N1 influenza vaccine based on vaccinia virus vector. 6th Vaccine & ISV Congress 2012. 10. 14-16. Shanghai (China)

7) 平田雄一, 池田和貴, 須藤正幸, 徳永優子, 田口良, 小原道法: C型肝炎ウイルスによるスフィンゴ脂質の合成促進とウイルス複製環境の構築. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012. 11. 13-5. グランキューブ大阪 (大阪)

8) 斎藤誠, 飛田良美, 棟方翼, 伊藤利紗, 菅裕明, 佐々木亨, 窪田規一, 小澤真, 小原恭子, 小原道法: 新世代抗体医薬としての特殊環状ペプチドによるインフルエンザウイルス増殖阻害効果. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012. 11. 13-5. グランキューブ大阪 (大阪)

9) 小原道法, 大槻貴博, 徳永優子, 木村公

則：HCV感染による慢性肝炎の病態形成
と治療ワクチン 第16回
日本ワクチン学会学術集会 2012.11.17-18.
パシフィコ横浜

なし

10) Yasui F., Munekata K., Itoh Y.,
Sakoda Y., Kida H., Ogasawara K., Kohara
M.: Single immunization with H5N1
influenza vaccine based on recombinant
vaccinia virus protects mice and macaques
from challenge with H5N1 influenza virus.
第41回日本免疫学会学術集会 2012.12.5-7.
神戸国際会議場 (神戸)

3. その他

なし

11) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M.,
Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R.,
Kohara M.: Self-enhancement of hepatitis
C Virus replication by promotion of
specific sphingolipid biosynthesis. 第35
回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14.
福岡国際会議場 (福岡)

12) Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T.,
Tokunaga Y., Kohara M.: Immunization
with a recombinant vaccinia virus
encoding a nonstructural protein of the
hepatitis C virus ameliorates chronic
hepatitis in the liver of transgenic mice.
Keystone Symposia on Molecular and
Cellular Biology 2012.12.13-18. Ottawa
(Canada)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1) 出願日：平成24年12月12日、出願番

号：特願2012-270987

発明の名称：肝線維症の予防または治療剤

発明者：公益財団法人東京都医学総合研究
所；小原道法、株式会社PRISM Pharma；小
田上剛直、小路弘行

出願人：公益財団法人東京都医学総合研究
所、株式会社 PRISM Pharma

2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

HBV高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は難治性の疾患であり、有効な治療法も現在のところ確立されていない。HBVのこれらの問題を解決するためには有効な動物モデルの存在が必要であり、現時点ではヒト肝細胞を持つ免疫不全マウスが唯一のモデルとして用いられている。HBV感染症のような長期にわたる疾患においては宿主の免疫系が病態や予後を知るうえで重要であるがマウスモデルではこれら免疫系の解析には不適である。本研究ではHBVの持続感染を示すことが報告されているツパイ（ツパイ科ツパイ目）を用いてHBVの感染動態や病態についての解析を行うことを目的に、HBV高感受性ツパイコロニーの作製とその個体における免疫学的な解析を行うことを目的として研究を開始した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）はヒト肝臓における難治性疾患を起こす病原体であり、有効な治療法は確立されていない。また、HBV感染症における病態や予後には宿主の免疫系が大きくかかわっていることが知られているが、ヒト肝細胞をもつ免疫不全マウスモデル以外の動物モデルが無く、免疫学的な治療法をも含めて有用な動物モデルの開発が必要である。本研究ではHBVの持続感染を示すことが報告されているツパイ（ツパイ科ツパイ目）を用いてHBVの感染動態や病態についての解析を行うことを目的とした。本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発へ道を開き、国民の健康増進につながると共に、肝障害の低下に伴う医療費削減を介して行政

への貢献も可能であると考えられる。

B. 研究方法

(1) 特殊ケージの作製

ツパイは希少な原猿類であるためにその生体に応じた特殊ケージの作製を試みた。

(2) ウイルス株の選定

持続感染を示す動物モデルの作製のためにヒト血漿中に高い力価で持続感染を示す、ウイルス株の選定を行った。

(3) 繁殖計画の作製

雌 20 匹と雄 10 匹を中国より輸入することとし、それによる垂直感染モデルの作製計画を樹立した。

（倫理面への配慮）

本研究では動物実験申請等の必要な委員

会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) ケージの作製

ツパイ専用ケージは当センターの経験と特色を生かし、ツパイの生体に適するものを作製した。新世界ザルのケージを基本とし、ツパイが閉所を好み閉所を出産することから一部に小箱を置く形とした。また、ツパイは前肢で物をつかむ能力が低いことから浅い皿用の餌箱を作製した。

(2) ウイルス株の選定

ヒト血漿中に高力価で長期間認められたウイルスが認められた血漿をヒト肝細胞移植キメラマウスに接種し、高力価のものを選別した。その結果15検体の候補から Genotype A のものを1株用いることとし、クローニングを開始した。

(3) 繁殖計画の策定

雌20、雄10頭の繁殖ペアを作製し、新生ザルに感染をさせ、ウイルス力価の高いものを高感受性ペアとしてコロニー化することとした(図1)。また、感染個体においても繁殖を行い、垂直感染系の樹立を検討することとした(図2)。

D. 考察

HBV 感染制圧において必要な命題となるのはウイルスを制御する免疫系の機構解明とそれに基づく予後の予測、治療法の確立である。それには免疫系が確立されている動物モデルを用いる必要がある。本研究で

は正常の免疫系を持つ動物であるツパイを用いることで、従来までの免疫不全マウスを用いる系を凌駕するモデルとなり得ると考えられた。

肝細胞に感染し HBV と同じく肝炎を誘発する HCV において、HCV 肝炎モデルを模倣するものとしてマーモセットを用いた HCV と近縁ウイルスである GBV のモデルが存在する。近年このモデルの有用性が検討されてきた。しかしながらウイルス自身が近縁とされるのみで他種であること、また、マーモセットの個体間におおいて病態に大きな違いがあることからモデル動物としての広がりはない。本研究では本来の感染病原体である HBV を用い、持続感染する実験動物をコロニーとして作製するというものを行っており、今後大きく期待できるものとなっている。

以上の事から本研究では世界で初めて HBV 病原体ならびに高感受性感染動物モデルの作製を行う先進的な研究であると考えられた。

E. 結論

HBV そのものを用いた感染動物モデルの作製であり、HBV 制圧に大きく貢献すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the