

201228015A

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

革新的な動物モデルや培養技術の  
開発を通じたHBV排除への創薬研究

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  
B型肝炎創薬実用化等研究事業

革新的な動物モデルや培養技術の  
開発を通じたHBV排除への創薬研究

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

- 革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究・・・ 1  
茶山 一彰

## II. 分担研究報告

1. 免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる・・・ 7  
マウスモデルの作製に関する研究  
瀬谷 司
2. B型肝炎ウイルスの持続感染時における自然免疫応答回避メカニズムの・・・ 10  
解明に関する研究  
加藤 博己
3. キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学的および遺伝子・・・ 12  
タンパク質発現解析・新規モデルの作製  
立野 知世
4. TALEを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発・・・ 19  
山本 卓
5. 革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究・・・ 22  
田原 栄俊
6. 宿主細胞によるHBVゲノム修飾の解析、抗HBV免疫応答を惹起する・・・ 25  
新規肝炎モデルマウスの開発  
丸澤 宏之
7. The Discovery of host restriction factors required for HBV entry・・・ 31  
(infection) into mouse cells  
Hussein H Aly
8. 革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究・・・ 34  
阿部 弘美



# 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）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
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研究院 教授

研究要旨：これまでに作製した B 型肝炎ウイルス（HBV）感染モデルにヒトリンパ球を導入することにより、急性肝炎、あるいは劇症肝炎に相当するモデルを作製することができた。このモデルではNK細胞が肝細胞障害を起こすことにより、広範にヒト肝細胞の壊死脱落が観察された。細胞壊死をもたらしたのは Fas-Fas-L 系であり、Fas の発現は HBV が感染した肝細胞のみに認められた。また、HBV が感染したマウスでのみ、NK細胞の Fas-L の表出が認められた。この Fas-L の表出には dendritic cell によるNK細胞の活性化が必須であり、dendritic cell を除去すると、この肝炎は全く起きなくなった。肝細胞傷害の治療として抗 Fas-L 抗体を投与したところ、肝細胞傷害はほぼ完全に阻害され、劇症肝炎の治療薬としてこの抗体が使用できる可能性が示された。現在ヒト化抗体の作製を行っている。さらに、異なるモデルとして肝炎モデルを NOG-scid, NOD-scid を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎モデルを作製することを試みている。また HBV を産生する transgenic mouse を作製している。これまでに4種類のファウンダーマウスを得た。またキメラマウスから得られたヒト肝細胞を利用して極めて感染効率の高い初代培養肝細胞が得られた。

[研究分担者]	瀬谷司	北海道大学大学院	教授
	加藤博己	京都大学ウイルス研究所	准教授
	立野知世	(株) フェニックスバイオ	取締役研究開発部長
	山本卓	広島大学大学院	教授
	田原栄俊	広島大学大学院	教授
	丸澤宏之	京都大学大学院	講師
	Hussein H Aly	国立感染症研究所	主任研究官
	阿部弘美	広島大学大学院	助教

## A. 研究目的

我々はヒトの免疫細胞とヒト肝細胞によるB型肝炎のマウスモデルおよびヒト肝細胞によるHBVの完全な継代培養系を構築した。これらの構築によりHBVの持続感染のメカニズムと免疫による排除に関する広範な研究が可能となった。本研究は、これら感染モデルあるいは細胞培養系を用いて、肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究、HBV感染マウスと新規HBV培養系を用いた創薬研究、cccDNAの排除、転写制御に関する研究を中心に行う。

## B. 研究方法

肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究 B型肝炎のマウスモデルを用い感染細胞が細胞性免疫により除去されるのに重要な役割を果たす因子を解明する。逆に、免疫応答を抑制する薬剤、サイトカインを同定し、過剰な免疫反応を抑制する劇症肝炎の治療薬を開発する。またT-cell, B-cellも含めたヒトのB型肝炎を再現するマウスモデルを作製する。さらに野生型HBV産生transgenic mouse、Transpozonを利用したHBV産生系、Cre-loxPを利用したHBV産生系を作製する。さらに、TRL系の活性化によるウイルス排除の機構に関与する因子を探索する。

HBV感染マウスと新規HBV培養系を用いた創薬研究 HBV感染キメラマウスと新規HBV感染・培養系を用い、レセプターを含めたHBVの肝細胞への接着から放出までの全ての段階で必要とされる宿主因子を次世代シーケンサーによる発現解析、microRNA

の網羅的解析により同定する。それらをsiRNA, TALENによりtargetingすることによりHBVの感染増殖を抑制する宿主因子を同定する。持続感染マウス、細胞に宿主の抗ウイルス活性因子をレンチウイルスで導入し、抗ウイルス効果を確認する(丸澤班員)。感染増殖抑制とウイルス変異との関連を次世代シーケンサーで解析し、関連する因子を同定する。

### cccNAの排除、転写制御に関する研究

cccDNAに結合可能なTALEを作製し、結合性、転写抑制性を検討する。増殖期と非増殖期にHBVと会合している宿主因子をCHIP法により解析し、ゲノム構造に違いがあるか否かを明らかにする。

## C. 研究成果

肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究 HBV plasmid のマウス肝細胞株への transfection、マウス個体を用いた hydrodynamics の両方で type I interferon receptor (IFNAR) が HBV の複製阻害に働くことが証明できた。一方、IPS-1, TICAM-1 の感染阻害作用は僅かであった。DNA transfection の際 type I IFN が誘導されるが、大部分は STING-TBK1 の経路に依存した。予想に反し、RIG-I/MDA5 と IPS-1 は DNA 依存性の IFN 誘導に僅かしか関与しなかった。IFNAR が HBV 感染阻害の鍵経路であった。HBV が肝細胞で複製すれば DNA 依存性に IFN が誘導され、それが IFNAR 経路の活性化を導いて感染防御に働くことが示唆された(瀬谷班員)。NOD-scid マウスを用いた肝炎モデルでは uPA-scid マウスを用

いた劇症肝炎モデルでは生着しなかった T 細胞の生着が認められた。miR-122, miR-22 が HBs 抗原の量と相関していること、さらに miRNA の成熟に関係する Argonaute2 (Ago2) は HBV 感染細胞内で HBc 抗原、HBs 抗原と共局在していることを明らかにした (阿部班員, 茶山班員)。uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID マウスをホストマウスとしたキメラマウス (cDNA-uPA/SCID キメラマウス) を作製、肝臓における薬物代謝酵素の遺伝子発現および活性を測定した。その結果、これらの発現及び活性は従来の uPA/SCID キメラマウスと同等であることを確認した (立野班員)。薬剤誘導性に肝細胞特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスと、Cre による LoxP の組換え作用により HBV 抗原を発現する遺伝子改変マウスを作製している (丸澤班員)。Immune-competent で HBV が増殖できるマウスモデルの作製を行っている (Aly 班員)。

**HBV 感染マウスと新規 HBV 培養系を用いた創薬研究** 次世代シーケンサーを用いた B 型肝炎患者の血液中マイクロ RNA の網羅的解析を行うことにより HBV に特異的な miRNA の発現変動を明らかにする目的で、健常人、低 HBV 患者、高 HBV 患者における血漿中エクソソームのマイクロ RNA の発現を次世代シーケンサーで解析し、HBV のウイルス量にともない増加する miRNA および HBV の感染の有無により変化する miRNA を見いだすことができた (田原班員)。

**cccDNA の排除、転写制御に関する研究** cccDNA の発現レベルがより高い HepG2 の

stable transfectant を現在セクションしている段階である。患者血清由来の HBV ウイルスを用いた実験はまだ行っていない。RLRs のリコンビナントタンパク質の精製は完了しており、後は HBV 感染価の高い細胞から RNA を抽出すれば良い段階である (加藤班員)。HBV の増殖を抑制するシステムを確立するために、コアプロモーターに結合する人工タンパク質の TALE を設計・合成し、in vitro での結合活性を調べた。その結果、転写因子の結合する配列に強く結合する 4 種類の TALE タンパク質について強い結合活性が確認された (山本班員)。

(倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は倫理手続きを経て販売されているものを購入して使用した。マウスを用いた実験は倫理指針に則って実験を行い、犠死・解剖の際にはエーテル麻酔を行った。

## D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV 感染に対する免疫応答が誘導されるモデルを構築した。HBV の感染早期において、樹状細胞が NK 細胞を活性化し、Fas/FasL pathway を介して感染肝細胞のアポトーシスを誘導することが示された。

## E. 結論

HBV 培養系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて、肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究、HBV 感染マウスと新規 HBV 培養系を用いた創薬研究、

cccDNAの排除、転写制御に関する研究の検討が可能となった。

## F. 健康危険情報

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, Tatenno 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;56(2):555-66
- 2) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One* 2012;7(10):e47490.
- 3) Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol.* 2013;85(5):789-98.

### 2. 学会発表

- 1) Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, C. Nelson Hayes, Masataka Tsuge, Shoichi

Takahashi, Hiroshi Aikata, Hiromi Abe, Daiki Miki, Hidenori Ochi, Chise Tatenno, Katsutoshi Yoshizato, Hideki Ohdan, Kazuaki Chayama. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer By Fas/FasL Interaction and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. The 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA. November 9, 2012

## 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

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
分担研究報告書（平成24年度）

免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きるマウスモデルの  
作製に関する研究

研究分担者 瀬谷 司 北海道大学医学部 教授

研究要旨：自然免疫特にインターフェロン誘導系の活性化によるB型肝炎ウイルス（HBV）排除の機構に関与する因子を探索する。各種KOマウスから確立した肝細胞株とKOマウスへのHBV plasmid i. v. 投与系を使ってHBV感染と自然免疫の関係を見る。

#### A. 研究目的

HBVはI型インターフェロン（IFN）が奏効しない肝炎を誘起して肝硬変・肝がんになる。本研究はHBV感染とIFN経路を含む自然免疫のHBV応答に関するものである。HBVの自然免疫に関する報告は乏しいので、申請分担者らは2つの系でHBV自然免疫系の解析を行う。1. ヒト肝細胞HBV培養系を使ってRNA、DNAウイルス認識に関与する経路のHBV応答を調べる。2. RNA認識経路のKOマウスとその肝細胞株を使ってHBVの制御に関連する自然免疫因子を同定する。

#### B. 研究方法

各種KOマウスは恵与か当研究室で確立した。MyD88<sup>-/-</sup>、TICAM-1<sup>-/-</sup>、IPS-1<sup>-/-</sup>、IRF-3<sup>-/-</sup>、IRF-7<sup>-/-</sup>、IFNAR<sup>-/-</sup>の各種KOマウスから不活化肝細胞株をSV40を用いて樹立した。ヒト肝細胞株HepG2とその持続感染株は茶山研より恵与を受けた。HBV plasmidsはChisari、茶山教授より拝受した。Hydrodynamics実験は既報に沿って行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

#### C. 研究結果

HBV plasmidのマウス肝細胞株へのtransfection、マウス個体を用いたhydrodynamicsの両方でtype I interferon receptor（IFNAR）がHBVの複製阻害

に働くことが証明できた。一方、IPS-1、TICAM-1の感染阻害作用は僅かであった。

DNA transfectionの際type I IFNが誘導されるが、大部分はSTING-TBK1の経路に依存した。

予想に反し、RIG-I/MDA5とIPS-1はDNA依存性のIFN誘導に僅かしか関与しなかった。IFNARがHBV感染阻害の鍵経路であった。HBVが肝細胞で複製すればDNA依存性にIFNが誘導され、それがIFNAR経路の活性化を導いて感染防御に働くことが示唆された。IFNAR下流のHBV感染阻害の特定因子について検索を進めている。

#### D. 考察

ウイルス感染で一般にRNA認識経路が活性化してIFN誘導と複製阻害が起きることが証明されて来た。IFN誘導に関与する自然免疫経路がそれとともに分子機構として明らかになった。本研究の成果はDNAウイルスでありながらRNAのphaseもとるHBVについて既報のウイルス抑制経路が主役にならないことが判明した。STING-TBK1からIFNAR活性化がHBV抑制に重要であり、この経路に沿った因子の解析がHBVの感染阻害を実行するために必須となる。

In vivoのhydrodynamicsの系でもこのことが判明した。従って、培養系の知見は

マウスモデルでも妥当な知見となることが予測される。次年度に向けて自然免疫によるHBV阻害の鍵因子を同定する予定である。

#### E. 結論

HBV感染阻害の自然免疫経路としてIPS-1経路でなく、STING-TBK1からIFNARへ到る経路が同定できた。In vivo肝細胞でも同様であると推察できた。この経路の関連因子からHBV抑制の鍵となる自然免疫分子を同定する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* 86: 185-194.
2. Azuma M., T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Cross-presentation and antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C largely depend on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells. *OncoImmunol.* 1: 581-592.
3. Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 2066-2071.
4. Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, T. Renno, S. and Lebecque, K. 2013. Cleavage of TLR3 by cathepsins generates two fragments that remain associated to form a functional receptor. *J. Immunol.* 190: 764-773.
5. Yamazaki, S., A. Maruyama, K. Okada, M. Matsumoto, A. Morita, T. Seya. 2012. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS ONE* 7(12):e51665.
6. Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. *Nat Commun.* (in press).
7. Aly, H. H., K. Shimotohno, M. Hijikata, T. Seya. 2011. Toward establishment of *in vitro* systems for analysis of HCV life cycle. *Microbiol. Immunol.* 56(1): 1-9.
8. Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem. (Tokyo)* 151: 5-11..
9. Seya T, Shime H, Matsumoto M. 2012. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunol.* 1: 1000-1001.
10. Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunol.* 1: 917-923.
11. Oshiumi, H., K. Funami, H. H. Aly, M. Matsumoto, T. Seya. 2012. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* (in press).
12. Seya, T., M. Azuma, and M. Matsumoto. 2013. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp. Opin. Target. Therap.* (in press)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



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）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
分担研究報告書（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの持続感染時における自然免疫応答回避メカニズムの解明に関する研究  
研究分担者 加藤 博己 京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学分野 准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルスが自然免疫機構を回避しているそのメカニズムの解明を目的とする。現在、cccDNAを安定的に高発現する細胞株の樹立を試みている。また、患者血清由来のHBVを感染させた細胞中に、免疫活性を持つ核酸が含まれているかを検討し始めている。さらにHBVが発現する各ウイルスタンパクの自然免疫機構への影響を検討するため、発現ベクターを作製中である。現在準備段階ではあるが、各実験系がセットアップされれば、B型肝炎ウイルスと自然免疫機構の関係を詳細に解析できることが期待される。

#### A. 研究目的

B型肝炎ウイルスが持続感染する際、自然免疫応答を回避していると考えられるが、その回避メカニズムは明らかではない。我々は、非自己のRNAを認識し抗ウイルスインターフェロン応答を惹起することで知られる細胞内RNAヘリケースRIG-I-like receptors (RLRs)に着目し、B型肝炎ウイルスが特にRLRsの認識を回避もしくはそのシグナル伝達を阻害しているかを検討する。また、受容体は定かではないが細胞内dsDNA認識経路に関しても、B型肝炎ウイルス感染との関係を検討する。

#### B. 研究方法

上記研究目的をもとに、下記1～3のようなin vitroの実験を中心に研究を行っていく。

1 HBVの感染性クローンやそのHepG2へのstable transfectantを用い、RLRsやそのシグナル分子の発現をsiRNAによって抑制した時の感染価の変化を検討する。

2 HBVの感染性細胞から核酸を抽出し、RLRsを活性化するRNAモチーフが含まれるかどうかを、RLRsのリコンビナントタンパク質を用いたin vitro ATPaseアッセイを行う。

3 HBVの各ウイルスタンパクを細胞に発現させ、RLRsやDNAセンサー経路による自然免疫応答

の活性化への影響を検討する。RLRsとの結合能やRLR依存的インターフェロン活性化への阻害効果の有無などを中心に検討していく。

（倫理面への配慮）培養細胞を用いた研究であるため倫理面での問題はない。）

#### C. 研究結果

研究方法1に関して、cccDNAの発現レベルがより高いHepG2のstable transfectantを現在セレクションしている段階である。患者血清由来のHBVウイルスを用いた実験はまだ行っていない。

研究方法2に関しては、RLRsのリコンビナントタンパク質の精製は完了しており、後はHBV感染価の高い細胞からRNAを抽出すれば良い段階である。

研究方法3に関しては、各ウイルスタンパクおよび蛍光タンパク（GFPなど）を結合したタンパクの発現ベクターを作製中である。

#### D. 考察

In vitroのHBVゲノム発現系において、cccDNAの発現レベルが予想していたよりかなり低いことが明らかとなり、cccDNA高発現細胞株を得ることが今後の研究の鍵になりそうである。患者血清由来のHBVウイルスを用いた実験を行う際にも、感染や複製レベルがかなり低いことが

予想され、実験材料、条件の適正化が重要だと考えられる。

#### E. 結論

現在、未だ研究準備段階である。cccDNAの発現レベルが高いHepG2のstable transfectantが得られることが望まれる。HBVワクチン接種が終了し、抗体価の上昇を確認でき次第、HBVウイルスを用いた実験も早急に行うべきである。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学および遺伝子・  
タンパク質発現解析・新規モデルの作製

研究分担者 立野（向谷）知世 株式会社フェニックスバイオ 取締役研究開発部長  
研究協力者 加国雅和 株式会社フェニックスバイオ  
大下宏樹 株式会社フェニックスバイオ  
石田雄二 株式会社フェニックスバイオ  
眞田春美 株式会社フェニックスバイオ  
吉実康美 株式会社フェニックスバイオ

研究要旨：これまでのヒト肝細胞キメラマウス（uPA/SCIDキメラマウス）は、長期間飼育すると、導入uPAゲノム遺伝子の欠失による正常マウス肝細胞の結節状の増殖が観察される。それに伴いヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへのHBV長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、新たに作製したuPA遺伝子欠失の見られないcDNA-uPA/SCIDマウスをホストマウスとしたキメラマウス（cDNA-uPA/SCIDキメラマウス）を用いて、肝臓における薬物代謝酵素の遺伝子発現および活性を測定した。その結果、これらの発現及び活性は従来のuPA/SCIDキメラマウスと同等であることを確認した。さらに、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスにHBVを接種し長期飼育観察（98日）を行った。その結果、感染、非感染で、マウスの体重、ヒトアルブミン濃度、ALTに顕著な差は見られなかった。また病理組織観察、TUNEL陽性細胞の割合、線維化の程度においても、両方で顕著な差は見られなかった。来年度は、その他のパラメーターの測定、さらなる長期飼育を行う予定である。

#### A. 研究目的

これまでのヒト肝細胞キメラマウス（uPA/SCIDキメラマウス）は、導入uPAゲノム遺伝子の欠失が起るため、長期間飼育により正常マウス肝細胞の結節状の増殖が観察される。それに伴い、ヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへのHBV長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、新たに作製したuPA遺伝子欠失の見られないcDNA-uPA/SCIDマウスをホストマウスとしたキメラマウス（cDNA-uPA/SCIDキメラマウス）の性状解析を行うと共に、HBV長期感染における病理学的、遺伝子・タンパク質発現の解析を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

##### ヒト肝細胞キメラマウスの作出

3週令のcDNA-uPA/SCIDマウスに2種類のドナーヒト肝細胞（5YM：5才、男児、アフリカ系アメリカ人、2YF：2才、女兒、ヒスパニック

ク人）を $2.5 \times 10^5$ 個脾臓より移植し、移植後3週目、6週目、それ以降は1週間に1回、マウス血中ヒトアルブミン（h-Alb）濃度を免疫比濁法にて測定した。

5YMを移植したキメラマウス3匹は、h-Albがプラトーに達した16週令（移植後13週）に剖検し、肝臓を採取した。

##### キメラマウスへのHBV感染

2YFを移植した11週令（移植後8週）のキメラマウス12匹は、HBV長期感染試験に使用した。12匹のうち、6匹にHBV Genotype Cを眼窩静脈叢より $1.0 \times 10^7$  copies/mL 100  $\mu$ L接種した。残りの6匹はHBV非感染コントロールとして同様に飼育した。HBV感染の翌週から週に1回、動物にイソフルラン麻酔を施し、眼窩静脈叢より約70  $\mu$ Lを採血した。2  $\mu$ Lをh-Alb測定に、10  $\mu$ LをHBV DNAコピー数測定、10  $\mu$ LをALT測定に用いた。

##### 定量性リアルタイムRT-PCR法による代謝酵素発現量の定量

凍結した肝臓組織からQIAGENのRNeasy Mini

Kitを用いてtotal RNAを抽出した。Total RNA 1  $\mu$ g、dNTP (2.5 mM) 2  $\mu$ L、ランダムプライマー 1  $\mu$ Lを混合し、全量13  $\mu$ Lを65°Cで5分間変性させた後、氷冷した。この調製液に5 $\times$ First-strand buffer 4  $\mu$ L、100 mM DTT 1  $\mu$ L、RNAase free水 1  $\mu$ L、SuperScript III RT逆転写酵素を加えて全量 20  $\mu$ Lとした。この調製液を25°Cで5分、55°Cで60分、72°Cで15分反応させた。得られたcDNAを鋳型として、以下の条件でPCRを行った。逆転写反応液1  $\mu$ Lに対しforwardおよびreverse primerを5 pmol/ $\mu$ L、CYBR Green PCR Mastermixが1倍量になるように加え、滅菌精製水で全量25  $\mu$ Lとした。それぞれの遺伝子について7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster CA)を用い、PCR反応は、50°C 2分 $\rightarrow$ 95°C 10分 $\rightarrow$ (95°C 15秒 $\rightarrow$ 60°C 1分) $\times$ 40サイクルで行った。

本研究で発現量を測定した遺伝子は、hCYP1A2、hCYP2C9、hCYP2C19、hCYP2D6、hCYP2E1、hCYP3A4、mCyp1a2、mCyp2b10、mCyp2c29、mCyp2c37、mCyp2c55、mCyp2a11であった。各プライマーの配列を表1に示す。これらのprimerは、ヒトとマウスに交差反応しないこ

表1 プライマー配列

遺伝子名	Forward	Reverse
hCYP1A2	GGTTCTACATCCCCAAGAAAT	AGCACITGGCCAGGACT
hCYP2C9	CCAGATGTGCAATAATTTTCTC	CAAGCTTCAATAGTAAATTCAGATG
hCYP2C19	TGAATGAAAACATCAGGATTG	CAAGGTTTTTAAGTAATTTGTTATGG
hCYP2D6	CTTGGACAAAGCCGTGA	GACAGCATTGACGACCTC
hCYP2E1	GGCTGAAGTAAAAGAGTATGTGTC	TTTCTCTCCATTTCCAC
hCYP3A4	ACTGCCTTTTTGGAAATA	GGCTGTGACCATCATAAAAG
hGAPDH	GGAGTCAACGGATTTGGT	AAGATGGTGATGGGATTTCCA
mCyp1a2	ACAGCGAGAAGTACAAAGAGAA	ACAAGTAGAAAATGCTCCAG
mCyp2b10	CCAATGTTTAGTGAGGAACTG	CAGATAATATTGGCCGTGATG
mCyp2c29	AGAGACCACAAGCAGAACAC	TGAATCATGGCGTGTATAG
mCyp2c37	CTTGAAGTACCCACATGTCCAC	GGGATGAGGTCAATGAATC
mCyp2c55	TCAGCAATGGAACAAAATGGAAGG	CACAGCTCAGGATGAATGTGG
mCyp3a11	CTAAGCAGAAGCAGGAGTGG	TTTCTGGATATCAGGGTGAGTGG
mGapdh	ACTAACATCAAATGGGGTGAG	ATTGCTGACAATCTTGAGTGA

total RNAから合成したcDNAを用いた。

### 薬物代謝酵素活性測定

キメラマウス肝臓中の薬物代謝酵素活性を測定するために、各マウス3匹ずつ肝臓からミクロソームを抽出した。基質と緩衝液を添加し、37°Cにて5分間プレインキュベート後、NADPH生成系補酵素溶液を加えて37°Cにてインキュベートした。反応液にはそれぞれの代謝物に対する内部標準物質を添加し、攪拌した後4°C下で9600xg、10分間遠心分離して上清を回収した。

各代謝酵素反応で得られた上清中の代謝物の濃度は、HPLC (株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京)を用いて測定した。それぞれのマウス肝臓の薬物代謝酵素活性はヒトの50ドナーミクロソーム(HLM 50 Donor Pool, BD Gentest<sup>TM</sup>; BD Biosciences, Woburn, MA)の活性に対する比として示した(表2)。

表2 CYP活性の反応および解析条件

	Enzyme Activity	Substrate (Concentration, $\mu$ M)	Metabolite	Buffer <sup>※</sup>	Incubation time (min)
CYP1A2	Phenacetin O'-deethylase	Phenacetin (20)	Acetaminophen	PB	20
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylase	Diclofenac (6)	4-Hydroxydiclofenac	TB	20
CYP2C19	S-Mephenytoin 4'-hydroxylase	S-Mephenytoin (60)	4'-Hydroxymephenytoin	PB	20
CYP2D6	Debrisoquin 4'-hydroxylase	Debrisoquin (100)	4'-Hydroxydebrisoquin	PB	20
CYP2E1	Chlorzoxazone 6'-hydroxylase	Chlorzoxazone (100)	6-Hydroxychlorzoxazone	PB	20
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylase	Midazolam (10)	1'-Hydroxymidazolam	PB	20

※TB: Tris-HCl buffer(pH7.5), PB: Pottassium phosphate buffer (pH7.4).

### 血清中ウイルス濃度測定

採取した血清10  $\mu$ Lからスマイテスト EX-R&D (医学生物学研究所、愛知)を用いてDNAを抽出し、20  $\mu$ LのNuclease-free waterに溶解した。PCR反応液は、溶解したDNA原液もしくは希釈したDNAを5  $\mu$ LとTaqMan PCR Core Reagent kit (Life Technologies Corporation)を用いて調製した。PCR反応と解析にはABI Prism 7500を用いた。PCR反応は、50°C 2分 $\rightarrow$ 95°C 10分 $\rightarrow$ (95°C 20秒 $\rightarrow$ 60°C 1分) $\times$ 53サイクルで行った。

### 血清中ALT活性測定

血清中ALT活性は、採取した血清10  $\mu$ Lを利用してドライケム3500 (富士フィルム、東京)を用いて測定した。

### 肝臓の病理組織学的検査

動物の安楽死確認後に剖検を実施し、血液と肝臓を採取した。肝臓の一部はホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン (H&E)染色、TUNEL染色、マッソン・トリクローム染色を行い、顕微鏡下で観察を行った。

とを確認した。

コントロールとしてヒトまたはマウス Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (h/mGAPDH)を測定した。発現量は各遺伝子のサイクル数(Ct値)からNTCのサイクル数を減じ( $\Delta$ Ct)、 $2^{-(\Delta Ct)}$ として表し、目的のmRNAとGAPDHのmRNAの相対比として示した。キメラマウス肝臓の対照として成人5ドナーの肝組織プール由来RNA (Total RNA-Human Adult Nomal Tissue 5 Donor Pool: Liver, Biochain)、およびSCIDマウス肝臓



(倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを経て加工・販売されているものを、(株)フェニックスバイオのヒト組織利用倫理委員会において承認を得た上で、購入して使用した。

ヒト肝細胞を持つキメラマウス作製実験に関しては、(株)フェニックスバイオの動物実験倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

### C. 研究結果

参考に、5YMをcDNA-uPA/SCIDマウスとuPA/SCIDマウスに移植したキメラマウスの長期飼育における体重とマウス血中h-Alb濃度のグラフ(参考資料1)と、置換率とh-Albの相関グラフ(参考資料)を示した。cDNA-uPA/SCIDで作製したキメラマウスでは、uPA/SCIDマウスに比較して、長期飼育における体重とh-Alb濃度の維持が観察された。また、置換率と

h-Albの相関に関しては、双方で近い値を示している。

### キメラマウス肝臓におけるヒトCYP、マウスCyp発現量、CYP活性

ヒトCYP発現量においては、hCYP1A2においてのみcDNA-uPA/SCIDキメラマウスでuPA/SCIDキメラマウスの約2倍高い値を示した。

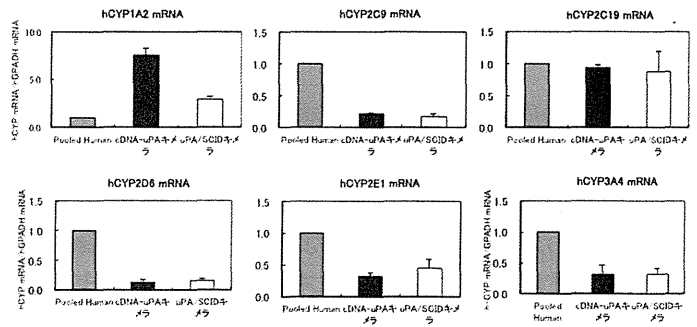


図1 hCYP mRNA 発現量

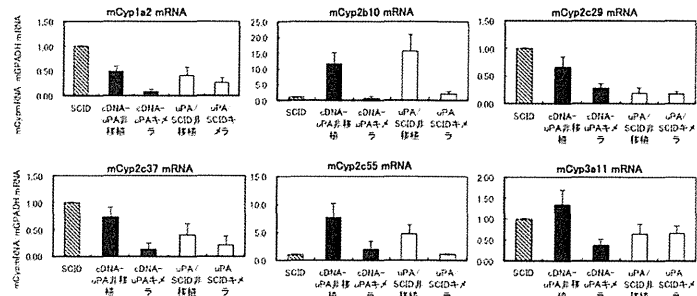


図2 mCYP mRNA 発現量

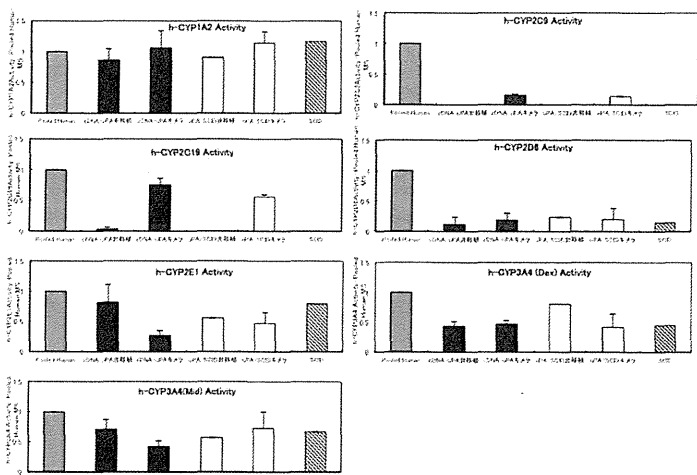
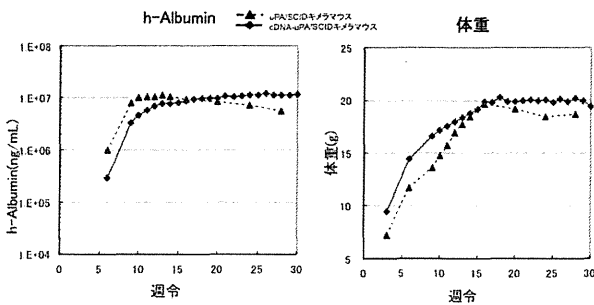
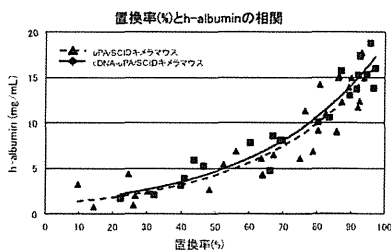


図3 CYP活性



参考資料1: 長期飼育におけるh-Albuminと体重の変化(ドナー:BD85)



参考資料2 マウス血中ヒトアルブミン濃度と置換率の関係(ドナー:BD85)

hCYP1A2タンパク量はhCYPの中で割合が低いことから、大きな影響はないと考えられた(図1)。その他のCYPに関しては両者で同程度の発現量を認めた。mCypの発現量は、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスとuPA/SCIDキメラマウスではほぼ同程度であった(図2)。CYP活性においても、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスとuPA/SCIDキメラマウスではほぼ同程度であった(図3)。

#### cDNA-uPA/SCIDキメラマウスへのHBV感染における、一般状態、体重、h-Alb、およびALTの推移

試験開始後79日目に非感染キメラマウスが1匹死亡した。一般状態観察では、眼球白濁、軟便、肛門周囲汚れ、疎毛、脱毛、痂皮が散見されたが、両群間で差はなかった。感染開始98日目にすべてのマウスの剖検を実施した。

体重に関しては、両群とも試験開始30日以降より徐々に体重減少が観察された。h-Alb値は両群ともほぼ安定していた。ALT値は両群で試験開始後20日以降上昇し、50日で安定し、両群間で差はなかった(図4)。

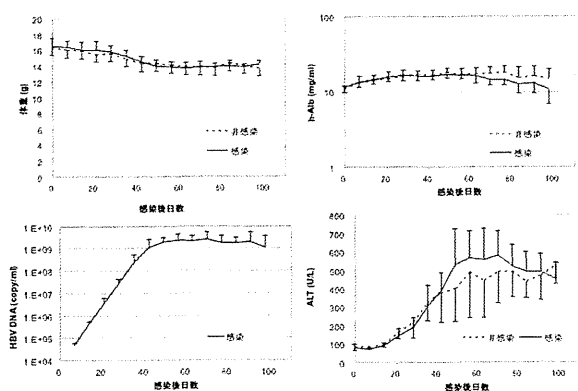


図4 HBV長期感染における体重、血中h-Alb、血清中HBV、血清中ALT

#### cDNA-uPA/SCIDキメラマウスへのHBV感染における肝臓の病理学的検査結果

肝臓のH&E染色標本では、uPA/SCIDキメラマウスで見られるような、マウス肝細胞の増殖性結節は観察されず、肝臓には、均一な宿主由来肝細胞とヒト肝細胞の2種類しか観察されなかった。宿主由来肝細胞は、エオジン好染で、大型のものが多く観察された。このことは、肝細胞のuPAの発現による障害により、DNA合成は起きているが、肝細胞の分裂ができないことによることが推測される。ヒト肝細胞領域は、uPA/SCIDキメラマウスと同様の形態で、細胞質がクリアで脂肪滴を含

む細胞が多く見られた。uPA/SCIDキメラマウス肝臓に出現するマウス肝細胞の増殖性結節が観察されないため、uPA/SCIDキメラマウス肝臓に比べて、個体差が少ない印象であった。病理所見としては、軽微または中等度の肝細胞脂肪変成、限局性単核細胞浸潤、oval cellの出現、マクロファージ浸潤が散見されたが、感染、非感染で差異は認められなかった。

肝臓切片のTUNEL染色を行ったところ、1%以下の割合で陽性細胞が観察されたが、両群に差異はなかった。肝臓のマッソン・トリクローム染色においても、線維化の程度に両群間に顕著な差異はなかった。

#### D. 考察

これまでのヒト肝細胞キメラマウスでは、導入uPAゲノム遺伝子の欠失により、長期間飼育すると、正常マウス肝細胞の結節状の増殖のためヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへのHBV長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、新たに作製したuPA遺伝子欠失の見られないcDNA-uPA/SCIDマウスをホストマウスとして作成したキメラマウスにHBVを感染させることにより、肝臓組織へのHBV感染の影響がより明らかになるのではないかと考えた。まず、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスの性質の解析の一環として、肝臓におけるCYP発現の解析を行った。その結果、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスにおけるhCYP発現、mCyp発現、CYP活性はuPA/SCIDキメラマウスとほぼ同等であった。これらのことから、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスは、従来のuPA/SCIDマウスと同様にヒトの薬物代謝を予測できる動物モデルとして利用可能と考えられた。

cDNA-uPA/SCIDキメラマウスにHBVの感染を行い、長期飼育を行った。感染後98日目(14週間)までの一般状態、体重、h-Alb、ALTに感染の有無による差異は認められなかった。感染98日目での肝臓における病理組織学的検査を行ったところ、uPA/SCIDキメラマウス肝臓に比較して、肝臓の状態の個体差が少ないと考えられた。このことから、cDNA-uPA/SCIDキメラマウスは長期飼育に適していると考えられた。しかしながら、HBV感染98日間では、

HBV感染による病変所見、TUNEL陽性細胞の増加、線維化の明らかな増加は観察されなかった。

今後、他のパラメーターの測定を行うと共に、長期間の感染実験（20週間以上）を行う予定である。

#### E. 結論

cDNA-uPA/SCIDキメラマウスの薬物代謝活性は、uPA/SCIDマウスと同等であった。cDNA-uPA/SCIDキメラマウスにHBVを感染したところ、感染98日目では、一般状態、体重、h-Alb、ALT、病理組織、TUNEL陽性細胞率、線維化において、非感染動物との明らかな差異は観察されなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) 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. *Annals of Surgery* (in press)

(2) Kakuni M, Morita M, Matsuo K, Katoh Y, Nakajima M, Tateno C, Yokoi T. Chimeric Mice with a Humanized Liver as an Animal Model of Troglitazone-induced Liver Injury. *Toxicology Letter* 2012;214:9-18.

(3) Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, Tateno C, Ushiki J. Investigation of Drug-drug Interactions Caused by Human Pregnane X Receptor-mediated Induction of Cytochrome P450 3A4 and 2C Subfamilies in Chimeric Mice with a Humanized Liver. *Drug Metab Dispos* 2012 Mar;40(3):474-480.

(4) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe A, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. *Hepatology* 2012 Aug;56(2):555-566.

(5) 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, 54:872-878.

(6) Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of Metabolism of Ibuprofen and Naproxen Using Chimeric Mice with Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 2012;40:2267-2272.

(7) Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos.* 2012, 40:322-328.

(8) Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, Kunihiro Y, Yoshimi K, Ishida S, Tanabe K, Yanagi A, Tachibana A, Hirose J, Yomoda J, Morimoto S, Kuramoto T, Voigt B, Watanabe T, Hiai H, Tateno C, Komatsu K, Serikawa T. Generation and Characterization of Severe Combined Immunodeficiency Rats. *Cell Reports* 2012;2:685-694.

(9) 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 18:3875-3882.

(10) 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. *Laboratory Investigation* 2013 93:54-71.

(11) 加国雅和、立野知世、ヒト肝細胞キメラ

マウスを用いた抗肝炎ウイルス薬効評価系、  
ファルマシア 2012;4:956-958.

(12) 立野知世、ヒト肝細胞キメラマウス—肝臓肥大のメカニズムに関して—生化学 特集「肝臓の発生・再生」宮島篤編、生化学 2012;84:699-706.

(13) 石田雄二、立野知世、吉里勝利、ヒト化肝臓をもつキメラマウスを用いた創薬研究、最新疾患モデルと創薬応用研究の最前線、遺伝子医学 MOOK 2012;22:38-43.

## 2. 学会発表

(1) Tateno C, Ishida Y, Kakuni M, Fukumuro M, Tanaka J, Masumori S, Nakajima M, Hayashi M. Comet assay and micronucleus test using chimeric mice with humanized liver (PXB mice®). Annual Meeting and ToxExpo2012, San Francisco 2012

(2) Kakuni M, Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Ushiki J, Tateno C. Investigation of drug-drug interactions caused by human pregnane X receptor-mediated induction of cytochrome P450 3A4 and 2C subfamilies in PXB-mice. Annual Meeting and ToxExpo2012. San Francisco 2012

(3) 立野知世、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗肝炎ウイルス薬効評価系の開発 ウィルス性肝炎と肝がん撲滅を目指した研究最前線、日本薬学会第 132 回年会一般シンポジウム、札幌、2012

(4) 佐能正剛、堀口彩、杉原数美、浦丸直人、立野知世、堀江透、北村繁幸、太田茂、ヒト肝細胞移植マウスを用いたイブプロフェンの代謝、血中動態の予測、日本薬学会第 132 回年会、札幌、2012

(5) 大下浩樹、浜村理子、横道博、加国雅和、川瀬洋介、寺社下浩一、須藤正幸、飛田良美、小原道法、立野知世、cDNA-uPA/SCID マウスを宿主とした長期試験に適するヒト肝細胞キメラマウスの開発、日本実験動物科学・技術九州 2012、大分、2012

(6) 西倉康史、植田亮、大下浩樹、加国雅和、立野知世、ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) 作製におけるヒト肝細胞移植時の鎮痛剤投与の効果、日本実験動物科学・技術九州 2012、大分、2012

(7) 石田雄二、柳愛美、吉実康美、山崎ちひろ、横道博、渡士幸一、脇田隆字、茶山一彰、立野知世、キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞への HBV 感染、第 48 回 日本肝臓学会、石川、2012

(8) Tateno C, Nakada N, Kakuni M, Ohbuchi M, Hamamura S, Ohshita H, Kazuki Y, Oshimura M, Sato K, Kato K, Kawamura A, Kamimura H, Usui T. Novel Cyp3a Knockout Chimeric Mouse with Humanized Liver and Metabolic Profiling of Nefazodone for Accurate Pre-clinical Human Prediction. 19th MDO Meeting and 12th European ISSX Meeting, Noordwijk aan Zee, the Netherlands, 2012

(9) Sanoh S, Naritomi Y, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of human pharmacokinetics by allometric scaling using chimeric mice with humanized liver. 19th MDO Meeting and 12th European ISSX Meeting, Noordwijk aan Zee, the Netherlands, 2012

(10) de Lannoy I, Saldivia V, Pang H, Kaczmarek S, Pan S, Morikawa Y, Tateno C. Evaluation of the Pharmacokinetics (PK) of Clozapine (CLZ) and Its Two Major Metabolites in PXB- and C57BL/6 Mice Following Intravenous (i.v.) and Oral (p.o.) Dosing of CLZ. NEDMDG Summer Symposium. Humanized in vivo models and in vivo-like in vitro models for DMPK/Tox. Shrewsbury, 2012

(11) 柳愛美、立花亜里、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、真下知士、芹川忠夫、立野知世、新規免疫不全ラットを用いたヒト肝細胞キメララットの作出、第 19 回 肝細胞研究会、札幌、1012.

(12) 辰巳公平、大橋一夫、鶴頭理恵、立野知世、中井浩之、吉里勝利、岡野光夫、自己肝細胞を用いた血友病新規細胞遺伝子治療の開発、第 19 回 肝細胞研究会、札幌、1012.

(13) 小嶋聡一、坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、立野知世、脇田隆字、C 型肝炎ウイルス NS プロテアーゼによる TGF- $\beta$  疑似活性を介する肝線維化、第 19 回 肝細胞研究会、札幌、