

201320001A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 26 年 (2014 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 26 年 (2014 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. miR-122 による C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明 14
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 18
網羅的解析、リバーシ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 . 22
検討
高倉 喜信
5. 次世代シーケンサーを用いた DAA 耐性 HCV の検討 26
前川 伸哉
6. HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討 29
松浦 善治
7. HCV 制御に関わる NK 細胞機能分子の解析 32
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 . 36
解析と創薬への応用
脇田 隆宇
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 57

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肝炎ウイルス制御に関する研究
平成25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：われわれはヒト肝細胞キメラマウスを使用した C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染系を確立して研究を行ってきた。本年度、このヒト肝細胞キメラマウスを用いた研究を中心に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 HCV 感染阻害効果が見いだされた。HCV 感染における miR-122 の役割を解析し、miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり、特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が、HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした。遺伝子型 2b の HCV 株のレプリコンを樹立し、さらにレプリコンゲノムに検出した適合変異を利用することにより、感染性ウイルスを作成することが可能となった。

2. 開発された薬剤の応用

次世代シーケンサーを用いて、direct-acting antiviral agent (DAA) 未治療の HCV 患者の NS5A 領域を解析し、IL28B の遺伝子型と NS5A Y93 変異が関連していることを見出した。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。DAA を sequential に使用すると多剤耐性変異が出現することを見出した。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。肝移植後の HCV 再感染における NK 細胞のフェノタイプおよび quasispecies の意義を明らかにした。

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。また超免疫不全である NOG マウスに Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を過剰発現させた TK-NOG マウスを用いた HCV 感染モデルを確立した。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) フェニックスバイオ学術顧問	金子周一	金沢大学大学院医学系研究科教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科教授	松浦喜治	大阪大学微生物研究所教授
脇田隆字 国立感染研究所ウイルス第二部部长	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	山梨大学大学院消化器内科学講師
今村道雄 広島大学大学院医学系研究科助教		

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。(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

これまでトロンボキササン A₂ (TXA₂) 合成酵素(TXAS)阻害剤によって感染性 HCV 産生が抑制されることを報告した。今年度は TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構の解明、また TXAS 阻害剤を投与したヒト肝細胞キメラマウスにおいて感染した HCV の感染伝播が回復していく現象が認められたのでその原因追及を目指した。JFH1 感染性粒子産生系において TXA₂ 受容体アゴニストとアンタゴニストの効果を検証したところ、双方とも全く効果を示さなかった。またキメラマウスの肝細胞や JFH1 感染性粒子産生系で用いられている HuH-7 細胞における TP の発現について検討したところ、これらの細胞では TP の発現がないことがわかった。このことから TXAS による感染性 HCV 産生の促進は TP を介さない未知の経路が関与していることがわかった (土方班員)。

HCV 感染における miR-122 の役割の解析を行った。培養細胞系での検討

から、miR-122 は、HCV の 5'UTR 領域に存在する結合部位への結合を介して HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり、特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が、HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした（金子班員）。

創薬のシーズの探索に応用するため種々の遺伝子型の HCV 培養系の確立を試みた。本年度は遺伝子型 2b の HCV 株のレプリコンを樹立した。遺伝子型 2b 株のレプリコンゲノムに検出した適合変異を利用することにより、感染性ウイルスを作成することが可能となった（脇田班員）。

(2) 開発された薬剤の応用に関する研究

近年開発されている direct-acting antiviral agent (DAA) は著明な抗 HCV 効果を有するが耐性変異が問題となる。次世代シーケンサーシステムを用いて、C 型肝炎患者における NS5A 耐性変異の検討を行った。Daclatasvir (DCV) 未治療の対象 110 症例において DCV 耐性変異 Y93H は 30.9% (34/110) の症例に存在した。Y93H 症例はインターフェロン感受性関連因子であるコア番変異 ($p=0.03$)、IRRDR 変異数 ($p=0.01$)、IL28B SNP ($p=0.002$) と関連したが、特に IL28B SNP は Y93H 変異と独立して関連していることを見出した（前川班員）。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 (TVR) 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。TVR+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 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（茶山、今村班員）。

ヒト肝細胞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）。

HCV 関連肝疾患に対し、肝移植療法は有用な手段であるが、HCV 再感染が問題である。これまで生体肝移植後の HCV 再感染に対し、肝由来 Natural killer (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。本年度はさらに HCV の感染抑制に働く NK 細胞のフェノタイプ解析を肝移植ドナー/レシピエントの肝臓内単核球

および末梢血単核球を用いて実施した。ドナーグラフト肝内在NK細胞のNKp46の発現強度には個体差があり，NKp46^{bright}細胞高含有率が肝移植後早期のHCV感染抑制に影響する可能性を確認した（大段班員）。また生体肝移植後のHCV再感染における遺伝子多型（Quasispecies）の意義を明らかにした。In vitroの感染系でHuh7に馴化したHCV（HCVcc/Huh7）とHep3Bに馴化したウイルス（HCVcc/Hep3B）を作製した。次世代シーケンスの結果，これらのウイルスは異なったQuasispeciesを保持しており，異なる宿主細胞株に感染した際に新たなQuasispeciesが出現することが明らかになった。HCVcc/Huh7はHuh7細胞に対してHCVcc/Hep3BはHep3B/miR-122細胞に対して高い感染性を示した。これらの成績からQuasispeciesは新しい宿主細胞に馴化するために重要な役割を果たしていることが示された（松浦班員）。

(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）。また新規動物モデルとして超免疫不全であるNOGマウスにHerpes simplex virus type 1 thymidine kinase（HSVtk）遺伝子を過剰発現させたTK-NOGマウスを用いたHCV感染モデルを確立した（茶山，今村班員）。置換率が低値あったマウスにおいても，TK-NOGマウスはuPA-SCIDマウスよりも高い割合で感染が成立しており今

後，肝炎モデルとして発展させていく。

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。本年度は，キメララット作成に必要なCre deleterラットの作成を試みた。京都大学中央動物実験センターよりユビキタスに発現するCAG-Cre Tgラット[W-Tg(CAG-cre)81Jmsk系統]受精卵の供給を受けてこの卵を発生させることによって必要なファンダーとすることにした。所定の手続きを経て入手した卵をWistar系統ラットの仮親内で発生させ19頭の産仔を離乳まで育成することができた。PCRによるジェノタイピングの結果，合計2頭のTg陽性個体を選別することができた。現在これらのTg陽性個体を育成し，コンディショナルDT-A BAC Tgラットと交配し繁殖させている（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) 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 Jul;62(7):1055-61
- 2) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A Translational Study of Resistance Emergence Using Sequential Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Using Ultra-Deep Sequencing. Am J Gastroenterol 108:1464-72, 2013
- 3) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Nelson Hayes C, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel

TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. Biochem Biophys Res Commun. 2013;441(1):230-5.

- 4) Abe Y., Aly H. H., Hiraga N., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M. Thromboxane A₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers, Gastroenterology, 2013, 145, 658-667
- 5) Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. Hum Gene Ther Clin Dev. 2Long-term elimination of hepatitis C virus from human hepatocyte chimeric mice after interferon-γ gene transfer.2014;25(1):28-39.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方 誠、肝炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日（土方班員）

2. 実用新案登録 なし

3. その他

- 1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、臍臓由来体性幹細胞の製造方法、PCT/JP2013/074026、出願日 2013/09/06
- 2) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腎臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074028、出願日 2013/09/06

3) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腸上皮由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074032、出願日 2013/09/06

Ⅱ. 分担研究報告

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
分担研究報告書（平成25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：次の3つの研究を行った。（1）肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析。

キメラマウスにHBVsAgL パーティクルを投与後、蛋白架橋剤

[3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl)propionate] を注入し肝臓組織を分離後その蛋白を2次元電気泳動法によって分析するという手法で、HBV 感染関連蛋白としてGRP78 (HSPA5)を同定していた。本年度は本蛋白の役割を知るための研究を実施した。キメラマウス由来のヒト肝細胞を培養しその GRP78 遺伝子の発現を siRNA 処理によって低下させた後、HBV を感染させ感染9日での感染率を測定したところ処理しない細胞に比べて有意に低下していた。（2）キメララット作成。キメラマウスと補完的に利用できるキメララットの作製を昨年度に引き続き実施した。今年度はユビキタスに発現する CAG-Cre Tg ラットを繁殖させた。（3）生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発。HepG2 細胞をコラーゲンゲル中に3次元的に分散させ、常時、新鮮培養液を灌流出来る装置で培養した（3次元フロー培養）。この方法で培養された肝細胞は灌流しない培養（ノンフロー培養）に比べてかなり高い増殖性を示した。

A. 研究目的

HCV の感染とそれ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、これ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。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のモデル実験系として、私達は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3つの目的を持って実施された。目的1。肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析。これまでの研究によって、GRP78 (HSPA5)が HBV とヒト肝細胞の相互作用に関わっていることを示す実験結果を得ている。本年度はこの蛋白質の機能を調べる研究を実施した。

目的2。キメラマウスと補完的に利用できるキメララットの作製研究。前年度に引き続きヒト肝細胞細胞で置換された肝臓を有

するキメララットの開発研究を実施した。

目的3。生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発。私たちが開発した新しい細胞培養法（3次元コラーゲンゲルフロー培養法）でヒト肝細胞を培養してその性質を調べた。

B. 研究方法

目的1（肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析）に関する研究。ヒト肝細胞の調製と培養は次の様に行った。Hispanic（2歳女兒）由来のヒト肝細胞を移植し、キメラマウスを作製した。ヒト肝細胞移植後9—11週目のマウス肝臓から常法に従って肝細胞を分離し、ヒト肝細胞画分を得た。得られたヒト肝細胞をネガティブコントロール siRNA、HBV siRNA、GRP 78 siRNA をそれぞれコーティングした96穴プレート（サイトパスファインダー社製）に播種し、10%子牛血清を含むdHCGM液で培養した。ノックダウン効果を検討するため、播種後2日目の細胞からRNAを回収し、GAPDHを内部標準としてリアルタイムPCRでGRP78の発現量を解析した。HBVに対する効果を検討するため、細胞を播種して4日目にHBVを接種した（5 Genome equivalent/cell, 4%PEG）。接種して2日後と3日後にそれぞれ培地を交換し、その後は、6日間培養を続け上清を回収した。上清中のHBsAg量を、ELISAで定量した。

目的2（キメラマウスと補完的に利用できるキメララットの作製研究）に関する研究。平成24年度研究によって、肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA（DTA）遺伝子を発現させるBAC Tgラットの作製することが

できた。今年度は、京都大学中央実験動物センターからユビキタスに発現するCAG-Cre Tgラットの受精卵を入手し、これを発生させ繁殖させることを行った。

目的3（生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発）に関する研究。ヒト肝細胞樹立株であるHepG2はATCC社から得た。コラーゲンゲル3次元培養装置は既報（平成25年度生化学会大会発表）の方法に従って作成した。コラーゲンゲルへの細胞の封入はコラーゲンゲルサンドイッチ法で行った。1mlの0.2%コラーゲンゲルをあらかじめ調製しておき、その上に 6×10^5 個の上記細胞を含む2mlの0.2%コラーゲンゲルを重畳し、培養液（10%子牛血清を含むDMEM液）を1ml/dayの流速で常時通液して6日間培養した。対照実験は、同様の培養条件で行ったが通液は行わず、ゲル上に1mlの新鮮培養液を添加し、この添加培養液を毎日交換した。6日目にゲルを倒立位相差顕微鏡で観察・写真撮影した。

（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

1. 肝炎ウイルス感染におけるGRP78の役割について。

私達はこれまでの研究によって、キメラマウスにHBVを感染させるとGRP78の遺伝子発現が低下することを

示している。本年度は次の実験を実施した。GRP78に対するsiRNAを作成し、キメラマウスから調製したヒト肝細胞をこのsiRNAを導入したプレートで4日間培養した。この操作で肝細胞におけるGRP78遺伝子の発現レベルは対照群細胞と比較して5%以下に抑制された。このヒト肝細胞にHBVを感染させ一週間後に培養液中のウイルス量を定量したところ、siRNA処理群では対照群に比べておよそ半減しており、この減少は有意であった。この実験結果は、HBVの感染およびその増殖にGRP78が関与していることを示唆している。

2. キメララットの作製について

平成24年度の研究で、キメララット作成に必要なCre deleterラットの作成を試みた。Cre発現コンストラクトを受精卵前核期胚に注入したが、首尾よくこのコンストラクトを受け入れたファウンダーを得ることができなかった。そこで本年度は、京都大学中央動物実験センターに保存されているユビキタスに発現するCAG-Cre Tgラット[W-Tg(CAG-cre)81Jmsk系統]受精卵の供給を受けてこの卵を発生させることによって必要なファンダーとすることにした。所定の手続きを経て入手した卵をWistar系統ラットの仮親内で発生させ19頭の産仔を離乳まで育成することができた。PCRによるジェノタイピングの結果、合計2頭のTg陽性個体を選別することができた。現在これらのTg陽性個体を育成し、コンディショナルDT-A BAC Tgラットと交配し繁殖させている。

3. 生体内環境に近い培養系で培養されたヒト肝細胞の性質について。ヒト肝細胞を培養標準的な方法(プラスチック皿の表面に単層培養し適宜培養液を交換する方法)で培養しても増殖

せず、正常な表現型発現も一週間程度に限られることが知られている。私たちは、キメラマウス肝臓で増殖させたヒト肝細胞をインビトロで有効に利用するために、従来の培養法の問題点を克服できる新しい培養法を開発することを目指している。本年度は、ヒト肝細胞としてHepG2細胞を用いて培養法の至適化実験を行った。研究方法の項で述べた方法(3次元コラーゲンゲルフロー培養法)で本細胞を6日間培養した。対照実験では、培養液を通液しない3次元コラーゲンゲル培養法で同細胞を培養した。培養後コラーゲンゲルを検鏡し、視野当たりの細胞数を計測した。対照実験群に対してフロー培養群では細胞数が2.7倍増していることが判った。フロー培養法がヒト肝細胞の新しい培養法として利用できる可能性が出てきた。

D. 考察

私達はこれまでのキメラマウスを利用した研究によって、HBV感染に小胞体ストレス蛋白の1つとして知られているGRP78(HSPA5)が関与している可能性を指摘してきた。本年度はこの可能性をより強固にするためにこの蛋白遺伝子発現を抑制した場合、HBVの感染効率に影響が出るかを調べた。GRP78遺伝子に対するsiRNAで処理されたヒト肝細胞では培養液に放出されるウイルス量がほぼ半減していた。この結果は、ウイルス感染によって肝細胞は小胞体ストレス状態になり、その状態はウイルス増殖にとって好環境になっている可能性を示唆している。今後、この考え方が正しいのか、ウイルス感染細胞で高発現することが知られているマーカー遺伝子の発現動態などを調べることによって検証していく必要がある。GRP78は、HBV

の感染成立に必要な因子として働く (HBVレセプター補助機能) 一方、感染成立後はウイルス増殖に対応する宿主因子として機能している可能性が考えられる。HCV感染に対しても同様な実験を実施したが有意な結果は得られなかった。HCV感染に対する顕著な効果を示す新薬が開発され、HBV感染患者に対する有効な治療法の開発が求められている。本研究によってGRP78をターゲットとしたHBV感染抑制法の可能性が出てきた。今後、この可能性についても詳細に検討する必要がある。

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。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がキメラマウスではその目的に十分には応えることができない。本研究ではキメラマウスと補完的に使用できるキメララットの作製研究を実施した。本研究課題によってこのラット作成に必要な2系統のファウンダー (肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA (DTA) 遺伝子を発現するラットとCre deleter Tgラット) を作成することができた。今後これら2系統のファウンダーを交配し目的のキメララットのための宿主作成を目指す予定である。

培養環境下でヒト肝細胞をその分化機能を維持させながら増殖させ、また、長期維持できる方法が開発されれば、医薬品開発のツールとしての価値が高い。本研究によって、ヒト肝細胞をコラーゲンゲル中で3次元的に培養しかつ培養液を常時通液させればヒト肝細胞の増殖を促進させることができる可能性が出てきた。今後、キ

メラマウス由来のヒト肝細胞を用いてこの可能性を検証し、さらに分化機能なども詳細に調べ、3次元コラーゲンゲルフロー培養法の評価を行う予定である。

E. 結論

ヒト肝細胞へのHBV感染にGRP78 (HSPA5) がウイルス受容体の補助因子あるいは細胞内でのウイルス増殖に必要な宿主因子として関与して可能性を示唆する実験結果を得た。キメララット作成に必要な2系統のファウンダー [肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA (DTA) 遺伝子を発現するラットとCre deleter Tgラット] を作成することができた。生体内環境に近いヒト肝細胞培養法として3次元コラーゲンゲルフロー培養法の有用性を示唆する結果を得た。本研究は、石田雄二、齋藤夏美、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) 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.

(2) Tominaga K, Sasaki E, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Kawada N, Yoshizato K, Arakawa T. Cytoglobin May Be Involved in the

Healing Process of Gastric Mucosal Injuries in the Late Phase Without Angiogenesis. Tanaka F, Dig Dis Sci. 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]

(3) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 8;441(1):230-5.

(4) Yoshizato K, Tateno C. A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection: where to next? Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013 Nov;9(11):1419-35.

(5) Tachibana A, Tateno C, Yoshizato K. Repopulation of the immunosuppressed retrorsine-treated infant rat liver with human hepatocytes. Xenotransplantation. 2013 Jul-Aug;20(4):227-38.

(6) 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 Jul;62(7):1055-61.

(7) 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 Jan;93(1):54-71.

2. 学会発表

齋藤 夏美, 足立 浩章, 田中 浩, 中田 悟, 河田 則文, 吉里 勝利. 常時通液環境下で培養されたヒト線維芽細胞の性質. 平成25年度日本生化学会大会

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

厚生労働省科学研究費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 25 年度）

miR-122 による C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明

研究分担者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 教授

研究要旨:肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に対して促進的に働くことが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法は、HCV 複製を抑制することが知られており、実際抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は HCV 感染チンパンジーさらに HCV 感染患者においても証明され、今後の臨床応用が期待されている。しかながら、miR-122 による HCV 複製機序は不明であったため今回その解明を行った。培養細胞系での検討から、miR-122 は、HCV の 5' UTR 領域に存在する結合部位への結合を介して HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり、特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が、HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした。抗 miR-122 療法は、DAA 製剤で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られており、今後 DAA 製剤との併用療法が期待される。

A. 研究目的

肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に促進的に働くことが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は、HCV 感染培養細胞系のみではなく、HCV 感染チンパンジー、さらには HCV 感染患者においても証明されている。そのため miR-122 を標的とした抗 miR-122 療法は、今後の C 型慢性肝炎の有力な新規治療法と考えられるが、miR-122 による HCV 複製制御機構は明らかではなかった。本年度は、miR-122 による HCV 複製制御機構を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。

B. 研究方法

1) miR-122 の HCV RNA 複製に対する影響を排除するため、RNA 依存性 RNA ポリ

メーゼ活性を有する NS5B の活性を有しな

い HCV RNA を作成した。また蛋白合成への影響も同時に評価するため HCV 遺伝子中に分泌型ルチフェラーゼを挿入した。この HCV RNA を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

- 2) HCV 持続感染培養細胞を作成、高濃度 (EC50 の 10 倍濃度) の NS5B 阻害剤 (PSI-6130) を投与して、HCV RNA 合成を停止させ、直ちに miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖を投与し、HCV RNA の安定化作用の有無を検討した。
- 3) HCV 持続感染細胞を作成し、DICER, Ago1 から Ago4 蛋白に対する siRNA を

投与して、HCV RNA 複製への影響を検討した。

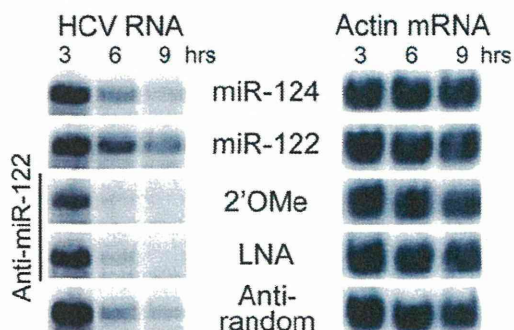
- 4) Ago2 ノックアウト細胞に非複製 HCV RNA (1) で使用) を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に遺伝子導入して、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白合成に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

(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)。

C. 研究結果

- 1) miR-122 の投与により非複製 HCV RNA は安定化され、miR-122 アンチセンス鎖の投与により、非複製 HCV RNA は不安定化された。(図 1) また miR-122 の投与により、非複製 HCV RNA からの蛋白合成は促成され、逆に miR-122 アンチセンス鎖の投与により、蛋白合成は抑制された。この結果から HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を



促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。

図 1

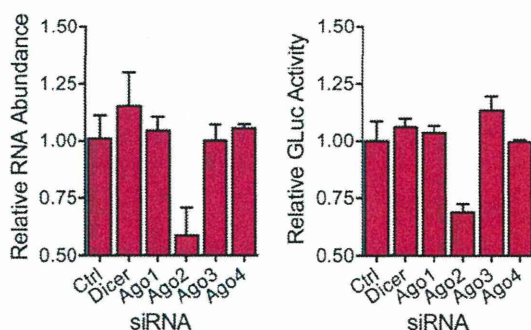
- 2) HCV 持続複製細胞においても miR-122 は HCV RNA を安定化し、逆に miR-122



アンチセンス鎖は HCV RNA を不安定化した。(図 2)

図 2

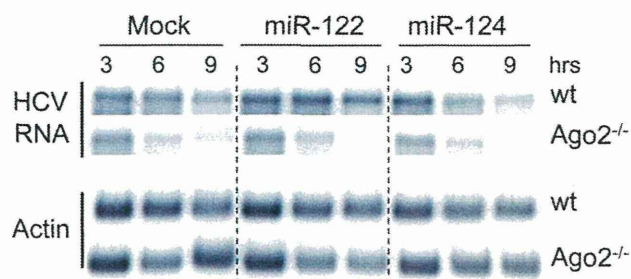
- 3) Ago2 蛋白の siRNA によるノックダウ



ンにおいてのみ HCV 複製の抑制を認めた。(図 3)

図 3

- 4) Ago2 ノックアウト細胞では miR-122



による HCV RNA 安定化作用および蛋白合成促進作用は認めなかった。(図 4)

図 4

D. 考察

抗 miR-122 療法は DAA 製剤による抗ウイルス療法で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られている。しかしながら miR-122 非発現細胞においても HCV は複製することが知られており、抗 miR-122 療法単独での HCV の排除は困難と考えられる。そのため抗 miR-122 療法と DAA 製剤の併用療法は DAA 製剤による薬剤耐性ウイルスの出現予防の点で極めて有用であり、今後検討を行う予定である。

E. 結論

- 1) miR-122 は HCV RNA を安定化することで HCV 複製を促進することが明らかとなった。
- 2) miR-122 による HCV RNA の安定化には Ago2 が必須であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Seki, S Yakai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, S Kaneko. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology 58(3):1133-42, 2013
- 2) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, S Kaneko.

MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87(9):5270-86, 2013

- 3) T Ueda, M Honda, K Horimoto, S Aburatani, S Saito, T Yamashita, Y Sakai, M Nakamura, H Takatori, H Sunagozaka, S Kaneko. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Genomics 101(4):238-48, 2013
- 4) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 57(4):1484-97, 2013
- 5) Y Hodo, M Honda, A Tanaka, Y Nomura, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sakai, M Sasaki, Y Nakanuma, M Moriyama, S Kaneko. Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Clin Cancer Re 19(7):1827-37, 2013

2. 学会発表

- 1) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T,