

2013-2000/B (V2)

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23～25年度 総合研究報告書

(1/2冊)

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 23～25 年度 総合研究報告書
(1/2冊)

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 26 年 (2014 年) 4 月

目 次

I. 総合研究報告

- 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11
肝炎ウイルス制御に関する研究
吉里 勝利
2. NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性 C 型肝炎ウイルスの特性解析と21
miR-122 による C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明
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26
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32
検討と肝臓特異的インターフェロン- γ 治療法の開発
高倉 喜信
5. 次世代シーケンサーを用いた肝病態進展と抗ウイルス治療効果と39
関連するウイルス遺伝子変異の解析
前川 伸哉
6. HCV 感染における遺伝子多型の意義45
松浦 善治
7. HCV 制御に関わる NK 細胞機能分子の解析52
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62
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	76
	今村道雄	
Ⅲ.	研究成果の刊行に関する一覧表	83
Ⅳ.	研究成果の刊行物・別刷り	91

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23～25年度総合研究報告書

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。平成23-25年の3年間において、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点を中心に以下に以下の知見を得た。

1. 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）治療効果およびIFN誘導遺伝子発現量の関連あるいは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。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、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。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。細胞培養・チンパンジー感染クローンである遺伝子型1a 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。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、さらに遺伝子型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した。

2. 開発された薬剤の応用

新規抗HCV療法として、プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤および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。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NS5AY93変異が関連していることを見出した。またHCVクローンを用いたreverse-geneticsの手法を用いて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。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。

3. 肝炎モデルの創生

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスにヒトリンパ球を投与することにより肝炎モデルマウスの作製を試みた。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。

【分担研究者】

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

脇田隆宇

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

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）．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．さらに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感染マウスを用いてHCV感染あるいは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，創薬のターゲットとなり得る遺伝子の探索を行った．HCV感染により抗原提示反応に関与す遺伝子のIFN反応性の低下を認めた（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．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．そのメカニズムを解明するため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，IFN誘導遺伝子(ISGs)発現量を検討した．IL28B TGの肝臓はTTの肝臓に比べ，IFN投与後の肝内ISGs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）．

細胞培養・チンパンジー感染クローンである遺伝子型 1a 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 NS3/4A 阻害剤、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)。

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 培養系および感染性 HCV の確立を試みた。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)。さらに genotype 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を用いた deep sequencing によって、C 型肝炎患者および HCV 感染マウスにおける変異株の解析を行った。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肝発癌と密接に関連していることが明らかとなった。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)。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)。またヒト肝細胞キメラマウスを用いて DAA 併用療法の効

果を検討した。Genotype 1b 型 HCV 感染マウスへのプロテアーゼ阻害剤, NS5A 阻害剤, 非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の単独投与では耐性変異による breakthrough が生じるが, これらの薬剤を組みあわせて投与することによりウイルスの排除が得られたが, genotype 2 型 HCV には有効性は低かった。その原因として, 2 型 HCV にはすでにこれら薬剤に対する耐性変異を有している症例が存在することを見出した(茶山, 今村班員)。さらに 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。キメラマウスを用いて有効な drug delivery の開発を試みた。持続的な遺伝子発現が可能である pDNA 骨格 (pCpG-mcs: InvivoGen) にヒト IFN- γ cDNA を挿入した pCpG-huIFN- γ 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。リンパ球を用いた HCV 感染阻害法の開発を試みた。ヒト末梢血単核球分画から培養・増殖させた NK/NKT 細胞をヒト肝細胞キメラ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)。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)。さらに生体肝移植後の 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る 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

スの作製を試みた(茶山, 今村班員). また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). 本マウスでは置換率が低値で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(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. 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. 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(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;62:1055-61
- 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) 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(2); 281-5, 2012
- 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 IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 54(3); 764-71, 2011
- 5) 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, Tateno 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
- 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 infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. *PLoS One.* 2011;6(8):e23856.
- 7) 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(5):872-8.
- 8) 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;55:11-8.
- 9) 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
- 10) 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.

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77回インターフェロン・サイトカイン学術集会 2012年6月21日, 神戸
- 3) 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
- 4) 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

H. 知的所得権の出願・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

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）

分担研究報告書（平成23～25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：ヒト肝細胞キメラマウスを利用した肝炎ウイルス制御に関する研究で以下の成果を得た。（1）HCV 感染初期における HCV の増殖動態は同一感染源（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場合があることを示した。（2）HCV は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た。（3）キメラマウス中でのヒト肝細胞と肝炎ウイルスの相互作用を解析する新しい手法で HBV 感染関連蛋白質の 1 つとして GRP78 (HSPA5) を同定し、この蛋白質が HBV の感染と増殖を制御している可能性を示した。（4）キメラマウスと補完的に利用できる新しい型のキメララットの作製を実施し、このために必要なファンダーの作成を完了した。（5）比較的良好に生体内環境を再現できる新しい培養法（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するとその増殖能が顕著に改善されることを示した。

A. 研究目的

本研究はヒト肝細胞キメラマウスを利用した肝炎ウイルス制御機構解明の一環として次の 5 つ目的を持って実施された。

（1）キメラマウスを利用するので宿主（ヒト肝細胞）とウイルスのゲノタイプを同一にした条件下で、ウイルス感染増殖に関わる患者個人の因子（宿主因子）の影響を調べることが可能である。このキメラマウスの優位性を利用して、同じゲノタイプの HCV を異なる患者から分離し、これらを同一ヒト肝細胞で作製されたキメラマウスに感染させその増殖動態を調べた。

（2）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、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。キメラマウスでは HCV 感染初期でヒト肝細胞の遺伝子発現にどのような影響が出ているのかを調べることが可能である。感染初期にお

ける HCV 感染応答性遺伝子の発現プロファイルを調べた。

（3）インビボでヒト肝細胞とウイルスの相互作用に関わる蛋白質を明らかにすることはウイルス感染防止法を開発することに貢献できる。HBV 表面蛋

白とヒト肝細胞をキメラマウス肝臓内で接触させ、架橋剤で固定し、両者の複合体形成に関わるヒト肝細胞蛋白質を同定する研究を実施した。

(4) 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。キメラマウスと補完的に利用できる新しい型のキメララットの作製を実施した。

(5) 研究用のヒト肝細胞は肝炎ウイルス感染増殖制御に関する研究に必須のツールであるが同一条件の実験に必要な充分量の健康なヒト肝細胞を入手する機会は限定的である。キメラマウス肝臓で増殖させたヒト肝細胞はこの条件を満たすことができる。この意味で将来的に利用価値が高まると期待されるキメラマウスから分離したヒト肝細胞を良好な条件で培養できる方法を開発するための研究を行った。具体的には、比較的良好に生体内環境を再現できる新しい培養法(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その増殖動態を調べた。

B. 研究方法

上記研究目的別にその研究方法を述べる。

(1) 異なる患者由来の同じゲノタイプ(genotype b)をもつHCVのキメラマウス肝臓での増殖。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頭あたり 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。

(2) 感染初期におけるHCV感染応答性遺伝子の発現プロファイルの調査。

(1)で得られた肝臓中でのGRP78, IRF7, HIF1 α , PPAR γ , PGC1- β , TFAM, BAK, BAX, BclXL, PPAR α 及びg, PGC1a及びbの発現レベルをGAPDHの発現レベルを内部標準としたリアルタイムPCRで定量した。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 array (Reverse Transcription-PCR array)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 arrayでは、プライマーはヒト特異的ではないためヒトとマウスのキメラ全体のレスポンスを観察する目的で実施した。

(3) 肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析[GRP78 (HSPA5)の機能調査]。私達は既にキメラマウスにHBVsAgL パーティクルを投与し、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。本研究では、この蛋白質のHBV感染増殖における機能解析の一環としてこの遺伝子に対するsiRNAを利用したGRP78遺伝子発現抑制実験を行なった。ヒト肝細胞の調製と培養は次の様に行なった。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、GRP78 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、6 日間培養した後、上清を回収した。上清中の HBsAg 量を、ELISA で定量した。

(4) キメララットの作製。ジフテリア毒素を発現させたヒト細胞は強い障害を受けることが知られている。私達は、ラットの肝細胞に必要なに応じて (コンディショナルに) この遺伝子を発現させることができる Tg ラット (diphtheria toxin-Tg ラット) を作製し、ヒト肝細胞のホストとして利用することを計画している。次の 2 つのことを行った。(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ェ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 [32 P]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) 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。

(5) 生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発。生体内環境を再現できる新しい培養法 (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その増殖動態を調べた。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。1 ml 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 2 ml 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 1 ml/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 1 ml 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) 感染初期におけるHCV増殖動態。感染源の異なるgenotype1b HCVのキメラマウス肝臓内での増殖。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年度及び24年度の研究で再現性が確認できた。

(2) HCV感染初期におけるホストの遺伝子発現プロファイル。HCV感染初期におけるヒト肝細胞における遺伝子発現プロファイルを酸化ストレス関連及び脂質代謝関連の87遺伝子に注目して解析を行った。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

イル別に次の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週間までは発現が減少するが、その後、上昇する遺伝子：Gpx2, Ncf2。このRT-PCR array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 array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、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タイターの関連を定量的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) 肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析[GRP78 (HSPA5)の機能調査]。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。本研究では次の実験を行った。GRP78に対するRNAi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。

(4) キメララットの作製

①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。そのため、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

[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頭の産子を離乳まで育成することができた。PCRによるジェノタイプピングの結果、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。

(5) 生体内環境に近い培養系で培養されたヒト肝細胞の増殖能。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細胞を使用し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倍に増加していた。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

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が示された。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（ウイルス）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。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24年度に渡って調べたが、再現性に問題があった。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再調査したいと考えている。

平成23年度と24年度の両年度に渡ってHCV感染初期における酸化ストレス及び資質代謝関連の遺伝子の発現動態をReverse Transcription-PCR array法で調べた。感染初期（3日）では、HCV RNAのタイターは低く、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拘らず、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、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。

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。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ホスト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、この可能性に関し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