

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究
（分担）報告書（平成 23～25 年度）

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

分担研究者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：ヒト肝細胞キメラマウスを用いてリバーシジェネティクス的手法により，野生型あるいは direct-acting antiviral agent (DAA) 耐性変異型 C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染マウスを作製した。患者血清およびクローンを用いて HCV 感染させたマウスではいずれにおいても telaprevir の投与により耐性変異が生じ，薬剤耐性 HCV はウイルスの selection および mutation いずれからも出現し得ることを見出した。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合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。NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウスに telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する 2 重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ，さらに NS5B 阻害剤の投与により，3 重耐性型 HCV が出現した。DAA 製剤を sequential に使用すると，多剤耐性変異型 HCV が出現するため，注意が必要であることが示された。uuPA/SCID マウスよりさらに免疫不全である 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 マウスを用いてヒト肝細胞キメラマウスを作製し HCV を感染させた。TK-NOG マウスは uPA/SCID マウスに比べヒト肝細胞置換率が低値であっても HCV の感染率が高く，HCV 研究に有用な新規のヒト肝細胞キメラマウスに有用になると思われた。

A. 研究目的

- 1) C 型肝炎ウイルス(HCV)感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて direct-acting antiviral agent (DAA) 単独あるいは併用投与における耐性株の出現，ウイルス排除効果，genotype 間の治療効果を検討する。
- 2)
- 3) uuPA/SCID よりさらに免疫不全である NOG マウスを用いて新規ヒト肝細胞キメラマウスを作製する。

B. 研究方法

- 1) Genotype 1b, 2a, 2bの患者血清を感染させたマウスに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を単独あるいは併用により4週間経口投与し，治療効果を検討した。
- 2) Genotype 1b HCV感染性クローンKT9のNS3領域にtelaprevir耐性V36A，NS5A領域にNS5A阻害剤RCI耐性L31V，Y93Hを挿入したクローンの全長cDNAを用いて*in vitro transcription*法により HCV RNAを合成し，50 μgのRNAをヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接注入し感染マウスを作製後，種々のDAAを投与した。

3) 超免疫不全マウスNOGをベースにした新規のヒト肝細胞移植TK-NOGマウスを用いて、HBVおよびHCV感染ヒト肝細胞移植TK-NOGマウスのウイルス感染率、抗ウイルス薬の薬効を評価した。

C. 結果

1) Genotype 1b型C型肝炎患者血清を投与し感染させたマウスに200 mg/kgのtelaprevirを投与したところ耐性変異であるNS3 V36A変異が出現した。また野生型HCVクローン感染マウスに対し、telaprevirを投与したところ、やはりNS3 V36A変異が出現し、HCVクローンからも耐性変異が出現することが見出された。NS5A阻害剤+第二世代protease阻害剤あるいはNS5A阻害剤+非核酸型NS5B阻害剤の併用療法により、genotype 1b型HCV感染マウスからのマウス血中HCV RNAは開始1週間には陰性化し、4週間の投与中、再上昇を認めなかった。治療終了後も血中ウイルス陰性化は継続し、HCVは排除されたものと思われた。一方、genotype 2aあるいは2b型感染マウスでは、血中HCV RNAはほとんど低下しなかった。これらマウスのHCVをdirect sequenceにて検討したところ、治療前、genotype 2a型では、NS3 A156G、NS5A L31M、NS5B I482LおよびV484A変異、genotype 2b型ではNS3 A156GおよびD168A、NS5A L31M、NS5B I482L、V484AおよびV499Aと第2世代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耐性変異を有していた。

2) Telaprevir耐性であるNS3 V36A変異クローンを感染させたマウスに対し、telaprevir+NS5A阻害剤を併用投与したところ、血中HCV RNAは低下するものの陰性化は得られず、NS3変異に加えNS5A阻害剤耐性変異であるNS5A Y93H変異が出現した。NS5A阻害剤耐性であるNS5A L31V変異あるいはL31V+Y93H変異型クローン感染マウ

スに対し、telaprevir+NS5A阻害剤を併用投与したところNS5Aの変異に加えNS3 V36A変異が出現し二重耐性型となりbreakthroughが生じた。さらにこのマウスに非核酸型ポリメラーゼ阻害剤を投与したところ、一旦は血中HCV RNAの低下を認めしたがHCVは再燃し、この際、三重耐性変異が出現していた。

TK-NOG マウスへのGCV投与1週後のALT値が高いほどヒト肝細胞移植8週後の血中ヒトアルブミン値(ヒト肝細胞置換率)は高値であった。HCV感染は高置換率マウス(70%以上)ではTK-NOG(10/10頭)およびuPA-SCIDマウス(50/53頭)で同程度であったが、低置換率マウス(70%未満)ではuPA-SCID(1/5頭)に比べTK-NOGマウス(27/28頭)において有意に高率であった。感染成立後のマウス血中HCV RNA量、IFN投与による血中ウイルス低下量はTK-NOGおよびuPA-SCIDマウスにおいてほぼ同程度であった。

D. 考察

DAA併用療法はgenotype 1b型HCVに対して有用な治療法であった。一方、genotype 2型では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効果はやや弱い。DAA製剤をsequentialに使用すると、多剤耐性変異型HCVが出現するため、注意が必要であることが示された。新規に作製されたTK-NOGマウスを用いたヒト肝細胞は、肝炎ウイルス研究に有用な動物モデルである。

E. 結論

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いてDAA耐性ウイルスの検討が可能であった。TK-NOGマウスを用いてHCV感染が可能なキメラマウスを作製した。

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.

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 . 知的財産権の出願・登録状況

特になし