

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
研究総括報告書（平成25年度）

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

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： NOG-SCIDを背景としたマウスにヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスにB型肝炎ウイルスを感染させB型肝炎キャリアモデルを作製した。感染成立後にヒト免疫細胞を移植し、慢性B型肝炎モデルを作製した。従来のuPA/SCIDマウス背景のB型肝炎ウイルスキャリアモデルおよび肝炎モデルと比較して、NOG-SCID背景のマウスの方がヒトアルブミン産生量は低く、ヒト肝細胞への置換率が低かったが、置換率が低くてもHBVの感染効率はuPA-SCIDと同等であった。統計学的な有意差はなかったがNOG-SCID背景のマウスの方が死亡率も低かった。どちらのマウスもヒト免疫細胞の投与により肝炎が発症した。uPA-SCIDマウスは劇症肝炎用の肝炎を発症し、ヒト肝細胞が急速消失した。この肝炎の主な炎症起細胞はNK細胞であることが見いだされた。これに対して、TK-NOG背景のマウスでは劇症型ではなく緩やかな肝炎が起こり、ヒトアルブミン値の低下、血清中HBV DNAの低下を認め、発症機序としてはCTLを介した反応であることが示唆された。また、HBVを産生するトランスジェニックマウスを3系統樹立した。さらにヒトiPS細胞より成熟肝細胞を誘導しHBV感染が引き起こされるかどうか検討を行った。iPS細胞由来の成熟肝細胞は肝特異的遺伝子であるAFPの発現やアルブミンの産生が認められた。昨年HBVレセプターの候補としてsodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が報告された。NTCPを恒常的に発現するNTCP-HepG2細胞株を樹立し、in vitroでのHBV感染系を作製した。cccDNA排除に向けた研究では、HBV coreを標的としたCRISPR/Casシステムを用いるとHBV複製中間体は1/5まで減少することを認めた。HBVの各蛋白をそれぞれ細胞に発現させたところPolymerase蛋白が細胞の蛋白合成全般を抑制することを見出した。

【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
	坂口 剛正	広島大学大学院	教授
	阿部 弘美	広島大学大学院	准教授

A. 研究目的

我々は、ヒトの免疫細胞とヒトの肝細胞をもちいて B 型肝炎のマウスモデルおよびヒト肝細胞による HBV の完全なライフサイクルを再現する継代培養系を構築した。これにより HBV の持続感染メカニズムと免疫反応に関する広範な研究が可能となった。昨年 HBV のエンターレセプターとして NTCP が見出されたことにより NTCP 安定発現株を用いて新規の *in vitro* HBV 感染培養系も構築された。本研究ではこれらのモデル動物、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

従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスを 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し、ヒトの B 型肝炎発症を再現するモデルを作製する。また、移植するヒト肝細胞をヒト iPS 細胞から誘導した成熟肝細胞も用いてヒト肝細胞キメラマウスを作製し HBV 感染モデルとして利用可能か検討する。また、Cre-loxP システムを利用した肝細胞特異的に HBs 抗原蛋白を発現しヒトの肝炎を模倣するモデルマウスを作製する。さらに HBV を産生するトランスジェニックマウスの作製を行う。これらのモデルを

用いて肝炎の発症機序、HBV 感染細胞内での自然免疫応答、HBV 粒子形成機構を詳細に検討する。

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

NOG-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した。NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスは従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスに比べるとヒトアルブミンの産生量は uPA/SCID の方が高いが、NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスの方がヒト肝細胞への置換率が低くても HBV 感染効率が良好で、死亡率も低かった(Kosaka et al., BBRC, 2013)。ヒト免疫細胞を HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに移植するとヒトアルブミン値の低下、血清中 HBV DNA の低下が認められ、既存の uPA/SCID を背景としたヒト肝細胞マウスを用いた劇症肝炎モデルとは肝炎の発症機序が異なる CTL を介した炎症反応が比較的緩やかな肝炎モデルを作製することができた(阿部班員、茶山班長)。また、ヒト iPS 細胞由来のヒト肝細胞を SCID マウスへの移植する肝細胞として使用可能かどうか検討を行った結果、ヒト成熟肝細胞へ誘導した細胞の 20-50% の細胞で肝特異的遺伝子であるアルブミン、フェトプロテインの発現が認められ、HBV を接種した結果、ヒト iPS 細胞由来の肝細胞内で HBV 複製中間体が検出された。このことからヒト iPS 細胞由来

の肝細胞でも HBV 感染は可能であることが示唆された(阿部班員、茶山班員)。また、uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスでは長期飼育を行った場合、uPA 遺伝子の欠失が起こることが知られていた。HBV 感染による慢性肝炎モデルの作製に向けて uPA 遺伝子の欠失が起こらないシステムにするため cDNA-uPA/SCID マウスを作製し、ヒト肝細胞を移植してヒト肝細胞キメラマウスを作製したところ 20 週間の長期飼育が可能となった(立野班員)。この HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの長期飼育により HBV 感染させなかったヒト肝細胞キメラマウス HBV 感染マウスに比較してアポトーシス関連の遺伝子の発現の上昇、細胞増殖に関連する遺伝子の発現低下、細胞の肥大化が認められた(立野班員)。また、HBV を産生する 1.4 倍長の HBV ゲノムを組み込んだ HBV トランスジェニックマウスを作製し 3 系統を樹立した。このうち 2 系統#31, #84 は血清中 HBV DNA 量は、いずれも 5 log copy/ml 以上であったが HBs 抗原量はいずれも 0.3-0.5IU/ml、HBe 抗原量は 10-20IU/ml と低値であった。反対に、残りの 1 系統#K では血清中 HBV DNA は 4-5 log copy/ml と低値であったが HBs 抗原量は 12 IU/ml、HBe 抗原量は 110 IU/ml と高値であった。HBV の core 蛋白の発現を調べたところ#31 では肝臓でのみ core 蛋白は発現し、#K では肝臓、腎臓で core 蛋白が発現していた。これら 3 系統について受精卵を保存した(阿部班員、茶山班員)。HBV エントリーレセプターとして NTCP が報告されたことを受け、ヒト NTCP 発現トランスジェニックマウスの作製を開始し

た。この動物実験は大臣確認実験と定められているため現在大臣確認申請中である(加藤班員)。

HBV 感染マウスと新規 HBV 培養系を用いた創薬研究

HBV のエントリーレセプターとして報告されたヒト NTCP を恒常的に発現する NTCP-HepG2 細胞を樹立した。NTCP の発現は蛋白レベルで検出可能であったが感染が成立しない細胞(Hussein 班員)感染効率が低い細胞(加藤班員)があり感染効率を上昇させる工夫が必要である。また、NTCP-HepG2 を用いて siRNA ライブラリーによる HBV 感染に関わる宿主因子のスクリーニングを進行中である。さらに HBV のライフサイクルに係る宿主因子として 500 個あるキナーゼのスクリーニングを行った結果現在までに HBV の複製に係るキナーゼとして 4 遺伝子、HBV の増殖抑制に関わる遺伝子として 5 遺伝子を見出した。これら 5 遺伝子のうちのひとつである TSSK2 はインターフェロン非依存性に働くことを確認した(Hussein 班員)。宿主側の解析では、マウスへ HBV 発現プラスミドを hydrodynamics 法により導入した実験系で ISG20 が HBV の複製を阻害していることを証明した。ISG20 の発現誘導機序としては、HBV 感染を感知した分子が細胞質内の IPS-1, TICAM-1 の両者を介して IRF3 を活性化し type I インターフェロンを誘導させ IFNAR を介して ISG20 の発現が誘導されることが証明された(瀬谷班員)。一方、ウイルス側の検討では、HBV は感染性のウイルス粒子である Dane 粒子を細胞外へ放出するが Dane 粒子だけでなく粒子内

に HBV ゲノムを持たない外側蛋白のみの中空の粒子を大量に放出することが知られている。HBV 粒子の細胞外への放出機構を詳細に調べるために細胞に preS1-preS2-S, preS2-S, S, preCore-Core, Core, HBe をそれぞれ単独で導入するとすべての蛋白が培養上清中に分泌された。Core 蛋白の C 末端にはアルギニンに富んだ領域が存在するがアルギニンの数を削っていくと Core 蛋白の培養上清中への分泌がなくなることから Core 蛋白の分泌には C 末端のアルギニンが重要であることが明らかになった。また HBV の各蛋白質のインターフェロンシグナル伝達への影響を調べるために HBV 蛋白と IFNB, IRF3, IFN stimulation responsive element (ISRE) のレポータープラスミドを共発現させセンダイウイルス Cantell 株を感染させてレポーター遺伝子の転写活性への影響を調べた。その結果 Polymerase 蛋白は対照の海シイタケルシフェラーゼ活性も強く抑制し、転写プロモーターを変えても抑制効果は変わらなかったことから Polymerase 蛋白は細胞の蛋白合成全体を抑制していることが示唆された (坂口班員)。さらに Polymerase 蛋白をドメイン毎に分けて発現させると逆転写酵素 (RT) ドメインに強力な蛋白質合成抑制作用があることが見出された。また、HBV 感染からの肝臓癌への進行症例、HCV 感染からの肝臓癌への進行症例、ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例の 3 グループでそれぞれ非癌部、癌部組織から microRNA を調製し次世代シーケンサーライフテクノロジーズ Ion PGM を用いた網羅的発現解析を行った結果、非癌部と比較して発現が上昇してい

る microRNA として HBV 感染からの肝臓癌への進行症例では 41 個、HCV 感染からの肝臓癌への進行症例では 10 個、ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例では 29 個、非癌部と比較して発現が減少している microRNA として HBV 感染からの肝臓癌への進行症例では 21 個、HCV 感染からの肝臓癌への進行症例では 11 個、ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例では 23 個の microRNA が認められ 3 グループに共通して非癌部と比較して発現が上昇する microRNA として miR-221 を含め 3 個が同定された (田原班員)。

cccDNA の排除、転写制御に関する研究

HBV core プロモーター領域の転写因子 FIF、HNF4 の結合領域を標的とした TALE を用いて HBV の転写阻害について検討した結果、対照のスクランブル TALE と比較してほぼ影響が見られなかった。一方、CRISPR/Cas システムを用いた系では HBV 複製中間体が 1/5 まで減少した (山本班員)。

D. 考察

NOG-scid マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスにヒト免疫細胞を投与することによって HBV に対する免疫応答を引き起こす肝炎モデルを作製することができた。肝炎の発症機序としては CTL を介した反応で比較的緩やかな炎症を惹起していることが示された。

E. 結論

肝炎モデルの改良、HBV Tg マウス、iPS 細胞由来肝細胞移植マウス、cDNA-uPA/SCID マウスをホストとしたヒト肝細胞キメラマ

ウス、in vitro HBV 感染培養系の構築が進み、HBV の各ライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となった。さらに、新規のゲノム編集技術 CRISPR/Cas システムを用いることで cccDNA の排除による HBV 完全排除に向けた創薬研究が可能となった。

F . 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). 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;441:230-235

2). 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 shepatitis B. J Med Virol.2013;85:789-798.

3). Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue

treatments in chronic hepatitis B patients. J Gastroenterol. 2013 ;48:1188-1204.

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし