

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25年度）

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・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 石田雄二 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  
吉実康美 株式会社フェニックスバイオ  
小川裕子 株式会社フェニックスバイオ

**研究要旨** 昨年度、新たに作製した uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID homozygote マウスをホストマウスとしたキメラマウス（cDNA-uPA/SCID ホモキメラマウス）に HBV を 14 週間感染させ、感染、非感染で、病理組織観察、TUNEL 陽性細胞の割合、線維化の程度を比較したところ、顕著な差は見られなかった。今年度、HBV 感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現を調べたところ、炎症や線維化に關与するマウス遺伝子発現 ( $\alpha$ -SMA, mCD14, mHGF, mTNF $\alpha$ , mTLR4, mProcollagen type1, mTGFR, mTGFB1) に差は見られなかったが、Apoptosis に關与するヒト遺伝子発現 (hTNFRSF10C, hFAS) の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現 (hPBK, hRRM2, hNCAPG) の低下傾向が見られた。また、HBV 感染キメラマウス肝細胞は非感染に比べて肥大していた。さらに、HBV 感染、非感染キメラマウスの肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が検出された。今年度はさらに長期間の感染飼育が可能と思われる、cDNA-uPA/SCID hemizygote マウスを用いたキメラマウス（cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウス）を作製し、HBV を接種し長期飼育観察（20 週）を行った。来年度は、cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスの遺伝子発現、病理組織学的解析を行う。

#### 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ホモおよびヘミマウスをホストマウスとしたキメラマウス(cDNA-uPA/SCIDホモおよびヘミキメラマウス)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

ヒト肝細胞ヘミキメラマウスの作出

3週令のcDNA-uPA/SCID hemizygote にドナーヒト肝細胞(2YF:2才、女兒、

ヒスパニック)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、32または34週令(移植後28または31週)に剖検し、肝臓、血液を採取した。

また、昨年度作製した、同じドナー細胞を用いたHBV感染(14週間)、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス(26週齢で剖検)の凍結保存肝臓組織を遺伝子発現解析、細胞サイズ測定に用いた。

#### cDNA-uPA/SCIDヘミキメラマウスへのHBV感染

2YFを移植した14週令(移植後11週)のcDNA-uPA/SCIDヘミキメラマウス11匹を、HBV長期感染試験(20週)に使用した。11匹のうち、5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50  $\mu$ Lを採血した。2  $\mu$ Lをh-Alb測定に、10  $\mu$ LをHBV DNAコピー数測定に用いた。

#### 定量性リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現量の定量およびマイクロアレイ解析

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス肝臓の以下に示す遺伝子の発現を昨年度報告の方法でreal-time RT-PCR法により解析した。

マウス由来の肝臓線維化に關与す

ると思われる遺伝子( $\alpha$ -SMA, mCD14, mHGF, mTNF $\alpha$ , mTLR4, mProcollagen type1, mTGFBR, mTGF $\beta$ 1) およびHBVの4週間感染によりこれまでキメラマウス肝臓で発現が変化することが報告されている一部の遺伝子

(hTNFRSF10C, hFAS, hPBK, hRRM2, hNCAPG、Tsuge M, et al. The Journal of Infectious Diseases 2011;204:224-8より)のprimerを作製し解析に用いた。primerは、ヒトとマウスに交差反応しないことを確認した。

また、HBV感染、非感染3匹ずつのTotal RNAを用いて、Affimetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (株式会社バイオマトリックス研究所、千葉)マイクロアレイ解析を行った。

#### 血清中ウイルス濃度測定

マウス血清中HBV DNA量を昨年度報告した方法で実施した。

#### キメラマウスの剖検、および病理学的検査

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。ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色標本を顕微鏡下で観察、写真撮影し、一定面積あたりのヒト肝細胞数をカウントした。

(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

#### cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス肝臓における線維化に關与すると思われるマウス遺伝子、HBV感染で変動があることが報告されているヒト遺伝子発現

線維化に關与すると思われるマウス遺伝子発現は、HBV感染、非感染で差は見られなかった。HBV感染で変化することが知られている遺伝子の発現では、Apoptosisに關与するヒト遺伝子発現(hTNFRSF10C, hFAS)の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現(hPBK, hRRM2, hNCAPG)の低下傾向がみられた。

#### HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスのマイクロアレイ解析

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスの肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、HBV感染で2倍以上上昇した17遺伝子、低下した18遺伝子が見られた。

#### cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスのHBV感染におけるヒト肝細胞の細胞サイズ

HBV感染、非感染14週間のキメラマウス肝臓における一定面積あたりのヒト肝細胞数をカウントした。その結果、HBV感染ヒト肝細胞半径は約1.6倍増加していた。

表 2. HBV感染、非感染キメラマウスの1定面積あたりのヒト肝細胞数

	肝細胞数/cm <sup>2</sup>	半径*	面積*	体積*
非感染	2.04 ± 0.31 × 10 <sup>5</sup>	1	1	1
感染	1.34 ± 0.07 × 10 <sup>5</sup>	1.6	2.7	4.3

\* 肝細胞を球と仮定して計算した。

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

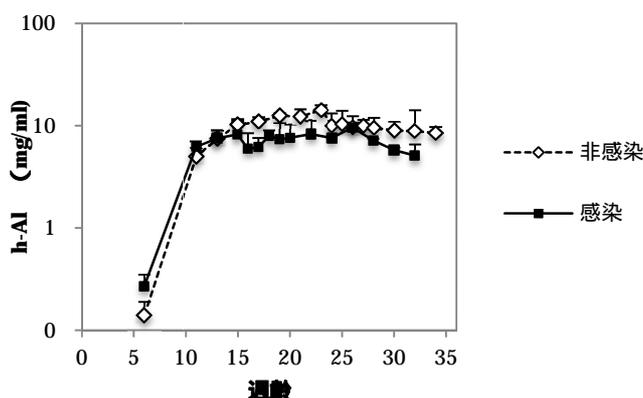


図 1 HBV感染、非感染へミマウスの血中ヒトアルブミン濃度

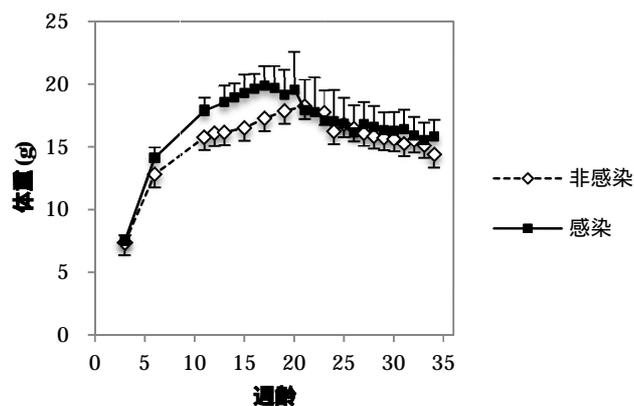


図 2 HBV感染、非感染へミマウスの体重

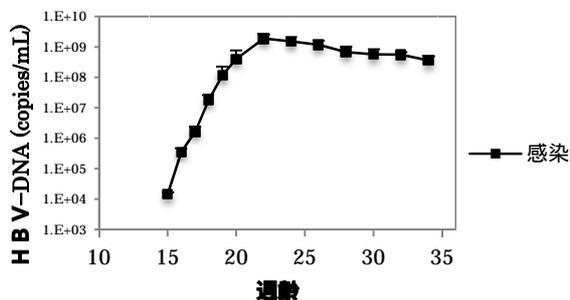


図 3 HBV感染へミマウスの血中HBV濃度

感染 8 週 (22 週齢) で HBV 感染キメラマウスが 1 匹死亡した。感染開始 20 週目にすべてのマウスの剖検を実施した。

体重に関しては、両群ともで 20 週齢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。HBV 感染群では、血中の HBV レベルは感染翌週から検出され、8 週よりプラトーに達した (図 1-3)。

#### 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、昨年度、新たに作製した uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID homozygotes 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 (14 週齢) の影響がより明らかになるのではないかと考えた。その結果、HBV 感染により、線維化、Apoptosis の増加などの病理学的な変化は見られず、炎症や線維化に關与するマウス遺伝子発現にも差は見られなかった。しかし、Apoptosis に關与するヒト遺伝子発現の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現の低下傾向がみられ、HBV 感染のヒト肝細胞

は非感染に比べて肥大しているのが確認された。このことから、今回調べたの遺伝子以外の発現にも差があるのではないかと考え、マイクロアレイ解析を行った。その結果、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が見つかった。来年度、これらの遺伝子発現を real-time RT-PCR で検証する。

今年度はさらに長期間の感染飼育が可能と思われる、cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスに HBV を接種し長期飼育観察 (20 週) を行った。来年度は、この肝臓の病理組織学的検査、および遺伝子解析も行う予定。

#### E. 結論

14 週間 HBV 感染 cDNA-uPA/SCID ホモキメラマウスでは、非感染に比べて炎症や線維化に關与するマウス遺伝子発現に差は見られなかったが、Apoptosis に關与する遺伝子の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現の低下傾向、ヒト肝細胞の肥大が観察された。マイクロアレイ解析により、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が見られた。今後、HBV 20 週間感染、非感染 cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスの肝臓における病理学的、遺伝子学的解析を実施する。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies. *Int J Mol Sci*. 2013 Dec 20;15(1):58-74.

(2) 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* 62;1055-61, 2013

(3) Asato Tachibana, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato Repopulation of the Immunosuppressed Retrorsine-treated Infant Rat Liver with Human Hepatocytes. *Xenotransplantation* 20;227-38, 2013

(4) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshihara M, Takaoka A, Kohara M.

Targeted induction of interferon- in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS One*. 8;e59611, 2013

(5) Kosaka, K. Hiraga, N. Imamura, M. Yoshimi, S. Murakami, E. Nakahara, T. Honda, Y. Ono, A. Kawaoka, T. Tsuge, M. Abe, H. Hayes, C. N. 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.* 441;230-5, 2013

(6) Arai M, Tokunaga Y, Takagi A, Tobita Y, Hirata Y, Ishida Y, Tateno C, Kohara M. Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT. *PLoS ONE* 2013 Dec 16;8(12):e82527.

(7) 石田雄二、山崎ちひろ、立野知世 . ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cells" 「細胞」7月号 "細胞移植" 特集, 2013

### 2. 学会発表

(1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi Y, Yoshizane Y, Chayama K, Tateno C. Development of a novel in vitro hepatitis B virus-infection model by using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse

liver. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 平成 25 年 10 月 21 日 Shanghai Medical College, Fudan University

(2) Kakuni M, Tachibana, A, Shimada T, Tateno C. Using PXB-mice® to Study the Effects of Antiviral Agents against Hepatitis B Virus. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 平成 25 年 10 月 21 日 Shanghai Medical College, Fudan University

(3) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C. In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®) transplanted from two different donor cells 第 28 回 日本薬物動態学会 平成 25 年 10 月 9 日 東京都 江戸川区夕ヶホール船堀

(4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Chayama K, Tateno C. Primary human hepatocytes isolated from mice with humanized livers as a novel in vitro hepatitis B virus infection model. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 27 日 大阪国際会議場

(5) Tateno C. Recent improvement and applications of chimeric mice

with humanized livers for drug development. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 27 日 大阪国際会議場

(6) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Cellular reaction of the humanized chimeric mouse liver after bile-duct ligation. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 26 日 大阪国際会議場

(7) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 26 日 大阪国際会議場

(8) 石田雄二、山崎ちひろ、柳愛美、吉実康美、藤川和幸、茶山一彰、立野知世 PXB マウス由来の初代培養ヒト肝細胞に対する HBV の持続感染 第 9 回 広島肝臓研究プロジェクト研究センターシンポジウム 平成 25 年 6 月 29 日 ホテルグランヴィア広島

(9) 立野知世、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由実子、山崎ちひろ、加国雅和 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性検出のためのヒト ALT-1 特異的 ELISA の開発 第 40

回日本毒性学会学術年会 平成 25  
年 6 月 19 日 幕張メッセ 国際会議  
場

(10) 石田雄二、茶山一彰、立野知世  
肝細胞キメラマウス由来培養ヒト肝  
細胞の HBV に対する感染性に関する  
解析 第 49 回 日本肝臓学会 平成  
25 年 6 月 6 日 京王プラザホテル

(11) 立野知世 ヒト肝細胞キメラ  
マウス由来 ” 新鮮ヒト肝細胞 ” の薬  
物代謝研究への利用 薬物動態談話  
会 4 月定例会 平成 25 年 4 月 10 日  
千里ライフサイエンスセンター

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

##### 1. 特許取得

特願 2012-102814 ( H24 年 4 月 27 日  
出願中 ) 「ウロキナーゼ型プラスミ  
ノーゲンアクチベータトランスジェ  
ニックマウス」、PCT/JP2013/062806  
( H25 年 4 月 25 日出願中 )

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし