

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）

抗HBV免疫応答を惹起する新規肝炎モデルマウスの開発
in vitro HBV感染系の樹立

研究分担者 丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科 講師

研究要旨：

HBV感染により惹起される多様な免疫応答が、病態形成や治療効果に深く関与していることが知られている。本研究課題では、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用によりHBVウイルス抗原を発現する遺伝子改変マウスを新たに作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、ヒト肝炎を模倣した免疫応答の誘導が可能な新規B型肝炎モデルマウスの開発を目指している。また*in vitro* HBV感染モデルとして、TALENを用いた遺伝子破壊技術を活用し、肝培養細胞において抗HBV分子、DNAウイルス感染センサー分子のノックアウトを行い、新しいHBV感染細胞系の樹立を進めている。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)はさまざまなウイルス感染症の中でも、そのウイルス感染に対する多彩な宿主免疫応答が誘導されることが特徴のひとつである。事実、HBV感染者には、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、無症候性キャリアと、きわめて多様な臨床病像が生じることが知られている。こうしたHBV感染による多様な病態の形成には、ウイルスが感染した肝細胞に対する免疫応答が中心的な役割を果たしている。加えて、インターフェロンや核酸アナログ製剤によるHBVに対する抗ウイルス療法に際しても、背景に存在する免疫系の応答機構の理解が、HBs抗原の消失などの臨床的治癒状態を達成するための必須条件となる。したがって、HBV治療における新しい創薬ターゲットを探求するためには、HBVにより惹起される多様な免疫応答を模倣し

た*in vivo*モデルの樹立が急務である。しかしながら、幼少時にHBV感染したヒトの場合には無症候性キャリアとなるのと同様に、モデルマウスにおいても胎児期にわずかでもHBV抗原提示が存在すると免疫寛容状態となってしまう、肝炎を発症しないことが知られている。このため、薬剤誘導性に成人期にHBV抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスがひとつのモデル候補となりうる。しかしながら、HBVは自らのゲノム中にpromoterやenhancerモチーフを有していることから、胎児期から完全にウイルス抗原タンパクの発現を抑制したモデルの構築がきわめて困難である。そこで、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用により内在性ウイルスpromoter配列を含まないHBV抗原タンパクを発現す

る遺伝子改変マウスを新規に作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、肝炎としての免疫応答の惹起が可能なB型肝炎モデルマウスの新規開発を目指すことを本研究課題の目的とする。

一方、DNA ウィルスである HBV が肝細胞に感染する際に、宿主側因子にどのように認識され、どのように抗ウイルス免疫応答が誘導されているかについては不明な点が多い。近年、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ複数のヒト遺伝子編集酵素が、HBV に対する抗ウイルス作用を発揮していることが明らかになりつつある。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリーである。APOBEC ファミリー分子は、塩基配列上のシチジン (C) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化をきたす作用を有している。遺伝子編集酵素群の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、複数のファミリー分子は、生体に感染したウイルスに対する防御機構として機能していることがわかってきている。この中でも、APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3C は HBV のゲノム配列において C→T/G A への遺伝子変異を高頻度に誘導する作用をもつことが報告され、APOBEC ファミリー分子が感染時にウイルス遺伝子に塩基変化を導入することによって、ウイルスを不活化する役割を担っていると考えられるようになった。我々のこれまでの検討結果から、肝炎ウイルス感染とそれに伴う炎症反応、ならびにイン

ターフェロン産生反応により、肝細胞にこれらの遺伝子編集酵素群のいくつかが特異的に発現誘導されること、APOBEC ファミリー分子のひとつである activation induced cytidine deaminase(AID)が抗 HBV 作用を有していること、などが明らかになってきた。しかしながら、HBV が肝細胞に感染した際に、どのようにして宿主因子に認識され、抗ウイルス応答が誘導されているかについては不明なままである。感染した肝細胞からのウイルスの完全排除を達成するためには、十分な免疫応答の乏しい慢性感染持続状態においても HBV 感染時のセンサー機構を活性化することが、新しい抗 HBV 制御機構につながるものと期待される。そこで、近年、DNA ウィルス感染のセンサー分子として同定された STING, cGAS に着目し、抗 HBV 作用を有する APOBEC family とともにこれらの遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築して HBV 感染感受性を検証することにより、HBV 制御の分子機構を明らかにすることにした。この目的を達成するために、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グループとの共同開発により、TALEN を用いた新しい遺伝子破壊技術による *in vitro* ノックアウト肝細胞の樹立に着手した。

B. 研究方法

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

まずはじめに、薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスの作成を行った。マウス作成のためのコンストラクトとしては、Cre を誘導可能にするために、estrogen 受容体部分に点

突然変異を複数導入し、内在性 estrogen に反応せず、tamoxifen に反応する性質をもった変異型 estrogen 受容体(ERT2)と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したコンストラクトを作成した。このコンストラクトを用いてマウス胚への injection を実施し、F0, F1 マウスを取得した。また、Cre による LoxP の組換え作用により promoter 配列を含まない個々の HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、まず CAG promoter 下流に loxP で挟んだ緑色蛍光タンパク(GFP)を置き、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したものを作成した。すなわち、Cre の存在しない状況ではマーカー分子としての GFP を発現し、Cre の存在下では LoxP の組換え作用によって HBs 抗原を発現することが期待できる構造としている。このコンストラクト作成を行い、マウス胚への injection を実施し、目的とする遺伝子改変を達成した F0 マウスを合計7ライン確保した。引き続き、得られた各ラインの F0 マウスから F1 マウスをそれぞれ樹立し、薬剤誘導刺激後のそれぞれの F1 ラインの表現型を検討した。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

抗 HBV 作用を有する APOBEC family とともに、近年、DNA ウィルス感染のセンサー分子として同定された STING, cGAS に着目し、これらの遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築することによる新しい *in vitro* HBV 感染モデルの作成を開始した。標的遺伝子のノックアウト技術として、同じ研究班に所属する山本卓教授の

研究グループが専門とする人工ヌクレアーゼのひとつである TALEN 技術を用いることとし、共同研究を開始した。植物病原細菌キサントモナス属がもつ TALE を DNA 結合ドメインとして利用した TALEN では、TALE は約 34 アミノ酸からなるほぼ完全な繰り返し構造からなっている。そのうちの 12,13 番目のアミノ酸の違いが DNA 塩基認識特異性を決定することから、AID, APOBEC3F/G, STING, cGAS それぞれに対応するユニットの作成を行った。同時に、薬剤耐性遺伝子を構成的に発現するカセットを挿入した targeting vector を作成した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正)及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正)並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正)に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報に適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済

産業省・環境省令第一号)「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成16年文部科学省・環境省令第一号)その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

モデルマウス作成のためのコンストラクト作成、マウス胚への injection、F0 マウスを7ライン樹立し、それぞれのラインの F1 マウスの獲得までの作業を完了した。薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、変異型 estrogen 受容体(ERT2)と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したベクターを構築した。このコンストラクトをマウス胚に injection し、F0 マウスを2ライン確保することができた。他方、Cre による LoxP の組換え作用により HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、CAG promoter 下流に loxP で挟んだ GFP を挿入し、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したベクターを作成した。また、上記、誘導型 Cre 発現コンストラクトと同様に、

HBs 抗原発現用コンストラクトもマウス胚への injection を実施し、F0 マウスを7ライン確保することに成功した。うち、先行する1ラインからの F1 マウスを用いて、薬剤誘導性に GFP 発現の消失すること、それと同時に血中に HBs 抗原タンパク質が発現・分泌されることを確認した。しかしながら、薬剤誘導1週間、2週間後のマウス肝組織には有意な炎症細胞浸潤が認められなかったことから、肝炎としての免疫応答は乏しい可能性が示唆された。同じ肝組織から抽出した RNA を用いた Real-time-RT PCR 解析からは、薬剤誘導によりインターフェロン下流遺伝子の発現が誘導されていることが示唆されたため、少なくとも HBs 抗原への免疫応答は惹起されているものと推定されたことから、今後、免疫応答を活性化する工夫を追加していくこととした。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

まず、*in vitro* の HBV 感染系の基盤となる DMSO+PEG 処理した HepG2 細胞への血清検体由来の HBV 感染の至適条件を設定した。このモデルを活用して、HepG2 細胞への TALEN を用いた特異的な遺伝子破壊を導入することとした。引き続き、AID, APOBEC3F/G, STING, cGAS それぞれに対応する TALE ユニットの設計を行い、それぞれの TALEN 発現ベクター作成した。また同時に、薬剤耐性遺伝子(puromycin)を構成的に発現するカセットを挿入した targeting vector を作成した。リポフェクションによりこれらの新規作成 vector を HepG2 細胞に導入し、puromycin でのセレクションを開始した。現在、hetero-knockout

細胞の構築までが完了しており、homo-knockout 細胞の樹立次第、HBV 陽性血清の *in vitro* 感染実験を開始する予定である。

D. 考察

薬剤誘導性に任意の時期に HBV 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成することにより、ヒト B 型肝炎病態を模倣した新しい B 型肝炎モデル動物の構築を目指すことを本研究課題の目標としている。同時に、*in vitro* においても培養細胞を用いた HBV 感染系を樹立することができれば、薬剤スクリーニングに際して異なる genotype やさまざまな変異ウイルスを含んだ血清検体を感染実験に簡便に試用することが可能となり、多様な HBV 感染病態に対応可能な創薬への貢献が期待できる。

E. 結論

肝炎としての免疫応答の惹起が可能な B 型肝炎モデルマウスの新規開発を目指し、薬剤誘導性に肝細胞特異的に HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスの作成を行った。また、*in vitro* HBV 感染モデルの樹立をめざし、TALEN を用いた抗 HBV 分子の特異的な遺伝子破壊を行った肝培養細胞の樹立を継続していく。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014.146(1):222-232.
- 2) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Hga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014(in press)
- 3) Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer*.2014.134(5):1067-76.
- 4) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T: Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013. 288(44):31715-27.
- 5) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto

Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S:
Efficacy and safety of prophylaxis with
entecavir and hepatitis B immunoglobulin
in preventing hepatitis B recurrence after
living donor liver transplantation.
Hepatol Res.2013.43: 67-71.

- 6) Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T: Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2013. 51:3645-3652.
- 7) Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Hyashino A, Haga H, Marusawa H, Teramukai S, Chiba T: Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation. PLoS One .2013.8:e58380.

2 . 学会発表

- (1) 丸澤宏之 . 慢性炎症によるゲノム異常生成と肝発癌 . 第 72 回日本癌学会学術総会 . パシフィコ横浜 2013.
- (2) 千葉勉、丸澤宏之 . 炎症と遺伝子不安定性 . 第 72 回日本癌学会学術総会 . パシフィコ横浜 2013.
- (3) 金秀基、丸澤宏之 . 肝幹/前駆細胞を起源とする肝発癌モデルを用いたゲノム異常の網羅的解析 . 第 17 回日本肝臓学会大会 . 品川プリンスホテル 2013.
- (4) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、喜多村晃一、脇田隆字 . IL-1/TNF- α によるシチジンデアミナーゼ AID 誘導を介した B 型肝炎ウイルス感染排除機構 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 . 神戸国際会場 2013.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし