

厚生労働科学研究補助金（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）

肝炎モデルの改良と新規HBV感染モデルマウスの作製

研究分担者 阿部 弘美 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授

研究要旨：ヒトiPS細胞より成熟肝細胞を誘導し、HBV産生細胞の培養上清を濃縮して感染源として調製したHBV溶液を接種し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。今回誘導させた肝細胞は成熟肝細胞に誘導後7日間までしか培養できないため培養上清中のHBVDNAを十分検討できなかったが複製中間体が検出された。このことよりiPS細胞由来の成熟肝細胞はHBV感染が引き起こされたと考えられる。今後、この細胞をSCIDマウスに移植してヒト肝細胞マウスを作製し既存のHBV感染モデルとの比較を行う予定である。

A. 研究目的

肝炎モデルを改良し慢性B型肝炎モデルを作製、またHBV産生モデルとしてHBVTgマウスを作製しHBV感染細胞の排除機構、cccDNAの排除、HBV粒子分泌抑制、HBV蛋白に対する抗体産生促進する因子の探索を目的とする。また、iPS細胞由来の肝細胞を用いたヒト肝細胞マウスを作製し、既存のヒト肝細胞キメラマウス、HBVTgマウスモデル間での感染効率等の比較を行う。

B. 研究方法

下記の3種類のヒト肝細胞マウスモデルを作製し、HBを感染させマウスモデル間の比較を行う。

ヒト肝炎モデルを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する。

3.5kb pregenome RNAを生成するような1.4倍長のHBVゲノムをC57BL/6J-Jclマウス受精卵へ導入しHBV産生マウスを作製する。得られた個体の血清中HBVDNA、HBs抗原、HBe抗原、HBVゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を樹立する。

iPS細胞からBasma et al., の3ステップからなる方法により成熟肝細胞を作製し、SCIDマウスへ移植を行う。

～のマウスモデルを用いてHBV感染効率、血清中HBVDNA、HBs抗原量、HBe抗原量を測定、肝細胞中のHBV複製中間体の解析を行った。また、～のモデルについてはin vitroでのHBV感染実験も行った。

C. 研究成果

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論文として発表した(Kosaka et al., BBRC, 2013)。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。また、HBV 感染マウスに対して抗ウイルス薬であるエンテカビルを投与すると 3 週間で血清中 HBV DNA は 3log copy/ml 減少した。従って改良型の NOG/SCID マウスを背景とした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と同等以上の HBV 感染モデル、B 型肝炎モデルとして使用可能であると考えられる。

HBV 産生マウスから得られた血清中 HBV DNA、HBs 抗原、HBe 抗原、HBV ゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を 3 系統 (#31, #84, #K)を樹立した。#31, #84 の系統では血清中の HBV DNA 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、#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。

iPS 細胞由来の肝細胞において肝細胞に特異的に発現している AFP、アルブミンの発現を免疫染色で調べた結果、20-50%の細胞が AFP、アルブミンを発現する成熟肝細胞であった。この細胞に HBV 産生細胞由来の HBV を感染させ、翌日 PBS を用いて感染源を除去

し、HBV 感染 3 日後、6 日後の培養上清中 HBV DNA を測定したところ感染 3 日後に比べて 6 日後の HBV DNA は減少していた。今回行った方法では成熟肝細胞に分化した後は 7 日間しか培養できなかったため、HBV 添加後の培養上清中 HBV DNA では HBV 感染の有無は判定できなかった。そこで、細胞外へ放出される前の HBV 複製中間体が形成されているかどうか調べるために肝細胞内の HBV core capsid を抗 HBV core 抗体に結合させ、SDS, proteinase K を用いて蛋白を分解させた後、核酸を精製し HBV core capsid 内に内包された HBV ゲノムの検出を試みた。その結果、iPS 細胞由来の成熟肝細胞内には core capsid に包まれた HBV ゲノムが検出され、HBV 感染が引き起こされていたことが示唆された。

D. 考察

NOG-scid マウスを用いることで長期ヒト血球細胞の生着が期待できる。HBV Tg マウスは高 HBV 量、低 HBV 量の両系統のマウスが得られた。iPS 由来の肝細胞への HBV 感染は複製中間体を検出することによって確認したが感染性の HBV 粒子が放出されているかどうかは未だ不明である。今後分化誘導方法を検討し長期間培養できるようなシステムの構築を目指す。さらに iPS 細胞由来の肝細胞を SCID マウスに移植しヒト肝細胞マウスを作製し、このマウスとの比較を行う。

E. 結論

改良型肝炎モデル、HBV Tg マウス、iPS 細胞由来肝細胞移植マウスを用いることで炎症反応の制御、HBV のライフサイクルに関する研究が促進され、宿主免疫を制御しながら HBV のライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となる。

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