2014230041A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
（Ｂ型肝炎創薬実用化等研究事業）

ツパイ全ゲノム解析に基づくＢ型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

平成26年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　小原　道法

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
（Ｂ型肝炎創薬実用化等研究事業）

ツパイ全ゲノム解析に基づくＢ型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

平成 26 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　　小原　道法

平成 27(2015) 年 3 月

ツパイ全ゲノム解析に基づくＢ型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

研究組織

研究代表者		
小原　道法	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・感染制御プロジェクト	シニア研究員
研究分担者		
保富　康宏	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	センター長
小原　恭子	国立大学法人鹿児島大学・獣医学部・越境性動物疾病制御研究センター	教授・センター長
石井　健	独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・アジュバント開発プロジェクト	プロジェクトリーダー
押海　裕之	国立大学法人北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター	准教授
村上　周子	公立大学法人名古屋市立大学・大学院医学研究科	特任助教
櫻井　遊	国立大学法人北海道大学・大学院薬学研究院	特任助教
日浅　陽一	国立大学法人愛媛大学・大学院医学系研究科　消化器・内分泌・代謝内科学講座	教授

目次

I. 総括研究報告
ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究
小原　道法 --1

II. 分担研究報告
1. ツパイ全ゲノムの解析、免疫学的解析系の確立、治療薬を用いた動物モデルの評価
小原　道法 --11

2. HBV 高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析
保富 康宏 --18

3. ツパイ免疫学的解析系の確立、感染・発症評価系の改良、効率の良い HBV-ツパイ感染実験モデルの確立
小原 恭子 --22

4. ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価
石井　健 --26

5. ツパイ自然免疫系の解析
押海　裕之 --32

6. ツパイ高感染姓 HBV の馴化・選択
村上 周子 --35

7. 肝細胞を標的とした薬物送達システムの開発
櫻井 遊 --39

8. ツパイを用いたB型肝炎治療ワクチンによる免疫療法の確立
日浅 陽一 --50

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 --57

IV. 研究成果の刊行物・別刷 --67

Ｉ．　総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服実用化研究事業(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
総括研究報告書

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

研究代表者:小原　道法　東京都医学総合研究所
感染制御プロジェクト・シニア研究員

研究要旨:B型肝炎ウイルス(HBV)　は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっているが、有効な根治治療法は確立されていない。HBVはヒト、チンパンジー以外に適正な感染動物が存在せず、治療や病態解析に用いる実験動物モデルの確立が急務となっている。近年、ヒトの肝臓細胞を持つ免疫不全マウスが開発され、HBV研究の様々な領域で威力を発揮している。しかし、このマウスは獲得免疫系が機能しておらず、ウイルスの病原性解析や治療効果の判定に用いることはできない。

ツパイは、B型肝炎ウイルス(HBV)に感染感受性を示し、肝炎も発症することから、チンパンジーに変わるB型肝炎のモデル動物となることが期待される。ツパイは肝炎ウイルス感染動物実験モデルの候補として優れているものの、これまでその免疫応答を解析するツールは殆ど存在していない。治療薬の効果を評価するにはツパイの免疫応答機構を解析するツールの作製が必須である。そこで、①HBV高感受性ツパイ個体を選択し、治療や病態解析実験動物モデルとして使用可能な系統化する。②ツパイ高感染性HBV株と、HBV高感受性ツパイ系統を各々樹立し、両者を組み合わせることで、慢性肝炎や肝がんをより高頻度に発症する条件を確立する。③治療薬の効果を評価するにはツパイの免疫応答機構を解析するツールの作製が必須である。そこで、ツパイの全ゲノム解析データ情報を基に免疫機構解析ツールを確立する。④抗ウイルス活性を持つ化合物や治療ワクチンなどの効果を検証する。これらの研究により、病態解析や薬理効果、治療効果の実証を可能とし、HBV病原性解析やHBV感染に起因する肝炎・肝がん治療法の開発など新規HBV感染治療法の確立において大きく貢献すると期待される。

研究分担者:
保富康宏:独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター　センター長
小原恭子:鹿児島大学・共同獣医学部　教授
石井健:独立行政法人医薬基盤研究所・アジュバント開発プロジェクトリーダー
押海裕之:北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター　准教授
村上周子:名古屋市立大学・大学院医学研究科　特任助教
櫻井　遊:北海道大学・大学院薬学研究院特任助教
日浅　陽一:愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学講座　教授

A. 研究目的

HBV感染を防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な実験動物モデルが必要であるが、これまでに感染感受性が報告された動物モデルはチンパンジーのみである。しかしチンパンジーは、動物愛護の観点から、実験動物としての使用が制限されており、安楽殺が禁止されているため実験終了後も飼育が必要である。

以上の点から、チンパンジーに代わる実験動物モデルの確立が急務となっている。

本研究者らは原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）にHCVが感染する事を見いだして報告してきた。ツパイはラット程度の大きさで寿命は4-7年である。HCVがツパイに感染すると1～3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事を確認しており（JV 2010）、飼育コストも低い事からチンパンジーに変わる感染実験動物モデルとして期待されている(The turn of the shrew. Nature 2011)。また、HBVのツパイ初代肝臓細胞における増殖効率はヒト初代肝細胞のそれに匹敵し、個体としてのツパイもHBVに感受性である事が報告されている(Hepatology 1996)。

その一方で、ツパイを実験動物とする医学的研究はほとんど行われていないため、ウイルス感染動態の解析ならびに治療効果の評価を行う上で不可欠な免疫系に関する知見は、ほとんど得られてない。このように、ツパイはHBV感染実験モデルとして高いポテンシャルを持つが、実際の応用には、ツパイの免疫系ならびにHBV感染に対する免疫応答の解明と、効率の良いHBV感染の成立と、安定的な発症を可能とするためのHBV-ツパイ感染実験系の改良が必要である。
また、HBV 感染患者では、肝炎が発症し、やがては肝硬変、肝癌へと進行する。しかし、全ての感染患者においてこのような経過をたどることはなく、免疫応答により治療する患者も多い。このことは、宿主の免疫を賦活することにより治療できる可能性を示している。しかし、これまでヒトにおける HBV 感染病態を模した動物モデルはチンパンジー以外存在しておらず、免疫賦活化による治療法を評価するモデル動物は存在していなかった。そのため、より効果的で安全なワクチンの開発のために、新規アジュバントの開発が重要であると考えられる。本研究では、感染感受性があることが知れているツパイを HBV 感染症のモデル動物として確立するとともに、本動物系を免疫賦活化による治療法開発および新規治療薬開発へ応用することを目的とする。

B．研究方法

研究代表者（小原道法）

(1) ツパイ

ツパイは鹿児島大学 共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター（小原恭子 教授）および医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター（保富康宏 センター長）より供与していただいた。実験には、およそ 1 歳齢の個体を使用した。

(2)ツパイ肝細胞へのHBV感染実験

3～6週齢のツパイより分離・培養した肝細胞に接種した。

(3) ツパイ肝臓置換キメラマウス

3週齢のツパイより肝細胞を分離し、3週齢のuPA/SCIDマウスに移植した。移植10週後に、感染実験に使用した。

(4) ツパイ肝臓キメラマウスへのHBV感染実験

ツパイ肝臓キメラマウスに10^6copiesのHBVを静脈より接種した。感染後2週間毎に採血を行い、リアルタイムPCRによるウイルス遺伝子量の測定を行った。

(5) ツパイへのHBV感染実験

ツパイ1頭あたり1×10^6copiesのHBVを静脈より接種した。感染後1日目、3日目、21日目に剖検・採材を行い、ALTおよびウイルス遺伝子量の測定、肝臓の病理学的解析、および次世代シーケンサーによるmRNAの発現解析に用いた。

(6) ツパイへのHBsおよびHBc抗原免疫投与実験

3週間毎、計6回、ツパイにHBs抗原およびHBc抗原を10ugずつ皮下投与もしくは鼻腔内投与し，免疫応答を解析した。

研究分担者（保富康宏）

(1)繁殖・育成

出産予定日をある程度予測する必要性と雄から雌への攻撃の可能性を少なくするため、交配時の雌雄同居は 5 日間とした。妊娠期間が 42～45 日であるが、妊娠の確認については、体重の増加と目視による体型の変化の確認により行った。分娩後は仔ツパイの体重を毎日測定すると共に、授乳状況によって人工哺育を行っている。

(2) HBV 感染実験

接種するウイルス株は肝細胞キメラマウス血清で高い力価を持つ Genotype A のウイルス株を用いた。生後 24 時間以内及び生後 3 日目の仔ツパイの腹腔内もしくは皮下へ 1×10^7コピー/100 μ L のウイルスを接種した。接種後、定期的に採血を行い、血清は使用するまで-80℃で保管した。

血中ウイルス量の定量は S 遺伝子に設計された Taqman PCR によって実施した。

(3) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種したウイルス株から得られた HBV DNA をクローニングした。48 クローンの全長 DNA 配列を決定し、得られたコンセンサス配列を基にして PCR 法によって、2 種類の断片のクローンを作製した後に、pUC19 ベクターに同時にライゲーションし、HBV ゲノム全長の 1.24 倍長の分子クローンを作製した。分子クローンを Huh-7 にトランスフェクションし、培養上清から HBV を精製し感染実験に用いた。

研究分担者（小原恭子）

2 匹のツパイ肝臓から DNA を抽出し、次世代シークエンサーで全ゲノム配列の決定を行った。これらから予測される cDNA に基づき、各種免疫系・シグナル分子に対するペプチド抗体を作成した（134 種）。

ツパイの繁殖には♀15 匹、♂10 匹を使用した。♀は 15 匹全頭出産できたが、♂は 10 頭中 8 匹であった。

FACS の解析機器は FACSVerse™(Becton Dickinson)を導入した。

新生児への HBV 接種は、生後 0 日目に 10^6~2x10^7 の HBV, genotype A2, C, J の腹腔内接種を行った。一部個体では、その後腹腔内か静脈内に HBV の追加接種を行った。生後 4 週目から各個体 0.5mL 採血を行ってウイルス量と ALT 値の測定をした。HBV 量は定量 PCR で、ALT は測定キット（和光）を用いた。その後 2 週間隔で測定を継続している。

研究分担者（石井健）

ツパイでの TLR9 リガンドの効果を評価するために、ツパイから脾臓を摘出し脾細胞を調整後、ヒト型、マウス型の CpG ODN および我々が昨年開発に成功したナノ粒子型 TLR9 リガンドである K3-SPG で刺激を行った。6 時間後に RNA を回収し自然免疫活性化能を real time PCR 法で解析した。TLR9 リガンドのアジュバント活性を検討するために、ツパイにモデル抗原であるオバルブミン単独またはヒト型、マウス型の CpG ODN および K3-SPG をアジュバントとして共に免疫し、その後の獲得免疫応答（体液性免疫、細胞性免疫応答）を評価した。

研究分担者（押海裕之）

ヒト、マウス、ツパイの培養細胞を用い、HBV の DNA に対する自然免疫応答を、サイトカインの産生やタンパク質の細胞内局在を指標に調べた。また、HBV に感染させたツパイ個体の各臓器から RNA を抽出しサイトカインの発現を調べた。肝臓由来の細胞株を用い、HBV のタンパク質を試験管内で発現させ、HBV タンパク質による自然免疫抑制機構を調べた

研究分担者（村上周子）

(1) ツパイに HBV を接種後、HBV-DNA を検出した血清サンプルについて、希釈により必要量の液量に調整し超高感度 HBs 抗原測定系（ICT-CLEIA（シスメックス）; Takeda et al, J Clin Microbiol. 2013）を用いて HBs

抗原を測定した。
(2) 1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株 genotype Ae、Bj、Ce、D について、薬剤耐性変異株(エンテカビル耐性、ラミブジン耐性、アデホビル耐性、ラミブジン＋アデホビル耐性)を作製し、Huh7 細胞へトランスフェクトしてウイルス粒子を含む培養上清を得るとともに、細胞内のウイルス複製を Southern blotting で確認した。また、培養上清中のウイルス粒子を限外ろ過により濃縮し、ヒト肝細胞キメラマウスに接種し、約 8 週後に感染を確認した。

研究分担者(櫻井遊)
これまで独自の脂質である YSK05 と呼ぶ脂質を用いてきたが、保存安定性に欠けるという問題があった。そのため、リノレイン酸を出発物質として、新規の脂質 YSK13 の合成を行い、活性の比較を行った。siRNA の肝臓内局在観察は下記の手順で行った。Cy5 標識 siRNA を搭載した脂質ナノ粒子を ICR マウス(4 週齢) に 1.0 mg siRNA/kg weight で静脈内投与した。30 分後に肝臓を回収し、Hoechst33342 で核を染色した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Nikon A1R) を用いて観察した。

肝実質細胞における遺伝子ノックダウン効率の測定は血液凝固第 VII 因子 (FVII) を標的とした siRNA (siFVII) を搭載した脂質ナノ粒子を ICR マウス (4 週齢) に静脈内投与し、24 あるいは 48 時間後に血液を採取し、ヘパリン処理後に血漿を得た。血漿中の FVII 酵素活性を測定した。
内皮リパーゼ (EL) およびリポプロテインリパーゼ (LPL) の阻害剤である GSK264220A (Tocris Bioscience 社) および LPL 阻害剤である orlistat (Cayman Chemical 社) はそれぞれ 30 mg/kg weight で脂質ナノ粒子の投与直前に腹腔内より投与した。

研究分担者(日浅陽一)
研究は、臨床的検討と基礎的検討を行った。対象は B 型慢性肝炎患者 151 名。ランダムに患者を 2 群に分けて、そのうちの 75 名に対して、HBs 抗原＋HBc 抗原ワクチンを 2 週 1 回、計 5 回、経鼻投与し、その後、HBs 抗原(100 μ g)＋HBc 抗原(100 μ g)ワクチンを 5 回皮下投与した(ワクチン治療群)。対照群として、76 名に peg-IFN-α (180mg)週 1 回、計 48 回投与して比較検討した(peg-IFN 群)。治療開始から治療終了後 48 週における ALT 値、HBe 抗原陽性率、HBs 抗原量、HBV-DNA 量、fibroscan による肝線維化の程度(肝硬度値)を測定し、治療効果および副作用について評価した。

また、百日咳全菌体ワクチンのアジュバント効果、副作用を検討するため、別の B 型肝炎患者 6 名に HBs 抗原＋HBc 抗原＋百日咳全菌体ワクチンを投与し、アジュバントを用いなかった 6 名の患者群と治療効果、副作用について比較検討した。

HBV 治療ワクチンの作用機序の解析がツパイで可能かを検証するため、ツパイに HBs 抗原＋HBc 抗原治療ワクチンを 30 μ g 投与し、2 週後に血中 HBs 抗体、HBc 抗体の誘導を検討した。また現在、HBV 持続感染が確認されたツパイに同治療ワクチンを投与している。

(倫理面への配慮)
患者由来の組織や血清の使用に当たっては各研究機関の倫理委員会において承認を受ける。提供者には「インフォームド・コンセント」を書面で行う。動物の管理は法律に従って行い、各研究機関の動物実験委員会の承認を得る。

C. 研究結果
研究代表者(小原道法)
(1)2頭のツパイ全ゲノム解析を終了し、ツパイのゲノム配列はヒトとは約88%、チンパンジーとは約83%の相同性を示した。その結果、HBV

やHCVレセプター等ヒトの分子と相同性の高い遺伝子群が認められた。
(2)得られたゲノム情報からツパイの免疫反応を担うサイトカインや細胞表面マーカー、自然免疫、シグナル分子など130種類を選択し、ペプチド抗体作成を行った。この抗体を用いてツパイ免疫系の解析をすすめた。
(3)ツパイ肝臓初代培養細胞及びツパイ肝臓細胞置換キメラマウスへのHBV感染を行い、効率良く感染増殖することを見出した。
(4)成獣ツパイに遺伝子型A,C,JのHBVを接種後経日的に採血し経過を観察したところ、全てのツパイに感染が成立し、肝臓組織の異常所見は感染3日後という早期から現れることが明らかとなった。
(5)感染1, 3, 21日後に剖検を行い、肝臓組織中の遺伝子発現の変化を次世代シークエンサーにより網羅的に解析し、感染1日後から炎症制サイトカインが誘導されていることをみいだした。
(6)ヒトHBVワクチンで使用されている遺伝子型AあるいはCの酵母発現HBs抗原、HBc抗原を皮下あるいは経鼻で接種し抗体産生、細胞性免疫誘導について解析した。2回の接種で高い抗体価の誘導が認められ、遺伝子型A抗原接種群の方が初期応答が早かった。

研究分担者(保富康宏)
(1)ツパイの繁殖系を樹立し、繁殖率、離乳率、育成率のいずれも過去の報告を上回るものであった。30頭のF0ツパイから約80頭のF1ツパイを得た。平均の産児数は3.3頭で、離乳率は約60%であった。
(2)新生ツパイ55頭へ感染者血清を腹腔内投与または皮下接種した。全ての感染個体血清中からHBV遺伝子が検出されている。これらの新生児を主とした感染系をさらに増加させ、長期持続感染の有無、並びに肝炎等の病態の観察を行っている。
(3)ツパイ個体の中でHBV感染感受性に違いが見られ、ウイルス感染に高感受性を示す産子を提供できるツパイのペアを選抜した。ツパイにおけるHBV高感受性系統の樹立は治療法の確立や病態解明に非常に重要で有る。
(4)HBV持続感染ツパイにHBs抗原・HBc抗原をK3-SPGアジュバントとともに接種し、ワクチン治療効果向上についての検討を行っている。

研究分担者(小原恭子)
(1) ツパイの飼育・繁殖法を確立した。全ての♀個体から子供を得る事ができ、40頭のF0ツパイから141頭のF1ツパイを得た。平均の産児数は3.9頭で、離乳率は約50%である。
(2) ツパイの新生児にHBVを感染させる方法が確立した。接種法は腹腔内、静脈内や皮下を検討した結果、皮下接種が最も高値持続感染化個体が多かった。感染に使用したA2, C, D3, D7, E, J株全てでツパイにおける感染は成立した。高値持続感染個体の成立はA2とJ株が高率に見とめられた。
(3) ツパイ個体の中でHBV感染感受性に違いが見られ、ウイルス感染に高感受性を示す産子を提供できるツパイのペアを選抜し繁殖した。
(4)新生児から母獣への感染が50%で認められた。また、感染した母獣から、父獣への感染も67%で見られた。これらの結果から、ツパイ感染系でHBVの水平感染や性的接触による感染が生じる事が明らかとなり、今後感染経路の解析研究モデルとしても有用と考えられた。
(5)HBV持続感染ツパイにHBV-siRNAを投与後にHBs抗原・HBc抗原を接種し、ワクチン治療効果向上についての検討を行っている。

研究分担者(石井健)
(1) TLR9リガンドであるCpGオリゴデオキシヌクレオチド (ODN)は、自然免疫応答を強力に活性化し、ワクチンのアジュバントとして期待されている。新たなTLR9リガンド新規アジュバントK3-SPGの開発に成功した。
(2)K3-SPGは単純に抗原と混ぜるのみでアジ

ュバント効果、特にT細胞応答を誘導する事ができる。
(3)ヒト型K3-SPGの自然免疫応答を検討し、ヒトと同様にツパイ末梢血単核球を活性化する事が確認された。

研究分担者(押海裕之)
(1)　ヒトとマウスでは HBV に対する自然免疫応答の経路が異なることを発見し、マウスモデル実験系から示された HBV に対する自然免疫応答のモデルは、ヒトにはあてはまらないことを示した。
(2) ツパイ動物モデルから、HBV 感染時には肝臓で DDX60 分子の発現上昇が観察された。この DDX60 分子は、I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生に必要であることを、動物モデルをもちい明らかにした。
(3) HBVのタンパク質がDDX60と共にはたらくRIG-Iタンパク質の翻訳後修飾としてのポリユビキチン化を阻害する分子機構を解明した。
(4)ツパイ個体への感染実験によりcGAS依存的な自然免疫応答が惹起されていないことを解明し、HBVに対する自然免疫応答ではウイルスRNA認識に関与する経路が重要であることを示した。

研究分担者(村上周子)
(1) HBV-DNA を確認したツパイ血清を超高感度 HBs 抗原測定系を用いて検討した結果、5 倍希釈で液量を調整することにより HBs 抗原を検出することができた。
(2) 作製した HBV 薬剤耐性変異株について、細胞内のウイルス複製を確認した。また、genotype Ae、Bj、Ce のエンテカビル耐性変異ウイルスをキメラマウスに接種後、約 8 週よりウイルスタイターの上昇を確認した。さらに血清中のウイルス DNA をシークエンス解析することにより薬剤耐性変異を確認し、感染源として血清を回収した。

研究分担者(櫻井遊)
(1)核酸を肝実質細胞へ効率的に導入することが可能な送達システム(MEND)の開発に成功した。この導入活性は、静脈内投与型siRNA医薬として現在最も開発が進んでいるAlnylam社のキャリアと同等であった。
(2)HBVに対するsiRNAを搭載したYSK13-MENDを静脈内投与することにより、HBV持続感染ヒト肝臓キメラマウスのHBV DNAや抗原蛋白質を減少させることに成功した(特願2014-217011)。
(3) mRNAと低分子量ポリエチレンイミンと複合体化することで、mRNAをMENDに高効率(90%前後)に搭載させることに成功した。

研究分担者(日浅陽一)
(1) HBVトランスジェニックマウスへのHBs抗原パルスDC投与ではHBs抗原特異的免疫反応しか得られなかったが、HBc抗原パルスDC投与では、HBs抗原の陰性化、HBs抗体の陽転、HBc抗原のみならずHBs抗原特異的CTLの産生がみられた。
(2)B型慢性肝炎患者におけるHBs抗原およびHBc抗原ワクチンのペグインターフェロンを上回る治療効果が得られた。(第3相臨床試験)。第3相臨床試験におけるワクチン治療開始12週後のALT値上昇とHBV排除の関連について解析を進めている。
(3)B型慢性肝炎患者におけるHBs抗原およびHBc抗原ワクチン治療における新たなアジュバンド(百日咳菌)による治療効果向上の検討を進めた。
(4)HBV持続感染ツパイを用いたHBs抗原およびHBc抗原ワクチンの治療プロトコールの作成を行った。

D．考察
　本年度は計画通りに研究を実施した。得られた結果をさらに発展させ以下の研究を進める。

研究代表者（小原道法）

本研究により、HBV はツパイの肝細胞においてヒトと同程度の増殖性を有していることが示された。また HBV をツパイに感染させることで、肝炎を呈することが確認され、ツパイはヒトにおける HBV 感染病態を模したモデル動物として有用であることが示された。

また今回 HBV 感染ツパイでは、感染後 1 日目より炎症性サイトカインなどの惹起がみられ、また病理学的にも所見が認められ、感染のごく初期から肝炎を呈していることがわかった。このような知見は、従来のチンパンジーを用いた感染系では動物が貴重であるため、得られていない知見であり、ツパイを用いることで得られたまったく新しい知見であるといえる。さらに、現在、ヒトにおいて臨床治験が行われている治療ワクチンに関して、本研究ではツパイを用いて、誘導される免疫応答を評価することができた。今後はウイルス感染個体などを用いて、ウイルス排除の効果を評価するなどして最適なプロトコールを検討・構築するとともにウイルス排除機構の解明にも応用する予定である。

研究分担者（保富康宏）

免疫機能を有したまま唯一 HBV 感染モデルと成りえるツパイであるが、実験動物としては確立されていない状態である。本研究では、安定的にツパイを飼育管理・繁殖・育成方法について良好な結果が得られたことにより、安定的にツパイでの研究が推進可能となった。また、これまでに 32 頭が他の研究班員の実験に供与された。

HBV 感染実験では血中から高頻度でウイルスゲノムが検出されている個体も確認できている。これらの F1 個体から F2 個体の作出も試みており、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立が大きく期待できる。

遺伝子配列の明らかな分子クローンを用いた感染実験においても、例数が少なく解析途中ではあるが血中にウイルスゲノムが検出された。HBV 感染キメラマウス血清を接種した場合と比較するとウイルス量が少ない傾向があるため、精製方法や濃縮方法に改善が必要である。

研究分担者（小原恭子）

ツパイの妊娠期間は 40 日程度であり、離乳までの期間が 60 日程度である。年間 3–4 回の繁殖が可能である。これから計算すると、1 匹あたり、年間 10–15 匹の産子が得られる。調べた全ての HBV 株に感染感受性を示したが、持続感染を成立させるためには、A2 か J 株の皮下接種が良いと考えられた。また、ツパイの HBV 感染感受性系統を今後確立していく必要がある。さらに、ツパイ新生児感染実験から、母親や父親に水平感染が成立し、感染経路の解析にも使用できる可能性が明らかとなった。

研究分担者（石井健）

本研究ではこれまでに開発研究を行ってきた CpG ODN のツパイにおける有用性を検討した。実際に、ツパイにおいて TLR9 リガンドが自然免疫応答を活性化する事が脾細胞を用いた実験により示す事ができた。しかしながら、ヒト型、マウス型どちらの CpG ODN に対しても自然免疫応答を活性化したため、種差による大きな違いは確認出来なかった。

さらに、in vivo における CpG ODN のアジュバント効果は細胞性免疫応答においては確認で来たが、体液性免疫（抗原特異的抗体）においては、抗原単独投与時に比べ変化はなかった。

今後は、抗原をモデル抗原であるオバルブミンから他の抗原（B 型肝炎ウイルス抗原など）に変える事で、TLR9 リガンドの効果を検討して行く必要がある。また、刺激を短時間での評価しか行えていないため、CpG ODN 処理後 24 時間後などの自然免疫応答なども詳細に解析する必要がある。

研究分担者（押海裕之）

ヒトやマウスの培養細胞を用いた解析から、ウイルス DNA に対する自然免疫応答は、ヒトとマウスの細胞では大きく異なっていた。これは、マウス動物モデルで得られた結果をそのままヒトに応用することが出来ないことを意味しており、マウス以外の小動物モデルとしてのツパイの重要性を示唆している。

我々は、HBV のタンパク質による RIG-I タンパク質の翻訳後修飾の阻害をヒト細胞を用いて我々は明らかにしたが、ツパイ個体に対する感染実験でも HBV による宿主の自然免疫応答の抑制が観察されたことから、ヒトと同様のメカニズムによりツパイの自然免疫応答を抑制していると推測される。これは、ツパイ動物モデルが HBV 感染のモデルとして非常に優れていることを示唆している。

研究分担者（村上周子）

超高感度 HBs 抗原測定系を用いたツパイ血清の測定は、前年度までの検討では 2-3 倍希釈での検出であったが、今年度の検討では 5 倍希釈で検出することに成功した。測定系の改良だけではなく、ツパイ自体の HBV 感染感受性も上がっていることが考えられる。

ツパイのように正常な免疫機能が備わった肝炎ウイルスが感染できるモデル動物は、これまで望まれていた試験モデルである。一方、獲得免疫系を持たない uPA/SCID マウスをベースとするヒト肝細胞キメラマウスに HBV を感染させ作製した感染源は、HBV に対する抗体を持たないため感染性が高く有用である。各 genotype で作製している核酸アナログ耐性 HBV クローンは、培養上清から動物へ直接接種して感染を成立させることが難しく、特に薬剤耐性ウイルスは、野生株が存在しないクローン化された変異ウイルスのみでは感染性が低い。そのため、まず易感染性が高いキメラマウスに接種して感染源を作製することは、ウイルスを増殖することに加えて感染性を高めることにも有効である。これらの感染源を感染感受性の高いツパイに接種し感染させることにより、生体内で実際に起こっている事象を免疫反応も含めて再現でき、病態解明に繋がることが期待できる。

ツパイによる HBV 高感染モデル・肝炎モデルを確立するため、今後はこの測定系を用いてツパイへの高感染 HBV 株の選定を行う。

研究分担者（櫻井遊）

脂質組成の最適化により健常マウス肝臓におけるノックダウン活性が ED50 を指標に 0.015 mg/kg を示す YSK13-MEND を構築することに成功した。これは、世界で最も強力な siRNA キャリアである pH 応答性リポソーム（Lipid nanoparticle; LNP）のノックダウン活性（0.01mg/kg）に近い値を示しており、YSK13-MEND は強力なノックダウン活性を有することを示唆している。新規に合成した YSK13 は構造的に体内の分解酵素や加水分解の影響を受け辛いことが考えられる。このため、従来の脂質と比較して in vivo の環境でより高活性であり、また溶液での保存で安定性を示したと考えられる。肝実質細胞にも細胞外リパーゼとして肝性リパーゼ（HL）の存在が知られているが、これは LPL と同様にホスホリパーゼ活性が低いことが知られている。従って、YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子は肝実質細胞上では不活性化をほとんど受けずに高い遺伝子ノックダウン活性を示し、肝血管内皮細胞上で EL のホスホリパーゼ活性によって特異的に不活性化された結果、YSK05 を含む粒子と比較して高い肝実質細胞特異性を示したものと推察された。今後はツパイ肝臓への核酸送達に向け、YSK13-MEND のツパイにおける有用性の評価が課題である。

研究分担者（日浅陽一）

HBs 抗原＋HBc 抗原治療ワクチンの治療効果について、peg-IFN 治療群との比較を治療終了後 48 週まで検討した。その結果、HBV-DNA の低下、HBe 抗原の陰性化率に

関して、ワクチン投与群においてIFN投与群と比し、良好な結果が得られた。また、HBs抗原の推移について、ワクチン治療終了後48週において、HBs抗原量の低下がみられている。これらの結果より、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンはpeg-IFN治療群と比較して、1）免疫治療効果が長期間持続すること、2）HBs抗原に対する免疫誘導を惹起する可能性があることを示唆している。また、ワクチン治療はpeg-IFN治療と比較して肝線維化の進行を抑制する効果が示唆された。今後はさらに長期間経過を観察することで、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンの効果を評価していく必要がある。また、ウイルスマーカーの変化、肝炎の進行のみならず、肝発癌に対する影響についても検討していきたい。

また、より強い免疫治療効果を期待して、百日咳全菌体ワクチンをアジュバントとして使用した結果、副作用の頻度は増加したものの、治療中止に至る重篤な副作用はみられなかった。アジュバント使用群と非使用群ではALTの反応が異なっており、何らかの免疫修飾効果が示唆される。今後、経過を観察してその治療効果について評価していく必要がある。

また、ツパイを用いた検討は緒に着いたばかりであるが、治療ワクチン投与によるHBV抗原特異的免疫反応が確認されたことから、ツパイを用いて治療ワクチンの免疫機序について解析する基盤が確立された。今後、HBV感染持続ツパイを用いて、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを皮下、あるいは経鼻投与し、そのすることで、肝内のHBV特異的細胞障害性T細胞の誘導とその機能を検討するとともに、最適な治療ワクチン投与量、投与方法について検討していきたい。

E. 結論

ツパイの肝細胞はHBVに対してヒト肝細胞と同程度の感染増殖性を示した。またHBVがツパイに感染すると感染の初期より肝炎を引き起こし、また持続的に感染することが明らかとなり、ツパイがヒトにおけるHBV感染モデル動物として有用であることが明らかとなった。持続感染を示したツパイに関してはウイルスの詳細な検討も必要と考えられる。加えて宿主側因子の解明の必要性もある。

HBVに対して自然免疫を維持したまま感受性を持つツパイにおいて飼育管理・繁殖・育成方法を確立した。持続感染を成立できるHBVの株はA2やJである事が明らかとなり、接種法は皮下が良い事も明らかとなった。また、高頻度でウイルスゲノムが検出されている個体も確認され、HBV高感受性ツパイ系統の樹立に向けて大きく期待できることとなった。さらに、ツパイ高感染性ウイルス株とウイルス高感受性ツパイ系統の樹立などを通じて、HBV-ツパイ感染実験系の精度を高め、ウイルスの病原性や種々の治療法の効果を、より効率よく詳細に解析できる様にしていく。ツパイは、チンパンジーよりも小型で寿命が短く、マウスよりもヒトに近い遺伝情報を持っており、今後HBV研究並びに各種治療薬の効果判定に威力を発揮する可能性が期待できる。

HBs抗原+HBc抗原の治療ワクチン接種による免疫治療は安全で、かつHBV-DNAおよびALTを持続陰性化しうる治療法となりうることが証明された。また、HBV持続感染ツパイモデルでも効率の良いHBsおよびHBc抗体誘導が確認された。今後、同HBV持続感染ツパイモデルを用いて、HBs抗原+HBc抗原の治療ワクチンの免疫機序を解析していくとともに、ワクチンの投与量、投与方法を含めた、より治療効果の高い治療法の確立を目指す。

今回の研究により、新規アジュバントの開発に成功した。このアジュバントはマウスと霊長類における反応性の違いを克服出来た事から、ヒトへの応用が期待される。

また、新規 pH 応答性脂質 YSK13 を含む YSK13-MEND は、最適化によりマウス肝臓で従来より 10 倍以上高いノックダウン活性を示した。ツパイ肝臓への核酸医薬の導入に効果

を発揮することが期待できる。今後は、脂質ナノ粒子の物理化学的・製剤的特性が毒性に与える影響について検討し、安全面からも最適な粒子設計を行うことで安全治療域の拡大を図る。また、実用化を目指した脂質ナノ粒子製造のスケールアップについての検討も行う。

HBs抗原＋HBc抗原治療ワクチンによる免疫治療は、ヒト臨床試験においてpeg-IFN治療に比べて、HBV-DNAの持続低値、HBe抗原消失率の向上、肝線維化進展抑制効果が得られ、その有効性が示された。今後、HBV感染感受性を持つツパイを用いた検討により、その免疫作用機序を解析するとともに、アジュバントの使用を含めた、より治療効果の高い投与方法、投与量を設定して、最適なHBVに対する免疫治療プロトコールの確立をめざす必要がある。ヒトやマウスの培養細胞を用いた研究と、ツパイ感染モデル実験から得られて成果から、ツパイ動物モデルがマウス動物モデルと比較して、ヒトへの感染に非常に近い有用なモデル実験系であることが示唆された。

また、HBVによる自然免疫応答抑制のメカニズムの一端を解明できたことから、今後この抑制を解除する薬剤の投与が新たな治療法として有用かどうかを検討できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

各分担研究報告書を参照

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

各分担研究報告書を参照

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

Ⅱ．分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（平成26年度）

ツパイ全ゲノムの解析、免疫学的解析系の確立、治療薬を用いた動物モデルの評価

研究分担者　小原　道法　　東京都医学総合研究所　感染制御プロジェクト　シニア研究員
研究協力者　真田　崇弘　　東京都医学総合研究所　感染制御プロジェクト　　研究員

研究要旨：ツパイは、B型肝炎ウイルス(HBV)に感染感受性を示し、肝炎も発症することから、チンパンジーに変わるB型肝炎のモデル動物となることが期待される。本研究では、ツパイをHBV感染モデル動物として確立し、HBV感染ツパイの病態解析、さらには治療法開発への応用を試みた。まずHBVのツパイ肝細胞での増殖能を解析すべく、初代培養ツパイ肝細胞およびツパイ肝細胞を移植したツパイ肝臓置換キメラマウスでのHBVの増殖性を解析したところ、ヒトの肝細胞と同程度にウイルスが増殖していることが示された。次にツパイにおけるHBV感染時の病態と宿主応答の解析を行ったところ、HBV感染ツパイではウイルス量の上昇とともに肝炎を呈していることが確認され、さらには炎症性サイトカインや病理学的な変化が感染後ごく初期より生じていることが示された。さらに、ツパイを治療法の開発へ応用すべくHBsおよびHBc抗原蛋白の免疫を行い、免疫の誘導に関する評価を行ったところ、免疫個体では、細胞性免疫および液性免疫の誘導を確認することができた。以上の結果から、ツパイはHBVの感染病態を解析する動物モデルとして有用なだけでなく、治療法開発へ応用できる可能性が示された。

A. 研究目的

HBV 感染患者では、肝炎が発症し、やがては肝硬変、肝癌へと進行する。しかし、全ての感染患者においてこのような経過をたどることはなく、免疫応答により治療する患者も多い。このことは、宿主の免疫を賦活することにより治療できる可能性を示している。しかし、これまでヒトにおける HBV 感染病態を模した動物モデルはチンパンジー以外存在しておらず、免疫賦活化による治療法を評価するモデル動物は存在していなかった。

本研究では、感染感受性があることが知れているツパイを HBV 感染症のモデル動物として確立するとともに、本動物系を免疫賦活化による治療法開発へ応用することを目的とする。

B. 研究方法

(1) ツパイ

ツパイは鹿児島大学 共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター（小原恭子 教授）および医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター（保富康宏 センター長）より供与していただいた。実験には、およそ 1 歳齢の個体を使用した。

(2)ツパイ肝細胞へのHBV感染実験

3～6週齢のツパイより分離・培養した肝細胞にHBVを5copies/cellとなるように接種した。感

染後、経時的に培養上清および細胞を回収し、リアルタイムPCRによるHBV遺伝子の検出に用いた。

(3) ツパイ肝臓置換キメラマウス

3週齢のツパイより肝細胞を分離し、3週齢のuPA/SCIDマウスに移植した。血清中のアルブミン値が高値な個体を高置換のマウスとみなし、これら個体に関して、移植10週後に、感染実験に使用した。

(4) ツパイ肝臓キメラマウスへのHBV感染実験

ツパイ肝臓キメラマウス1頭あたり1×10^6copiesのHBVを静脈より接種した。感染後2週間毎に採血を行い、リアルタイムPCRによるウイルス遺伝子量の測定を行った。

(5) ツパイへのHBV感染実験

ツパイ1頭あたり1×10^6copiesのHBVを静脈より接種した。感染後1日目、3日目、21日目に剖検・採材を行い、血清はALTの測定およびウイルス遺伝子量の測定、肝臓はヘマトキシン・エオジン染色による病理学的解析、ウイルス遺伝子量の測定および次世代シーケンサーによるmRNAの発現解析に用いた。

(6) ツパイへのHBsおよびHBc抗原免疫投与実験

3週間毎、計6回、ツパイにHBs抗原およびHBc抗原を10ugずつ皮下投与もしくは鼻腔内投与した。アジュバントとしてK3-SPGを添加した群と添加していない群をそれぞれ用意した。免疫時に採血を行い、血清はELISAによる各種蛋白に対する抗体応答の評価に用いた。また最終投与後1週目に剖検を行い、全血液を採取した。全血液より分離したPBMCは、HBs蛋白を10ug/mlで刺激し、24時間後に細胞を回収した後、RNAを抽出し、IFN gamma遺伝子の定量に用いた。

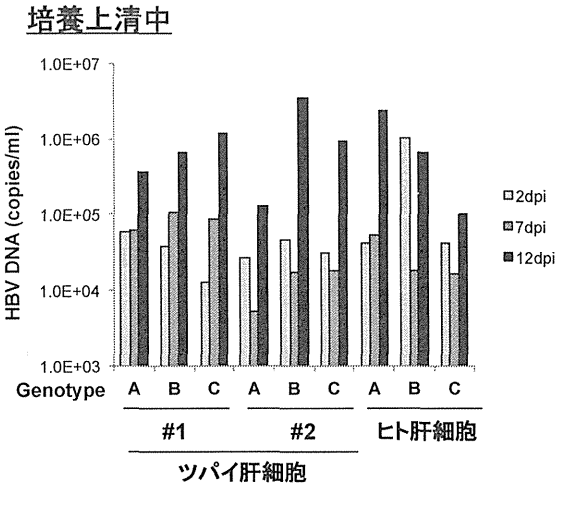
(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は用いていない。

C. 研究結果

(1)HBV感染ツパイ初代肝細胞およびツパイ肝キメラマウスの解析

ツパイ肝細胞でのHBVの増殖性を評価すべく、ツパイより肝細胞を分離・培養し、各種HBV感染後の細胞中および培養上清中のウイルス遺伝子量の推移を解析した。Genotype A,B,Cいずれにおいてもツパイの肝細胞感染後、ウイルスの増加が見られ、ヒトの肝細胞と同程度であった。



また本細胞をuPA/SCIDマウスへと移植し、ツパイ肝臓キメラマウスを作製し、生体内でのツパイ肝細胞におけるHBVの増殖性を検討した。感染させたいずれのGenotypeにおいても感染の経過とともに、血清中のウイルス遺伝子量の増加がみられた。以上の結果から、ツパイの肝細胞において、HBVはヒトと同程度の増殖性を有することが示された。

(2)ツパイにおけるHBV感染病態の解析

続いてHBVのツパイにおける感染病態の解析を行った。血清中および肝臓中のウイルス遺伝子量をリアルタイムPCRにより解析した結果、感染の経過とともにウイルス遺伝子量の上昇が確認された。また肝細胞傷害のマーカーであるALTにおいても感染の経過とともに上昇が見られた。肝臓の病理学的な解析を行ったところ、感染後1日目より軽微な肝細胞変性が認められ、3日目には肝細胞の変性やリンパ球の浸潤がみられた。21日目には、肝細胞の変性や索状構造の乱れ、炎症性細胞の浸潤が確認され、重度の肝炎を呈していることが確認された。さらにこれら個体に関して、HBVに対する宿主応答を詳細に解析すべく、肝臓中のmRNAの発現を次世代シーケンサーにより解析した。その結果、炎症性サイトカインであるIFN gammaやIL-8、また炎症マーカーであるIL2 receptor alphaといった遺伝子が感染後1日目より誘導されており、また感染の経過とともに発現量も上昇していた。

以上の結果から、HBVはツパイにおいて、感染後1日目の時点で、炎症性サイトカインなどを誘導、肝細胞の変性を引き起こし、肝炎を引き起こしていることが明らかとなった。

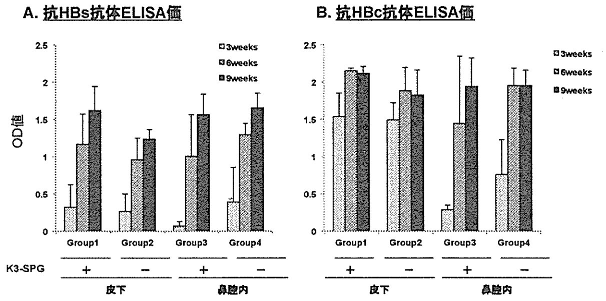
(3)ツパイへのHBV抗原免疫の効果の評価

現在、バングラディッシュにおいてHBV感染患者にHBsとHBc抗原を2週毎に10回免疫する第III相臨床治験が進められている。本治験では、免疫終了後、24週経過した時点においても60%もの症例において血清中のHBVのウイルス遺伝子陰性が維持されており、免疫による顕著な効果が確認されている。

しかし、本免疫法の最適な投与スケジュール、投与方法、アジュバントに関しては、十分に検討されておらず、ウイルスを排除する機序においても明らかにされていない。

そこで、これらの事柄を検討すべく、ツパイにHBsおよびHBc抗原で免疫を行い、誘導される免疫応答に関しての解析を行った。

経時的に採取した血清を用いて、ELISAにより抗HBsおよびHBc抗体の産生量の解析を行った。各種免疫法において、抗体の誘導が確認され、免疫を重ねるごとに誘導される抗体量の増強が認められた。抗HBc抗体に関しては、鼻腔内投与よりも皮下投与の方が早期に誘導される傾向がみられた。



また特異的細胞性免疫の誘導に関しても解析すべく、免疫を終了した個体のPBMCをHBs蛋白質で刺激を行い、誘導されるIFN gammaの遺伝子量を解析した。その結果、鼻腔内投与よりも皮下投与において、またアジュバントに関しては、K3-SPGを投与個体においてIFN gammaの誘導が強くみられた。以上の結果より、ツパイを用いることで、各種免疫法による免疫応答誘導を評価することができた。

D. 考察

本研究により、HBV はツパイの肝細胞においてヒトと同程度の増殖性を有していることが示された。また HBV をツパイに感染させることで、肝炎を呈することが確認され、ツパイはヒトにおける HBV 感染病態を模したモデル動物として有用であることが示された。

また今回 HBV 感染ツパイでは、感染後 1 日目より炎症性サイトカインなどの惹起がみられ、また病理学的にも所見が認められ、感染のごく初期から肝炎を呈していることがわかった。このような知見は、従来のチンパンジーを用いた感染系では動物が貴重であるため、得られていない知見であり、ツパイを用いることで得られたまったく新しい知見であるといえる。

さらに、現在、ヒトにおいて臨床治験が行われている治療ワクチンに関して、本研究ではツパイを用いて、誘導される免疫応答を評価することができた。今後はウイルス感染個体などを用いて、ウイルス排除の効果を評価するなどして最適なプロトコールを検討・構築するとともにウイルス排除機構の解明にも応用する予定である。

E．結論

ツパイの肝細胞は HBV に対してヒト肝細胞と同程度の感染増殖性を示した。また HBV がツパイに感染すると感染の初期より肝炎を引き起こすことが示された。さらに HBs および HBc 蛋白でツパイに免疫を行ったところ、細胞性免疫および液性免疫の誘導を確認することができた。以上の結果より、ツパイがヒトにおける HBV の感染病態を模した動物モデルとして有用なだけでなく、免疫賦活化による治療法の評価に有用である可能性が示された。今後は、本動物系を用いて、感染病態を解析するとともに、治療ワクチンの効果の検討を進めていく予定である。

F．研究発表

1.論文発表

1. Yutaka Amako, Tsubasa Munakata, Michinori Kohara, Aleem Siddiqui, Chris Peers and, Mark Harris. Hepatitis C virus attenuates mitochondrial lipid β-oxidation by down-regulating mitochondrial trifunctional protein expression
. J. Virology (2015) in press.

2. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus.
Immunity 2015 Jan 20;42(1):123-32.

3. Sayeh Ezzikouri, Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Soumaya Benjelloun, Yoichiro Kino, Kazuaki Inoue, Akira Matsumori, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Inhibitory Effects of Pycnogenol® on Hepatitis C Virus Replication. Antiviral Research 2015 Jan;113:93-102.

4. Kyoko Tsukiyama-Kohara and Michinori Kohara. *Tupaia belangeri* as an experimental animal model for viral infection. Experimental Animals 2014 Oct 30;63(4):367-74. Epub 2014 Jul 22.

5. Chao-Kuen Lai, Vikas Saxena, Chung-Hsin Tseng, King-Song Jeng, Michinori Kohara, and Michael M. C. Lai. Nonstructural Protein 5A Is Incorporated into Hepatitis C Virus Low-Density Particle through Interaction with Core Protein and Microtubules during Intracellular Transport. PLoS One. 2014; 9(6): e99022.

6. Tsubasa Munakata, Makoto Inada, Yuko Tokunaga, Takaji Wakita, Michinori Kohara, and Akio Nomoto. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. Antiviral Research 2014 Aug;108:79-87.

7. Masaaki Arai, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asako Takagi, Yoshimi Tobita, Kazuaki Inoue and Michinori Kohara. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in Hepatitis C virus nonstructural proteins.