

201423043A

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)

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 27 年 (2015 年) 4 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)

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 27 年 (2015 年) 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 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・・・1
茶山 一彰

II. 分担研究報告

1. 免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きるマウスモデルの作製に関する研究
志馬 寛明
2. B型肝炎ウイルス感染に対する自然免疫応答の影響に関する研究・・・11
加藤 博己
3. キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学および遺伝子・タンパク質発現解析・新規モデルの作製・・・13
立野 知世
4. TALEおよびCRISPR/Casを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発・・・20
山本 卓
5. 次世代シーケンサーを用いたB型肝炎ウイルス感染と宿主因子の解析・・・22
田原 栄俊
6. 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・・・26
丸澤 宏之
7. Analyzing host factors regulating HBV as tool to develop HBV drugs and mouse model.31
Hussein H Aly
8. B型肝炎ウイルス粒子形成に係わる宿主因子の同定とウイルス増殖抑制法の開発・・・34
坂口 剛正

9. トランスジェニックマウスを用いた B 型肝炎の免疫機構の解析	37
阿部 弘美	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷り	51

I. 総括研究報告

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

我々は昨年度、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 型肝炎ウイルス感染モデルを作製し論文として発表した (Kosaka et al., BBRC, 2013)。この改良型モデルマウスに重症 B 型肝炎急性肝炎治癒後の患者から得られたヒト末梢血単核球を投与した結果、肝組織中へのリンパ球浸潤、HBV 感染肝細胞の細胞死、血清中の ALT 上昇、Granzyme A や IFN- γ レベルの上昇が認められた。また、肝臓内には HBV 特異的な CTL が検出され、本モデルは HBV 特異的 CTL による HBV 感染肝細胞死が誘導されたヒト劇症肝炎モデルであると考えられた。また、HBs 抗原は陰性化し、HBs 抗体が陽性となった。さらに T 細胞を標的とした薬剤である CTLA4Ig を用いて T 細胞の活性化を抑制することで HBV 感染肝細胞の傷害が抑制できるか検討を行った結果、HBV 感染肝細胞死は阻害された。CTLA4 はリウマチに安全に使用されている薬剤であることから、B 型重症肝炎の治療として使用できる可能性が示された。また、肝炎モデルは細胞障害性 T 細胞を利用した B 型肝炎ウイルスの排除を行う上での安全策などに利用可能であり、幅広い応用研究が可能である可能性があると考えられる。また、HBV 感染が可能な NTCP-HepG2 細胞を用いて各 HBV のライフサイクルにおいて相互作用がある分子を同定した。さらに、新規の CRISPR/Cas9 システム(ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型、FokI-dCas9 型)を構築し、HBV ゲノムに対する抑制効果を検討した。その結果、ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型では抗 HBV 効果が認められた。

【研究分担者】	志馬 寛明	北海道大学大学院	助教
	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、肝炎モデルを改良しヒト肝炎をマウス内で再現する慢性B型肝炎モデルを作製し、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などに関与する因子の探索を行いHBV

の完全な排除を目指す創薬研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

肝炎モデルの開発と感染肝細胞の排除に関する

る研究

重傷免疫不全であるNOGマウスにthymidine kinase遺伝子をtransgeneしたTK-NOGマウスにガンシクロビルを投与することによりマウス肝細胞を傷害し、形成されるニッチを利用してヒト肝細胞を増殖させることができるマウスモデルを用いてヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスにHBV感染患者由来の血清を用いてHBV感染させた。HBV DNA量がプラトーに達したHBV接種8週後に、B型急性重症肝炎治療後の患者から得られたヒト末梢血単核球(PBMC)を比重遠心法にて分離し、腹腔経由で移入した。PBMC移入2週後にマウス肝組織および肝灌流液中のヒトPBMCの表現型をフローサイトメーターにて解析した。また血清中のALTレベル、各種サイトカインレベル、HBs抗原、抗体、HBV DNAの定量を行った。

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立野班員らは、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った。

丸澤班員らは、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として、Albumin(Alb)-Cre-ERT2マウスを活用してtamoxifenに反応するコンストラクトを作製し、CreによるLoxPの組換え作用により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作製のため、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コンストラクトを作製した。これは、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。このコンストラクトのマウス胚へのinjectionを実施し、目的とする遺伝子改変を達成したF0マウスを最終的に合計3ライン確保した。

瀬谷班員らは、IFNAR欠損細胞を用いたin vitro,IFNAR KOマウスを用いたin vivoの系

でIFN誘導遺伝子によるHBV複製阻害活性を検討した。

加藤班員らは、RIG-I様受容体の必須アダプター分子であるIPS-1の発現を抑制したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株を作製し、さらにIPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスを作製中である。また高感度にHBV感染を検出する方法としてフローサイトメーターを用いて感染細胞におけるHBsやHBc量を検出する系を検討中である。

HBV感染マウスと新規HBV培養系を用いた創薬研究

HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの同定するため田原班員らは、miRBaseに登録された約2500のマイクロRNAをノックダウンできるmiRNAに相補的なLNA核酸ライブラリーを用いて、uPA/scid肝細胞移植マウス由来のHBVを感染させた初代培養細胞を用いて、スクリーニングを実施した。HBs抗原を指標に、ウイルス量が減少するマイクロRNAを検索した。また、HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発のため、血清及び組織から、Qiagen miRNeasy kitを用いて精製し、バイオアナライザー2000 (Agilent)にて、精製したRNAの純度を検定した。このRNAを用いて、次世代シーケンサーIon PGMで小分子RNAの配列を解析した。配列情報は、CLC bio社 CLC Genomics Workbenchを用いて解析を行った。

Aly班員らは、HepG2-AD38.7細胞のtet-on/off システムを用いて、ヒトキナーゼ分子におけるHBVライフサイクルに影響を及ぼす分子のスクリーニングを行い、ヒトTSSK2を同定した。またヒトヘリカーゼ、G蛋白共役型レセプター、核レセプター、サイトカインレセプターのスクリーニングを検討中である。キナーゼ分子として501遺伝子、ヘリカーゼ分子として133遺伝子、G蛋白共役型レセプター分子として380遺伝子、サイトカインレセプターとして116遺伝子、核レセプターとして52遺伝子のスクリーニングを行い現在詳細に検討中である。

cccDNAの排除、転写制御に関する研究

山本班員らは、HBVのコアプロモーター領域

の転写調節因子FTFやHNF4の結合するTAL Eタンパク質およびHBVのコアタンパク質を切断する人工ヌクレアーゼのTALENの作製し、HepG2細胞におけるHBVの増殖抑制効果について調べた。さらに、HBVのコアタンパク質を標的とするCRISPR/Cas9システム(ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型、FokI-dCas9型)を構築し、ヒト培養細胞での活性評価を行った後に、HBVの増殖抑制効果をHepG2細胞およびT23細胞において調べた。

坂口班員らは、HBV 広島YE株 (Accession# AB206816) を主に用い、この1.4倍長全ゲノムをもつプラスミドを培養細胞HepG2あるいはT23, 293Tに導入して、ウイルス複製と粒子形成をおこさせた。あるいはHBs蛋白質を単独で発現させて生じるウイルス様粒子 (S-VLP)、Core蛋白質によるウイルス様粒子 (C-VLP) を用いた。

各種の宿主因子の発現プラスミドあるいはドミナントネガティブ変異体 (DN変異体) を用い、あるいはCRISPR/Cas9、shRNAi、siRNAを用いたノックアウト、ノックダウンを行った。宿主因子とウイルス蛋白質の相互作用を免疫共沈降法で、共局在を蛍光顕微鏡で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に関わる動物実験は、広島大学動物実験倫理審査委員会の承認を得ている。またヒト血球の使用に関しても臨床研究の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

肝炎モデルの開発と感染肝細胞の排除に関する研究

HBV感染させたマウスにPBMC移入2週間後、血清中ヒトアルブミン値、ALTを調べたところPBMCを移入しなかったコントロールマウスに比較してALTは有意に上昇、ヒトアルブミン値は有意に減少した。HBVを感染させたマウスと感染させていないマウスにPBMCを移入した実験ではHBV感染マウスで生着率が有意に高率であった。またPBMCを移入したマウスでは有意にHBV DNAレベルが低下していた。さらに、組織学的検討では、PBMC移入マウスでは肝臓内へのリンパ球の集簇が認められ、肝細胞の細胞死も認められ

た。これらのことから移入したヒトPBMCによってHBV感染肝細胞を傷害しHBV DNA量が低下したと考えられた。次に、血清中の各種サイトカインの産生レベルを調べたところPBMC移入マウスではコントロールマウスに比較して有意にGranzyme A、IFN- γ レベルが上昇していた。さらに本モデルマウスにおけるGranzyme A、IFN- γ 産生細胞は何か調べるためにフローサイトメトリーにより肝臓内に浸潤したリンパ球の表現型を検討した。その結果、HBV感染マウスでは非感染マウスに比較してヒトPBMCの生着率が2.6倍程度上昇しており、またPBMC移入マウスでのみCD8陽性、テトラマー陽性のHBV特異的CTLが検出された。これらのことから本モデルにおける肝障害はHBV特異的CTLが主役であると考えられた。そこで、有効な治療法が確立していないB型劇症肝炎に対する有効な治療法していないためT細胞を標的とした薬剤であるCTLA4Igを用いてT細胞の活性化を抑制することでHBV感染肝細胞の傷害が抑制できるか否かについて検討を行った。PBMC移入前にCTLA4Igを投与したところヒトアルブミン値の減少やHBV DNA量の減少は認められずCTLA4IgによってHBV感染肝細胞の傷害が阻害された (阿部班員、茶山班長)。

マイクロアレイ解析では、HBV感染、非感染で大きな遺伝子変化は認められなかったが、HBV感染キメラマウス肝臓において、増殖に関する遺伝子低下が観察された。また、14週間および20週間HBVを感染させたキメラマウス肝臓組織において、炎症、apoptosis、線維化の増加は認められなかったが、肝細胞のサイズの増加が観察され、14週間感染マウスにおいては、2核細胞の割合の増加が観察された。また、HBV感染肝細胞と非感染肝細胞を継代移植したところ、肝細胞の生着には差は認められなかったものの、非感染キメラマウスは高置換になったが、HBV感染キメラマウスは低置換に留まった。これらのことから、HBV感染キメラマウスの肝細胞に形態変化がおり、増殖能が低下している可能性が考えられた。そこで、肝細胞が増殖期にあるキメラマウスにHBVを感染させることにより、HBVの肝細胞増殖における影響を調べる実験を行った。予想に反して、非感染、HBV感染キメラ

マウス間にヒトアルブミンの増加に差は見られなかったが、これらのマウスから分離した肝細胞には大きな差が観察された。HBV感染キメラマウス肝細胞の直径は増加し、2N細胞の割合が約半分に減少していた。また、2核細胞の割合は約5倍程度増加していた。

これらのことから、HBVはin vivoのヒト肝細胞に対して、増殖阻害作用を有している可能性が考えられた（立野班員）。

薬剤誘導型HBsAg発現マウスの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。HBsAg発現後の肝組織を用いたマイクロアレイ解析の結果、IFN- λ 受容体1、Pin1、IL-17受容体遺伝子の発現上昇が認められHBV急性感染応答としてIFN- λ シグナルが関与する可能性が示唆された（丸澤班員）。

IFNAR欠損細胞、IFNAR KOマウスを用いたHBV複製阻害活性実験では、RNAiによるISG20の阻害実験でもpolyI:CなどによるHBVの産生抑制がISG20に依ると判明した。ISG20は過剰発現でHBVのRNAを分解したが、肝細胞由来のRNAは分解しなかった。また、HBV plasmid のDNAも殆ど分解しなかった。HBV RNAから産生されるゲノムDNAは減少した。以上からISG20はウイルスRNAに特異的なエクソヌクレアーゼと判明した（瀬谷班員）。

IPS-1ノックダウンNTCP安定発現株は親株に比べてHBV感染によりHBcおよびHBs mRNA量やHBcタンパク質量が顕著に上昇することを確認できている。現在、cccDNAの検出を試みている段階である（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

約2500のマイクロRNAをノックダウンできるmiRNAに相補的なLNA核酸ライブラリーを用いて、HBs抗原を指標に、ウイルス量が減少した候補マイクロRNAを同定した。それらのうちあるマイクロRNAは、HBVの肝切除により顕著に減少するマイクロRNAであり、HBVウイルス産生に寄与する可能性が考えられた。また、HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発を目指す。次世代シーケンズの

解析により、健常人血清とHBV患者血清で顕著に増減するマイクロRNAを見いだすことができた。未知の小分子RNA画分の配列についても、HBV感染患者と健常人で異なる配列も見いだすことができた。また、非HBV患者とHBV患者における血清中のマイクロRNA配列は、Iso-miRの割合が違うことを見いだした。肝臓に高発現するmiR-122についても、大きく異なっており、HBV感染によるマイクロRNAのプロセッシング異常が起こっていることが示唆された。本年度同定したマイクロRNA-Xは、HBV肝切除により顕著にウイルス量が減少し、肝炎治療のバイオマーカーになる可能性が見いだされた（田原班員）。

cccDNAの排除、転写制御に関する研究

CRISPR/Cas9システムを用いた抑制効果についてHepG2細胞検討を行った。その結果、ヌクレアーゼ型およびNニッカーゼ型のCRISPRを用いた場合、有意にHBV量を低下させることがHepG2細胞において示された。一方、FokI-dCas9型では、抑制効果を確認することができなかった（山本班員）。

HBV, C-VLP出芽は、ESCRT機能を阻害するDN変異体で出芽が阻害された。少なくとも成熟粒子の放出にESCRTが関与している。S-VLP出芽は阻害されなかったため、空粒子の出芽には関与していない可能性がある。

Alixは868残基のV字型分子であり、膜に結合する。ESCRTの構成蛋白質の一つであるが、単独でも膜を湾曲させて、エクソゾーム形成、一部のウイルス出芽をおこすと考えられている。AlixとCore蛋白質が直接結合することを確認し、そのそれぞれの結合ドメインを同定した。Alixの欠失変異体の一部で、HBV, C-VLPの出芽が抑制されることを観察しており、この変異体がDN変異体として働いている可能性がある。S-VLPには全く影響を与えない。坂口らはLC3が、HBs蛋白質やpreS2-S蛋白質、preS1-S2-S蛋白質と共局在することを見いだしており、HBV出芽とautophagyとの関連が疑われた。現在のところ、autophagy阻害剤3-MAは、HBVあるいはS-VLP, C-VLPの出芽に影響がないとの結果が得られた。

BST2/tetherin/CD317は、インターフェロン誘導性のType II 膜蛋白質であり、C末端にGPIアンカーが結合することで、N端、C端

の両方で膜に結合する分子である。HIV-1において、細胞表面でウイルスを物理的に引き留めることで出芽を抑制することが明らかになっている。HIV-1はそのVpu蛋白質によって、tetherinの作用を不活化している。tetherinは過剰発現すると、C-VLPの出芽は阻害しないが、HBVおよびS-VLPの出芽を阻害した。従ってtetherinは潜在的にウイルス出芽を阻害すると考えられる。ところが、HBV持続感染HepG2由来細胞（T23細胞）では、tetherinのsiRNAによるノックダウンあるいは過剰発現でHBVの出芽は影響を受けないというデータがあり、持続感染細胞ではtetherinの働きを無効化する機構があることが推測される。HBV増殖がtetherinの阻害作用から逃れるような機構が存在する可能性が考えられる（坂口班員）。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスにB型急性重症肝炎治癒後の患者から得られたPBMCを移入することで、HBV特異的なCTLによるヒトの劇症肝炎を再現するモデルを作製した。

E. 結論

本モデルマウスにより免疫学的機序によるウイルス排除によるHBVの持続感染から治癒を目指す治療を開発することが可能となった。また、HBVのライフサイクルと相互作用のある宿主因子の検討から新規治療薬となり得る分子が見いだされた。さらに、新規のゲノム編集技術である3種の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. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat.* 21: e89-97. 2014.
2. Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K, Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial

virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther.* 2014; in press.

3. Leong CR, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, Chayama K and Seya T. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J Innate Immun.* 2014; in press.
4. Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect.* 2014; in press.

2. 学会発表

1. 茶山一彰, Hepatitis B mouse model involving CTL, 肝炎部会, 2015/1/25, 台北
2. 茶山一彰, 肝硬変の新たなマネージメント, 第102回日本消化器病学会中国支部例会, 2014/11/29, 広島
3. 茶山一彰, 肝炎ウイルス感染と肝細胞癌, 日本消化器関連学会機構(JDDW)2014, 2014/10/26, 神戸
4. 茶山一彰, 肝炎ウイルスに対する創薬研究, 第50回日本肝臓学会総会, 2014/5/29, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 名称：急性重症肝炎モデル非ヒト動物の作製方法、急性重症肝炎モデル非ヒト動物、劇症肝炎治療薬のスクリーニング方法および劇症肝炎治療薬
発明者：茶山一彰
権利者：広島大学
種類：特許
番号：特願2014-217516
出願年月日：2014年10月24日
国内外の別：国内
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)

免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きるマウスモデルの作製に関する研究

研究分担者 志馬寛明 北海道大学大学院医学研究科 助教
研究協力者 瀬谷司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) 排除に肝細胞のインターフェロン誘導系、特に IRF-3/7 と IFNAR が重要と判明した。IFN-inducible genes の中から HBV 複製阻害因子を網羅的に探索したところ、細胞質内エクソヌクレアーゼの ISG20 が HBV 複製阻害に最も有効と分かった。ISG20 の HBV 抑制機構を調べている。

A. 研究目的

HBV はI型インターフェロン (IFN) が奏効する肝炎を誘起して肝硬変・肝がんになる。本研究はHBV感染とIFN経路を含む自然免疫のHBV応答に関するものである。HBVの自然免疫に関する報告は乏しいので、申請分担者らは2つの系でHBV自然免疫系の解析を行う。1. ヒト肝細胞HBV培養系を使ってRNA, DNAウイルス認識に關与する経路のHBV応答を調べる。2. RNA認識経路のKOマウスとその肝細胞株を使ってHBVの制御に關連する自然免疫因子を同定する。

B. 研究方法

HBVに感受性のIFNAR欠損マウス肝細胞株は当研究室のHussein が樹立した。IFNAR^{-/-}マウスにHBV plasmids (茶山先生より恵与) をHydrodynamic injection するin vivo系とヒトHepG2細胞株 (またはNTCP発現株) をHBV感染させる細胞培養系を用いた。ISG20は当研究室でcDNAクローニングして発現ベクターに組み込んだ。Northern, southern 解析は既報に拠った。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

IFNAR欠損マウス肝細胞株でIFN-inducible genes のHBV複製阻害活性を評価した。2つの遺伝子に強いHBV産生阻害活性があった。IFNAR^{-/-}マウスのHBV plasmid増幅系でIFN-inducible genes のHBV抑制活性を検証したところ、その中の1つ、ISG20にin vivoのHBV増幅阻害活性を再現できた。RNAiによるISG20

の阻害実験でもpolyI:CなどによるHBVの産生抑制がISG20に依ると判明した。ISG20は過剰発現でHBVのRNAを分解したが、肝細胞由来のRNAは分解しなかった。また、HBV plasmid のDNAも殆ど分解しなかった。HBV RNAから産生されるゲノムDNAは減少した。以上からISG20はウイルスRNAに特異的なエクソヌクレアーゼと判明した。HBVがIFN投与で改善する理由の1つはISG20がHBVのpgRNA, mRNAを積極的に分解するためである。

D. 考察

Takaokaらの最近の論文ではRIG-IがHBV のpgRNAのε stem鎖を認識してIFN-λを発現誘導させることがHBVの排除に重要だとしている。この場合、HBV DNAではなくRNAがRIG-I sensorで検知される結果IFN誘導とIFN-inducible genesが発現することになる。我々の検討ではIFN-λもISG20を誘導するので、(マウス肝細胞と違いヒト細胞では) RIG-IがHBVを認識する可能性はありうる。しかし、RIG-IがpgRNAを認識するなら、pgRNAはISG20などを回避して安定に存在する必要がある。

我々の別の結果はHBVのDNA polymerase がMAVS経路のIFN誘導を強く阻害することを示唆した。ISG20が宿主RNAを分解せずpgRNAを分解し易いことを考慮すると、HBVのRNAではなくDNAがRIG-I/MAVS経路を活性化してIFNを産生誘導し、ISG20の発現上昇とRNA分解を起こしているかもしれない。これらは今後の検討課題である。

ISG20が常に活性型でRNAを分解する活性を持つのか、どのようにウイルスRNAだけを識別して分解するのか、細胞質内で如何なる分子会合を作って機能発揮するのか、等の解決すべき問題を残すが、本研究はHBVの自然免疫はISG20というエフェクター分子の活性化を目指すことを検証した。ISG20はRNaseL と異なり、HBV RNAのみを標的とする。

ISG20を活性化する（または発現上昇させる）低分子化合物の探索はHBV創薬に重要な主題となりうる。

E. 結論

ISG20はIFN誘導性に産生され、HBV RNAを標的として、これらを分解することでウイルスの増殖を阻害することを検証した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takaki, H., K. Honda, K. Atarashi, F. Kobayashi, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Shingai, and T. Seya. 2014. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Molec. Immunol.* 57: 100-110.
2. Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J. Innate Immun.* 6: 293-305.
3. Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, N. Kato, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 192: 2770-2777.
4. Kasamatsu, J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. INAM Plays a Critical Role in IFN- γ Production by NK Cells Interacting with Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Accessory Cells. *J. Immunol.* 193: 5199-207.
5. Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* 193: 5118-28.
6. Nakai, M., T. Seya, M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, and H. H Aly. 2014. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol.* 27: 285-294.
7. Kumeta H, H. Sakakibara, Y. Enokizono, K. Ogura, M. Horiuchi, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2014. The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1. *J Biomol NMR.* 58: 227-230.
8. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. *Int J Biochem Cell Biol.* 53C: 329-333.

9. Tatematsu, M., T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* 458: 195-201.
 10. Seya, T. 2014. Measles virus takes a two-pronged attack on PPI. *Cell Host Microbe.* 16: 1-2.
 11. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tatematsu, M. Azuma, and T. Seya. 2014. Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling. *Methods. Enzymol.* 535: 149-165.
 12. Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H Takaki, M. Matsumoto, K.Chayama, and T. Seya. 2015. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J. Innate Immun.* 7: 47-58.
 13. Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, and T. Seya. 2015. PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice. *Immunobiol.* 220: 74-82.
 14. Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, H. Shime, and T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat Commun.* 6: 6280.
 15. Maruyama, A., H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press).
- ### 2. 学会発表
- 省略
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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)

B型肝炎ウイルス感染に対する自然免疫応答の影響に関する研究

研究分担者 加藤 博己 京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学分野 准教授

研究要旨 : B型肝炎ウイルス(HBV)感染時における自然免疫応答の役割の解明を目的とし研究を行っている。今年度は、RIG-I様受容体からのシグナルが顕著に減弱している IPS-1ノックダウン NTCP 安定発現株を樹立した。この細胞株に HBV 感染を行った場合、NTCP 安定発現親株と比べ HBc および HBs mRNA 量や HBc タンパク質量が顕著に上昇することが明らかとなった。このことは、RIG-I 様受容体による認識が HBV 感染を抑制することを強く示唆している。現在までのところ HBV 感染が認められていないヒト NTCP トランスジェニックマウスを、IPS-1 欠損マウスと掛け合わせることで、HBV 感染が成立することが期待される。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)が持続感染する際、まず自然免疫応答を回避し感染を樹立させていると考えられるが、そのメカニズムは明らかではない。我々は、ウイルス RNA を認識し抗ウイルスインターフェロン応答を惹起する細胞内 RNA ヘリケース RIG-I 様受容体に着目し、B型肝炎ウイルスが RIG-I 様受容体の認識をどのように回避もしくはそのシグナル伝達を阻害するか、その機構を明らかにしていきたい。

さらに、RLR によるシグナル伝達が起こらない状況を利用することにより、細胞やマウスレベルにおいて HBV 感染系の樹立を目的とする。

B. 研究方法

上記研究目的をもとに、下記1~3のような実験を中心に研究している。

1 前年度樹立したHBV受容体であるヒトNTCPを安定的に発現するHepG2細胞株において、RIG-I様受容体の必須アダプター分子であるIPS-1の発現を抑制したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株を作製する(作製済み)。HBV感染価を検

討する(詳細に検討中)。

2 IPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスを作製する。(現在マウスの掛け合わせ中)。
3 作製した細胞株やトランスジェニックマウスを用いて高感度でHBV感染をモニターする系を検討する。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた研究に関して倫理面での問題は無い。マウスの作製にあたっては、大臣確認済である。

C. 研究結果

研究方法1に関して、IPS-1ノックダウンNTCP安定発現株は樹立できており、親株と比べHBcおよびHBs mRNA量やHBcタンパク質量が顕著に上昇することを確認できている。現在、cccDNAの検出を試みている段階である。

研究方法2に関しては、肝臓特異的アルブミンプロモーター存在下でヒトNTCPを発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウス

に種々の条件でHBV感染実験を行っているが、今のところ肝臓でのHBV複製は認められていない。そこで、IPS-1ノックアウトマウスとの掛け合わせを行っている。IPS-1遺伝子が欠損した条件下で、感染が認められるようになることを期待している。

研究方法3に関しては、FACSを用いて感染細胞におけるHBsやHBc量を検出することを試みている。現在、種々の抗体を用いて条件検討を行っている段階である。

D. 考察

作製したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株において高いHBV感染価が認められている。しかし、cccDNAが検出できる複製レベルであるかどうかは未だ明らかではなく、今後の課題である。またIPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスが得られ、*in vivo*でのHBV感染が認められることが期待される。

E. 結論

作製した細胞株やマウスを用いて、HBV感染を高感度でモニターできるFACSなどの実験系のセットアップが必要である。マテリアルの作製に関しては、今のところ順調に進んでいると考えられ、IPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスにおけるHBV感染の樹立が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS Pathog.* 2014 Oct 23;10(10):e1004417. doi: 10.1371/journal.ppat.1004417. eCollection 2014 Oct.
2. Kato H and Fujita T Autoimmunity caused by

constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Aug 19

3. ○Yoo JS, Kato H, Fujita T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Jun 23;20C:131-138. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.011. [Epub ahead of print] Review.

2. 学会発表

- I) Symposium: The 62nd annual meeting of the Japanese society for virology
Location: Yokohama, Japan
Date: 2014/11/10-12
Title: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2
Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita

- II) Symposium: The 62nd annual meeting of the Japanese society for virology
Location: Yokohama, Japan
Date: 2014/11/10-12
B型肝炎ウイルス(HBV)感染に対するI型インターフェロンの影響

池田 宗太郎、要 祐喜、Yao Wan Ling、覃 勉、大高 木 結媛、加藤 博己、藤田 尚志

- III) Symposium: 2014 HBV international meeting
Location: UCLA, USA
Date: 2014/09/03-06
Title: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2
Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita

- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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)

キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学のおよび遺伝子・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	
	山崎ちひろ	株式会社フェニックスバイオ	
	柳 愛美	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	
	坂本尚昭	広島大学大学院 理学研究科	数理分子生命理学専攻

研究要旨 新たなホストマウスである cDNA-uPA/SCID マウスを用いて、HBV 感染実験を 14 週、20 週間実施した。これまで、14 週間感染マウス肝臓の組織学的解析を行ったところ、HBV 感染マウス肝臓において、炎症細胞の増加、apoptosis の増加、線維化の増加は観察されなかったが、ヒト肝細胞の肥大および 2 核細胞の増加が認められた。今年度は、HBV の 14 週間感染、非感染キメラマウスのマイクロアレイ解析結果から、発現量に差が認められた遺伝子に関して RT-PCR を行った。その結果、HBV 感染により細胞分裂に関する遺伝子発現の低下が見られた。また、9 週間 HBV を感染させたキメラマウスから肝細胞を分離し、ホストマウスへ移植したところ、HBV 感染マウス由来肝細胞の移植後 2 日目の生着は非感染マウス由来肝細胞と同等であったが、ヒトアルブミン濃度が 1 mg/mL 以上は上昇せず (予想置換率<5%)、ヒト肝細胞の増殖能の低下が示唆された。次に、移植したヒト肝細胞の増殖の盛んな時期である 7 週令から HBV 感染を行ったところ、マウス血中のヒトアルブミン濃度には感染、非感染で差はなかった。感染後 12 週目に感染、非感染マウスからコラゲナーゼ灌流法によりヒト肝細胞を分離した。分離肝細胞の FACS 解析を行ったところ、HBV 感染キメラマウス肝細胞において 2 倍体細胞が約半分に減少し、2 核細胞が約 5 倍に増加していた。以上の結果から、cDNA-uPA/SCID ホストマウスにヒト肝細胞を移植したキメラマウスに HBV 感染を行ったところ、線維化、炎症は見られなかったが、HBV 感染が *in vivo* でのヒト肝細胞分裂に影響を与えたことが示唆された。

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

HBV感染、非感染キメラマウスヒト肝細胞の継代移植

24年に報告した方法により、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した (肝細胞ドナー ; Hispa

nic, 2歳、女兒、BD Biosciences)。非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスとHBV (Genotype C, 1匹あたり 10^5 DNA copies接種) を9週間感染させたcDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスに継代移植を行った(5×10^5 cells/匹)。血液を経時的に採取し、血中ヒトアルブミン濃度を平成24年度に報告した方法により測定した。HBV感染キメラマウス由来肝細胞を移植したマウスに関しては、血清中HBVコピー数を同じく平成24年度に報告した方法により測定した。

肝細胞増殖期のキメラマウスにおけるHBV感染

これまで、HBV感染はヒト肝細胞の増殖終末期(11週令以降)に行ってきた。肝細胞増殖へのHBV感染の影響を調べるため、ヒト肝細胞移植後4週目(7週令)のcDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスにHBVを接種し、19週令まで、マウス血中ヒトアルブミン濃度およびHBVコピー数を測定した。19週令のマウスの肝臓からコラゲナーゼ灌流法により、肝細胞を採取し、顕微鏡下で写真撮影、肝細胞直径を計測した。さらに、FACS Calibur (BD Biosciences)を用いてPloidy解析を行った。

定量性リアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現量の定量

昨年度実施したマイクロアレイ解析結果(cDNA-uPA/SCIDホモマウスへのHBVの14週間感染、非感染キメラマウス)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。このうち、上昇した遺伝子hANGPTL4, hTNFSF11, hCCRN4L, hARHGER12、低下した遺伝子hCCL2, hISG20, hCD276, hCCNA2, hCDK1, hCCNG2, hCCNB2のprimerを用いて、14週間感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現量を平成24年度に報告した方法を用いてRT-PCR法によって測定した。primerは、マウスに交差反応しないことを確認した。

肝細胞サイズおよびPloidyの解析

肝臓のホルマリン固定・パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色標本を作製した。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、および2核肝細胞の割合をカウントした。

(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。キメラマウスを用いた動物実験に関しては、(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

HBV感染、非感染キメラマウス肝臓における遺伝子発現

マイクロアレイ解析で上昇した遺伝子hANGPTL4, hTNFSF11, hCCRN4L, hARHGER12、低下した遺伝子hCCL2, hISG20, hCD276, hCCNA2, hCDK1, hCCNG2, hCCNB2のプライマーを用いて、14週間感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現量を解析したところ、上昇した遺伝子に関しては、有意な上昇はみられなかったが、hCCRN4L, hTNFSF11は高い傾向が認められた。低下した遺伝子に関しては、hISG20にみ有意に低下し、hCCNA2, hCDK1, hCCNG2, hCCNB2は低い傾向にあった。

cDNA-uPA/SCIDホモおよびヘテロキメラマウスのHBV感染におけるヒト肝細胞の細胞サイズおよび2核細胞の割合

昨年度、HBV感染、非感染14週間のcDNA-uPA/SCIDホモ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結果、一定面積あたりのヒト肝細胞数は非感染マウスがHBV感染マウスに比べて1.52倍多かった。さらに、2核細胞の割合をカウントしたところ、非感染 $3.7 \pm 1.2\%$ 、感染 $6.5 \pm 1.9\%$ であった。HBV感染、非感染20週間のcDNA-uPA/SCIDヘテロキメラマウス肝臓においても同様に調べた結果、一定面積あたりのヒト肝細胞数は非感染マウスがHBV感染マウスに比べて1.37倍多かったが、2核細胞の割合は非感染 $3.2 \pm 0.3\%$ 、感染 $3.3 \pm 0.7\%$ で差は認められなかった。

HBV感染、非感染キメラマウスヒト肝細胞の継

代移植におけるヒトアルブミン、HBV濃度変化

非感染細胞を継代移植したマウスのヒトアルブミン濃度は、13週令で9匹中7匹が10 mg/mLに達し、高置換となった。一方、HBV感染細胞を継代移植したマウスは、4匹ともヒトアルブミンが1 mg/mLに達しなかった（13週令で0.2-0.8 mg/mL、予想置換率<5%）（図1）。HBVの血清レベルの上昇は1代目よりも緩やかに上昇し、15週令で 10^8 に達したが、26週令で 10^7 レベルに低下した（図2）。尚、HBV感染マウス由来肝細胞の移植後2日目の生着は非感染マウス由来肝細胞と同等であった

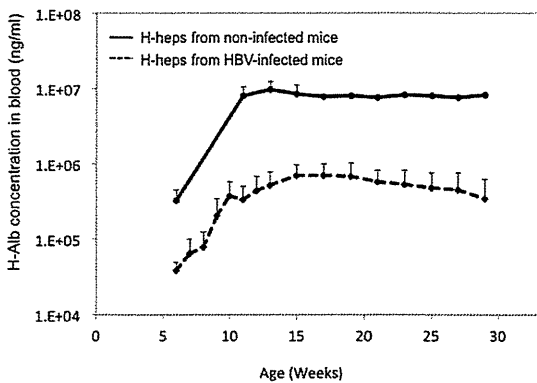


図1 HBV感染、非感染キメラマウス肝細胞の継代移植におけるマウス血中ヒトアルブミン濃度の変化

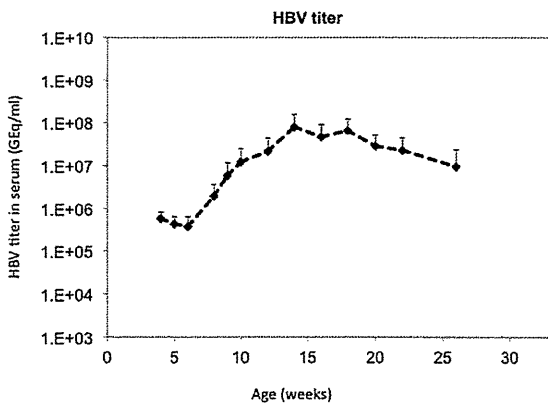


図2 HBV感染キメラマウス肝細胞の継代移植におけるマウス血清中HBVコピー数の変化

肝細胞増殖期にHBV感染させたキメラマウスのヒトアルブミン、HBV濃度変化、肝細胞直径およびPloidy解析

7週令にHBV感染させたキメラマウスのヒトアルブミン濃度は、予想に反して非感染キメ

ラマウスと同等に上昇し、高置換となった（図3）。また、HBVの血清中濃度も、増殖終息期に感染させた時と同様に増加し、 10^9 レベルに達した（図4）。19週令でコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、肝細胞直径を測定したところ、非感染マウスで $21.0 \pm 2.2 \mu\text{m}$ 、HBV感染マウスで $23.2 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった。FACSによるPloidy解析では、非感染マウスで2N: 82.2%、4N, 2Nx2: 8.5%、HBV感染マウスで2N: 48.4%、4N, 2Nx2: 38.5%であった（図5）。シャーレに播種した肝細胞を用いて2核細胞の割合をカウントしたところ、非感染マウスで $5.8 \pm 3.1\%$ 、HBV感染マウスで $26.7 \pm 5.6\%$ であった。

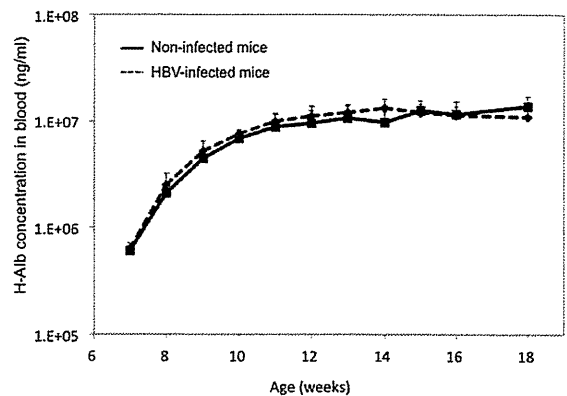


図3 移植後4週目からのHBV感染、非感染キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度の変化

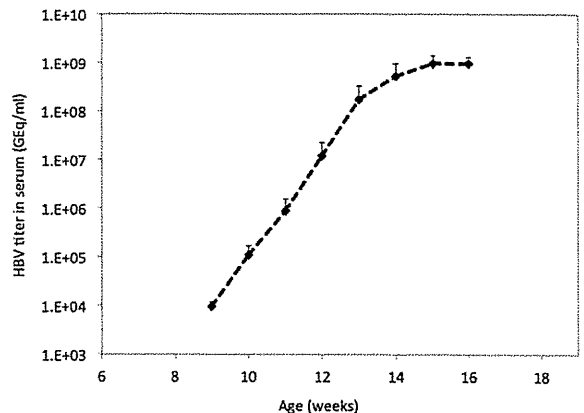


図4 ヒト肝細胞移植後4週目からのHBV感染キメラマウス血清中HBVコピー数の変化

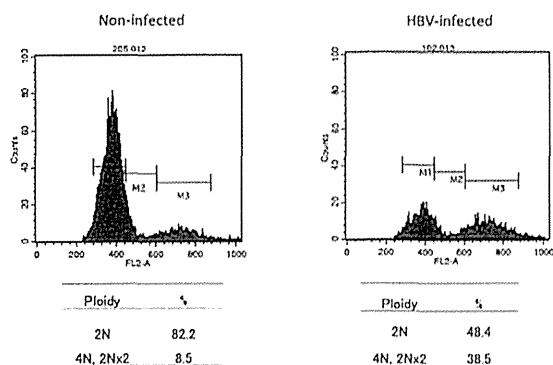


図5 ヒト肝細胞移植後4週目からのHBV感染、非感染キメラマウス（図3）から分離したヒト肝細胞のFACSによるPloidy解析結果

D. 考察

これまで、Hepatitis B virus X proteinが、肝細胞の増殖異常を誘導することがいくつかの実験により知られている。HBxを導入したChang cells (ChangX-34 cells)は、中心体が3個出現するという異常が観察され、増殖が阻害される (Chawon Yun et al. Molecular Cancer Research 2:159-169, 2004)。また、HBxトランスジェニックマウスは、肝部分切除後、G1/S移行が阻害され、肝細胞死が誘導されることが知られている (B.-K Wu et al. BBRC 340:916-928, 2006)。しかしながら、ヒトの *in vivo* の肝臓においてもHBVが肝細胞に同様の影響を与えているかどうかは報告がない。

マイクロアレイ解析では、HBV感染、非感染で大きな遺伝子変化は認められなかったが、HBV感染キメラマウス肝臓において、増殖に関する遺伝子低下が観察された。また、14週間および20週間HBVを感染させたキメラマウス肝臓組織において、炎症、apoptosis、線維化の増加は認められなかったが、肝細胞のサイズの増加が観察され、14週間感染マウスにおいては、2核細胞の割合の増加が観察された。また、HBV感染肝細胞と非感染肝細胞を継代移植したところ、肝細胞の生着には差は認められなかったものの、非感染キメラマウスは高置換になったが、HBV感染キメラマウスは低置換に留まった。これらのことから、HBV感染キメラマウスの肝細胞に形態変化がおり、増殖能が低下している可能性が考えられた。

そこで、肝細胞が増殖期にあるキメラマウ

スにHBVを感染させることにより、HBVの肝細胞増殖における影響を調べる実験を行った。予想に反して、非感染、HBV感染キメラマウス間にヒトアルブミンの増加に差は見られなかったが、これらのマウスから分離した肝細胞には大きな差が観察された。HBV感染キメラマウス肝細胞の直径は増加し、2N細胞の割合が約半分に減少していた。また、2核細胞の割合は約5倍程度増加していた。

これらのことから、HBVは *in vivo* のヒト肝細胞に対して、増殖阻害作用を有している可能性が考えられた。今後、増殖中のHBV感染キメラマウス肝細胞の中心体が増加しているかどうか検証したい。

また、このような変化が、インターフェロンなどの投与により可逆的に元に戻るかどうかの実験を行う予定である。

E. 結論

キメラマウスのヒト肝細胞は、HBVを感染させることにより、肝細胞サイズ、2核細胞の増加が起こることが明らかとなった。これらのことから、HBV感染はおおよび *in vivo* において肝細胞の増殖障害を起こしている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H.: Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. *Cell Transplant.* (in press)
- 2) Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.: Chimeric Mice with hepatocyte-humanized liver as an appropriate model to study human peroxisome proliferator-activated receptor- α *Toxicol Pathol.* (in press)

- 3) Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, Terasaki T: Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos.*, 2014; 41: 1039-1043.
 - 4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Path.* (in press)
 - 5) Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S: Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* (in press)
 - 6) Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, Horie T: Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of in vivo protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. *Toxicology Research* (in press)
2. 学会発表
 - 1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Watashi K, Abe H, Wakita T, Chayama K, Tateno C: Hepatitis B Virus Spread in Primary-cultured Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (2014.4, Taipei, Taiwan)
 - 2) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世: キメラマウスから分離した初代培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染. 第 50 回 日本肝臓学会 (2014.5, 東京)
 - 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Tateno C: In vitro evaluation of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). 第 87 回 組織培養学会 (2014.5, 東京)
 - 4) 立野 知世: ヒト肝細胞キメラマウスの改良と応用. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
 - 5) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美 田中靖人、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV genotype の性状比較. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
 - 6) 山崎ちひろ、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由美子、加国雅和、石田雄二、立野知世: ヒト ALT-1 特異的 ELISA を用いたヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性の検出. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
 - 7) 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるヒト EpCAM の発現. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
 - 8) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛