

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 (平成26年度)

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- $\gamma$  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と比較して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と比較して有意にGranzyme A、IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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と比較してヒト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、茶山班員)。

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-lambda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-lambda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。次世代シーケンスの

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