

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的および遺伝子・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息期(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

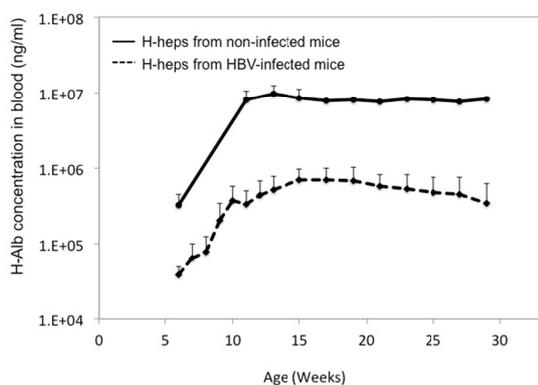


図1 HBV感染、非感染キメラマウス肝細胞の継代移植におけるマウス血中ヒトアルブミン濃度の変化

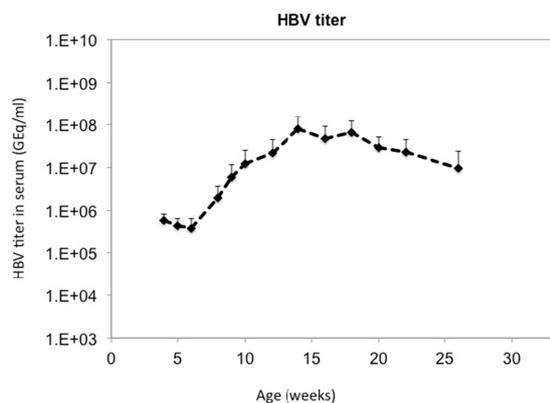


図2 HBV感染キメラマウス肝細胞の継代移植におけるマウス血清中HBVコピー数の変化

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。

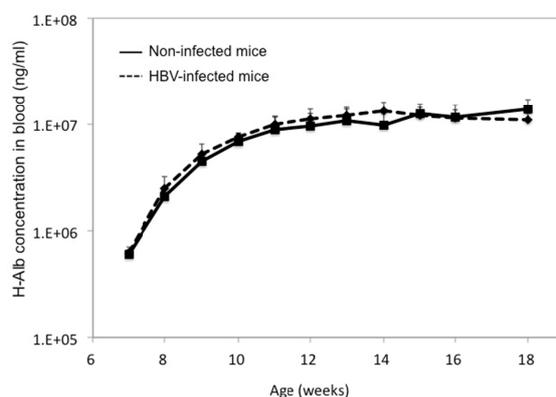


図3 移植後4週目からのHBV感染、非感染キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度の変化

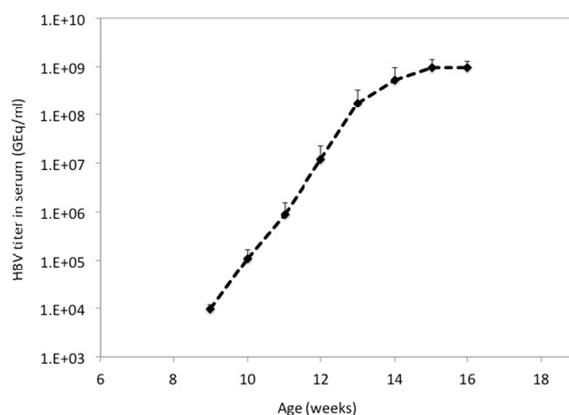


図4 ヒト肝細胞移植後4週目からのHBV感染キメラマウス血清中HBVコピー数の変化

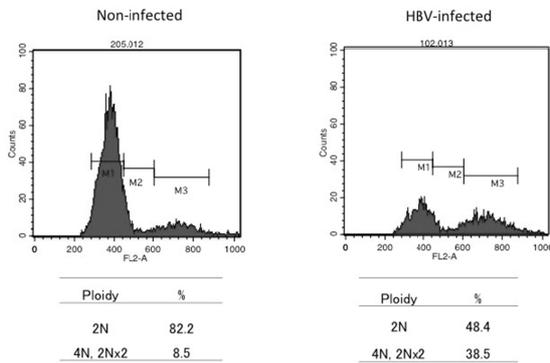


図5 ヒト肝細胞移植後4週目からのHBV感染、非感染キメラマウス(図3)から分離したヒト肝細胞のFACSによるPloidy解析結果

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- *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

- 美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰
立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来
の新鮮培養ヒト肝細胞における HBV の水
平感染第 10 回広島肝臓プロジェクト研
究センターシンポジウム (2014.7, 広島)
- 9) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y,
Ishida Y, Tateno C: Characterization
and proliferation assessment of hCK19-
and hEpCAM-positive cells in bile
duct-ligated chimeric mice with
humanized livers. 2014 FASEB Summer
Research Conference (2014.7, Keystone,
CO)
- 10) 内田 宅郎, 平賀 伸彦, 今村 道雄, 柘植
雅貴, 阿部 弘美, 相方 浩, 石田 雄二,
立野 知世, 茶山 一彰: cDNA-uPA/SCID
マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス
の作製および肝炎ウイルス感染. 第 18 回
日本肝臓学会大会 (2014.10, 神戸)
- 11) 平賀伸彦, 今村道雄, 内田宅郎, 柘植雅
貴, 阿部弘美, 相方 浩, 石田雄二, 立
野知世, 茶山一彰: 超免疫不全 TK-NOG
マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス.
第 18 回日本肝臓学会大会 (2014.10, 神
戸)
- 12) Nelson CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N,
Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H,
Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K:
Hepatitis B virus infection efficiency
and immune response decrease with cell
density in primary cultured
hepatocytes. 65TH AASLD (2014.11,
Boston)
- 13) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M,
Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y,
Tateno C, Yoshizato K, Murakami K,
Chayama K: A novel humanized
cDNA-iPA/SCID mouse for the study of
HBV and HCV infections. 65TH AASLD
(2014.11, Boston)
- 14) Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kawaoka
T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H,
Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K,
Chayama K: A novel TK-NOG based
humanized mouse model for the study of
HBV and HCV infection. 65TH AASLD
(2014.11, Boston)
- 15) DebRoy S, Hiraga N, Imamura M, Canini
L, Pohl RT, Persiani S, Uprichard SL,
Perelson AS, Tateno C, Chayama K,
Dahari H: HCV kinetics in uPA-SCID
chimeric mice with humanized livers
during intravenous silibinin
monotherapy. 65TH AASLD (2014.11,
Boston)
- 16) Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga
N, Canini L, Uprichard SL, Perelson AS,
Tateno C, Dahari H, Chayama K: HBV
infection in humanized chimeric mice
has multiphasic viral kinetics from
inoculation to steady state and an HBV
half-life of 1 hr. 65TH AASLD (2014.11,
Boston)
- 17) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y,
Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno
C: In vitro evaluation of human
hepatocytes isolated from chimeric
mice with humanized livers (PXB-mice®)
transplanted using cells from three
different donors. 19th North American
ISSX Meeting/29th JSSX Meeting (2014.
10, San Francisco, CA)
- 18) 土居 茜, 佐能 正剛, 山崎ちひろ, 石田
雄二, 加国雅和, 立野知世, 太田茂: ヒ
ト肝細胞移植キメラマウスを用いた
CYP2D6 基質のヒト体内動態予測. 第 53
回日本薬学会中国四国支部学術大会
(2014.11, 広島)
- 19) Tateno C: Development of novel chimeric
mice with humanized livers and

infected with HBV as hosts. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B-Recent progress in basic and clinical research (2014.11, Hiroshima)

- 20) 山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、景山豊、岩崎由美子、石田雄二、立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cells" の性状解析．細胞アッセイ研究会シンポジウム (2015.1, 東京)
- 21) 立野知世：ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物．第8回ラットリソースリサーチ研究会 (2015.1, 京都)
- 22) 高橋美和,立野知世,石田雄二,井上薫,吉田緑：ヒト肝細胞キメラマウス (PXBマウス) における卵胞発育不全．第31回日本毒性病理学会 (2015.1, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2012-102814 (H24年4月27日出願中)
「ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータートランスジェニックマウス」、
PCT/JP2013/062806 (H25年4月25日出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし