

201449001A

厚生労働科学研究委託費
肝炎等克服実用化研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等
治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の
開発に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 茶山 一彰

平成 27(2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人広島大学が実施した平成26年度「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
肝炎等克服実用化研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等
治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の開発
に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 茶山 一彰

平成27（2015）年3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の開発に関する研究

茶山一彰

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発

立野知世

2. ビタミン A 誘導体による C 型肝炎ウイルス感染制御

（抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発）

島上哲朗

3. 宿主因子を標的とする新規薬剤の開発

土方誠

4. インターフェロン - $\lambda 3$ 遺伝子導入に基づく C 型肝炎治療法の開発

（抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発）

高倉喜信

5. 次世代シークエンサーと系統樹解析を用いた DAA 耐性変異の検討

（宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

前川伸哉

6. HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討

（宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

松浦善治

7. 臓器不全合併症例に対する治療法の確立

-臓器移植後の新規抗 HCV 療法に適した免疫抑制プロトコールの導入-

大段秀樹

8. 異なる遺伝子型の HCV の感染増殖に関わる宿主因子の解析
(宿主因子を標的とする新規薬剤の開発)

脇田隆字

9. 透析患者の C 型慢性肝疾患に対するダクラタスビル+アスナプレビル
併用の薬物動態と有効性および安全性の検討－ Pilot Study －
(臓器不全合併症例に対する治療法の確立)

川上由育 大段 秀樹 正木崇生

10. 薬剤の効果に関連する宿主因子の検討
(宿主因子を標的とする新規薬剤の開発)

三木大樹

11. 薬剤耐性のウイルスに対する既存の薬剤による有効な治療法の開発
平賀伸彦

Ⅲ.学会等発表実績

Ⅳ.研究成果の刊行物・別刷

I. 委託業務成果報告（総括）

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の開発に関する研究

業務主任者 茶山 一彰 広島大学大学院医歯薬保健学総合研究院 教授

研究要旨：直接作用型抗ウイルス剤により C 型慢性肝炎に対する治療は飛躍的に向上するが、一部では、完治に至らない症例も出現すると思われる。本研究では、これらの症例に対する治療法開発を目的とし、以下の検討を行い、知見を得た。

(1) 薬剤耐性や種々の genotype の HCV に対する既存の薬剤による有効な治療法の開発

プロテアーゼ阻害剤/PEG-IFN/RBV 併用療法において、次世代シークエンサーを用いて、治療後超早期のウイルスゲノム多様性減変化は IFL3 SNP に有意な関連があり、治療効果を予測する因子となる可能性を示した。HCV 感染マウスを用いて NS3 D168 変異が約 10%以下の場合にはダクラタスビル+アスナプレビル併用投与により HCV 排除が可能なことを見いだした。培養細胞系を用いて、HCV が異なる細胞に感染する際、新たな quasispecies を出現すること、さらに HCV 感染マウスでは、培養細胞とは異なる quasispecies が選択されることを明らかにした。

(2) 現在開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発

HCV 培養細胞系を用いてビタミン A 誘導体が HCV 複製抑制効果を有しており、中でも、肝癌の chemoprevention の有用性が報告されている Peretinoin (NIK333) が最も強力であることを見いだした。

(3) 宿主因子をターゲットとした治療薬の開発

培養細胞系を用いて HCV 感染を阻害する化合物をスクリーニングし、ウイルス粒子形成または分泌過程を阻害することが推測される 12 種類の化合物を見いだした。うち脂質代謝に関与する化合物 A の持つ PLD 阻害活性が感染性 HCV 産生阻害に重要であり、PLD 阻害剤が HCV 粒子の分泌を阻害し、HCV 感染の拡大を阻止することを見いだした。HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を分離培養したところ、培養上清に HCV RNA が放出されることが確認された。

(4) IFN, その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発

HCV 感染に対する IFN- λ 3 遺伝子治療法の開発を試み、HCV レプリコン細胞に IFN- λ 3 発現プラスミドを導入したところ抗 HCV 効果が確認された。また HCV レプリコン細胞を用いて薬剤ライブラリーによって HCV 複製を抑制する新たな薬剤をスクリーニングすることにより、ステアリル・CoA デサチュラーゼ (SCD) 阻害薬が効果的に HCV ゲノム複製を抑制すること、SCD 阻害薬を DAA や IFN と併用することで相加的および相乗効果的に作用することを見いだした。

透析患者および肝移植患者に対するダクラタスビル+アスナプレビル併用療法の安全性および有効性を検討する臨床研究を行っていく。

【担当責任者】

立野知世 (株) フェニックスバイオ 取締役研究開発部長
島上哲朗 金沢大学附属病院恒常性制御学講座 助教
土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野 教授
前川伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 特任講師
松浦喜治 大阪大学微生物研究所分子ウイルス分野 教授
大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院消化器・移植外科学 教授
脇田隆字 国立感染研究所ウイルス第二部 部長
正木崇生 広島大学大学院医歯薬保健学研究院分子内科学 教授
川上由育 広島大学病院臨床研究部 講師
三木大樹 (独) 理化学研究所統合生命医科学研究センター・消化器疾患研究チーム 研究員
平賀伸彦 広島大学大学院医歯薬保健学研究院消化器・代謝内科 特任助教

A. 研究目的

直接作用型抗ウイルス剤 (DAA) により C型慢性肝炎に対する治療は飛躍的に向上する。しかし、これらの治療が全て実用化されても多剤耐性ウイルスの存在により、現在考え得る全ての治療薬を使用しても完治に至らない難治例の存在が既に明らかになっている。また、genotype 1b型および2型以外のC型肝炎ウイルス (HCV) 感染例に対する対策も十分でない。今後を講じるべき難治例としては、耐性ウイルスを有し、インターフェロン (IFN) の効果が期待出来ない症例、genotype 1b型、2型以外の症例、非代償性肝硬変、肝移植後、腎不全、透析中、腎移植後など臓器不全を合併した症例があげられる。本研究は、このような症例に対する治療法開発を目的とし、(1) 薬剤耐性や種々のgenotypeのHCVに対する既存の薬剤による有効な治療法の開発 (2) NS2阻害剤のような現在

開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発 (3) 耐性出現の可能性の少ない宿主因子をターゲットとした治療薬の開発 (4) インターフェロン、その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発、の4点を中心に行う。

B. 研究方法

(1) 薬剤耐性のウイルスに対する既存の薬剤による有効な治療法の開発では、申請者らがこれまでに作製した infectious clone である KT-9 クローンに変異を加え、現在開発されている DAA に対する各種耐性株を作製しヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、異なる DAA の組み合わせなどによる治療効果を検証する実験を行う。既存の DAA やインターフェロン α 、 β 、 λ などの組み合わせ、投与量などを検討し、どのような耐性株にはどの薬剤の併用が有効

であるかを明らかにする。(2) 新しい抗ウイルス薬の開発と評価では、現状のDAA以外の薬剤の治療効果および既存のDAAに対する薬剤耐性の抗HCV効果を検証する。(3) 宿主因子を標的とする新規薬剤の開発では、これまで我々が発見してきた宿主の蛋白を標的とした治療を開発するため、Ezetimib, cox2 inhibitor, Thromboxan A2 阻害剤などの抗ウイルス効果を増強させる方法を検討し、これらの組み合わせによりどのような抗ウイルス効果が得られるかを検討する。また siRNA による screening を行い、C 型肝炎ウイルスの増殖に必須である宿主因子を同定し、発見された宿主因子とウイルス蛋白の interaction について解析し、シーズの発見を行う。(4) 抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発では、HCV の増殖に寄与する宿主因子に関して、HCV 感染前後のトランスクリプトームを解析してライブラリーを作製し、HCV 感染により、特異的に発現が亢進あるいは抑制される因子を同定し、IFN 以外の抗ウイルス因子の研究を行う。このような因子は hydrodynamic 法によりキメラマウスに強制発現し、その抗ウイルス効果を検証する。また臓器不全合併症例に対する治療法を確立するため、肝移植、腎移植、透析中、非代償性肝硬変など、臓器不全や免疫抑制などのリスクを負う症例に対して臨床研究を計画し、最適な治療法を開発する。

C. 結果および考察

(1) 薬剤耐性や種々の genotype の HCV

に対する既存の薬剤による有効な治療法の開発

NS3 D168変異を種々の割合で有するHCV感染マウスに対し、ダクラタスビルとアスナプレビルの併用投与を行ったところ、D168変異が10%以下の場合には併用投与によりHCVの排除が可能であることを見出した(平賀班員)。

プロテアーゼ阻害剤/PEG-IFN/RBV3 剤併用療法において、次世代シーケンサーを用いて HCV quasispecies の動態および薬剤耐性変異の発生と経過を解析した(前川班員)。治療後超早期のウイルスゲノム多様性減少と最終治療効果、あるいは宿主 IFL3 SNP は有意な関連があり、超早期における多様性変化で治療効果を予測しうる可能性が示唆された。治療前に少数の耐性変異を認めた症例では、その HCV は臨床的耐性 HCV に進展せず、臨床的耐性は野生型の HCV に変異が生じ耐性を獲得したと考えられた。一方、治療抵抗性になるにつれ、quasispecies の系統は大きく変化することを明らかにした。

In vitro の感染系で、Huh7 細胞に馴化した HCVcc (HCVcc/Huh7) と Hep3B 細胞に馴化した HCVcc (HCVcc/Hep3B) を作製し、次世代シーケンスにて解析したところ、それぞれ異なった quasispecies を保持しており、異なる細胞株に感染させた際に、さらに新たな quasispecies が出現することを明らかにした(松浦班員)。HCVcc/Huh7 は Huh7 細胞に対して、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に対して特異的に

高い感染性を示しており，これらの結果から，quasispecies は細胞特異的な高い感染性を得るために重要な役割を果たしていると思われた．さらに SCID マウスを用いて，Huh7 細胞や Hep3B 細胞と異なる quasispecies が *in vivo* で選択されることを明らかにした．

(2) 現在開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発

新規抗ウイルス薬としてビタミン A 誘導体に注目して HCV 培養細胞系を用いてその抗ウイルス効果を解析し，複数のビタミン A 誘導体は，genotype 1a 型，1b 型，2a 型のいずれの HCV に対しても複製抑制効果を有することを見いだした（島上班員）．またビタミン A 誘導体の中でも，肝癌の chemoprevention の有用性が報告されている Peretinoin (NIK333) による HCV 複製抑制効果が最も強力であり，Peretinoin による HCV 複製抑制効果は，時間依存性かつ用量依存性であった．さらに Peretinoin はウイルスの RNA 複製のみでなく，感染性粒子産生能も抑制することを見いだした．

(3) 宿主因子をターゲットとした治療薬の開発

約 2000 例の C 型慢性肝炎症例について高密度のゲノムワイド SNP タイピングを実施した（三木班員）．今後，HCV の慢性感染，また IFN 併用から IFN フリーのレジメンまで含めた治療症例において，臓器不全合併症例を含む難治例に絞った

治療効果，あるいは治療不応をもたらすウイルスの薬剤耐性（ウイルスゲノムと宿主ゲノムの相互作用），治療不耐をもたらす各種副作用などに関連する宿主の遺伝的要因について解析する．

J6/JFH1 株の合成全長 RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし上清中のウイルスの感染性を阻害する化合物をスクリーニングした（脇田班員）．ウイルス粒子形成または分泌過程を阻害することが推測される 12 種類の化合物を見いだした．うち脂質代謝に関与する化合物 A の持つ PLD 阻害活性が感染性 HCV 産生阻害に重要であり，PLD 阻害剤が，HCV 粒子の分泌を阻害し，HCV 感染の拡大を阻止することを見いだした．

HCV 感染に対する宿主因子の影響を検討する為，HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を分離し，コラーゲンコートプレート上で平面培養を試みた（立野班員）．Genotype 1a 型 HCV 感染マウスのヒト肝細胞を PEG-IFN で処理すると明らかな HCV RNA 量の低下を認めたことから，培養 12 日目の上清中には *in vitro* で新規に合成された HCV RNA が放出されていると思われた．また genotype 3a 型 HCV 感染マウスのヒト肝細胞を培養し，上清中と細胞内の HCV RNA 量の検討を行ったところ，細胞内の HCV RNA 量の低下に伴って上清中の HCV RNA 量が低下する事が示され，生体内で HCV に感染したヒト肝細胞であれば，一定期間は培養下でも HCV を複製し上清中に放出可能である事が示された．

(4) IFN, その他の抗ウイルス性サイ トカインを利用したウイルス排除法の 開発

IFN-λ3 遺伝子治療法の抗 HCV 効果を検討した(高倉班員)。本年度は短期発現型 IFN-λ3 発現ベクターとして pcDNA3.1 ベクター, 持続型 IFN-λ 発現ベクターとして pCpG-mcs を選択し, これにヒト IFN-λ3 の cDNA を挿入したベクター, pCMV-IFN-λ3 および pCpG-IFN-λ3 を構築した。構築したプラスミドベクターを HCV レプリコン感染細胞 LucNeo#2 細胞にトランスフェクションしたところ IFN-λ3 の発現と HCV レプリコンの減少が確認された。また, ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入されたマウスにおいて, 血中 IFN-λ3 が検出されることが確認された。

これまでに報告している感染性 HCV 産生阻害効果を持つトロンボキササン A2 合成酵素 (TXAS) 阻害薬の薬効作用機序の解析をおこなった(土方班員)。肝癌由来培養細胞を TXAS 阻害薬で処理した時に発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ法で解析し, 数十種類の候補遺伝子を見出した。また HCV レプリコン細胞を用いて薬剤ライブラリーによって HCV 複製を抑制する新たな薬剤をスクリーニングすることにより, ステアシル CoA デサチラーゼ (SCD) 阻害薬が効果的に HCV ゲノム複製を抑制することを見出した。SCD 阻害薬は既存の DAA と併用することで相加的にその効果を上昇させ, またインターフェロンと併用することで相乗

効果を示した。このことから SCD 阻害薬が既存薬の効果を上昇させる併用薬の候補となると思われた。

透析患者および肝移植患者を対象にダクラタスビル+アスナプレビル併用療法に関する臨床研究を行っていく。透析患者の C 型慢性肝疾患患者を対象として, ダクラタスビル+アスナプレビル併用した場合の薬物動態と有効性および安全性の評価を多施設共同研究として実施する(川上班員, 正木班員)。また肝移植患者に対してダクラタスビル+アスナプレビル併用した際の免疫抑制薬を含めた薬物動態の解析を行うとともに, リンパ球混合試験で抗ドナー免疫応答を解析し, 有効性・安全性の評価を行うため, 対象患者の抽出を行い, 新規抗 HCV 療法に適した免疫抑制プロトコールおよび検査スケジュールを作成した(大段班員)。

D. 考察

臨床検体, HCV 培養細胞系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて新規候補となる抗ウイルス剤のスクリーニングあるいは新規治療法の開発を試みた。有効性が示された薬剤および治療法は今後, 難治性の C 型肝炎患者に対する新規治療法となることが期待され, さらに詳細な検討を行っていく。

E. 結論

臨床検体, HCV 培養系, HCV 感染マウスを用いて (1) 薬剤耐性や種々の genotype の HCV に対する既存の薬

剤による有効な治療法の開発 (2) NS2 阻害剤のような現在開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発 (3) 耐性出現の可能性の少ない宿主因子をターゲットとした治療薬の開発 (4) IFN, その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発に関する研究を行った。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H.

Quantitative Effect of Natural Killer-Cell Licensing on Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Curative Hepatectomy. *Cancer Immunol Res.* in press.

2) Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D,

Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir

combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J Viral Hepat.* in press.

3) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Chayama K;

Hiroshima Liver Study Group. Ribavirin dose reduction during telaprevir/ribavirin/peg-interferon therapy overcomes the effect of the ITPA gene polymorphism. *J Viral Hepat.* in press.

4) Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Kubo M, Chayama K. IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. *J Gen Virol.* 95(Pt 6):1297-306. 2014.

5) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(4):2105-12. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発

担当責任者 株式会社フェニックスバイオ 立野（向谷）知世 取締役研究開発部長

研究要旨

HCV 感染に対する宿主因子の影響を検討する為、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を分離し、コラーゲンコートプレート上で平面培養を行った。まず genotype 1a に感染したヒト肝細胞を用いて検討したところ、細胞の播種密度が高い方が上清中の HCV RNA 量を高く維持出来る事が明らかとなった。また、PEG-IFN で処理すると明らかな HCV RNA 量の低下を認めたことから、培養 12 日目の上清中には *in vitro* で新規に合成された HCV RNA が放出されている事が示唆された。次に genotype 3a に感染したヒト肝細胞を培養し、上清中と細胞内の HCV RNA 量の検討を行ったところ、細胞内の HCV RNA 量の低下に伴って上清中の HCV RNA 量が低下する事が示された。今回の結果から、生体内で HCV に感染したヒト肝細胞であれば、一定期間は培養下でも HCV を複製し上清中に放出可能である事が示された。

共同研究者氏名

石田雄二 (株)フェニックスバイオ
山崎ちひろ(株)フェニックスバイオ
柳 愛美 (株)フェニックスバイオ
吉実康美 (株)フェニックスバイオ

測定した。13 週齢以降に、7 mg/mL 以上のヒトアルブミン濃度を示した個体に対して、HCV genotype 1a, 3a を接種した(10^4 copies/匹)。接種後 4 週目と 5 週目に採血を行い、以下に示す方法で血中の HCV 量を定量し、感染が成立している事を確認した。

A. 研究目的

これまでヒト新鮮肝細胞を用いた *in vitro* HCV 感染系は存在しない。その原因は、HCV 感染による宿主因子の誘導が考えられている。そこで今回我々は、HCV 感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞の *in vitro* 培養系を用いて、培養条件の HCV 感染に対する影響を調べた。

—コラーゲナーゼ灌流によるヒト肝細胞の分離—
HCV 感染が確認されたキメラマウスから、山崎ら (2010年) の方法に従ってコラーゲナーゼ灌流を行い、ヒト肝細胞を分離した。平均すると、キメラマウス 1 匹から約 1.5×10^8 個の細胞が分離された。分離された細胞のうち、ヒト肝細胞の割合は 90-95% 程度で、生存率は 80% 以上であった。

B. 研究方法

—HCV 感染キメラマウスの作製—

既報の論文 (立野ら 2004 年) に従って、以下のようにキメラマウスを作製した。3 週令の albumin enhancer/promoter-urokinase cDNA-plasminogen activator-transgenic/SCID (cDNA-uPA/SCID) マウスに対して、脾臓経由で市販の凍結ヒト肝細胞 (Hispanic、2 歳、女兒、BD) を 1 匹あたり 1.25×10^5 個移植した。移植後 3 週目と 8 週目、およびそれ以降は週 1 回の割合で尾静脈から採血を行い、ラテックス凝集免疫比濁法 (LZ テスト ‘栄研’ U-ALB、栄研化学) にて生化学自動分析装置 (JCA-BM6050、日本電子) を用いて血中のヒトアルブミン濃度を

—HCV 感染ヒト肝細胞の培養—

HCV 感染ヒト肝細胞を文献 (山崎ら 2006、石田ら 2015 *in press*) に従って培養した。培養には Biocoat 24-well plate (コーニングインターナショナル) を使用し、細胞の播種密度は $0.5-4 \times 10^5$ 個/well とした。播種 2 日目以降は 5 日毎に培地交換を行い、必要に応じて HCV RNA 定量用に培養上清を回収した。また一部の細胞に対しては、Pegylated Interferon- $\alpha 2a$ (PEG-IFN、[Pegasys] 中外製薬) を 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培養開始時から持続的に暴露し、HCV RNA 量への影響を評価した。

—HCV RNA 量の定量—

SepaGene RV-R RNA extraction system (三共純薬)を用いて5 μ Lの血清もしくは30 μ Lの培養上清からRNAを抽出し、30 μ LのDWに溶解した。5 μ LのRNA溶液と、以下のプライマー、プローブを用いてリアルタイムPCR法(TaqMan EZ RT-PCR Core Reagent, ABI Prism 7500 sequence detector system、ライフテクノロジーズ)でHCV RNA量の定量を行った。

Forward primer (nucleotides 130-146),
5' -CGGGAGAGCCATAGTGG-3'

Reverse primer (nucleotides 290-272),
5' -AGTACCACAAGGCCTTTCG-3'

TaqMan probe (nucleotides 148-168),
5' -CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3' (Dye: FAM for 5', TAMRA for 3')

PCR条件は以下の通り。

50°C 2 min, 60°C 30 min, 95°C 5 min \times 1サイクル

95°C 20 sec, 62°C 1 min \times 50 サイクル

HCV感染細胞からのRNA回収には、TRIZOL (ライフテクノロジーズ)を使用した。回収されたRNAを用いて、上記の方法でHCV RNA量の定量を行った。

(倫理面への配慮)

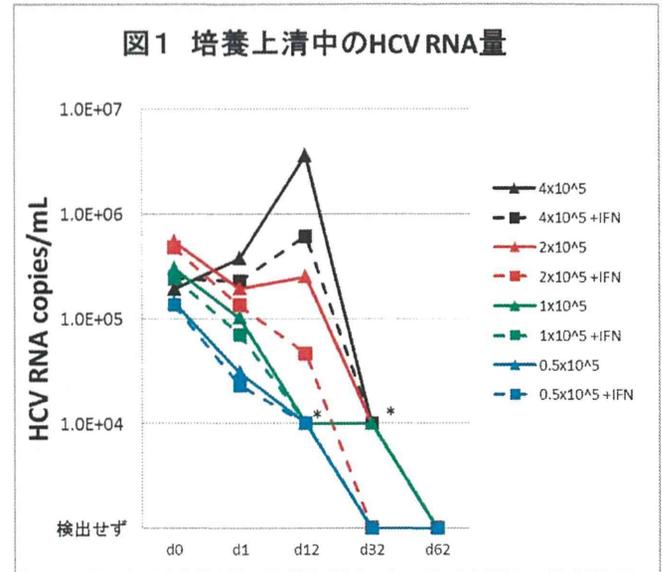
ヒト肝細胞キメラマウスの作製に使用した凍結ヒト肝細胞は、適切なインフォームドコンセントの元で採取されており、市販されているものである。その使用にあたっては、株式会社フェニックスバイオのヒト組織利用に関する倫理委員会の承認を得た。また本実験に関わる動物実験についても、株式会社フェニックスバイオの動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

まずHCV genotype 1aが感染したキメラマウスから回収されたヒト肝細胞を、コラーゲンコートプレートに0.5, 1, 2, 4 \times 10⁵個/wellで播種し、PEG-IFN存在下と非存在下でそれぞれ平面培養を行った。培養期間を通じて、HCV感染肝細胞は非感染細胞に比べて顕著な形態変化や生存率の変化等は観察されなかった。培養上清中のHCV RNA量の定量結果を図1に示した。

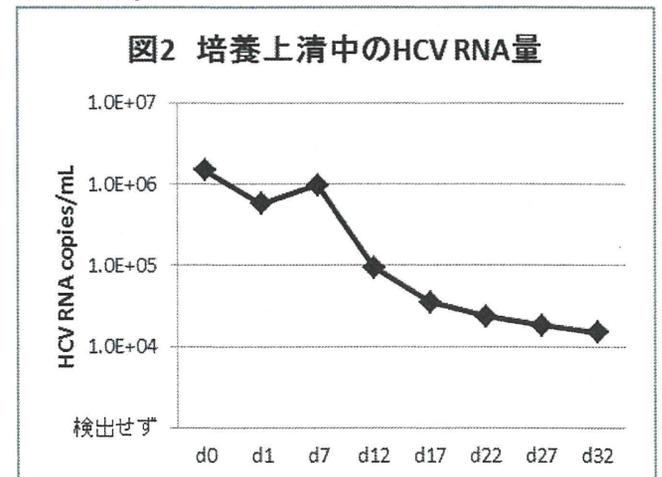
4 \times 10⁵個/wellで播種した場合は、d0, d1に比べてd12で明らかなHCV RNA量の上昇が確認された。また同じd12で比較した場合、PEG-IFN添加によってHCV RNA量が1/5に低下したことから、少なくともd12まではHCV RNAの複製と培養上清への放出が起きているものと推測された。2 \times 10⁵個/wellで播種すると、d12でのHCV RNA量は4 \times 10⁵個/wellで播

種した場合の1/10以下となったが、それでもPEG-IFN添加により更なるHCV RNAの低下が確認された。0.5 \times 10⁵個/wellと1 \times 10⁵個/wellでそれぞれ播種した場合は、d12では定量下限以下のHCV RNA量しか検出されなかった。以上の事から、感染細胞の播種密度が高いほど、上清中のHCV RNA量が高く維持出来る事が判明した。しかしながら、d32以降はいずれの条件でもHCV RNA量は定量下限以下となった。



HCV genotype 1a感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞培養上清中のHCV RNA量。横軸は上清を回収した培養日数(播種日をd-1とする)で、縦軸は上清中のHCV RNA量。実線がPEG-IFN非存在下で、点線がPEG-IFN存在下(9 μ g/mL)を示す。定量下限は1 \times 10⁴ copies/mLで、*は定量下限以下を示す。(n=1)

次に、HCV genotype 3aを感染させたキメラマウスからヒト肝細胞を分離し、4 \times 10⁵個/wellで播種し、培養上清中(図2)と細胞内(図3)のHCV RNA量を定量した。



HCV genotype 3a感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞培養上清中のHCV RNA量。播種細胞数は、4 \times 10⁵個/well。(n=1)

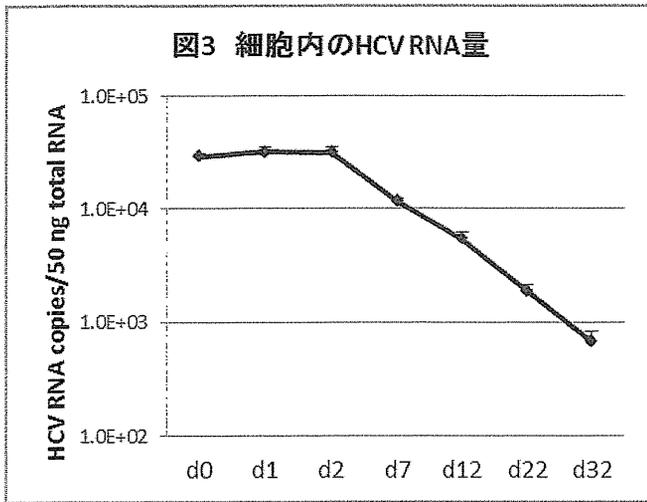


図3 細胞内のHCV RNA量
HCV genotype 3a感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞中のHCV RNA量。条件は図2と同じ。バーは標準偏差。(n=3)

上清のHCV RNA量については、d7までは大きな変化は無く、その後は徐々に低下したがd32の時点でも 1×10^4 copies/mL以上を維持していた。細胞内のHCV RNA量については、d7の時点から低下する傾向が確認された。培養上清・細胞内HCV RNA量共に、培養開始直後と終了時点で比べるとおよそ2ケタ程度の低下が認められ、上清の値と良く相関している事が示された。

D. 考察

HCV genotype 1aの感染キメラマウスを用いた実験では、播種細胞数が多いほどより効率よくHCVを複製し細胞上清に放出している事が示された。これまでの実験から、肝細胞は高密度で培養した方が肝機能を高く維持出来る事が知られている。今回のHCV感染細胞においても、高密度で培養する事で肝機能が保たれ、HCV RNAの複製・放出が維持されたと考えられる。

今回の実験では、元々HCVに感染した動物から肝細胞を採取している事から、生体内で産生されたHCV RNAが細胞培養系に持ち越されていると考えられる。しかしながら、PEG-IFNにより、明らかなHCV RNA量の低下が認められたことから、genotype 1aに関しては少なくともd12の時点までは新たなHCV RNAの合成と上清中への放出が起きていると考えられた。

Genotype 1a・3aとも、d32にかけてHCV RNA量の低下が認められた。HCV genotype 3aの結果から、培養上清中のHCV RNA量と細胞内のHCV RNA量は概ね相関していたことから、上清中のHCV RNA量の低下は、細胞におけるHCV RNA複製能の低下に起因すると考えられる。今回のように培養期間が長くなるとHCV RNAの複製能が低下する理由は不明であるが、初代ヒト肝細胞に対して*in vitro*でHCVを感

染させると、IFNの産生が誘導される事が既に知られており、初代ヒト肝細胞ではHCVの持続感染が成立しない要因の一つと考えられている。今回の実験においても、HCV感染細胞をキメラマウスから取り出して培養することで形質が変化し、*in vivo*では誘導されないIFN産生が起きている可能性が考えられる。

今回の実験では2つのgenotypeを用いたが、それぞれのgenotypeで、*in vitro*でのウイルス量の推移が異なる点は興味深い。我々のデータでは、キメラマウス血中のHCV RNA量を比較すると、genotype 1aと3aは同等であるにも関わらず (data not shown)、d0の培養上清に放出されていたウイルス量に関しては、genotype 3aの方が明らかに高い値を示した。また、1aではd7からd12にかけて明らかなHCV RNA量の増加が見られたのに対して、3aではそのような変化は認められなかった。今回の実験では同じドナー由来のヒト肝細胞を移植している事から、これら違いは、明らかに感染源の違いに起因するものである。

E. 結論

キメラマウスから分離したHCV感染ヒト細胞を高密度(24 wellプレートの場合、 4×10^5 細胞/well)で培養する事で、*in vitro*でもHCV RNAの複製及び上清中への放出が確認された。

G. 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-cellss" 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

特記事項無し

ビタミンA誘導体によるC型肝炎ウイルス感染制御 （抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発）

島上哲朗 金沢大学附属病院消化器内科 助教

研究要旨：現在C型肝炎の治療は、インターフェロン製剤を中心にした治療法から、C型肝炎ウイルス（以下HCV）の複製を直接抑制するDirect Acting Antivirals（DAA）に移行しつつある。DAAの使用により、インターフェロン製剤を使用した治療法に比べて副作用が少なく、また高い抗ウイルス効果を得ることが可能となった。しかしながらDAA製剤の問題点として、DAA耐性ウイルスの出現・選択により治療不成功例となり、多剤耐性ウイルスが残存しうること、またその高額な薬価があげられる。今回、新規抗ウイルス薬としてビタミンA誘導体に注目してHCV培養細胞系を用いてその抗ウイルス効果を解析した。その結果以下のことが明らかとなった。1)複数のビタミンA誘導体は、Gt1a、Gt1b、Gt2aいずれのGenotypeのHCVに対してもHCV複製抑制効果を認めた。2)ビタミンA誘導体の中でも、肝癌のchemopreventionの有用性が報告されているPeretinoin（NIK333）によるHCV複製抑制効果が最も強力であった。3)PeretinoinによるHCV複製抑制効果は、時間依存性かつ用量依存性であった。4)PeretinoinはウイルスのRNA複製のみでなく、感染性粒子産生能も抑制した。来年度以降Peretinoinの抗ウイルス作用機序の解明を行う。

A. 研究目的

現在C型肝炎の治療は、インターフェロン製剤を中心にした治療法から、C型肝炎ウイルス（以下HCV）の複製を直接抑制するDirect Acting Antivirals（DAA）に移行しつつある。DAAの使用により、インターフェロン製剤を使用した治療法に比べて副作用が少なく、また高い抗ウイルス効果を得ることが可能となった。しかしながらDAA製剤の問題点として、DAA耐性ウイルスの出現・選択による治療不成功例となり、多剤耐性ウイルスが残存しうること、またその高額な薬価があげら

れる。そのため、耐性ウイルスが出現しづらく、安価な抗ウイルス薬を開発することが急務である。

今回、そのような抗ウイルス薬の一つとしてビタミンA誘導体に注目した。同じく脂溶性ビタミンであるビタミンDは、HCVに対する抗ウイルス活性を有するため、インターフェロン製剤にビタミンDを併用することでウイルス排除率が改善することが知られている。ビタミンA誘導体に関しては、培養細胞系を用いた検討では、HCV複製を促進するという報告と、抑制するという相反する報告が存在し、