

201449002A

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）

モデル動物等を用いたHCV感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の
解析と新規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

業務主任者 竹原 徹郎

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（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））による委託業務として、国立大学法人大阪大学が実施した平成27年度「モデル動物等を用いたHCV感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と新規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）

モデル動物等を用いたHCV感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の
解析と新規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

業務主任者 竹原 徹郎

平成27（2015）年 3月

モデル動物等を用いた HCV 感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と
新規治療法の開発に関する研究

担当責任者名簿

業務主任者	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	教授
担当責任者	阪森 亮太郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	助教
	疋田 隼人	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	特任助教
	三善 英知	大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学	教授
	末水 洋志	公益財団法人実験動物中央研究所 バイオメディカル研究部	部長
	永野 浩昭	山口大学大学院医学系研究科 消化器 腫瘍外科学	教授
	江口 英利	大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科学	講師
	坂本 直哉	北海道大学大学院医学研究科 消化器内科学	教授
	加藤 孝宣	国立感染症研究所ウイルス第二部	室長
	水口 裕之	大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野	教授

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- モデル動物等を用いた HCV 感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と …… 1
新規治療法の開発に関する研究
竹原 徹郎

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. キメラマウスにおける HCV の感染と病態解析
（肝切除検体を用いたヒト肝細胞キメラマウスの作成） …… 7
阪森 亮太郎
2. キメラマウスにおける HCV の感染と病態解析
（ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HCV 感染モデルの確立） …… 10
疋田 隼人
3. 感染モデルを用いた、肝臓や血清のバイオマーカーの探索 …… 14
三善 英知
4. 改良型 TK-NOG ヒト肝キメラマウスの作製に関する研究 …… 17
末水 洋志
5. 手術検体を用いた HCV 感染マウスの作成
（肝移植後難治性 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療および切除肝サンプル由来肝細胞
を用いたヒト肝細胞置換マウス作成に関する研究） …… 18
永野 浩昭
江口 英利
6. HCV NS3-4A Protease に制御される宿主因子の解析と新規治療法への応用 …… 20
坂本 直哉
7. 細胞培養系を用いた HCV ライフサイクル評価法の構築 …… 22
加藤 孝宣
8. ヒト iPS 細胞を用いた HCV 感染系の構築 …… 26
水口 裕之

III. 学会等発表実績 …… 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 37

I. 委託業務成果報告（総括）

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）

委託業務成果報告（総括）

モデル動物等を用いた HCV 感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と
新規治療法の開発に関する研究

業務主任者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：C型肝炎に対する治療は、選択的な抗ウイルス薬（DAA）の登場によりSVR率の飛躍的な向上が得られるようになったが、同時に多剤耐性ウイルスの出現など新たな対応が必要である。より難治例に治療適応が拡大するなかでSVR後発がんの急増が危惧されるなど、C型肝炎に伴う病態の解明、さらに疾患進展・発がんを予測するバイオマーカーの開発が以前にも増して重要となってきた。本研究課題ではC型肝炎ウイルス（HCV）に感染性を示す新規のモデル動物、培養細胞を作出し、DAA治療による耐性克服や、HCV感染後の病態の可塑性等について以下のような研究を行う。1）HCVが効率よく感染し、長期にわたって解析できる新規肝細胞キメラマウスを作成する。また日本人が持つ人種的特徴を反映した解析を行うため、日本人由来の肝細胞を用いて、肝細胞キメラマウスを作成する。2）効果的なウイルス排除治療の確立のために、HCV感染肝細胞キメラマウスに各種DAA製剤を投与し、ウイルスの変異株存在率とDAAの効果を検討する。3）キメラマウス由来のヒト初代培養肝細胞を用いて感染実験を行い、ウイルス排除機構を解明する。4）iPS細胞にCRISPR/Casシステムを用いて、免疫応答関連遺伝子を修飾した細胞を作成する。この細胞を肝細胞に分化誘導し、感染細胞として使用することでDAA製剤治療における細胞内免疫応答機構の意義を検討する。5）C型肝炎に伴う病態解明のために、HCV感染モデルを用いて遺伝子発現解析、遺伝子変異・メチル化解析、糖鎖修飾の解析を行い、HCV感染が肝線維化やがん化に与える影響を明らかにする。3年計画の初年度において、キメラマスの作出、HCV感染モデルの作成など所期の計画を達成した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染は、肝線維化を引き起こし、肝発がんを誘導する。このような病態進展を抑止し得る第一義的な治療は抗ウイルス治療であり、ペグインターフェロン・リバビリン併用によるHCV排除により線維化進展や発がんは抑制される(Oze T, Takehara T et al. Clin Gastroenterol Hepatol 12:1186-1195, 2014)。近年、テラプレビルやシメプレビルなどのDAA製剤が開発され、ペグインターフェロンとリバビリンを用いる治療の治療効果の飛躍的な向上が得られている(Takehara T. Expert Rev Anti Infect Ther 12:909-917, 2014)。また、インターフェロンを使用しないDAA製剤のみによる治療も登場している。このようなSVR率80%超の時代を迎え、今後、耐性ウイルスの出現による超難治例の経年的な増加、病態進展例におけるSVR後発がんの増加などが危惧され、このような症例に対する対策が喫緊の課題になっている(Hiramatsu N, Takehara T, et al. Hepatol Res 45:152-161, 2015)。また、DAAの登場は移植後C型肝炎の治療法として期待されているが、肝移植後などの免疫抑制剤使用下での治療効果など、DAA治療に占める免疫機構の必要性も不明である。DAA製剤のみによる治療により肝臓の線維化や発がんがどの程度抑制されるかも今後明らかにされるべき課題である。このようにDAA治療によるウイルス排除は耐性化問題の克服と免疫機構関与の必要性を明らかにする必要がある。ウイルス排除以外にも、肝線維化、肝発がんの効果的な治療法開発が急務である。

肝臓において細胞死と再生が継続するこ

とが線維化や発がんをもたらすことがマウスモデルを用いて証明されているが(Takharu T, et al. Gastroenterology 127:1189-1197, 2004; Hikita H, et al. Hepatology 50:1217-1226, 2009; Hikita H et al. J Hepatol 57: 92-100, 2012)、肝細胞障害だけではHCV感染による肝硬変・肝発がんのすべてを説明できない。これまで申請者らはC型慢性肝炎の肝生検サンプルを用いて、メチル化異常の蓄積を明らかにしているが、HCV感染がエピジェネティックな変化を肝細胞にもたらし、その結果として、肝線維化の進展や肝発がん、さらには肝細胞の再生遅延などが誘導されている可能性が示唆される。これらの変化はウイルス排除後にも残存し、SVR後の発がんに寄与している可能性がある。

本研究課題では、HCVに感染性を示す新規のモデル動物、培養細胞を作出し、DAA治療による耐性克服やHCV感染後の病態の可塑性について検討することを目的とする。

B. 研究方法

TK-NOGマウスにガンシクロビルを投与し、肝障害を誘導することによって、ヒト肝細胞キメラ率の高いTK-NOGマウスを作成する。ガンシクロビルの投与方法を工夫することで、より安定して高いキメラ率のヒト化マウスの作成を行う。また、ドナー細胞として今までは欧米人の公知の初代培養肝細胞を用いていたが、肝切除後の手術検体から初代培養肝細胞を作成し、ドナー細胞として用いることで、日本人の肝細胞によるキメラマウスを作成する。このよう

なキメラマウスを作成することにより、ヒト肝細胞の *in vivo* での増幅を行い、大量の培養肝細胞を調整する。さらに、日本人由来の iPS 細胞から肝細胞を分化誘導し、TK-NOG マウスに生着させる。iPS 細胞には CRISPR/Cas システムを用いて遺伝子修飾し、HCV 感染に関与する宿主側因子を検討する。

患者血清を HCV のイノキュラムとして使用することはすでに倫理委員会で許可を得ており、インフォームドコンセントの得られた患者血清由来 HCV はすでに使用可能である。しかし患者血清由来の HCV をイノキュラムとして用いるだけでは、HCV ウイルスのゲノムの多様性すなわちクアシピーシスが存在するため、感染経過に伴う変異 HCV の出現が、あらかじめ存在していたのか、変異が誘導されたのか区別ができない。そのため、HCV クローンを作成しイノキュラムとして用いる。また、この HCV クローンに任意の変異を挿入することで耐性化 HCV クローンを作成し、イノキュラムとして使用する。

HCV イノキュラムを上記キメラマウスや培養肝細胞に感染させてウイルス増殖能の検討を行う。各種 DAA 製剤を投与することにより、HCV の違いによる DAA の感受性の違いを検討する。また DAA 耐性ウイルス出現頻度を明らかにし、耐性ウイルスの遺伝子変異を同定する。DAA 製剤にリバビリンやその他の薬剤 (L カルニチンなど) の追加により、ウイルス抑制効果が増強しないか検討する。また、末梢血単核球移植したヒト肝細胞キメラマウスは、免疫抑制剤投与下で HCV を感染成立させることで、移植後 C 型慢性肝炎を模倣としたモデルとなる。

移植後の C 型慢性肝炎は DAA 治療では HCV の存在は線維化の急激な進行を誘導するため、ウイルス排除治療の確立が望まれる。本モデルを用いることで、免疫抑制剤使用可でも効果的なウイルス排除が期待できる DAA を中心とした治療法を検討する。さらに細胞内免疫システムを欠損させて感染・治療 (DAA 製剤やリバビリン、インターフェロン製剤) 実験を行うことで、HCV 感染・治療における細胞内の免疫応答の関与を検討する。

HCV 感染マウス肝臓を用いてマイクロアレイ解析で発現解析、パスウェイ解析を行うと同時に、エピジェネティックな変化を特にメチル化、マイクロ RNA、エクソソームに焦点を当てて解析する。また代謝・分解応答もメタボローム解析を行うことなどで検討する。これらエピジェネティックな変化や代謝・分解応答が C 型肝炎の病態形成 (特に線維化・がん化) にどのように関わるのかを解明する。そして、HCV の排除で可逆的に改善するのかを検討するとともに、ウイルス排除治療としてのインターフェロンと DAA でこの可逆性に差がないかを検討する。さらに HCV 感染によるエピゲノム異常、代謝・分解応答の変化を解除する効果的な薬剤の検討を行う。同時にこれらの変化を血清学的なマーカーで検出できないか、特に糖鎖構造に着目して検討する。具体的には、レクチンアレイにより糖鎖修飾の差を検出し、その後質量分析により差がある糖鎖構造を決定し、その意義を検討する。これら本研究で得られた結果を、C 型慢性肝炎患者の臨床経過記録と臨床検体を用いて検証する。この研究遂行によって、HCV 感染によって誘導される肝細胞のエピ

ジェネティック変化・代謝応答と病態進展のメカニズム解明、新規バイオマーカー開発を行い、HCVの排除だけではない「感染前状態への肝臓の初期化治療」を目指した新規治療法の開発につなげる。

なお、遺伝子組み換えウイルス作成実験に該当する実験は、文部科学大臣の拡散防止措置の確認の受けたうえで、各研究実施機関の遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行っている。また、その他の遺伝子組み換え実験も、各研究実施機関の遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行っている。

(倫理面への配慮)

臨床検体や臨床データを用いた研究は、各研究実施機関において倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得た上で行っている。すべての動物実験は、各研究実施機関の動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行っている。

C. 研究成果

ヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスにC型肝炎患者血清を投与することにより、ウイルス血症が出現し、HCV持続感染が成立することを明らかにした。

HCVのフルゲノムRNAを肝臓に直接接種することにより、ウイルス血症が出現し、HCV持続感染が成立した。シングルクローンからのHCV感染モデルの作出に成功した。

患者血清の接種により作成したHCV持続感染マウスに、NS3/4A阻害剤、NS5A阻害剤、NS5B阻害剤を投与した。薬剤の投与により血清HCV RNA量の低下がみられ、ヒトにおける治療効果を反映するモデルとなることが示された。

肝切除検体の余剰サンプルを用いて、切除断面の門脈よりコラゲナーゼ灌流を行うことで、生細胞比率の高いヒト肝細胞の単離に成功した。

切除肝検体から単離したヒト肝細胞をTK-NOGマウスに投与することで、マウス血清からヒトアルブミンが検出された。日本人由来肝細胞を用いたヒト肝細胞キメラマウスの作成に成功した。

ヒト肝細胞キメラマウスから単離した初代培養肝細胞は長期にわたって培養可能であった。HCV患者血清を投与することでHCVの感染が成立し、培養上清中にHCVの産生を認めた。

Transthyretin (TTR) 遺伝子プロモーター作動性HSVtkトランスジェニックマウスファウンダーをNOGマウスとの交配により、今までのアルブミンプロモーター作動性のTK-NOGマウスより早期に肝細胞移植に十分な肝障害が誘導できる新規TK-NOGマウス(第二世代TK-NOGマウス)の作出に成功した。

JFH-1株のNS5A領域を遺伝子型1b株であるCon1株に入れ替えたキメラウイルス株を作製し、さらにNS5A阻害剤の耐性変異として知られているL31とY93の変異を導入した株を作製した。これらのキメラウイルスを用い、測定したNS5A阻害剤に対するEC50値は、L31Mの変異では約4倍、L31Iでは1.4倍、L31Vでは約22倍の耐性を示した。強い耐性変異として知られているY93Hは約700倍の耐性を示した。

糖鎖バイオマーカーとして、慢性肝疾患患者の血中のフコシル化ハプトグロビンとフコシル化標的蛋白であるMac-2bpを測定した。肝細胞癌の腫瘍マーカーとしてのフ

コシル化ハプトグロビンの有用性と、線維化進展バイオマーカーとしての Mac-2bp の有用性が示唆された。

NS3/4A と結合する宿主蛋白である GPx8 を同定した。その他にも多数の結合候補蛋白も検出された。

ゲノム編集技術で遺伝子変異細胞株を樹立するには、single clone を回収する必要がある。そのため、iPS 細胞から single clone クローニングが可能な培養方法を確立した。

D. 考察と結論

3年計画の初年度において所期の計画を達成した。このような成績を受け、2年度以降以下の検討を行っていく計画である。

1) 肝切除検体を用いたヒト肝細胞キメラマウス及び、第二世代 TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスを作成し、HCV 感染効率を検討する。2) 多剤耐性 C 型肝炎患者血清あるいは耐性変異を導入した HCV RNA をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、HCV 感染モデルを作成する。HCV の変異（特に現在承認されている NS5A 阻害剤で誘導される L31 と Y93 のダブル変異など）が選択的抗ウイルス薬（DAA）の治療抵抗性に与える影響を検討する。3) HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV の持続感染によってヒト肝細胞における遺伝子変異が増加するか、DNA メチル化などが変化するかを検討する。またその後のインターフェロンや DAA の治療介入によってこれらが感染前状態に初期化されるか解析する。合わせて血中の糖鎖関連蛋白を解析することで、遺伝子変異やメチル化状態などと関連する新規バイオマーカーを探索する。4) キメラマウスから単離したヒ

ト初代培養肝細胞に、細胞内免疫応答シグナルなどを欠損させることで、より感染効率の高いヒト肝細胞の樹立を行う。樹立した細胞を用いて、ヒト患者由来 HCV を感染させ DAA の治療効果判定が予測できないか検討する。5) ヒト iPS 細胞に遺伝子修飾技術を用いてウイルス RNA 認識機構に関する遺伝子（IPS-1 や IRF など）を欠損させたヒト iPS 細胞を作成する。この細胞からヒト肝細胞を誘導して生着させたキメラマウスを用いることで、HCV 感染におけるウイルス認識機構を個体レベルで解明する。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

別添

G. 知的所有権の取得状況

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）

キメラマウスにおける HCV の感染と病態解析
(肝切除検体を用いたヒト肝細胞キメラマウスの作成)

担当責任者 阪森 亮太郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 助教
研究協力者 甲斐 優吾 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 大学院生
齋藤 義修 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 大学院生

研究要旨：ウイルス性疾患の病態解明や治療法の開発のため、近年ヒト肝細胞キメラマウスが開発されているが、現在キメラマウスのヒト肝細胞は欧米人由来がほとんどであり日本人由来はない。そこで本研究では肝切除検体を用いた日本人由来のヒト肝細胞キメラマウスの作成を行った。7例の肝切除余剰検体の提供を受けた。その内訳は肝腫瘍切除目的が4例、肝移植ドナーが3例であった。門脈より脱血処理後にコラゲナーゼ液をかん流し、肝組織の消化と肝細胞単離を行った。7例中3例で生存率の良好な肝細胞の単離に成功した。単離した肝細胞をあらかじめ肝障害を誘導したTK-NOG マウスに経脾臓的に移植したところ、すべてのマウスにおいて移植後2週目の時点よりマウス血清中にヒトアルブミンを検出し、肝細胞の生着を確認した。血清ヒトアルブミン濃度は、およそ移植後12週～20週目にピークに達し、その後徐々に低下する傾向にあったが、移植後24週時点でもヒトアルブミンを検出しており、長期に渡りヒト肝細胞が生着維持されることが分かった。本研究において、日本人由来の肝細胞によるヒト肝細胞キメラマウスを作成することに成功した。今後、よりキメラ率の高いヒト肝細胞キメラマウスの作成に取り組むとともに、作成したキメラマウスを用いて肝炎ウイルスの感染実験やゲノム、エピゲノムに与える影響などの検討を行うことで、日本人における肝疾患の病態解明と治療開発に役立つ可能性があると考えられる。

A. 研究目的

ウイルス性疾患の病態解明や治療法の開発には、肝炎ウイルスの感染が成立する小動物モデルが必要である。しかし、B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスはヒト以外にはチンパンジーにしか感染が成立しない。近年、マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換するヒト肝細胞キメラマウスが開発され、これらのマウス体内でHBVやHCVの感染が成

立することが報告されている。しかし、キメラマウスの作成に用いる市販初代培養肝細胞は、欧米で作成されているため、作成されるキメラマウスのヒト肝細胞は欧米人由来がほとんどである。ウイルス感染の影響や薬剤代謝は人種によって異なる可能性があり、日本人に有効なウイルス排除を目的とした薬剤の検討は日本人由来の肝細胞を用いたキメラマウスで検討することが望

ましい。そこで、本研究では肝切除検体を用いた日本人由来のヒト肝細胞キメラマウスを作成し、日本人に最適なウイルス性肝疾患の新たな治療法開発に繋げることを目的とした。

B. 研究方法

肝切除検体として、他臓器癌の肝転移などに対して摘出を行った慢性肝炎に罹患していない患者由来の切除肝の非癌部、もしくは肝移植の際にドナーより摘出された切除肝の余剰部をそれぞれ 5g 程度切り分けたものを用いた。まず、提供された切除肝の切離面において主な門脈を同定し、その門脈より 37°C 程度に加温したハンクス液を基本組成とする前かん流液を 25G エラスター針を用いて用手的に 20~30 ml 程度注入し脱血処理を行った。続いて、同じく加温したハンクス液を基本組成とするコラゲナーゼ液を同様に 30 ml 程度注入し、結合組織の消化を行った。その後メスを用いて肝臓をほぐし、70 μ m のフィルターを用いて濾過することで、組織から単離した細胞を得た。この単離した細胞を細胞培養液洗浄し、遠心分離機による低速遠心を行うことで肝細胞を単離した。続いて、あらかじめガンシクロビルを腹腔内投与して肝障害を誘導した、免疫不全マウスである TK-NOG マウスに、精製した肝細胞を 1 個体あたり 1×10^6 個程度を経脾臓的に肝臓へ移植した。移植後経時的に採血を行い ELISA 法にてヒトアルブミン濃度を測定することで、移植した肝細胞の生着確認とキメラ率算出を行った。なお、ガンシクロビルの投与は、肝細胞投与の 2 週間前に 10mg/kg 腹腔内投与し、1 週間後に血清 ALT 値が 200 (IU/L) に達しない

マウスには、1 週間前にさらに 50 mg/kg 追加腹腔内投与した。

遺伝子組み換え実験は、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得た上で行った。また、すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行った。

C. 研究成果

60 歳代の胆管細胞癌症例 1 例、20 歳代の精巣癌肝転移症例 1 例、50-60 歳代の大腸癌肝転移症例 2 例、30-40 歳代肝移植ドナー症例 3 例の合計 7 例の肝切除検体の提供を受けた。いずれも同様の手順で肝細胞の単離を行ったが、実際にマウスに移植できる肝細胞を単離できたのは精巣癌肝転移 1 例、大腸癌肝転移 1 例とドナー 1 例の計 3 例であった。肝細胞の単離に失敗した原因としては、提供された肝臓が微小であるためにかん流に用いる門脈が同定できない、あるいは被膜に覆われていない切離面が複数ありかん流液が他の切離面から漏れ出るために有効なかん流ができない、などかん流に関する原因が主なものであった。単離できた 3 例では、単離肝細胞の生細胞率は 62~76% で、単離細胞数は $1.7 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個であった。

TK-NOG マウスに 10mg/kg のガンシクロビルを腹腔内投与すると、1 週間後の ALT は 20-1800 (IU/l) であり、36% のマウスが移植に望ましいとされる ALT 値 200 (IU/l) に達していなかった。これらのマウスに対して

追加で 50 mg/kg のガンシクロビルを腹腔内投与すると、40%のマウスでさらに 1 週間後には ALT 値が 200 (IU/l) を超え、この方法では 8 割程度の TK-NOG マウスで移植に適する肝障害が誘導できた。そこで、この肝障害誘導 TK-NOG マウスに、単離した肝細胞 1×10^6 個程度、計 7 匹に経脾臓的に移植し、経時採血を行った。移植後 2 週目の時点よりすべてのマウスにおいて血清中にヒトアルブミンを検出し、その後徐々にヒトアルブミン濃度の上昇を認め、移植したすべてのマウスにおいてヒト肝細胞が生着したことが確認された。血清ヒトアルブミン濃度は、個体差はあるもののおよそ移植後 12 週～20 週目に 0.1～0.6 (mg/ml) に達し、その後徐々に低下する傾向にあったが、移植後 24 週時点でもヒトアルブミンを検出しており、長期に渡りヒト肝細胞が生着し維持されることが分かった。これらのマウスのうち、最もヒトアルブミン濃度が高かったのはドナー肝由来の肝細胞を移植した 2 匹のマウスで、過去の検討より報告されているキメラ率算出のための推定式を用いるとピーク時のキメラ率はそれぞれ 11.4%、8.5%であった。その次にキメラ率が高いのは非ドナー例のうちもっとも若年患者より提供された精巣癌肝転移の症例であった。

D. 考察と結論

今回、日本人由来の切除肝検体を用いて肝細胞を単離し、TK-NOG マウスに移植することで、日本人由来の肝細胞によるヒト肝細胞キメラマウスを作成することに成功した。また、生着した肝細胞は長期に維持され、日本人に適した肝疾患の治療法の開発に寄与できる可能性が示唆された。一方で、

単離に用いる肝組織は切除肝検体の余剰部であり検体の部位や門脈の有無、切離面の状態などに依存するところも大きく、すべての切除肝検体で肝細胞の単離に成功することは難しく、今後症例を重ねて検討する必要がある。1つの断面以外は被膜に覆われた肝右葉や左葉の辺縁で、かん流に用いる門脈が太くしっかりとした大きめの検体であれば、高率に肝細胞が単離できる可能性が示唆された。また、ドナー肝や若年患者から提供された切除肝から単離した肝細胞が最も生着が良かったことから、提供される肝臓の状態にも依存する部分があると考えられる。これらの状況がうまく揃い、また単離や精製、移植の技術の向上などが加われば、よりキメラ率の高いヒト肝細胞キメラマウスを多く作成することが可能であると考えられる。今後、これらのキメラマウスを用いて肝炎ウイルスの感染実験やゲノム、エピゲノムに与える影響などの検討を行うことで、日本人における肝疾患の病態解明と治療開発に役立つ可能性があると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

3. 特許取得：なし
4. 実用新案登録：なし
5. その他：なし

キメラマウスにおけるHCVの感染と病態解析
(ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HCV 感染モデルの確立)

担当責任者 疋田 隼人 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 特任助教
研究協力者 甲斐 優吾 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 大学院生
中堀 輔 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 大学院生

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）は小動物モデルを用いた薬物効果判定などは不可能であった。また、genotype1bのHCV株が感染可能な培養細胞株も存在せず、細胞感染実験も不可能であった。近年、マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換するヒト肝細胞キメラマウスが開発された。そこで本研究課題ではNOGマウスの肝臓をヒト肝細胞で置換したヒト肝細胞置換TK-NOGマウスを用いてHCV感染モデルとなり得るか検討を行った。まず、ヒト肝細胞キメラマウスに、NS5A阻害剤に対する耐性変異として知られるL31、Y93変異を持たない患者血清由来のHCVおよびfull genome RNA、L31V、Y93H変異を持つ患者血清由来HCVの3種類をイノキュラムとして接種した。いずれの場合も2週間でマウス血清よりHCV-RNAが検出され、4-6週でプラトーに達した。マウスに感染させることで新たにL31、Y93に変異が生じることはなかった。L31、Y93変異を持たないHCVを感染したマウスに、NS5A阻害剤単独もしくはNS5B阻害剤併用投与すると2週間でウイルスは検出感度以下もしくは定量限界未満にまで低下した。2週で投与を中止すると速やかにウイルスは増加したことから、キメラマウスモデルでは薬剤治療効果の検討が可能であり、今後L31M/V、Y93H変異があるHCVに対する治療実験も含め、より長期に治療した際の治療効果と耐性誘導に関する検討が重要であると考えられた。また次にキメラマウスから初代培養肝細胞を単離したところ、60日以上培養可能であった。この細胞は患者血清由来HCVの投与で感染が成立したと考えられた。今後、マウスモデルより簡便に薬剤による抗HCV効果を検出できる培養モデルになる可能性が期待された。以上の結果より、ヒト肝細胞キメラマウス及びその単離肝細胞を用いて、HCV感染モデルを確立した。これらのモデルを用いて、持続感染成立や薬剤によるHCV排除が肝細胞に与える影響が検討できると考える。また、ウイルス排除に最適な薬剤の検討にも応用できると考える。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）はヒト以外にはチンパンジーにしか感染が成立しないため、小動物モデルを用いた薬物効果判定などは不可能であった。また、genotype1bのHCV株が感染可能な培養細胞株は存在せず、細

胞での実験も困難である。近年、マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換するヒト肝細胞キメラマウスが開発され、これらのマウス体内でHCVの感染が成立することが報告されている。またこのマウス肝臓から単離した初代培養肝細胞は、患者由来HCVの感染が

成立する可能性がある。

そこで、本研究では免疫不全マウスである NOG マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換したヒト肝細胞置換 TK-NOG マウスを用いて、患者由来の HCV を尾静脈より投与するもしくは、full genome RNA を肝臓に投与することで、HCV の持続感染が成立し、薬剤効果の評価が可能かを検討した。また、ヒト肝細胞置換 TK-NOG マウスから初代培養肝細胞を単離し、HCV を投与することで同様に感染が成立し薬剤効果の評価が可能かを検討した。

B. 研究方法

キメラ率が 40%以上のヒト肝細胞キメラマウスに患者血清由来の genotype 1 b である HCV を尾静脈より投与した。もしくは患者血清から得られた NS5A に変異領域のない HCV をもとに作成した genotype 1 b の full genome RNA 40-100ug をキメラマウスの肝臓に投与した。その後継時的に採血し、血中の HCV-RNA を測定し、HCV 感染を評価した。一部のマウスでは肝組織切片を用いて HCV-core を免疫染色し、HCV の感染を確認した。HCV のウイルス変異はダイレクトシーケンスもしくはディープシーケンスにて検討した。

感染が成立したマウスを用いて、NS 5 A 及び 5 B 阻害剤を投与し、経時的な血中 HCV-RNA を測定し、HCV に対する薬剤効果がこのマウスモデルで評価できるかを検討した。

ヒト肝細胞キメラマウスから初代培養肝細胞を単離し、*in vitro* での培養が可能かを検討した。一部の細胞には HCV を感染させ、感染が成立するかを検討した。

遺伝子組み換えウイルス作成実験に該当

する実験は、文部科学大臣の拡散防止措置の確認の受けたうえで、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。その他の遺伝子組み換え実験は、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認もと、インフォームドコンセントを得た上で行った。すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行った。

C. 研究成果

ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスに、NS5A 領域のダグラタスビルで耐性変異と知られている L31 と Y93 のいずれの変異をディープシーケンスにて認めない患者血清由来の genotype 1 b である HCV を 5.8 Log Copy 投与した。投与後 2 週間よりマウス血中で HCV-RNA 検出された。4-6 週で HCV-RNA は 5-7 LogC/ml にまで達し、プラトーとなった。4 週目の時点で摘出した肝臓を用いて肝組織切片を作成し免疫染色を行うと、一部の細胞で HCV-core 陽性となる細胞を認め、HCV 感染が成立しているものと考えられた。マウス血清から検出した HCV でも、L31 と Y93 にはディープシーケンスにて変異を認めなかった。次にダグラタスビル投与後再燃した患者血清由来の HCV を 4.3 Log Copy 投与した。この HCV はディープシーケンスにて NS5A 領域の L31V と Y93H 変異を認めた。この HCV 接種されたマウスも 2 週で血中 HCV-RNA は検出され、4-6 週で 5-7LogC/ml とプラトーに達した。このマウスの血中から検出した HCV をダイレクトシーケンスにて解析しても、L31V と Y93H 変異は保たれて

いた。

変異を認めない HCV を接種し感染が成立したマウスのうち 1 匹に NS5A 阻害剤であるダグラタスビルを 2 週間週 3 回、2 匹に NS5A 阻害剤と NS5B 阻害剤の 2 剤を 2 週間連日経口投与した。いずれも HCV-RNA 量は 1 週間で 2 LogC 以上低下し、2 週目には感度以下もしくは定量限界 (3.2 LogC/ml) 未満にまで低下を認めた。しかし投与中止後いずれのマウスでの HCV-RNA の再上昇を認めた。なお、再上昇を認めた HCV-RNA をダイレクトシーケンスにて検討したが、L31 と Y93 ともに変異は認めなかった。

次に、患者血清由来の HCV では Quasispecies のため、治療介入などで出現した変異 HCV がもともとマイナークローンとして存在している HCV か、誘導された変異 HCV かの区別ができない。そこで、NS5A に変異領域のない HCV をもとに作成した genotype 1b の full genome RNA 40-100ug をキメラマウスの肝臓に投与し、人工的に単一ゲノム由来の HCV の作成が可能かを試みた。RNA を投与したマウスでは、投与後 2 週でマウス血清から HCV が検出された。検出した HCV は L31 と Y93 変異は認めなかった。

最後にヒト肝細胞キメラマウスから初代培養肝細胞を単離した。単離した肝細胞は 60 日以上にわたって培養が可能であった。また 1 か月の時点でもアルブミンや CYP3A4 も mRNA レベルで保たれていることが確認できた。この細胞に患者血清由来 HCV-RNA を 5-50 Copy/cell 投与した。マウスの初代培養肝細胞に投与しても投与 6 日後には上清中の HCV-RNA は検出感度未満になるのに対して、キメラマウスの初代培養肝細胞では 3

週間以上にわたって HCV-RNA が検出され、感染が成立していると考えられた。

D. 考察と結論

ヒト肝細胞キメラマウスは患者血清由来の HCV 投与で持続感染が成立することが明らかとなった。また、full genome RNA を肝臓に投与することで、HCV が作成され、持続感染することも明らかとなった。HCV が感染したキメラマウスでは NS5A 阻害剤などの Direct Acting Antivirals (いわゆる DAA 製剤)により速やかに HCV-RNA 量は減少し、DAA の抗 HCV 効果を評価できるモデルであると考えられた。今後、ダグラタスビル耐性変異として知られる L31M/V と Y93H 変異を持つ HCV 感染キメラマウスに対して、どのような薬剤が効果的に HCV-RNA 量を減少させられるのかを検討する予定である。

また、キメラマウスから単離した初代培養肝細胞は長期にわたり維持培養が可能であった。また HCV 投与により感染が成立すると思われた。今後の更なる検討により、マウスモデルより簡便に DAA による抗 HCV 効果を検討できる培養モデルになるのではないかと期待できる。さらに、内因性 IFN シグナルなどの解析により、HCV 感染時における細胞内免疫応答を解析するのに適したツールではないかとも考える。

ヒト肝細胞キメラマウス及びその単離肝細胞を用いて、HCV 感染モデルを確立した。これらのモデルを用いて、持続感染成立や治療による HCV 排除が肝細胞に与える影響、ウイルス排除に最適な薬剤の検討などに応用したい。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

3. 特許取得：なし

4. 実用新案登録：なし

5. その他：なし

感染モデルを用いた、肝臓や血清のバイオマーカーの探索

担当責任者 三善 英知 大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学・教授

研究要旨

本研究では当研究室で見いだしたヒト慢性肝疾患の肝線維化バイオマーカーMac2bp のマウス慢性肝疾患モデルにおける病態意義の解明と測定系の開発を行っている。

A. 研究目的

HCV 感染による慢性肝炎は進展とともに肝線維化を引き起こす。肝線維化進展に伴い、肝硬変・肝不全・肝発がんが生じる。肝線維化のバイオマーカー開発は極めて重要な課題である。本研究では「マウス肝疾患モデルにおける糖鎖バイオマーカーの開発」を目的とする。

A. 研究方法

研究室ではすでにヒト慢性肝疾患の肝線維化バイオマーカーとして Mac2 binding protein (Mac2bp)を見いだしている。本研究ではマウス慢性肝疾患モデル（非アルコール性脂肪性肝炎モデル、肝線維化モデル）を用いて Mac2bp と肝線維化進展の関係について検討する。また肝線維化進展において中心的役割を担う肝星細胞を用いて Mac2bp の生理学的意義についての検討を行う。また Mac2bp に対する抗体を作成してマウス Mac2bp 測定系を開発する。

（倫理面への配慮）

動物実験の際は大阪大学動物実験規定に則り、動物に与える苦痛を最小限にするよう常に配慮している。すでに、本研究に関する研究計画書の承認を得ている。

B. 研究結果

Mac2bp は正常肝臓では全く発現していないが、非アルコール性脂肪性肝炎モデルであるメチオニン・コリン欠乏食投与マウス、肝線維化モデルである胆管結紮マウスでは肝臓中発現がタンパク・遺伝子発現ともに著明に上昇していた。またその発現は病態進展とともに増大していった。現在肝星細胞への Mac2bp の作用を検討中であり、マウス血中 Mac2bp 測定系の開発のため、Mac2bp に対するラットモノクローナル抗体の作成を開始したところである。

C. 考察

マウス血中 Mac2bp 測定系が開発できれば様々なマウス慢性肝疾患モデルへの応用が可能となる。特に HCV 感染病態に関連した肝線維化進展の評価方法として利用することで竹原班における研究進捗に大きく寄与するものと考えられる。また、肝疾患における糖鎖バイオマーカーの生物学的意義を知ることができる。

D. 結論

マウスにおいても肝線維化進展に伴い肝臓中 Mac2bp は増加していた。マウス血中 Mac2bp 測定系の開発はマウス慢性肝疾患モデルの肝線維化進展を評価する有用なツ-