

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

HBV ゲノム発現プラスミドおよびアデノウイルスベクターを用いた HBV 感染
モデルマウスの作製に関する研究

担当責任者 櫻井 文教 （大阪大学大学院薬学研究科・准教授）

研究要旨

B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus; HBV）の感染を原因とする B型肝炎は、我が国において緊急に克服すべき課題となっている。HBV の生活環の解明や抗 HBV 薬の創成、および B型肝炎発症機構に向けては、HBV 感染モデルマウスの開発が必要不可欠である。これまで HBV 感染モデルマウスとしては、ヒト肝臓キメラマウス、もしくはプラスミドやアデノウイルスベクターを用いて HBV ゲノムを肝臓に導入したマウスが用いられてきた。しかし、ヒト肝臓キメラマウスは重度の免疫不全のために HBV 感染による免疫応答が評価できない。また HBV ゲノムを肝臓に導入したマウスでは、HBV ゲノムの発現が一過性であり、慢性感染状態を再現できない。そこで本研究では新生児マウスに HBV ゲノムをアデノウイルス（Ad）ベクターを用いて導入することにより、HBV 慢性感染モデルマウスの作製を試みる。まず本年度は HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作製するとともに、新生児マウスにおける遺伝子導入特性を検討した。

研究協力者	田中 靖人	名古屋市立大学大学院 医学研究科教授	
水口 裕之	大阪大学大学院薬学研 究科教授	脇田 隆字	国立感染症研究所ウイ ルス第2部 部長
立花 雅史	大阪大学大学院薬学研 究科助教	渡土 幸一	国立感染症研究所ウイ ルス第2部 主任研究官
山本 達郎	大阪大学大学院薬学研 究科大学院生	A. 研究目的	B型肝炎ウイルス（Hepatitis B
飯塚 俊輔	大阪大学大学院薬学研 究科大学院生		

Virus; HBV) の感染を原因とする B 型肝炎は、我が国において非常に多くの患者を有すること、核酸アナログ製剤などが開発されているが、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題を有することなどから、革新的な治療薬の開発が求められている。B 型肝炎の主要な症状に、免疫応答を主因とする強い肝障害が挙げられる。従って新規 B 型肝炎治療薬の創成に向けては、HBV に対する免疫応答も加味した HBV 感染モデル動物が必要不可欠である。これまで HBV 感染モデル動物としては、ヒト肝臓キメラマウスが用いられてきた。ヒト肝臓キメラマウスは、肝細胞のほとんどがヒト肝細胞に置き換わったマウスである。ヒト肝臓キメラマウスでは効率よく HBV が感染するが、極めて高価であること、重度の免疫不全マウスであるため免疫応答を評価できないといった問題点を有する。また、野生型マウスに Ad ベクターやプラスミドを用いて HBV ゲノムを導入し発現させることも可能であるが(マウス肝細胞では HBV 粒子は感染できないが、HBV ゲノムを導入することで感染性の HBV 粒子が産生される)、この場合、肝細胞中の HBV ゲノム量が急速に減少していくため、一過性の HBV 感染しか模倣できない。そこで本研究では、免疫機構が成熟化していない新生仔マウス

に Ad ベクターを用いて HBV ゲノムを導入することを試みることにした。本年度は、HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作製するとともに、新生仔マウスにおける Ad ベクターの遺伝子導入特性を評価した。

B. 研究方法

B.1. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターの開発

Genotype A-C の HBV ゲノムを非増殖型 Ad ベクターゲノムの E1 欠損領域に挿入した。Genotype A-C の HBV ゲノムは、田中靖人教授(名古屋市立大学大学院医学研究科)よりご供与いただいた。また遺伝子導入効率を補正することを目的に、Cytomegalovirus (CMV) プロモーターによってドライブされる Gaussia Luciferase (gLuc) 発現カセットを HBV ゲノムの下流に挿入した(Figure 1)。Ad ベクターの調製は、improved in vitro ligation 法を用いて調製した。

B.2. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターによる各種培養細胞への HBV ゲノム導入

上記 B. 2 で作製した Ad ベクターをヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に 300 vector particle (VP)/cell もしくは 3000 VP/cell で作用させた。Ad ベクター作用 72 時間後、培養上清中の HBV

ゲノム量を定量的 PCR により、HBV 抗原量 (HBs 抗原、HBcr 抗原) を化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) を用いて測定した。また培養上清中の gLuc 活性については、Gaussia Luciferase assay kit (New England Biolabs) を用いて行った。

B.3. Ad ベクターを用いた新生仔マウスへの遺伝子導入と遺伝子発現解析

CMV プロモーターによってホタルルシフェラーゼを発現する発現カセットを搭載した Ad ベクター (Ad-L2) を、生後 2 日のマウスに対し、眼窩静脈叢より全身投与した。投与より 2 日後、各臓器を回収し、ホモジネートを調製した。遠心後、上清のルシフェラーゼ活性を測定することで、遺伝子発現効率を評価した。また、経日的に血液を回収し、肝障害マーカーである血清中の Alanine aminotransferase (ALT) および Aspartate aminotransferase (AST) 値を測定することで、Ad ベクター投与による肝障害を評価した。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

C. 研究成果

C.1. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターの開発

マウス肝臓に高効率に HBV ゲノムを導入することを目的に、非増殖型 Ad ベクターに HBV ゲノムを搭載した。さらに、遺伝子導入効率を補正することを目的に gLuc 発現カセットを挿入した。gLuc は分泌型ルシフェラーゼであることから、培養上清もしくは血液中の gLuc 活性をそのまま測定することが可能である。本 Ad ベクターは、従来の Ad ベクター作製法により効率よく調製することが可能であった。

C.2. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターによる各種培養細胞への HBV ゲノム導入

次に作製した Ad ベクターが HBV 粒子産生能を有するか検討するために、ヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞に HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作用させ、培養上清中の HBV ゲノム量ならびに HBV 抗原量を定量した。これまでに HepG2 細胞は、HBV ゲノム搭載プラスミドを Transfection することにより HBV 粒子が産生されることが多く報告されている。HepG2 細胞に HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作用させたところ、Ad ベクター量依存的に培養上清中に HBV ゲノムが検出された。さらに、HBs 抗原ならびに HBcr 抗原が検出された。本結果より、作製した HBV 搭載 Ad ベクターを肝細胞に作用させることに

よりHBV粒子が産生されることが示唆された。

C.3. Adベクターを用いた新生仔マウスへの遺伝子導入と遺伝子発現解析

新生仔マウスへのHBVゲノム搭載Adベクター投与に先立ち、ルシフェラーゼ発現Adベクターを用いて新生仔マウスにおけるAdベクターの遺伝子導入特性について検討した。生後2日の新生仔マウスの眼窩静脈叢より投与したところ、肝臓において最も高い発現が見られた。しかし、成体マウスと比較するとその発現量は低く、肝臓の次に高い遺伝子発現を示した心臓との差は、成体マウスでは約1500倍あったのに対し、新生仔マウスでは約30倍であった。また経日的にマウス肝臓におけるルシフェラーゼ活性を測定したところ、投与後徐々にルシフェラーゼ活性は減少していき、投与28日目にはほとんどバックグラウンドレベルにまで減少した。

次に肝障害マーカーである血清中のAST、ALT値を測定することにより新生仔マウスにおけるAdベクター投与後の肝障害について検討した。その結果、PBS投与群と比較し、有意なAST、ALT値の上昇は観察されなかった。以上の結果より、Adベクターを用いるこ

とで新生仔マウスの肝臓に高効率かつ安全に遺伝子導入可能であることが示された。

D. 考察

本研究ではHBV感染モデルマウスの作製に向けて、HBVゲノム搭載Adベクターを作製するとともに、新生仔マウスにおけるAdベクターの遺伝子導入特性を明らかにした。Adベクターは他のウイルスベクターと比較し高いタイターが回収可能であることや比較的大きな遺伝子を搭載可能であることに加えて、静脈内投与後、肝臓に極めて高効率に遺伝子導入可能であることから、HBVゲノムをマウス肝臓に送達するのに極めて適したベクターであると言える。今回、HepG2細胞に本Adベクターを作用させたところ、培養上清中にHBVゲノムならびにHBV抗原が検出されたことから、HBV粒子が産生させているものと思われる。今後は新生仔マウスに全身投与することでHBV慢性感染モデルマウスの開発を試みる。

また本年度はHBV慢性感染モデルマウスの開発に先立ち、新生仔マウスにおけるAdベクターの遺伝子導入特性を検討した。新生仔マウスでは、獲得免疫が未発達のため、Adタンパク質に対する免疫応答が起こらずに遺伝子

発現が長期間にわたり得られるものと期待される。すなわち HBV ゲノムを長期間維持・発現することで、HBV 慢性感染モデルマウスが得られると考えた。新生仔マウスでは全身投与後、肝臓において高い遺伝子発現が得られたが、その効率は成体マウスと比較して低いものであった。実際に肝臓中の Ad ベクターゲノムコピー数を測定したところ、成体マウスと比較して低いものであった。新生仔マウスでは血管が未成熟なために、投与した Ad ベクターが血管から漏れ出て抹消組織に分布し肝臓への移行量が減ったものと思われる。

また肝臓における導入遺伝子の発現は、投与後徐々に減少していき、投与 28 日後には検出限界以下であった。この原因のひとつとしては、新生仔マウスの状態から成長するにつれて肝臓も大きくなったために、肝細胞あたりの Ad ベクターゲノム量も少なくなったためと思われる。しかし、Ad ベクターを用いて新生仔マウス肝臓に HBV ゲノムを導入した場合、HBV ゲノムはマウス肝細胞内で増殖することから、新生仔マウスに導入し肝臓が大きくなってもそれほど肝細胞あたりの HBV ゲノム量は減少しないものと予想される。

E. 結論

- ・ HBV ゲノム搭載 Ad ベクターの作製に成功し、HepG2 細胞に作用させることにより、HBV 粒子を産生させることに成功した。
- ・ 新生仔マウスに Ad ベクターを全身投与することにより、マウス肝臓に高効率に遺伝子を導入することに成功した。

F. 健康危険情報

該当事項無し。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

該当事項無し。

G.2. 学会発表

- (1) 櫻井文教、山本剛史、森大輔、山本達郎、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、立花雅史、小比賀聡、水口裕之。2',4'-BNA/LNA 導入型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる B 型肝炎ウイルスの感染抑制。2014 年 9 月 8-9 日 第 24 回アンチセンスシンポジウム
- (2) 飯塚俊輔、櫻井文教、清水かほり、立花雅史、水口裕之。アデノウイルスベクターの新生仔マウスにおける遺伝子発現特性の解析。2014 年 10 月 11 日 第 64 回日本

薬学会近畿支部総会・大会

- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当事項無し。