

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15293

研究課題名(和文) 安定同位体ラベルヒト初代培養肝細胞とウイルスを用いた抗ウイルス治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-viral treatment using primary human hepatocyte and stable isotope.

研究代表者

茶山 一彰 (CHAYAMA, KAZUAKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：00211376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：安定同位体を導入した食餌をマウスに与えて飼育し、マウスがラベル可能であるかどうかを検討した。マウスの種類により食事の好みは激しく、uPA-scid マウスをもとにしたヒト肝細胞キメラマウスでは十分な摂取が困難であることが明らかになった。そこで、他のマウス種によるヒト肝細胞キメラマウスの作製を試みた。これまでの研究で新たな免疫不全マウス種を使用してヒト肝細胞キメラマウスを作製することに成功した。このマウスを使用して、B型およびC型肝炎ウイルスの感染が確認できた。今後このような新しいキメラマウスを使用してラベルの実験を行っていく。

研究成果の概要(英文)：We administered mouse food that is used to make stable isotope containing diet. uPA-scid based mouse did not eat this food and weakened. Thus it became clear to create stable isotope labelled primary hepatocyte using this diet. As the diet is quite expensive and difficult to purchase a different diet, we decided to make a different strain of human hepatocyte chimeric mouse. We attempted to establish a human hepatocyte chimeric mouse using different immune deficient mouse strain and succeeded to establish enough human hepatocyte chimerism. We also confirmed to establish stable hepatitis B and hepatitis C virus viremia using this human hepatocyte chimeric mouse. We will try to feed this mouse with stable isotope labelled diet and create labelled primary human hepatocytes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：B型肝炎ウイルス ヒト肝細胞 キメラマウス Hepg2 NTCP

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルスは世界に3億5千万人、C型肝炎ウイルスは世界に2億人のキャリアが存在するとされており、世界の疾患死亡の中で上位を占める肝細胞癌の重要な原因因子とされている。肝炎ウイルス感染は宿主であるヒト肝細胞の蛋白とウイルス蛋白が様々な相互作用することにより成立する。B型肝炎ウイルスの蛋白はpre-S蛋白がミリスチン化されることによりレセプターとしての機能を獲得することが知られている。また、core蛋白のユビキチン化がウイルスの放出に必要であることも知られている。またC型肝炎ウイルスのNS5A蛋白はリン酸化されることが知られている。しかし、その他の修飾もユビキチン化を含め多数あることは想定されているが、その詳細は明らかにされていない。これらのうちのいくつかはウイルスの増殖に必須である可能性は高く、このような修飾を阻害する薬剤が新規抗ウイルス薬となる可能性は高い。さらに、ウイルス感染によって起こる宿主蛋白の変化やウイルス蛋白との会合も同様に創薬のシーズとして有用であることが想定される。

本研究者はこれまでにヒト肝細胞キメラマウスを使用し、B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスに関する研究を行ってきた。B型肝炎ウイルスではe抗原は感染増殖には必須ではないが(Tsuge et al. Hepatology 2005)、HBx蛋白の発現が必須であること(Tsuge et al. J Gen Virol 2010)を明らかにし、C型肝炎ウイルスの新規レセプターも発見した(Sainz et al Nature Med 2012)。また、技術改良によりヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞をさらに次のマウスに継代することが可能であることも明らかにした(Utoh et al. Hepatology 2008)。これらの研究を行っていくうちに、新しいウイルス蛋白の修飾や宿主蛋白の解析に安定同位体によるラベルを行った肝細胞が有用であり、技術的に可能であることを見出した。

2. 研究の目的

安定同位体でラベルしたマウスを作製する。作製した肝細胞を安定して凍結する方法を開発し、安定同位体ラベルした初代培養肝細胞が安定的に供給できる技術を確立する。

3. 研究の方法

ヒト肝細胞を移植する uPA-scid mouse を silac diet で飼育し、ヒト肝細胞を3代にわたり継代する。また、これまでのようなプログラムフリーザーによる凍結では融解後の肝細胞の生着率が悪いので、平成27-28年にヒト肝細胞を凍結融解後に初代培養肝細胞として生着させる技術を開発する。

安定同位体でラベルすることにより作製したキメラマウスにB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスを感染させ、質量分析によりウイルスや感染細胞の修飾状態を検討する。

4. 研究成果

安定同位体を導入した食餌をマウスに与え

て飼育し、マウスがラベル可能であるかどうかを検討した。マウスの種類により食事の好みは激しく、ヒト肝細胞キメラマウスでは十分な摂取が困難であることが明らかになった。現在他のマウス種によるヒト肝細胞キメラマウスを作製しており、肝炎ウイルスの感染が確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計34件)

1. Miyaki E, Hiraga N, Imamura M, et al. (16/16) Interferon alpha treatment stimulates interferon gamma expression in type I NKT cells and enhances their antiviral effect against hepatitis C virus. *PLoS One*. 査読有, 2017; 12: e0172412. DOI:10.1371/journal.pone.0172412.
2. Hayes CN, Imamura M, Chayama K. The practical management of chronic hepatitis C infection in Japan - dual therapy of daclatasvir + asunaprevir. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 2017; 11: 103-113. DOI:10.1080/17474124.2017.1270205.
3. Van Renne N, Roca Suarez AA, Duong FH, et al. (16/23) miR-135a-5p-mediated downregulation of protein tyrosine phosphatase receptor delta is a candidate driver of HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Gut*. 査読有, 2017. in press. DOI:10.1136/gutjnl-2016-312270.
4. Chayama K, Hayes CN. Treatment of HCV patients on hemodialysis with daclatasvir and asunaprevir. *J Gastroenterol*. 査読有, 2017; 52: 125-126. DOI:10.1007/s00535-016-1252-7.
5. Uchida T, Imamura M, Kan H, et al. (14/14) Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. *J Gen Virol*. 査読有, 2017. in press. DOI:10.1099/jgv.0.000726.
6. Mori N, Imamura M, Kawakami Y, et al. (15/15) IFNL4 polymorphism effects on outcome of simeprevir, peginterferon, and ribavirin therapy for older patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 査読有, 2017; 47: E5-E13. DOI:10.1111/hepr.12715.
7. Mori N, Imamura M, Kawakami Y, et al. (15/15) IFNL4 polymorphism effects on outcome of simeprevir, peginterferon, and ribavirin therapy for older

- patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 査読有, 2017; 47: E5-e13. DOI:10.1111/hepr.12715.
8. Morio K, Imamura M, Kawakami Y, et al. (20/20) Real-world efficacy and safety of daclatasvir and asunaprevir therapy for hepatitis C virus-infected cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 査読有, 2017; 32: 645-650. DOI:10.1111/jgh.13511.
 9. Urabe A, Imamura M, Tsuge M, et al. (18/18) The relationship between HBcrAg and HBV reinfection in HBV related post-liver transplantation patients. *J Gastroenterol.* 査読有, 2017; 52: 366-375. DOI:10.1007/s00535-016-1240-y.
 10. Toyota J, Karino Y, Suzuki F, et al. (10/21) Daclatasvir/asunaprevir/beclabuvir fixed-dose combination in Japanese patients with HCV genotype 1 infection. *J Gastroenterol.* 査読有, 2017; 52: 385-395. DOI:10.1007/s00535-016-1245-6.
 11. Hayes CN, Chayama K. Interferon stimulated genes and innate immune activation following infection with hepatitis B and C viruses. *J Med Virol.* 査読有, 2017; 89: 388-396. DOI:10.1002/jmv.24659.
 12. Kawaoka T, Aikata H, Teraoka Y, et al. (16/16) Impact of Hepatitis C Virus Eradication on the Clinical Outcome of Patients with Hepatitis C Virus-Related Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib. *Oncology.* 査読有, 2017. in press. DOI:10.1159/000458532.
 13. Fukuhara T, Yamamoto S, Ono C, et al. (17/18) Quasispecies of Hepatitis C Virus Participate in Cell-Specific Infectivity. *Sci Rep.* 査読有, 2017; 7: 45228. DOI:10.1038/srep45228.
 14. Leong CR, Funami K, Oshiumi H, et al. (9/10) Interferon-stimulated gene of 20 kDa protein (ISG20) degrades RNA of Hepatitis B virus to impede the replication of HBV in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 査読有, 2016; 7: 68179-68193. DOI:10.18632/oncotarget.11907.
 15. Nakamura Y, Aikata H, Fukuhara T, et al. (20/20) Liver fibrosis assessment by FibroScan compared with pathological findings of liver resection specimen in hepatitis C infection. *Hepatol Res.* 査読有, 2016. in press. DOI:10.1111/hepr.12815.
 16. DebRoy S, Hiraga N, Imamura M, et al. (13/13) Hepatitis C virus dynamics and cellular gene expression in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. *J Viral Hepat.* 査読有, 2016; 23: 708-717. DOI:10.1111/jvh.12551.
 17. Kumada H, Mochida S, Suzuki F, et al. (4/10) Vaniprevir plus peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-experienced Japanese patients with hepatitis C virus genotype 1 (GT1b) infection: Phase 3 studies. *J Gastroenterol Hepatol.* 査読有, 2016; 31: 1674-1683. DOI:10.1111/jgh.13328.
 18. Abe-Chayama H, Hayes CN, Chayama K. Pan-genotypic cell culture system for propagation of hepatitis C virus clinical isolates. *Hepatology.* 査読有, 2016; 64: 1356-1358. DOI:10.1002/hep.28751.
 19. Morio K, Imamura M, Kawakami Y, et al. (22/22) ITPA polymorphism effects on decrease of hemoglobin during sofosbuvir and ribavirin combination treatment for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 査読有, 2016; 52: 746-753. DOI:10.1007/s00535-016-1279-9.
 20. Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, et al. (19/19) Antiviral effects of anti-HBs immunoglobulin and vaccine on HBs antigen seroclearance for chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol.* 査読有, 2016; 51: 1073-1080. DOI:10.1007/s00535-016-1189-x.
 21. Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, et al. (6/6) Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells.* 査読有, 2016; 21: 1253-1262. DOI:10.1111/gtc.12437.
 22. Kawakami Y, Imamura M, Ikeda H, et al. (15/15) Pharmacokinetics, efficacy and safety of daclatasvir plus asunaprevir in dialysis patients with chronic hepatitis C: pilot study. *J Viral Hepat.* 査読有, 2016; 23: 850-856. DOI:10.1111/jvh.12553.
 23. Morio K, Imamura M, Kawakami Y, et al. (23/23) Effects of ITPA polymorphism

- on decrease of hemoglobin during simeprevir, peg-interferon, and ribavirin combination treatment for chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 査読有, 2016; 46: 1256-1263. DOI:10.1111/hepr.12681.
24. Aizawa S, Okamoto T, Sugiyama Y, et al. (13/19) TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis. *Nat Commun.* 査読有, 2016; 7: 11379. DOI:10.1038/ncomms11379.
 25. Yamamoto S, Fukuhara T, Ono C, et al. (13/15) Lipoprotein Receptors Redundantly Participate in Entry of Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* 査読有, 2016; 12: e1005610. DOI:10.1371/journal.ppat.1005610.
 26. Nagaoki Y, Aikata H, Nakano N, et al. (23/23) Development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection who achieved sustained virological response following interferon therapy: A large-scale, long-term cohort study. *J Gastroenterol Hepatol.* 査読有, 2016; 31: 1009-1015. DOI:10.1111/jgh.13236.
 27. Kawaguchi Y, Hinoi T, Saito Y, et al. (12/16) Mouse model of proximal colon-specific tumorigenesis driven by microsatellite instability-induced Cre-mediated inactivation of Apc and activation of Kras. *J Gastroenterol.* 査読有, 2016; 51: 447-457. DOI:10.1007/s00535-015-1121-9.
 28. Kawaoka T, Imamura M, Morio K, et al. (14/14) Three patients treated with daclatasvir and asunaprevir for recurrent hepatitis C after liver transplantation: Case report. *Hepatol Res.* 査読有, 2016; 46: 707-712. DOI:10.1111/hepr.12602.
 29. Aly HH, Suzuki J, Watashi K, et al. (4/8) RNA Exosome Complex Regulates Stability of the Hepatitis B Virus X-mRNA Transcript in a Non-stop-mediated (NSD) RNA Quality Control Mechanism. *J Biol Chem.* 査読有, 2016; 291: 15958-15974. DOI:10.1074/jbc.M116.724641.
 30. Hayes CN, Chayama K. HBV culture and infectious systems. *Hepatol Int.* 査読有, 2016; 10: 559-566. DOI:10.1007/s12072-016-9712-y.
 31. Miyaki E, Imamura M, Hiraga N, et al. (11/11) Daclatasvir and asunaprevir treatment improves liver function parameters and reduces liver fibrosis markers in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 査読有, 2016; 46: 758-764. DOI:10.1111/hepr.12621.
 32. Tsuge M, Hiramatsu A, Shinohara F, et al. (26/26) Improvement of renal dysfunction in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis by daclatasvir and asunaprevir combination therapy: A case report. *Hepatol Res.* 査読有, 2016; 46: 944-948. DOI:10.1111/hepr.12629.
 33. Kan H, Hiraga N, Imamura M, et al. (14/14) Combination therapies with daclatasvir and asunaprevir on NS3-D168 mutated HCV in human hepatocyte chimeric mice. *Antivir Ther.* 査読有, 2016; 21: 307-315. DOI:10.3851/IMP3009.
 34. Foster GR, Chayama K, Chuang WL, et al. (2/28) A randomized, controlled study of peginterferon lambda-1a/ribavirin +/- daclatasvir for hepatitis C virus genotype 2 or 3. *Springerplus.* 査読有, 2016; 5: 1365. DOI:10.1186/s40064-016-2920-z.
- [学会発表](計7件)
1. 茶山一彰, Targeting Host and Viral Interactions: Insights from Mice Model, Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2017 (APASL 2017) (アジア太平洋肝臓病学会議), 2017/2/17, 上海(中国)
 2. 茶山一彰, Recent Progress in Treatment for Chronic Hepatitis C, 2016 アジア太平洋消化器病週間 (APDW2016), 2016/11/5, 神戸
 3. 茶山一彰, B型慢性肝炎治療の軌跡, 第20回日本肝臓学会大会, 2016/11/4, 神戸
 4. 茶山一彰, Integrated safety and Tolerability of DCV+ASV in Patients with Chronic HCV Genotype 1b Infection, 2016 APASL Single Topic Conference on Hepatitis C, 2016/6/12, 高雄(台湾)
 5. 茶山一彰, Best Strategy for Curing HCV Genotype 1 and 4: East vs. West, 2016 APASL Single Topic Conference on Hepatitis C, 2016/6/11, 高雄(台湾)
 6. 茶山一彰, A mouse model of human CTL mediated severe acute hepatitis B, 第52回日本肝臓学会総会 特別企画1-JSH主催 EASL Joint Meeting, 2016/5/20, 幕張
 7. 茶山一彰, B型肝炎, 第52回日本肝臓学会総会前期教育講演会, 2016/5/20, 幕張

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：高力価のB型肝炎ウイルスを産生する
細胞及びその作製方法
発明者：茶山一彰
権利者：広島大学
種類：特許
番号：特願 2015-081135
出願年月日：2015 年 04 月 10 日
国内外の別： 国内

6．研究組織

(1)研究代表者

茶山一彰 (Chayama Kazuaki)
広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・
教授
研究者番号：00211376