

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420796

研究課題名(和文) ヒト肝細胞キメラマウスとバキュロウイルスを用いた遺伝病モデルの創生

研究課題名(英文) Novel animal models for hereditary diseases using human hepatocytes transplanted chimeric mice and vaculovirus

研究代表者

茶山 弘美 (Chayama, Hiromi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：70572329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代表的な遺伝性肝疾患であるヘモクロマトーシス、ポルフィリン症、糖原病、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症、体質性黄疸、線維性嚢胞性肝疾患、ウィルソン病の原因遺伝子をノックアウトまたは変異を起こさせるようなCRISPR-Cas9システムのバキュロウイルスベクターのドナーコンストラクトを2種類作製した。作製したコンストラクトをHEK293細胞に導入し、得られたバキュロウイルスをHepG2細胞、Huh7細胞に感染させると著しく細胞増殖を阻害したためベクターを改良することとした。改良したベクターを用いて目的の変異が導入されたかどうかゲノムの配列を確認中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I established two type of CRISPR-Cas9 systems using vaculovirus vectors that work to knock out or mutate causative genes of hemochromatosis, porphyria, glycogenosis, amino acid metabolism abnormality, urea cycle disorder, constitutional jaundice, fibrotic cystic liver disease and Wilson's disease. I transfected theses constructs into HEK293 cells and harvested vaculoviruses. However, when I inoculated Huh7 cells and HepG2 cells with the vaculoviruses, the cell growths were seriously inhibited. From these results, I decided to improve vaculovirus vectors. Now I confirming whether the targeted genome editing was occurred using the improved CRISPR-Cas9 systems. Further experiments are necessary. I will establish in vitro hereditary liver diseases models using human primary hepatocytes derived from human hepatocytes transplanted chimeric mice and in vivo models using human hepatocytes transplanted chimeric mice with these CRISPR-Cas9 systems.

研究分野：消化器病

キーワード：ゲノム編集 ヒト肝細胞キメラマウス 遺伝性肝疾患

#### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は体内最大の臓器であり、代謝、排出、解毒、体液の恒常性など多機能である。我が国における肝疾患は慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌が主なものであり、治療法などの研究開発がすすんでいる。しかしながら比較的患者数は少ないが難病とされるヘモクロマトーシス、ポルフィリン症、糖原病、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症、体質性黄疸、線維性嚢胞性肝疾患、ウィルソン病など遺伝子異常によって引き起こされる疾患についてはほとんど研究されていない。

#### 2. 研究の目的

私はこれまで B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスの研究を通してヒトの肝細胞内でウイルス感染によって起こる変化を動物で再現し、分子生物学的手法や次世代シーケンサーなど最新のツールを用いて実施してきた。その成果は豊富であり、その解析技術や創造性は世界的にも高く評価されている。そこで、今回これまでウイルス性肝炎に関する研究の知識と経験を活かし、ヒト肝細胞キメラマウスに CRISPR-Cas9 システムをウイルスベクターに導入し肝細胞内のゲノム編集を行うことでさまざまな遺伝子異常によって引き起こされる疾患のモデルを作製し、病態の研究と新規治療薬のシーズを探索することを目的として研究を行うこととした。

#### 3. 研究の方法

代表的な遺伝性肝疾患であるヘモクロマトーシス、ポルフィリン症、糖原病、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症、体質性黄疸、線維性嚢胞性肝疾患、ウィルソン病の原因遺伝子をノックアウトまたは変異を起こさせるような CRISPR-Cas9 システムのバキュロウイルスベクターのコンストラクトを作製する。ヒト肝細胞キメラマウスに対して作製したバキュロウイルスベクターを導入し、各種肝疾患モデルを作製する。疾患モデルの確認はキメラマウスの標的遺伝子の mRNA の配列を解析することで行う。次に、得られた疾患モデルを用いて各種代謝反応の解析を行い、疾患発症機構を解明する。それら疾患モデルを用いて各疾患に対する標的分子や、治療薬の候補となるような低分子化合物のスクリーニングを行う。さらに、標的分子または低分子化合物の各疾患に対する作用機序の解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、代表的な遺伝性肝疾患であるヘモクロマトーシス、ポルフィリン症、糖原病、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症、体質性黄疸、線維性嚢胞性肝疾患、ウィルソン病の原因遺伝子をノックアウトまたは変異を起こさせるような CRISPR-Cas9 システムのバキュロウイルスベクターのドナーコンストラクトを 2 種類作製した。作製したコンストラクトを HEK293 細胞に導入し、得られたバキュロウイルスを HepG2 細胞、

Huh7 細胞に感染させると著しく細胞増殖を阻害したためベクターを改良することとした。改良したベクターを用いて同様にバキュロウイルスを作製し HepG2 細胞、Huh7 細胞に感染させ、目的の変異が導入されたかどうかゲノムの配列を確認中である。今後、改良ベクターを用いてヒト肝細胞キメラマウスから分離した培養肝細胞にバキュロウイルスを感染させ、正常ヒト肝細胞での遺伝性肝疾患モデルや、そのヒト肝細胞を移植した *in vivo* の遺伝性肝疾患ヒト肝細胞キメラマウスを作製する予定である。各遺伝疾患に適合する変異が得られればヒトの肝細胞内での生命現象を正確に再現できるモデルが作製されていると考えられる。また、uPA-Scid マウスを背景とするためマウスの血球細胞自体も少なく、ヒトの血球細胞も存在しないため純粋にヒト肝細胞内の反応を解析できる。従って、本研究のヒトの遺伝性肝疾患を正確に再現した実験系で見出される新規治療薬の候補分子は信頼性、実用性、有効性が極めて高い。

#### 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 17 件)

1. Development of a novel site-specific pegylated interferon beta for antiviral therapy for chronic hepatitis B. Tsuge M, Uchida T, Hiraga N, Kan H, Makokha GN, **Abe-Chayama H**, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Shimozone R, Iwamura T, Narumi H, Suzuki T, Kainoh M, Taniguchi T, Chayama K. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017. In Press. 査読有り
2. Interferon alpha treatment stimulates interferon gamma expression in type I NKT cells and enhances their antiviral effect against hepatitis C virus. Miyaki E, Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kan H, Tsuge M, **Abe-Chayama H**, Hayes CN, Makokha GN, Serikawa M, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Ohdan H, Chayama K. **PLoS One.** 2017;12(3):e0172412. 査

- 読有り
- Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. Uchida T, Imamura M, Kan H, Hiraga N, Hayes CN, Tsuge M, **Abe-Chayama H**, Aikata H, Makokha GN, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. **J Gen Virol**. In Press. 査読有り
  - Antiviral effects of anti-HBs immunoglobulin and vaccine on HBs antigen seroclearance for chronic hepatitis B infection. Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Kan H, Miyaki E, Masaki K, Ono A, Nakahara T, **Abe-Chayama H**, Zhang Y, Naswa MG, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. **J Gastroenterol**. 2016 ;51:1073-1080. 査読有り
  - Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. Sakuma T, Masaki K, **Abe-Chayama H**, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K. **Genes Cells**. 2016 ;21:1253-1262. 査読有り
  - Pan-genotypic cell culture system for propagation of hepatitis C virus clinical isolates. **Abe-Chayama H**, Hayes CN, Chayama K. **Hepatology**. 2016 ;64:1356-1358. 査読有り
  - Human Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Acute Liver Failure and Rescue by Immunoglobulin in Human Hepatocyte Transplant TK-NOG Mice. Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, **Abe H**, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Murakami K, Chayama K. **J Virol**. 2015;19:10087-10096. 査読有り
  - Rapid, Sensitive, and Accurate Evaluation of Drug Resistant Mutant (NS5A-Y93H) Strain Frequency in Genotype 1b HCV by Invader Assay. Yoshimi S, Ochi H, Murakami E, Uchida T, Kan H, Akamatsu S, Hayes CN, **Abe H**, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Chayama K. **PLoS One**. 2015 Jun 17;10(6):e0130022. 査読有り
  - Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy. Yoshimi S, Imamura M, Murakami E, Hiraga N, Tsuge M, Kawakami Y, Aikata H, **Abe H**, Hayes CN, Sasaki T, Ochi H, Chayama K. **J Med Virol**. 2015 ;87:1913-20. 査読有り
  - Novel Robust in Vitro Hepatitis B Virus Infection Model Using Fresh Human Hepatocytes Isolated from Humanized Mice. Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, **Abe H**, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. **Am J Pathol**. 2015; 185:1275-85. 査読有り
  - Association between variants in the interferon lambda 4 locus and substitutions in the hepatitis C virus non-structural protein 5A. Akamatsu S, Hayes CN, Ochi H, Uchida T, Kan H, Murakami E, **Abe**

- H**, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. *J Hepatol.* 2015 ;63:554-63. 査読有り
12. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, **Abe H**, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. **J Infect.** 2015;70:273-287. 査読有り
  13. The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. Honda Y, Takahashi S, Zhang Y, Ono A, Murakami E, Shi N, Kawaoka T, Miki D, Tsuge M, Hiraga N, **Abe H**, Ochi H, Imamura M, Aikata H, Chayama K. **J Gastroenterol Hepatol.** 2015;30:619-627. 査読有り
  14. New insight into the enhanced effect of pegylated interferon- $\alpha$ . **Abe H**, Hayes CN, Chayama K. **Hepatology.** 2014;60:1435-1437. 査読有り
  15. IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. Ochi H, Miki D, Hayes CN, **Abe H**, Hayashida Y, Kubo M, Chayama K. **J Gen Virol.** 2014 Jun;95(Pt 6):1297-306. 査読有り
  16. Ultra deep sequencing study of HCV genotype 1 in chronic hepatitis patients treated with daclatasvir, peg-interferon and ribavirin. 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. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014 ;58:2105-2112. 査読有り
  17. Aryl Hydrocarbon Receptor plays protective roles in Con-A induced hepatic injury by both suppressing IFN- $\gamma$  expression and inducing IL-22 **Abe H**, Kimura A, Tsuruta S, Morita R, Sekiya T, Shichita T, Chayama K, Fujii-Kuriyama Y, Yoshimura A. **Int Immunol.** 2014 ;26:129-137. 査読有り
- (学会発表)(計 5件)
1. **Abe H**, Masaki K, Sakuma T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Aikata H, Yamamoto T, Chayama K. Analysis of the effect on HBV life cycle by HBV genome editing using two different CRISPR/Cas9 systems. The 66th AASLD Annual Meeting, San Francisco, USA. November 13- 17, 2015 (Poster)
  2. **Abe H**, Sakuma T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Aikata H, Yamamoto T, Chayama K. Analysis of the effect on HBV life cycle by HBV genome editing using TALEN and CRISPR/Cas9 systems. The 65th AASLD Annual Meeting, Boston, USA. November 7- 11, 2014 (Poster)
  3. **Abe H**, Hayes CN, Hiraga N,

Imamura M, Tsuge M, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Pretreatment induction of ISGs in the presence of IFNL4 in hepatocytes but not in white blood cells is related with poor induction of ISGs following IFN- $\alpha$  therapy. The 65th AASLD Annual Meeting, Boston, USA. November 7- 11, 2014 (Poster)

4. **Abe H**, Hayes CN, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Kobayashi T, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Chayama K. IFNL4 Stimulates Expression of IFNLs and Differentially Controls Basal Expression Levels of Anti-viral ISGs and Signal Suppressers which Lead to Different Effects of IFN. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association for the Study of the Liver (EASL), London, UK. April 8-13, 2014 (Poster)
5. **阿部弘美**, 三木大樹, 平賀伸彦, 今村道雄, 柘植雅貴, 小林知樹, 河岡友和, 川上由育, 相方浩, 越智秀典, 茶山一彰 HCV 感染における IFNL4 の多型の違いによる IFN- $\alpha$  の発現量とインターフェロン投与前後のインターフェロン誘導遺伝子の発現量の関係 2014年5月29~30日 第50回日本肝臓学会総会・東京(口頭発表)

〔図書〕(計 0件)

無し

〔産業財産権〕

無し

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://shounai.hiroshima-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
茶山 弘美(Chayama Hiromi )  
広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 70572329

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
( )