

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670383

研究課題名(和文) OTC欠損症のモデル動物作製とその応用

研究課題名(英文) Development of animal model mimicking ornithine transcarbamylase deficiency

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)：ヒトの遺伝性疾患の研究を行い、治療を開発するには動物モデルが必要であるが、動物は代謝、吸収などの薬物動態がヒトとは異なっており、開発を行う上で問題となることがしばしばである。この問題を解決するために肝臓が高度にヒトの肝細胞に置換された動物を用い、TALEN/CRISPR/Casシステムにより標的遺伝子をknockoutすることによりヒトの疾患を模倣し、in vivoで薬物動態などが評価できるモデルを構築することとした。研究対象としてまずOTC欠損症のモデルを作製するためにTALENのconstructを作製し、切断活性を確認した。

研究成果の概要(英文)：There are several liver diseases caused by genetic disorder such as Wilson's disease, hereditary hemochromatosis and so on. One of such diseases, ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency is caused by mutations in the OTC gene, which is located on the X chromosome. Knockout mouse is often used to study such disorders. However, the metabolism of mouse is different from that of humans. We attempted to develop a mouse model of OTC deficiency using human hepatocyte chimeric mouse. Using genome editing technology we will be able to ablate the gene to make OTC deficient liver cells. We confirmed that TALEN which cut target gene in liver cancer cell lines actually worked and also developed a method to confirm if the gene of interest had actually been ablated. This mouse model will be useful to study human liver situation in mice and will be useful to develop therapy for this disorder.

研究分野：肝臓病学

キーワード：ゲム

1. 研究開始当初の背景

肝臓を疾患の主要臓器とする遺伝性疾患は 1 anti-trypsin 欠損症、血友病、OTC 欠損症、ウイルソン病、ヘモクロマトーシスなど多数存在する。これらの疾患の病態の解析、治療の開発にはノックアウトマウスが用いられていることが多い。しかし、マウスとヒトの病態は必ずしも同一ではなく、またマウスで良好なモデルが作製できないものもある。我々は肝臓がほぼ完全にヒト肝細胞に置換されたキメラマウスを作製して、ヒトとチンパンジーにしか感染しない B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスの感染モデルを作製し、創薬研究に成果を上げてきた (Matsumura et al. Gastroenterology 2009, Sainz et al. Nature Medicine 2012, Abe et al. Gastroenterology 2013)。さらに、クローン化したウイルスを使用して、両型肝炎ウイルスの reverse genetics の系を構築した (Tsuge et al. Hepatology 2005, Kimura et al. J General Virology 2008)。さらに、最近我々は理学研究科との共同研究で TALEN や CRISPR/Cas システムを用いて複数の遺伝子を同時に knockout する系を構築した。また、BacMam システムを使用して、高効率にヒト肝細胞キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞に GFP 遺伝子を導入できることも確認した。これらの技術を使用してヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞の標的遺伝子を knockout し、創薬研究が可能なマウス、細胞系を創出する。

本研究では平成 26 年度中に OTC 欠損症のモデル作製に必要な knockout construct を作製し、BacMam のシステムに導入する。また BacMam システムでマウス中のヒト肝細胞に遺伝子が導入できるかどうかを確認する。

ヒトの肝細胞で疾患状態を形成させることが出来るのはこのシステムのみである。

2. 研究の目的

ヒトの遺伝性疾患の研究を行い、治療を開発するには動物モデルが必要であるが、動物は代謝、吸収などの薬物動態がヒトとは異なっており、開発を行う上で問題となることしばしばである。

この問題を解決するために肝臓が高度にヒトの肝細胞に置換された動物を用い、BacMam システムと TALEN/CRISPR/Cas システムにより標的遺伝子を knockout することによりヒトの疾患を模倣し、in vivo で薬物動態などが評価できるモデルを構築する。研究対象としてまず OTC 欠損症のモデルを作製する。さらに技術をウイルソン病、hemochromatosis、血友病などの疾患にも応用する。

3. 研究の方法

ornithine transcarbamylase のエクソンを切断する TALEN の left, right arm の construct とこの酵素と相同性を有し、Neomycin 耐性遺伝子を有するドナー DNA を作製する。これを組み替えバキュロウイルスに導入して感染価を測定しておく。ヒト肝細胞キメラマウスから灌流分離した肝細胞を初代培養とし、3 種類のバキュロウイルスベクターを感染させ、Neomycin により ornithine transcarbamylase が欠損した肝細胞を選択する。これを 5 週齢の uPA-scid マウスに経脾臓的に投与し、ヒト肝細胞キメラマウスを作製する。生着肝細胞の mRNA を調べ、正常の mRNA が存在しないことを確認する。このマウスの肝臓から肝細胞を灌流分離し、初代培養肝細胞を作製する。この実験により in vitro, in vivo の療法で治療法を検討できる系が構

築される。

4. 研究成果

肝臓を疾患の主要臓器とする遺伝性疾患は 1 anti-trypsin 欠損症、血友病、OTC 欠損症、ウイルソン病、ヘモクロマトーシスなど多数存在する。これらの疾患の病態の解析、治療の開発にはノックアウトマウスが用いられていることが多い。しかし、マウスとヒトの病態は必ずしも同一ではなく、またマウスで良好なモデルが作製できないものもある。我々は肝臓がほぼ完全にヒト肝細胞に置換されたキメラマウスを作製して、ヒトとチンパンジーにしか感染しない B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスの感染モデルを作製し、創薬研究に成果を上げてきた。さらに、最近我々は理学研究科との共同研究で TALEN や CRISPR/Cas システムを用いて複数の遺伝子を同時に knockout する系を構築した。また、BacMam システムを使用して、高効率にヒト肝細胞キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞に GFP 遺伝子を導入できることも確認した。

そこで、本研究ではこれらの技術を使用してヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞の標的遺伝子を knockout し、創薬研究が可能なマウス、細胞系を創出することとした。平成 26 年度には OTC 欠損症のモデル作製に必要な knockout construct を作製し、BacMam のシステムに導入した。現在 BacMam システムでマウス中のヒト肝細胞に遺伝子が導入し、実際に切断が得られるかどうかについて検討を行っている。

今後はこのようにして正常の遺伝子を破壊した細胞を選択し、さらにそれをキメラマウスに戻すことにより、全てのヒト肝細胞が遺伝子欠損を有する動物モデルを作製することが出来るが、さらにこの動物から取り出した肝臓を再灌流して播種することにより薬剤のスクリーニングに使用できる細胞を作製することが出来ると考えられるため、この方向でさらに研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 25 件)

全て査読有り。

- (1) Onitake T, Ueno Y, Tanaka S, et al. (8/8) Pulverized konjac glucomannan ameliorates oxazolone-induced colitis in mice. *Eur J Nutr*. 2014. in press. 10.1007/s00394-014-0772-2.
- (2) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, et al. (11/12) Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Am J Pathol*. 2014; 184: 3026-3629. 10.1016/j.ajpath.2014.07.024.
- (3) Kumada H, Sato K, Takehara T, et al. (6/12) Efficacy of telaprevir-based therapy for difficult-to-treat patients with genotype 2 chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res*. 2014. in press. 10.1111/hepr.12416.
- (4) Shakado S, Sakisaka S, Okanou T, et al. (4/15) Interleukin 28B polymorphism predicts interferon plus ribavirin treatment outcome in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis: A multicenter retrospective study in Japan. *Hepatol*

- Res.** 2014; 44: 983-992. 10.1111/hepr.12280.
- (5) Tanaka Y, Ohira M, Tashiro H, et al. (5/6) Impact of alloimmune T cell responses on hepatitis C virus replication in liver transplant recipients. **Hum Immunol.** 2014; 75: 1259-1267. 10.1016/j.humimm.2014.09.006.
- (6) Hayes CN, Chayama K. Emerging treatments for chronic hepatitis C. **J Formos Med Assoc.** 2015; 114: 204-15. 10.1016/j.jfma.2014.09.001.
- (7) Kawaoka T, Takahashi S, Kawakami Y, et al. (13/13) Sustained virological response to antiviral therapy improves survival rate in patients with recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation. **Hepatol Res.** 2014. in press. 10.1111/hepr.12447.
- (8) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, et al. (12/12) Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. **J Infect.** 2015; 70: 273-87. 10.1016/j.jinf.2014.10.017.
- (9) Shahidi M, Tay ES, Read SA, et al. (5/7) Endocannabinoid CB1 antagonists inhibit hepatitis C virus production, providing a novel class of antiviral host-targeting agents. **J Gen Virol.** 2014; 95: 2468-2479. 10.1099/vir.0.067231-0.
- (10) Yokoyama S, Takahashi S, Kawakami Y, et al. (17/17) Effect of vitamin D supplementation on pegylated interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C genotype 1b: a randomized controlled trial. **J Viral Hepat.** 2014; 21: 348-356. 10.1111/jvh.12146.
- (11) Ochi H, Miki D, Hayes CN, et al. (7/7) IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. **J Gen Virol.** 2014; 95: 1297-1306. 10.1099/vir.0.060103-0.
- (12) McPhee F, Hernandez D, Zhou N, Yu F, Ueland J, Monikowski A, Chayama K, Toyota J, Izumi N, Yokosuka O, Kawada N, Osaki Y, Hughes EA, Watanabe H, Ishikawa H, Kumada H, et al. (7/16) Virological escape in HCV genotype-1-infected patients receiving daclatasvir plus ribavirin and peginterferon alfa-2a or alfa-2b. **Antivir Ther.** 2014; 19: 479-490. 10.3851/IMP2729.
- (13) Fujino H, Imamura M, Nagaoki Y, et al. (29/29) Predictive value of the IFNL4 polymorphism on outcome of telaprevir, peginterferon, and ribavirin therapy for older patients with genotype 1b chronic hepatitis C. **J Gastroenterol.** 2014; 49: 1548-1556. 10.1007/s00535-013-0924-9.
- (14) Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, et al. (10/11) On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. **Antivir Ther.** 2014. in press. 10.3851/IMP2777.
- (15) Nagaoki Y, Imamura M, Kawakami Y, et al. (22/22) Interferon lambda 4 polymorphism affects on outcome of telaprevir, pegylated interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. **Hepatol Res.** 2014; 44: E447-454. 10.1111/hepr.12336.
- (16) Kohno T, Tsuge M, Murakami E, et al. (10/10) Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. **J Viral Hepat.** 2014; 21: e89-97. 10.1111/jvh.12240.
- (17) Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, et al. (6/21) Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. **Hepatology.** 2014; 59: 2083-2091. 10.1002/hep.27113.
- (18) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, et al. (19/19) Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014; 58: 2105-2112. 10.1128/AAC.02068-13.
- (19) Takaki S, Kawakami Y, Miyaki D, et al. (20/20) Non-invasive liver fibrosis score calculated by combination of virtual touch tissue quantification and serum liver functional tests in chronic hepatitis C patients. **Hepatol Res.** 2014; 44: 280-287. 10.1111/hepr.12129.
- (20) Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, et al. (6/7) Long-term elimination of hepatitis C virus from human hepatocyte chimeric mice after interferon-gamma gene transfer. **Hum Gene Ther Clin Dev.** 2014; 25: 28-39. 10.1089/humc.2013.066.
- (21) Yokoyama S, Kawakami Y, Chayama K. Letter: Pitavastatin supplementation of PEG-IFN/ribavirin improves sustained virological response against HCV. **Aliment Pharmacol Ther.** 2014; 39: 443-444. 10.1111/apt.12605.
- (22) Suzuki F, Toyota J, Ikeda K, et al. (4/12) A randomized trial of daclatasvir with peginterferon alfa-2b and ribavirin for HCV genotype 1 infection. **Antivir Ther.** 2014; 19: 491-499. 10.3851/IMP2730.
- (23) Kawaoka T, Takahashi S, Tatsukawa Y, et al. (16/16) Two patients treated with pegylated interferon/ribavirin/telaprevir triple therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. **Hepatol Res.** 2014; 44: 1259-1264. 10.1111/hepr.12296.
- (24) Kawakami Y, Suzuki F, Karino Y, et al. (6/6) Telaprevir is effective given every 12 h at 750 mg with pegylated interferon-alpha2b and ribavirin to Japanese patients with HCV-1b IL28B rs8099917 TT. **Antivir Ther.** 2014; 19: 277-285. 10.3851/IMP2706.

(25) Mori N, Imamura M, Takaki S, et al. (7/7) Hepatitis C virus (HCV) reactivation caused by steroid therapy for dermatomyositis. **Intern Med.** 2014; 53: 2689-2693. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447651>

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) 茶山一彰, Hepatitis B mouse model involving CTL, 肝炎部会, 2015/1/25, 台北、台湾
- (2) 茶山一彰, 肝硬変の新たなマネジメント, 第 102 回日本消化器病学会中国支部例会, 2014/11/29, 広島
- (3) 茶山一彰, All-oral Dual Combination of Daclatasvir plus Asunaprevir Compared with Telaprevir plus Peginterferon Alfa/Ribavirin in Treatment-naïve Japanese Patients Chronically Infected with HCV Genotype 1b: Results from a Phase 3 Study, The 65nd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases 2014(AASLD), 2014/11/11, ボストン(アメリカ)
- (4) 茶山一彰, 肝炎ウイルス感染と肝細胞癌, 日本消化器関連学会機構(JDDW)2014, 2014/10/26, 神戸
- (5) 茶山一彰, 肝動脈化学塞栓療法の新しい治療戦略, JDDW2014 第 18 回日本肝臓学会大会, 2014/10/24, 神戸
- (6) 茶山一彰, C 型肝炎治療の新展開と到達点, JDDW2014 第 18 回日本肝臓学会大会, 2014/10/23, 神戸
- (7) 茶山一彰, 肝癌に対する経カテーテル治療における DEB-TACE の位置づけ, 第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2014/9/13, 東京
- (8) 茶山一彰, C 型慢性肝炎に対する治療の最前線, 日本内科学会北陸支部 第 62 回生涯教育講演会, 2014/6/22, 金沢
- (9) 茶山一彰, C 型肝炎撲滅に向けた治療戦略, 第 101 回日本消化器病学会中国支部例会, 2014/6/21, 岡山
- (10) 茶山一彰, 治療 3, 第 50 回日本肝臓学会, 2014/6/6, 京都
- (11) 茶山一彰, 講演 1: DC Bead による肝動脈化学塞栓療法 講演 2: 肝癌治療におけるイノベーション, 第 50 回日本肝臓学会, 2014/6/5, 京都
- (12) 茶山一彰, 肝炎ウイルスに対する創薬研究, 第 50 回日本肝臓学会総会, 2014/5/29, 東京
- (13) 茶山一彰, C 型肝炎に対する最新の治療, 第 50 回日本肝臓学会総会, 2014/5/29, 東京
- (14) 茶山一彰, プロテアーゼ阻害剤の知見と問題点, 第 100 回日本消化器病学会総会, 2014/4/24, 東京

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 急性重症肝炎モデル非ヒト動物の作製方法、急性重症肝炎モデル非ヒト動物、劇症肝炎治療薬のスクリーニング方法および劇症肝炎治療薬

発明者: 茶山一彰

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-217516

出願年月日: 2014 年 10 月 24 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・教授

研究者番号: 00211376