

令和 2 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：2017～2019

課題番号：17K09427

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス感染マウスを用いたゲノム編集によるHBVcccDNAの排除

研究課題名(英文) Elimination of cccDNA by genome editing by using HBV-infected mice

研究代表者

今村 道雄 (Imamura, Michio)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：40403513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)を感染させたヒト肝細胞移植uPA/SCIDマウスを用いて、高用量の抗ウイルス薬投与により、肝臓内cccDNAが十分に低下し、薬剤中止後も肝臓内HBVの制御が可能となること示された。cDNA-uPA/SCIDマウスとRag2-/-/Jak3-/-マウスを交配させて作製したcDNA-uPA/Rag2-/-/Jak3-/-マウスにヒト肝細胞を移植後、HBV感染患者血清を投与することにより、HBVの持続感染が可能であった。本マウスに予めヒト肝細胞および抗CD80/CD86抗体にて前処置したヒトPBMCを投与することにより、アロ応答が抑制されPBMCの生着が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBV感染マウスに抗ウイルス薬を投与することで肝内cccDNAを十分に低下させることが可能であった。今後、抗ウイルス薬と免疫調整薬を組み合わせることにより肝内cccDNAを消失させる治療法開発が期待される。cDNA-uPA/Rag2-/-/Jak3-/-マウスを用いてヒトPBMCの生着が可能であった。今後さらに生着したPBMCのプロファイルの解析、HBV特異的CTLの有無、肝線維化発症の有無などの検討が必要である。B型肝炎モデルマウスの構築は、B型慢性肝炎に対する根治的治療法開発に有用である。

研究成果の概要(英文)：High-dose combination therapy with six weeks of entecavir plus PEG-IFN for hepatitis B virus (HBV)-infected human hepatocyte transplanted uPA/SCID mice resulted in persistently negative HBV DNA in serum. Serum HBsAg and hepatitis B core related antigen (HBcrAg) continued to decrease and eventually became negative at 12 weeks after cessation of the therapy. Persistent loss of serum HBV DNA and loss of HBV markers by entecavir and PEG-IFN combination treatment in mice suggests that control of HBV can be achieved even in the absence of a cellular immune response. We generated new immunodeficiency cDNA-uPA/Rag2-/-/Jak3-/- mice with humanized livers that were almost completely repopulated with human hepatocytes and succeeded in HBV infection to these mice. Co-culture of PBMCs with human hepatocyte and anti-CD80/CD86 antibodies before administration to mice resulted in an establishment of human CD45-positive mononuclear cell chimerism with reduction of allo-immunity.

研究分野：ウイルス型肝炎

キーワード：B型肝炎 cccDNA ヒト肝細胞移植マウス 末梢血単核球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B 型慢性肝炎患者に対し、インターフェロンや核酸アナログによる抗ウイルス療法が行われている。抗ウイルス療法により B 型肝炎ウイルス (HBV) の複製は制御可能であるが、B 型肝炎に対する有効な根治的治療は未だ存在しない。B 型肝炎における問題点として (1) HBV は、感染肝細胞の核内に閉環状完全二重鎖 DNA (cccDNA) として存在するため、持続的にウイルスの複製が可能である。cccDNA の排除が可能となれば B 型肝炎の根治的治療となり得るが、cccDNA は非常に安定しており、排除は困難である。(2) B 型肝炎の根治的治療法開発のためには有効な動物モデルが必要である。ヒト肝細胞移植マウスは HBV の感染、複製が可能であり、抗ウイルス薬のスクリーニングには有効であるが、免疫不全のため肝炎は発症しない。よって慢性肝炎さらには肝線維化、肝発癌などヒトの B 型慢性肝炎も模倣する有効な動物モデルの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は (1) HBV が増殖可能な培養細胞およびヒト肝細胞移植マウスを用いて、抗ウイルス薬および CRISPR-Cas9 システムによる標的ゲノムの編集を併用することにより、HBV cccDNA を排除する治療法を開発する。HBV の s、X、Core 遺伝子をターゲットとした CRISPR-Cas9 システムをアデノウイルスベクターに挿入する (Adeno-CRISPR-Cas9)。また細胞は、HBV 1.4 倍長を発現する plasmid を HepG2 細胞に stable transfection させた細胞株を用いる。本細胞は培養上清中に 10^{5-6} copy/mL の感染性の HBV DNA を産生する。本細胞に Adeno-CRISPR-Cas9 を infection する。アデノウイルスベクターを用いることにより、ほぼ 100% の細胞に遺伝子が導入される事は確認されている。Adeno-CRISPR-Cas9 感染後、経時的に細胞内 HBV DNA および cccDNA を real-time PCR にて測定する。肝臓内 HBV DNA および cccDNA を最も低下させた Adeno-CRISPR-Cas9 をヒト肝細胞移植マウスに用いる。(2) HBV を感染させたヒト肝細胞移植マウスにヒト末梢血単核球 (PBMC) を投与することにより、B 型慢性肝炎モデルマウスを作製し、HBV の根治的治療開発に有効利用する。

3. 研究の方法

(1) HBV 遺伝子をターゲットとした CRISPR-Cas9 システムをアデノウイルスベクターに挿入し (Adeno-CRISPR-Cas9) HBV を transfection した HepG2 細胞に infection し、細胞内 cccDNA を最も抑制する CRISPR-Cas9 を探索する。ヒト肝細胞移植マウスに HBV 感染患者の血清を経静脈的に投与し、HBV 感染を惹起する。この方法により、約 8 週後、マウス血中 HBV DNA は 10^{7-8} copu/mL に上昇することはすでに確認している。HBV 感染 8 週後より、20 mg/kg のエンテカビルを連日経口投与し、さらに 300 μ g/kg の PEG-IFN を週 2 回、皮下注する。6 週間のエンテカビルおよび PEG-IFN を併用投与し、肝臓内 cccDNA を十分に低下させた後、細胞株において最も有効であった Adeno-CRISPR-Cas9 を経静脈的に投与する。投与 4 週後、マウス肝臓内の HBV DNA および cccDNA 量を real-time PCR にて測定する。

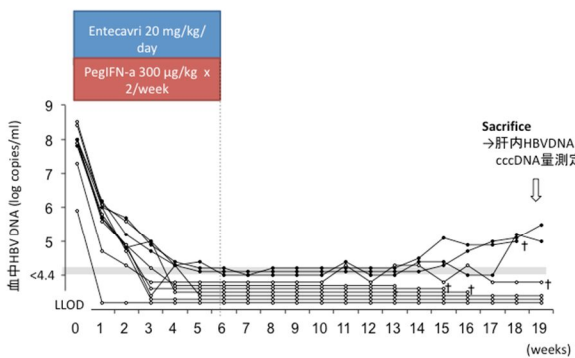
(2) これまでの研究により、ヒト肝細胞移植 TK-NOG マウスに HBV を感染後、ヒト PBMC を投与することにより、B 型重症肝炎モデルが作製されている (文献 1)。本モデルでは肝臓内に特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) が検出され、HBV 感染肝細胞の著明な障害、血中ヒトアルブミン値および HBV DNA 量の急激な低下が生じた。HBV の持続感染および特異的 CTL による慢性肝炎を生じるモデルの作製には、より強い免疫不全状態が必要と考え、新たに cDNA-uPA/SCID マウスおよび Rag2^{-/-}/Jak3^{-/-} マウスを交配させ作製した cDNA-uPA/Rag2^{-/-}/Jak3^{-/-} マウスにヒト肝細胞

を移植後、HBV を感染させる。HBV 感染成立後、健康人より採取・分離した 5×10^6 個のヒト PBMC を腹腔内投与する。PBMC 投与 8 週後に肝臓液中のリンパ球を FACS にて解析した。

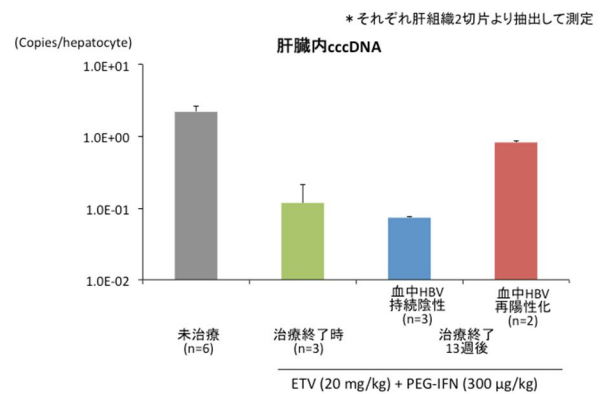
4. 研究成果

(1) HBV を感染させたヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスに対し、エンテカビル 2 mg/kg/日 を連日、あるいは PEG-IFN 2a 30 μ g/kg \times 2 回/週を 6 週間投与することにより、血中 HBV DNA 量はそれぞれ 3.6、1.3 log copy/mL 減少した。また両薬剤を併用投与することにより、より強い抗ウイルス効果を認め、血中 HBV DNA 量は投与 5 週後には検出感度以下に低下した。さらに薬剤投与量を増量し、エンテカビル 20 mg/kg/日連日および PEG-IFN 300 μ g/kg \times 2 回/週を併用投与したところ、投与 3-4 週後に血中 HBV DNA は検出感度以下となった(文献 2)。Real-time PCR 法により測定した肝臓内 cccDNA 量は、治療前 1.81 ± 0.55 copy/hepatocyte であったが、エンテカビルおよび PEG-IFN 2a を高用量で 6 週間併用投与したマウスでは、 0.12 ± 0.10 copy/hepatocyte に減少した。治療終了後さらに観察した 5 頭のマウスのうち、2 頭のマウスでは治療終了 8 および 9 週後に血中 HBV DNA が再陽性化した。3 頭のマウスでは治療終了 13 週後まで検出感度以下が維持された。血中 HBV DNA が再上昇した 2 頭のマウスでは、血中の HBsAg および HBcrAg 量が治療終了後に上昇していた。治療終了 13 週後の肝臓内 cccDNA は、血中 HBV DNA が再陽性化した 2 頭のマウスでは 0.83 ± 0.47 copy/hepatocyte であったが、血中 HBV DNA が検出感度以下を維持していた 3 頭のマウスでは 0.08 ± 0.05 copy/hepatocyte とより低値だった。以上のように HBV 感染マウスを用いて、高用量のエンテカビル、PEG-IFN の併用療法により、より早期の血中ウイルス陰性化が得られ、肝臓内 cccDNA の低下を認めることが確認された。さらに肝臓内 cccDNA が十分低下した場合、薬剤中止後も HBV の再上昇が生じなかった。この結果は、免疫システムがなくとも、抗ウイルス薬のみにより肝臓内 cccDNA を十分に低下させることにより、薬剤中止後も肝臓内 HBV の制御が可能となることを示すものである。

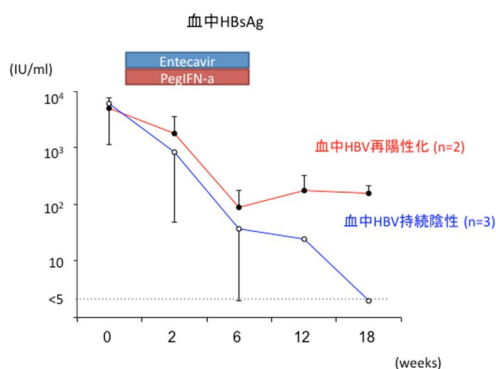
高用量のエンテカビル+PEG-IFN併用投与による
血中HBV DNA量



高用量のエンテカビル+PEG-IFN併用投与による
肝臓内HBV DNA量およびcccDNA量

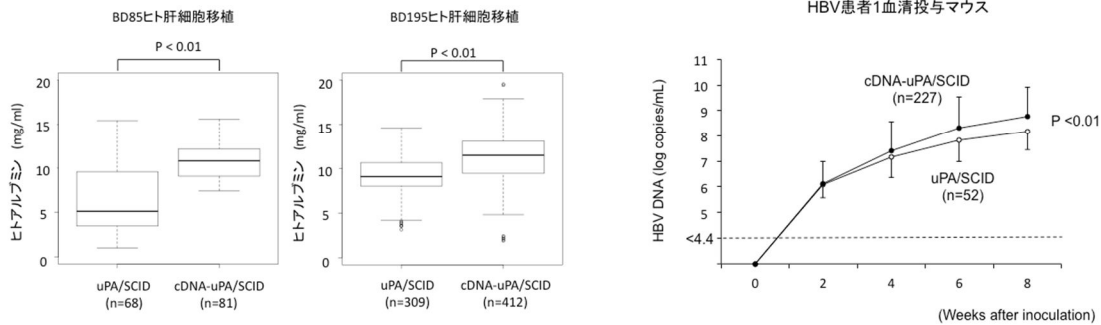


高用量のエンテカビル+PEG-IFN併用投与による
血中HBsAgおよびHBcrAg



(2) cDNA/uPA-SCID マウスは、これまでの uPA-SCID マウスと比較し、ヒト肝細胞移植後の血中ヒトアルブミン値が高値であり、マウス肝臓がより高度にヒト肝細胞に置換されているものと思われた(文献3)。さらに cDNA/uPA-SCID マウスは uPA-SCID に比較し、HBV 感染後の血中 HBV DNA 量は有意に高値であり、より高 titer の HBV 持続感染マウスとなった。

uPA/SCIDマウスおよびcDNA-uPA/SCIDマウスにおける 血中ヒトアルブミン値 **uPA/SCIDマウスおよびcDNA-uPA/SCIDマウスにおける 血中HBV DNA量**



さらに cDNA/uPA-SCID マウスと Rag2^{-/-}/Jak3^{-/-} マウスを交配させて作製した cDNA-uPA/Rag2^{-/-}/Jak3^{-/-} マウスにヒト肝細胞移植後、HBV 感染患者血清を投与することにより、HBV の持続感染が可能であった。本マウスにエンテカビルあるいは PEG-IFN を投与することにより、血中 HBV DNA 量の低下も認められ、本マウスが抗ウイルス薬の治療効果判定に有用であることが示された。B 型肝炎モデルマウスを作製するため、本マウスに健常人より採取したヒト PBMC を投与した。しかし PBMC 投与後、体重減少、血中ヒトアルブミン値の低下が生じ、マウスは次第に衰弱した。各臓器の組織学的検討にて、明らかな移植片対宿主反応 (GVHD) の所見はなく、移植ヒト肝細胞と投与 PBMC のアロ応答が生じたものと思われた。移植ヒト肝細胞と PBMC のアロ応答を回避するため、PBMC を予めヒト肝細胞および抗 CD80/86 抗体にて 7 日間培養し、ヒト肝細胞と応答し活性化した T 細胞を除去後、マウスに投与したところ、一部の PBMC では、体重減少やアルブミン値の低下が抑制され、マウスの生存、ヒト PBMC の生着が得られた。これらの結果から、HBV 感染ヒト肝細胞移植 cDNA-uPA/Rag2^{-/-}/Jak3^{-/-} マウスに予めヒト肝細胞および抗 CD80/86 抗体にて前処置したヒト PBMC を投与することにより、B 型慢性肝炎モデルが構築される可能性が示された。

References

- 1) 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. Human cytotoxic T lymphocyte-mediated acute liver failure and rescue by immunoglobulin in human hepatocyte transplanted TK-NOG mice. *J Virol.* 2015;89(19):10087-10096.
- 2) Uchida T, Imamura M, Hayes CN, Hiraga N, Kan H, Tsuge M, Abe-Chayama H, Zhang Y, Makokha GN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Persistent loss of HBV markers in serum without cellular immunity by combination of PEG-IFN plus ETV therapy in humanized mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):e00725-17.
- 3) 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. Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. *J Gen Virol.* 2017;98(5):1040-1047.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Cheng X, Uchida T, Xia Y, Umarova R, Liu CJ, Chen PJ, Gaggar A, Suri V, Mucke MM, Vermehren J, Zeuzem S, Teraoka Y, Osawa M, Aikata H, Tsuji K, Mori N, Hige S, Karino Y, Imamura M, Chayama K, Liang TJ. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Diminished hepatic IFN response following HCV clearance triggers HBV reactivation in coinfection | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Clin Invest | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI135616 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga N, Sen S, Yokomichi H, Tateno C, Canini L, Perelson AS, Uprichard SL, Dahari H, Chayama K | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Acute hepatitis B virus infection in humanized chimeric mice has multiphasic viral kinetics | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Hepatology | 6. 最初と最後の頁 473-484 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.29891 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 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 | 4. 巻 98 |
| 2. 論文標題 Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 J Gen Virol | 6. 最初と最後の頁 1040-1047 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.000726 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Uchida T, Imamura M, Hayes CN, Hiraga N, Kan H, Tsuge M, Abe-Chayama H, Zhang Y, Makokha GN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Persistent loss of HBV markers in serum without cellular immunity by combination of PEG-IFN plus ETV therapy in humanized mice | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother | 6. 最初と最後の頁 e00725-17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00725-17 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuji Teraoka, Michio Imamura, Takuro Uchida, Mitsutaka Osawa, Kazuki Ohya, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama |
| 2. 発表標題 Permission of hepatitis B virus infection in Jak3KORag2K0 mouse |
| 3. 学会等名 AASLD The liver meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuro Uchida, Michio Imamura, Yuji Ishida, Chise Tateno, Yuji Teraoka, Mitsutaka Osawa, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, Grace Naswa Makokha, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama |
| 2. 発表標題 A novel Jak3KORag2K0 chimeric mouse model for the study of hepatitis virus virology |
| 3. 学会等名 AASLD The liver meeting 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 内田宅郎、今村道雄、茶山一彰 |
| 2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝内cccDNA制御による抗HBV療法 |
| 3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuro Uchida, Michio Imamura, Nelson C Hayes, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, Grace Naswa Makokha, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama |
| 2. 発表標題 Persistent loss of HBV markers in serum without cellular immunity by combination of PEG-IFN plus ETV therapy in humanized mice |
| 3. 学会等名 AASLD The liver meeting 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 内田 拓郎 (Uchida Takuro) | | |
| 研究協力者 | 寺岡 雄吏 (Teraoka Yuji) | | |