

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：モデル動物等を用いた HCV 感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と新規治療法の開発に関する研究

2. 研究開発代表者： 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 医学専攻 教授 竹原 徹郎

3. 研究開発の成果

- ・ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスに C 型肝炎患者血清を投与することにより、ウイルス血症が出現し、HCV 持続感染が成立した。このモデルを用いて薬剤効果を検討することにより、アスナプレビル (ASV) /ダクラタスビル (DCV) 治療非奏功患者血清を接種したマウスでは、野生型マウスに比し、レジパスビル (LDV) /核酸型 NS5B 阻害薬 4 週間投与の抗ウイルス効果が低下することを明らかにした。また、HCV 感染マウスに対して DAA 治療を行い非著効を重ねると、HCV 耐性変異箇所が増加した。
- ・ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスの肝臓に HCV フルゲノム RNA を直接接種することにより、ウイルス血症が出現し、HCV 持続感染が成立した。シングルクローンからの HCV 感染モデルの作出に成功した。このマウスに LDV を 4 週間投与したところ、ウイルスの陰性化は得られなかったが、治療後のマウス血清からイノキュラムの RNA には存在しない NS5A Y93H 変異が検出された。
- ・肝切除検体の余剰サンプルを用いて、日本人由来肝細胞を用いたヒト肝細胞キメラマウスの作成に成功した。
- ・ヒト肝細胞キメラマウスから単離した初代培養肝細胞は長期にわたって培養可能であった。HCV 患者血清を投与することで HCV は感染し、培養上清中に HCV の産生を認めたが、その後 1 か月以内に上清中のウイルスは消失した。
- ・JFH-1 株を Huh7.5.1 細胞に感染させたところ、オートファジーを負に制御する Rubicon の発現が上昇し、P62 の蓄積と LC3-II Flux の低下を認めたことから、HCV 感染によりオートファジーは抑制されることが示唆された。また、JFH-1 株の NS5A 領域を Con1 株に置換したキメラウイルスに、既報の NS5A 阻害剤耐性変異株 (L31M/V/I, Y93H) と、これらの変異を組み合わせ挿入した二重変異株を作製し、培養細胞に導入して、コア抗原量と感染力価を測定した。この結果 L31M 変異がウイルス複製の増強に、Y93H 変異が感染性ウイルス粒子生成の亢進に関わっていることが明らかとなった。
- ・Transthyretin (TTR) 遺伝子プロモーター作動性 HSVtk トランスジェニックマウスファウンダーを NOG マウスと交配し、第二世代 TK-NOG マウスを作出し、TtrTK-NOG マウスとして系統を樹立した。また、ヒト肝細胞移植マウス作製に使用している凍結ヒト肝細胞の代替として、HepaRG 細胞及び HepaRG 細胞株よりも更に肝細胞分化能が高い亜株 HepaRP3 細胞を用いて肝細胞キメラ TK-NOG マウスを作成した。
- ・マウス Mac2-bp に対するモノクローナル抗体を作成し、Western blot (WB)、免疫染色、ELISA で使用できることを確認した。
- ・SILAC 法により NS3 プロテアーゼ発現により変動する宿主蛋白を網羅的に解析し OCAD1 (Ovarian carcinoma immunoreactive antigen domain-containing protein 1) をあらたに同定し、ヒト肝組織での発現および、HCV 感染肝組織での NS3 プロテアーゼによる切断を確認した。
- ・HCV ゲノムによる自然免疫活性化に関与する分子をノックアウト可能な CRISPR/Cas9 システムを構築した。また、HCV ゲノムによる自然免疫活性化に関与する分子をノックダウンすることにより、iPS 細胞由来肝細胞における HCV ゲノムの複製が向上することを明らかにした。

4. その他： 特記事項無し