

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 肝炎等克服実用化研究事業 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of
New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発と
その応用
(英語) Development of the next generation hepatitis B virus infected small
animal model that holds immune system and its application

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 教授 竹原徹郎
所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Professor Tetsuo Takehara

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) HBV 増殖・感染モデルの作成と免疫応答の解析
開発課題名：(英語) Development of HBV proliferation/infection model and
analysis of its immune response.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 講師 巽智秀
所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Associate Professor Tomohide Tatsumi

分担研究 (日本語) ヒト化マウスの作成と HBV 増殖・感染モデルの作成
開発課題名：(英語) Generation of humanized liver mice and development of HBV
proliferation/infection model.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 助教 疋田隼人
所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Assistant Professor Hayato Hikita

分担研究 (日本語) HBV コンストラクトの作成と HBV 増殖能の評価
開発課題名：(英語) Generation of HBV construct and evaluation of HBV multiplication

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 教授 上田啓二
所属 役職 氏名: (英 語) Osaka University Professor Keiji Ueda

分 担 研 究 (日本語) ヒト iPS/ES 細胞由来肝細胞の作成
開 発 課 題 名: (英 語) Generation of hepatocyte-like cells from human ES/iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 教授 水口裕之
所属 役職 氏名: (英 語) Osaka University Professor Hiroyuki Mizuguchi

分 担 研 究 (日本語) ヒト iPS 細胞から造血幹細胞の誘導
開 発 課 題 名: (英 語) Induction of hematopoietic stem cells from human iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人東京都医学総合研究所 主席研究員 北島健二
所属 役職 氏名: (英 語) Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ ハイドロダイナミック法にてゲノタイプ A の HBV を発現させた NOG マウスは 5 か月以上にわたり高いウイルス血症を示したが、ゲノタイプ C の HBV を発現させた NOG マウスでは血中ウイルス量や肝内 cccDNA 量、HBs 抗原陽性細胞数が低く、約 3 か月でいずれも検出感度以下となった。HBV ゲノタイプ C はゲノタイプ A より免疫担当細胞非依存的な細胞障害性が高いことを示した。
- ・ ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスに B 型慢性肝炎患者血清を接種すると、持続感染が成立した。ヒト肝細胞の NTCP を siRNA にて発現抑制させると、HBV 接種後の HBs 抗原陽性細胞の拡大は抑制され、血中ウイルス量も抑制されたことから、NTCP を標的とした治療薬の可能性が示唆された。
- ・ NOG マウスの免疫原性をさらに減弱させた MHC class I & class II ダブルノックアウト NOG マウス (dKO-NOG) に成人末梢血リンパ球 (PBMC) を投与した。NOG マウスで見られるような GVHD を呈さず長期生存し、長期的にヒトリンパ球が維持された。dKO-NOG マウスの肝臓に HBV を発現させ、その後ヒト PBMC を投与すると、HBV 特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導が確認された。また、HBV 発現細胞を移植しヒト PBMC を投与しても、HBV 特異的 CTL が確認された。PBMC を移植した dKO-NOG マウスに B 型肝炎ワクチンを投与すると、B 細胞の活性化を確認し HBs 抗体産生が確認された。
- ・ HBV 単独感染マウスに比し HBV/HCV 共感染マウスでは血中 HBV DNA は低値で推移した。HCV/HBV 共感染マウスの HCV 感染を DAA により排除すると、血清中 HBV DNA は上昇した。初代培養肝細胞では、HBV 単独感染時に比較して、HCV/HBV の共感染時には IFN 応答が強く発現しており、上清中の HBV DNA 量は低かった。この IFN 応答を抑制することで、上清中 HBV DNA 量の増加を認めた。
- ・ 新たな肝細胞キメラマウスのプラットフォームとして、肝細胞特異的 Mcl-1 欠損 NOG マウス、改良型 TK-NOG マウス (TTR-TKmut30-NOG マウス) を作成に成功した。
- ・ NOG マウスの遺伝子を改良した系統(計 28 系統)を樹立した。獲得免疫系誘導：NOG-HLA-A2,11, 24, NOG-HLA-DR9,12,15。(HLA 拘束反応の誘導)骨髄系細胞分化：NOG-GM-CSF/IL-3 (血液細胞全般の亢進), NOG-hIL-6 (単球亢進)。NK 細胞分化 NOG-hIL-2, NOG-IL-15 (NK 細胞の分化、維持)：免疫応答増強：NOG-pROR γ t γ c (リンパ節回復による免疫増強)。マウス MHC 除去：NOG-MHC-I,II DKO, NOG-A2Tg/MHC-I,II DKO (異種 GVHD の低減)
- ・ HBV 感染性・感染能を視覚的・定量的に評価できる蛍光蛋白やルシフェラーゼ遺伝子を内在するリコンビナント HBV (それぞれ rcHBV-GFP_{PhyG}, rcHBV-LUC_{Neo}) を構築し、ウイルスの産生を確認した。rcHBV-LUC の感染性は低いながらも感染能を定量評価可能であることが示された。
- ・ ヒト iPS 細胞由来肝細胞移植後の癌化のリスクを軽減するために、インテグレーションフリーのヒト iPS 細胞を複数株作製した。インテグレーションフリーヒト iPS 細胞を三次元培養条件下で肝細胞へと分化誘導し、細胞シート移植することによって、肝障害モデルマウスの生存率を改善することができ、マウス血中ヒトアルブミン値は 20 μ g/ml 以上となることを確認した。
- ・ マウス iPS 細胞に、転写因子 Lhx2 を過剰発現させることにより、造血幹細胞への分化誘導に成功した。得られた造血幹細胞は、マウスに移植すると長期骨髄再建能を示し、T 細胞以外の各種血液細胞に分化した。Lhx2 は、T 細胞分化を阻害することが判明し、Lhx2 の過剰発現により得られた造血幹細胞は、Lhx2 の発現を抑制すると T 細胞に分化することを発見した。GSK3 β 特異的阻害剤を用いて、ヒト iPS 細胞から効率よく血液細胞へ試験管内分化誘導できる培養システムの開発に成功した。
- ・ 同一ドナー由来のヒト iPS 細胞由来肝細胞と PBMC を TK/ dKO-NOG マウスに移植することで、GVHD 反応を起こすことなく肝および免疫双方がヒト化されたキメラマウスを作成することに成功した。

- NOG mice were transfected by hydrodynamic injection with the HBV expression plasmids pHBA1.2 or pHBC1.2. Serum levels of HBV DNA, HBsAg and HBeAg in mice transfected with pHBA1.2 were maintained over 5 months. In contrast, those in mice with pHBC1.2 gradually decreased over time and reached undetectable levels within 3 months after transfection. HBcAg-stained hepatocytes were detected in mice transfected with pHBA1.2, but not pHBC1.2, 5 months post-transfection. Hepatocytes expressed HBV genotype C, but not genotype A, suggested to be induced cell death without immune cells.
- TK-NOG mice with a humanized liver were susceptible to HBV and persistently infected for more than 3 months. siRNA-mediated NTCP knockdown suppressed the spread of HBV infection in the liver and evoked declines in serum HBV DNA and HBsAg levels, which suggested that NTCP-targeted therapy has potential for regulating HBV infection.
- MHC class I and class II double KO NOG mice (dKO-NOG) with human PBMC survived longer time without GVHD than NOG mice with human PBMC. Human PBMC transplantation into HBV-expressed dKO-NOG mice induced HBV-specific cytotoxic T lymphocyte. Human PBMC transplantation into dKO-NOG mice with HBV-expressed hepatoma cells also induced HBV-specific cytotoxic T lymphocyte. Human PBMC transplantation into dKO-NOG mice with HBV vaccine induced B cell activation and production of anti-HBs antibody.
- The serum HBV DNA levels of HBV · HCV co-infected mice were lower than HBV-infected mice. Elimination of HCV in HBV · HCV co-infected mice by DAA therapy increased the serum HBV DNA levels. In primary human hepatocytes, the IFN response was strongly expressed at the time of HBV · HCV coinfection compared with HBV single infection, and the levels of HBV DNA in the supernatant were low. Suppressing this IFN response increased the levels of HBV DNA in the supernatant.
- We developed hepatocyte-specific Mcl-1 knockout NOG mice and improved TK-NOG mice (TTR-TKmut30-NOG mice) for generating new chimeric mice with a humanized liver.
- We established gene-modified NOG mice for improving human hematopoiesis (Total 28 strains)
 - Promotion of acquired immune responses: NOG-HLA-A2,11, 24, NOG-HLA-DR9,12,15
 - Enhanced myelopoiesis: NOG-GM-CSF/IL-3, NOG-hIL-6 (monocyte/macrophages)
 - Induction of human NK cells: NOG-hIL-2, NOG-IL-15 (differentiation/maintenance of NK)
 - Augmentation of immune responses: NOG-pRORgt-gc (restored development of lymph nodes)
 - Depletion of mouse MHC genes: NOG-MHC-I,II DKO, NOG-A2Tg/MHC-I,II DKO (reduction of xenogeneic GVHD)
- We constructed recombinant HBV which encoded a fluorescent protein or a luciferase gene (rcHBV-GFP_{hyg} and rcHBV-LUC_{neo}, respectively) and confirmed that such recombinant HBV was produced. Infectivity of rcHBV-LUC_{neo} was observed, though the level was relatively low.
- In this study, we attempted to generate human liver chimeric mice with human iPS cell-derived hepatocyte-like cells. To decrease the risk of teratoma formation, we generated several integration-free human iPS cell lines. These human iPS cell lines were differentiated into hepatocyte-like cells under the 2D or 3D cell culture condition. The human iPS cell-derived hepatocyte-like cells were transplanted to liver-injury model mice by using two transplantation methods (intrasplenic transplantation and cell-sheet transplantation). After the transplantation, the survival rate of those mice and human ALB concentration in the mice were examined. We confirmed that the survival rate of liver-injury model mice and human ALB concentration could be

enhanced by cell sheet transplantation of integration-free human iPS cell-derived hepatocyte-like cells generated under the 3D condition

- We successfully induced hematopoietic stem cells (HSCs) from mouse iPS cells by overexpression of transcription factor Lhx2. These HSCs showed long-term hematopoiesis repopulating activity and differentiated into various hematopoietic cells except T cells. We found that Lhx2 inhibited T cell differentiation and Lhx2-induced HSCs could give rise to T cells by removal of Lhx2 expression. We developed a robust in vitro hematopoietic differentiation induction system of human iPS cells by GSK3b inhibitor.
- Using class I and class II double KO TK-NOG mice, we generated both human hepatocyte and human immune system chimeric mice without GVHD by transplanting iPSCs-derived hepatocyte-like cells and autogenic PBMCs

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 8 件)

1. Nakabori T, Hikita H, Murai K, Nozaki Y, Kai Y, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Wada H, Eguchi H, Takahashi T, Suemizu H, Sakamori R, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver. Scientific Reports. 2016, 6, Article number: 27782.
2. Yoshioka T, Tatsumi T, Miyagi T, Mukai K, Nishio K, Nishio A, Yokoyama Y, Suda T, Kegasawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Takehara T. Frequency and role of NKp46 and NKG2A in hepatitis B virus infection. PLoS One. 2017 Mar 22;12(3):e0174103.
3. Somiya M, Liu Q, Yoshimoto N, Iijima M, Tatematsu K, Nakai T, Okajima T, Kuroki K, Ueda K, Shun-ichi Kuroda. Cellular uptake of hepatitis B virus envelope L particles is independent of sodium taurocholate cotransporting polypeptide, but dependent on heparan sulfate proteoglycan. Virology. 2016, 497:23–32.
4. Rahayu R, Ohsaki E, Omori H, Ueda K. Localization of latency-associated nuclear antigen (LANA) on mitotic chromosomes. Virology. 2016, 496: 51–58.
5. Takamatsu S, Shimomura M, Kamada Y, Maeda H, Sobajima T, Hikita H, Iijima M, Okamoto Y, Misaki R, Fujiyama K, Nagamori S, Kanai Y, Takehara T, Ueda K, Kuroda S, Miyoshi E. Core-fucosylation plays a pivotal role in hepatitis B pseudo virus infection: a possible implication for HBV glycotherapy. Glycobiology. 26(11):1180-1189, 2016.
6. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Murakami S, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosoya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M, Moriishi K. Inhibitory effect of CDK9 inhibitor FIT-039 on hepatitis B virus propagation. Antiviral Research. 2016, 133: 156-164.
7. Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Okamoto R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi M. Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure. Journal of Hepatology. 2016, 64, 1068-1075.
8. Mitani S., Takayama K., Nagamoto Y., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Mizuguchi H. Human iPS Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells Achieve Zone-Specific Hepatic Properties by

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. キメラマウスを用いた NTCP を標的とした B 型肝炎治療, 口頭, 中堀輔, 正田隼人, 竹原徹郎, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016/4/22, 国内
2. キメラマウスを用いた B 型肝炎ウイルス感染における NTCP 抑制効果の解析, 口頭, 中堀 輔, 正田 隼人, 竹原 徹郎, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/20, 国内
3. 肝細胞キメラマウスを用いたウイルス肝炎の創薬研究, 口頭, 正田隼人, 竹原徹郎, 第 63 回日本実験動物学会総会, 2016/5/18, 国内
4. 末梢血単核球移植免疫ヒト化マウスにおける B 型肝炎ウイルスに対する免疫反応とヒト iPS 細胞由来肝細胞およびキメラマウスの作成, 口頭, 巽智秀, 正田隼人, 竹原徹郎, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 国内
5. PBMC 移植免疫ヒト化マウスを用いた B 型肝炎研究, 口頭, 青野悟志, 巽智秀, 依誠一, 末村茂樹, 大西良輝, 西尾啓, 須田貴広, 正田隼人, 阪森亮太郎, 竹原徹郎, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 国内
6. マウス胎児肝への同種異系・異種初代培養肝細胞／ヒト iPS 細胞由来肝細胞投与による肝臓キメラマウス作成についての検討, 口頭, 齋藤義修, 正田隼人, 甲斐優吾, 野崎泰俊, 牧野祐紀, 中堀輔, 田中聡司, 阪森亮太郎, 宮城琢也, 平松直樹, 巽智秀, 竹原徹郎, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 国内
7. Study of viral hepatitis using humanized liver chimeric mice. Oral, Hayato Hikita, 5th Osong Laboratory Animal Center Symposium, 2016/11/24, 海外
8. Kohji Moriishi, Tomohisa Tanaka, Kaori Okuyama-Dobashi, Wenjia Chen, Toru Okamoto, Keiji Ueda, Takamitsu Hosoya, Yoshiharu Matsuura, Akihide Ryo, Yasuhito Tanaka, Masatoshi Hagiwara. CDK inhibitor FIT-039 suppresses HBV propagation. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 札幌.
9. Golzar Md Hossain, Keiji Ueda. Importance of Promyelocytic Leukemia Protein on Kaposi's sarcoma associated herpesvirus replication. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 札幌.
10. Retno Rahayu, Eriko Osaki, Toru Okamoto, Koichi Watashi, Keiji Ueda. Analysis of the HBV life cycle in a HepG2 expressing human NTCP. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 札幌.
11. Tomoyuki Honda, Eriko Ohsaki, Keiji Ueda. The roles of a viral-L1 chimeric transcript in hepatitis B virus infection. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 札幌.
12. Keiji Ueda. High-throughput screening for inhibitors of Hepatitis V virus polymerase. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 札幌.
13. Harutaka Katano, Madori Osawa, Sohtaro Mine, Shinichiro Ohta, Kengo Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Takayuki Kannno, Hideki Hasegawa, Keiji Ueda, Nsashi Fukuyama, Takuya Maeda, Soichiro Kanoh, Akihiko Kawana, Yuji Fujikura. Establishing and characterizing a new primary effusion lymphoma cell line harboring Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年 10 月 23-25 日. 札幌.
14. 水口裕之、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製と創薬研究への応用、第 89 回日本組織培養学会大会、

大阪、2016 年 5 月、国内（口頭発表）

15. 水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞および小腸上皮細胞の作製と創薬・再生医療への応用、日本薬物動態学会第 31 回年会、長野、2016 年 10 月、国内（口頭発表）
16. 水口裕之、創薬および再生医療への応用を目指したヒト iPS 細胞由来肝細胞／小腸上皮細胞の開発、第 5 回バイオ創薬研究会、大阪、2017 年 2 月、国内（口頭発表）
17. 三谷成二、高山和雄、立花雅史、櫻井文教、水口裕之、zone 特異的な性質を有したヒト iPS 細胞由来肝細胞作製法の開発、**第 23 回肝細胞研究会**、大阪、2016 年 7 月、国内（口頭発表）
18. Kitajima K, Hara T. In vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Hematopoietic Stem Cell-like Cells. 14th IGAKUKEN International Symposium. IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders. 2016.7.1, Tokyo. (Oral presentation)
19. Miyashita K, Kagaya N, Izumikawa M, Kitajima K, Watakabe-Inamoto K, Najima Y, Doki N, Kobayashi T, Kakihana K, Goyama S, Kitamura T, Ohashi K, Shin-ya K, and Hara T. Growth Suppressing Activity of Lhx2 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL)-derived Cells and Large-scale Screening of Lead Compounds Targeting T-ALL. 58th ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition, 2016.12.3-6, San Diego.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 日本肝臓学会「肝がん撲滅運動」市民公開講座を開催し「C 型肝炎」「アルコール/肥満と脂肪肝炎」「B 型肝炎」について講演 巽智秀, 阪森亮太郎, 山田涼子, 竹原徹郎. 日本肝臓学会「肝がん撲滅運動」市民公開講座, 2017/01/21, 国内

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 肝炎等克服実用化研究事業 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of
New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用

(英語) Development of the next generation hepatitis B virus infected
small animal model that holds immune system and its application

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 教授 竹原徹郎

所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Professor Tetsuo Takehara

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ヒト細胞により再構成されたヒト化免疫系マウス、ヒト化肝臓マウス、および免疫系・肝臓のデュアルヒューマナイズドマウス作製に関する研究

開発課題名： (英語) Studies on production of humanized mice that hold immune system or liver function, and of dual-humanized mice that hold both functions.

研究開発分担者 (日本語) 実験動物中研研究所 部長 末水洋志

所属 役職 氏名： (英語) Central Institute for Experimental Animals Deputy Director of Research
Division Hiroshi Suemizu

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 国立大学法人大阪大学 教授 竹原徹郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- （１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Nakabori T, Hikita H, Murai K, Nozaki Y, Kai Y, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Wada H, Eguchi H, Takahashi T, Suemizu H, Sakamori R, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T: Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver, Sci Rep. 2016, 6:27782

- （２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

- （３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

- （４）特許出願