

201228014A

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成25（2013）年 3月

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

班員名簿

班長	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	教授
班員	巽 智秀	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	助教
	疋田 隼人	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	特任助教
	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科 ウイルス学	教授
	水口 裕之	大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野	教授
	仲野 徹	大阪大学大学院生命機能研究科 時空生物学	教授
	末水 洋志	公益財団法人実験動物中央研究所 バイオメディカル研究部	部長
	高橋 武司	公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部免疫研究室	室長
	中村 雅登	公益財団法人実験動物中央研究所 病理病態研究部	部長

## 目 次

I. 総括研究報告書	
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	1
に関する研究	
竹原 徹郎	
II. 分担研究報告書	
1. HBV 増殖・感染モデルの作成と免疫応答の解析	9
巽 智秀	
2. ヒト化マウスの作成と HBV 増殖・感染モデルの作成	12
疋田 隼人	
3. HBV コンストラクトの作製と HBV 増殖能の評価	15
上田 啓次	
4. ヒト iPS/ES 細胞由来肝細胞の作成	18
水口 裕之	
5. 造血幹細胞移植系の確立に関する研究	27
仲野 徹	
6. キメラマウスの作成に関する研究	29
末水 洋志	
7. 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	30
に関する研究	
高橋 武司	
8. ヒト化肝/NOG マウスの病理組織学的解析に関する研究	31
中村 雅登	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37



# I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費  
B型肝炎創薬実用化等研究事業  
研究報告書

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

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：B型肝炎の病態を解明し、画期的な創薬研究を推進するためには、動物モデルの開発が必要である。uPA-SCIDモデルはマウス個体内でB型肝炎ウイルス(HBV)の複製を可能にした優れたモデルであるが、自然発症劇症肝炎を基盤としているため管理と維持に労力がかかり高コストである、比較的短命である、獲得免疫応答を保持していない等の問題点がある。本研究課題では1)免疫系を保持したB型肝炎モデルを作成し、B型肝炎に対する免疫応答を解析すること、2)長期生存可能な安定した肝細胞キメラマウスを作成すること、3) iPS細胞からマウスの肝臓および免疫系をヒト化するドナー細胞を誘導する技術を開発し、同系のヒト肝細胞・免疫細胞とHBVがマウス個体内で相互作用し病態形成をする新規B型肝炎動物モデルを作出すること、を目的に研究を行う。5年計画の初年度において、i)種々のゲノタイプの増殖可能HBV DNAコンストラクトを作成し、免疫系を保持したマウスに投与し、病態解析を開始した、ii) MHC class I/IIを欠損させたNOGマウスに対するヒト末梢血単核球の投与を行い、このモデルではNOGマウスに比しGVHD応答が極めて軽微で長期間ヒト免疫細胞が維持されることを見出した、iii) TK-NOGマウスにヒト肝細胞を移植し、キメラマウスを作成し、B型肝炎患者血清の感染実験を開始した、iv) 16.5日の胎児の卵黄嚢静脈より、同系の標識したマウス肝細胞を移植し、生着することを確認した、v) 種々のヒト細胞からインテグレーションフリーのiPS細胞を作成する技術確立した、また、ヒトiPS細胞にFOXO遺伝子、HNF遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて順次導入することにより、高機能の肝細胞を誘導した、vi) マウスES細胞に転写因子を導入することにより、同系マウスに長期生着する血液細胞を誘導した。このような成績を踏まえて、2年度以降の研究を推進する計画である。

A. 研究目的

B型肝炎の病態の解明や画期的な治療法の確立にはモデル動物を用いた研究が

必要である。チンパンジーの感染実験は倫理的問題から実施が困難であり、ウッドチャックなどの感染モデルではB型肝炎ウ

イルス (HBV) そのものの感染を解析することはできない。実験動物として長く使用され遺伝的な解析もすすんだ小動物としてマウスの感染モデルの開発が望まれている。

マウスを用いた HBV モデルの開発としては2つの方向性がある。ひとつは遺伝子を基盤とした発現モデルであり、増殖可能な HBV ゲノムをトランスジーンとして発現するトランスジェニックモデルと *in vivo* 遺伝子導入法 (ハイドロダイナミック法) を用いて発現させるモデルがある。もう一つはマウスの肝臓をヒト肝細胞で置換することにより、HBV 感染を可能にするシステムであり、uPA-SCID モデルが代表的なものである。

uPA-SCID はマウスの体内で HBV の感染と増殖を再現できる優れたモデルであるが、免疫不全マウスを用いることからウイルスに対する免疫応答が解析できない。また、uPA マウスそのものが劇症肝障害を自然発症することから系統の維持およびキメラマウスの作成にコストと労力がかかる。さらに、6 か月程度で死亡することが多く発癌を含めた長期の解析ができない等の問題がある。

本研究課題ではこれらの問題を解決するために、(uPA とは異なる) より制御された肝障害マウスを用いた肝臓のヒト化を基盤として、胎児期肝細胞移植によるマウス免疫機能の保持あるいはマウス免疫機能のヒト細胞での再構築を行うことにより、免疫機能を有し、より取扱いが容易で安定した HBV 感染・増殖小動物モデルの開発を行う。具体的には、肝臓のヒト化には GCV (gancyclovir) 投与で肝障害

が誘導できる肝細胞特異的 TK (thymidine kinase) Tg マウスと肝細胞アポトーシスを制御できる肝細胞特異的 Bcl-2 関連遺伝子 KO マウスを用いる。免疫系のヒト化は通常の SCID バックグラウンドでは不可能であることから、免疫不全マウスとして NOD/SCID/Il2ry<sup>null</sup> (NOG) マウスを用いてヒト免疫細胞の再構築を行う。ドナー細胞としては従来の初代培養肝細胞あるいは臍帯血造血幹細胞だけではなく (allogeneic)、ES 細胞・iPS 細胞を利用することにより遺伝的な背景を一致させたモデル (autologous) の作成も行う。最終的にこのようなマウスに、ハイドロダイナミック法により種々の変異を入れた HBV を感染させる、あるいは B 型肝炎患者血清中の HBV を感染させることにより、HBV とヒト肝細胞、ヒト免疫細胞の複雑な相互作用を解析できる次世代型の HBV 感染小動物モデルを開発することを目標とする。

研究にあつたては培養細胞評価系班と密接な連携を行う。また、開発した HBV 感染・増殖モデルは、他の B 型肝炎創薬実用化等研究事業における研究班に随時提供し、連携して研究を推進する。具体的には、新規治療薬開発班における (CCC DNA 排除を含めた) 抗ウイルス効果の検討、レセプター等探索班における標的分子の阻害実験、自然免疫系解析班における免疫応答の研究等に使用し、研究事業全体としての総合的な成果の達成を目指す。

## B. 研究方法

ハイドロダイナミック法を用いた HBV 増殖に対する免疫応答の解析 (流れ図①)

1.2 倍超の HBV ゲノムをタンデムにつないだ増殖可能な HBV コンストラクトを作成する。また、コアプロモータ/プレコア等に変異を導入したコンストラクトも作成する。これらの遺伝子を野生型マウスにハイドロダイナミック法を用いて投与し、ウイルス増殖能を評価するとともに、HBV 増殖に伴う自然免疫応答と獲得免疫応答の詳細を解析する。

#### マウス免疫系のヒト細胞による再構成と HBV 増殖に対するヒト免疫応答の解析(流れ図②)

MHC class I/II を欠損した NOG マウス (NOG-DKO) を作成する。NOG マウスおよび NOG-DKO マウスにヒト末梢血から分離した単核球を投与する。経時的に血液、脾臓、肝臓を採取し、GVHD 反応、ヒト細胞の生着率を評価する。ヒト免疫系が再構築されたマウスに対して、HBV 遺伝子をハイドロダイナミック法を用いて投与し、HBV 増殖に伴う B 細胞、T 細胞応答を、抗体産生、ELISPOT 法を用いて解析する。

#### マウス免疫機能を保持したヒト肝細胞置換マウスの作成とその解析(流れ図③)

肝細胞の生存は Bcl-2 関連分子である Bcl-xL と Mcl-1 に依存しており、両者を肝細胞特異的にノックアウトした L-bcl-x<sup>ΔΔ</sup> mcl-1<sup>ΔΔ</sup> マウス (Albumin-Cre Bcl-xL<sup>fl/fl</sup> Mcl-1<sup>fl/fl</sup>) は発生過程で肝細胞の形成がおこらず、生後 1 日以内に肝不全にて死亡する。胎生 16.5 日のこのマウスの卵黄囊静脈よりヒト初代培養肝細胞を投与し、2 日後に帝王切開を行い、ヒト肝細胞に対して免

疫寛容が成立したマウスの作製を行う。このようにして作出したマウスに、HBV 患者血清あるいは HBV 遺伝子コンストラクトを接種し、HBV 感染モデルを作成するとともに、HBV 感染に対するマウス免疫応答を解析する。

#### ヒト肝細胞置換マウスの作成と免疫系のヒト細胞による再構成(流れ図④)

NOG バックグラウンドで肝障害が誘導できる TK-NOG マウスに経脾門脈的にヒト肝細胞を移植しヒト化肝/TK-NOG マウスを作成する。同マウスに HBV 患者血清を投与し、HBV 感染性を検討する。また、肝細胞特異的に Mcl-1 を KO した Albumin-Cre Mcl-1<sup>fl/fl</sup> マウスに NOG マウスを戻し交配し L-mcl-1<sup>ΔΔ</sup>-NOG を作成する。このマウスに Bcl-xL 阻害剤 ABT-737 を投与することにより肝細胞アポトーシスを誘導し、経脾的に投与した肝細胞の置換率と HBV 感染性を検討する。さらに、これらの肝細胞キメラマウスに臍帯血由来ヒト造血幹細胞を投与し、マウスの個体内で同種のヒト細胞が相互作用するモデルを作成する。安定した移植を成立させるためのステロイド剤の投与の要否についても検討する。このモデルは免疫学的にヒトの肝移植後に類似したモデルであり、移植後肝炎のモデルとしての有用性を検討する。

#### ES 細胞、iPS 細胞を用いた肝臓と免疫系のヒト細胞再構成(流れ図⑤)

ヒト iPS 細胞由来の中胚葉系細胞や内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞にアデノウイルスベクターを用いて SOX17 遺伝子、HEX 遺伝子、HNF4a 遺伝子、あるいは FOXA2 遺



伝子、HNF1a 遺伝子を導入し、分化度の高い肝細胞を誘導する。TK-NOG マウスに、誘導した肝細胞を投与し、ヒト肝細胞キメラマウスを作成する。また、ES/iPS 由来造血幹細胞が生着・分化する至適条件を検討する。両者を同一の個体に移植することにより、マウスの個体内で同系のヒト細胞が相互作用するモデルの作成を行う。

### C. 研究成果

#### 組換え HBV とハイドロダイナミック法を用いた HBV の発現・増殖系

Genotype A および Genotype C の HBV 遺伝子をそれぞれ 1.2-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドを作成した。Balb/cA マウスにこれらの遺伝子をハイドロダイナミック法にて投与したところ、約 5% の肝細胞において HBV 関連抗原が陽性となり、HBs 抗原血症が成立した。Genotype A 投与群は Genotype C 投与群に比し、肝障害が軽微で、HBs 抗原血症が長期に持続し、また、肝細胞における HBc 抗原の陽性が長く遷延した。ハイドロダイナミック法でマウスに成立するウイルス増殖システムがヒトの B 型急性感染でみられる応答と酷似していることが示された。

#### マウス免疫系のヒト化

NOG-MHC class I/class II KO マウスにヒト末梢血単核球を移植した。ヒト NK 細胞、樹状細胞、B 細胞、T 細胞が経時的に増加し、移植後 28 日で約 90% の単核球がヒト細胞に置換された。NOG マウスへの移植で認められる GVH 応答は著明に抑制され、肝障害も極めて軽微であり、マウス免疫系ヒト化の有望なツールになることが示された。また、HLA-DR4 を発現する NOG マウスを作成し、

ヒト液性免疫応答の惹起を確認した。

#### 新生児型ヒト肝細胞キメラマウスの作成

ED16.5 の胎児の卵黄嚢静脈より、vehicle を投与し、最も生存率のよい手技法について検討した。その結果、子宮を切開することなく穿刺を行い、注入する方法が最も良好な結果が得られることが判明した。このような方法を用いて、野生型胎児に GFP トランスジェニックマウス由来の初代培養肝細胞を投与した。生下時において、GFP 陽性肝細胞がマウス肝臓内に生着していることが示された。

#### 成人型ヒト肝細胞キメラマウスの作成

Mcl-1 KO マウスを免疫不全化するために NOD マウスに戻し交配を開始した。Mcl-1 fl, Alb-Cre 両陽性を示した個体のマイクロサテライトマーカーを解析し、最も NOD 化した個体を選抜して、スピードコンジェニックを進めている。

#### TK-NOG キメラマウスを用いた B 型肝炎モデル

TK-NOG マウスの病理学的解析を行うとともに、同マウスにヒト肝細胞を移植し、ヒト化肝臓マウスを作成した。ヒト肝細胞への置換率が 30~40% の TK-NOG マウスに Genotype A、Genotype C の患者血清を投与した。血清投与 1~2 週の極めて早期からマウス血中で HBV DNA が陽性となり TK-NOG マウスにおける HBV の感染が確認された。対照に用いた NOG マウスへの患者血清投与ではマウス血中 HBV DNA の陽性化は認められなかった。また、HBV の生体内での挙動を可視化するためのシステムを確立するため、EGFP を遺伝子として組込んだ非増殖性組換え HBV を作成し、その産生を確認した。

### iPS細胞を用いた検討

ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞からなる細胞シートを肝障害免疫不全マウスに移植し、血中ヒトアルブミン濃度が 100~2000 ng/mL に上昇することを確認した。キメラマウス作成に適すると予想されるヒト iPS 細胞として、センダイウイルスベクターを用いてインテグレーション・フリーiPS細胞の作成を行った。ヒト iPS 細胞から CD34 陽性細胞への分化誘導に成功した。さらに転写因子導入による血液細胞への分化誘導法を検討するため、マウス ES 細胞に Lhx 遺伝子を導入し、致死放射線照射を行った C57BL/6 マウス投与した。骨髄定着能をもつ造血細胞が誘導されていることが示された。

### D. 考察と結論

図 1 に示す 5 つのステップについて初年度においてほぼ当初の予定通りの計画を達成した。来年度以降もこれらの研究を推進し、個々のステップを統合していくことにより、最終的に免疫系が保持され、肝細胞が長期安定して置換され、ヒトの同系細胞が相互作用する次世代型 HBV 感染小動物モデルを作成し、創薬研究に応用していく計画である。

### E. 研究発表

#### 論文発表

1. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J*

*Hepatol*. In press.

2. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu TK, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, in press
3. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N, Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 121:3343-56, 2011
4. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hayashi N, BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets. *J Biol Chem* 286:13905-13913, 2011
5. Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt

- pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 412:92-97, 2011
6. Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. **Biochem Biophys Res Commun** 406:614-620, 2011
7. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N, Delayed-onset caspases-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bax/Bak-deficient mice. **Hepatology** 54: 240-251, 2011

学会発表

**The 62nd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease**  
Nov 4~Nov 8, 2011 San Francisco

Continuous hepatocyte apoptosis is sufficient for liver cancer development. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Satoshi Tanaka, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara*

Requirement of BH3-only activator proteins Bid and Bim for apoptosis by genetic ablation of Bcl-xL is completely different between hepatocytes and platelets. *Takahiro Kodama,*

*Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Satoshi Shimizu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara*

**Digestive Disease Week 2011**

**May 7~May 10, 2011 Chicago**

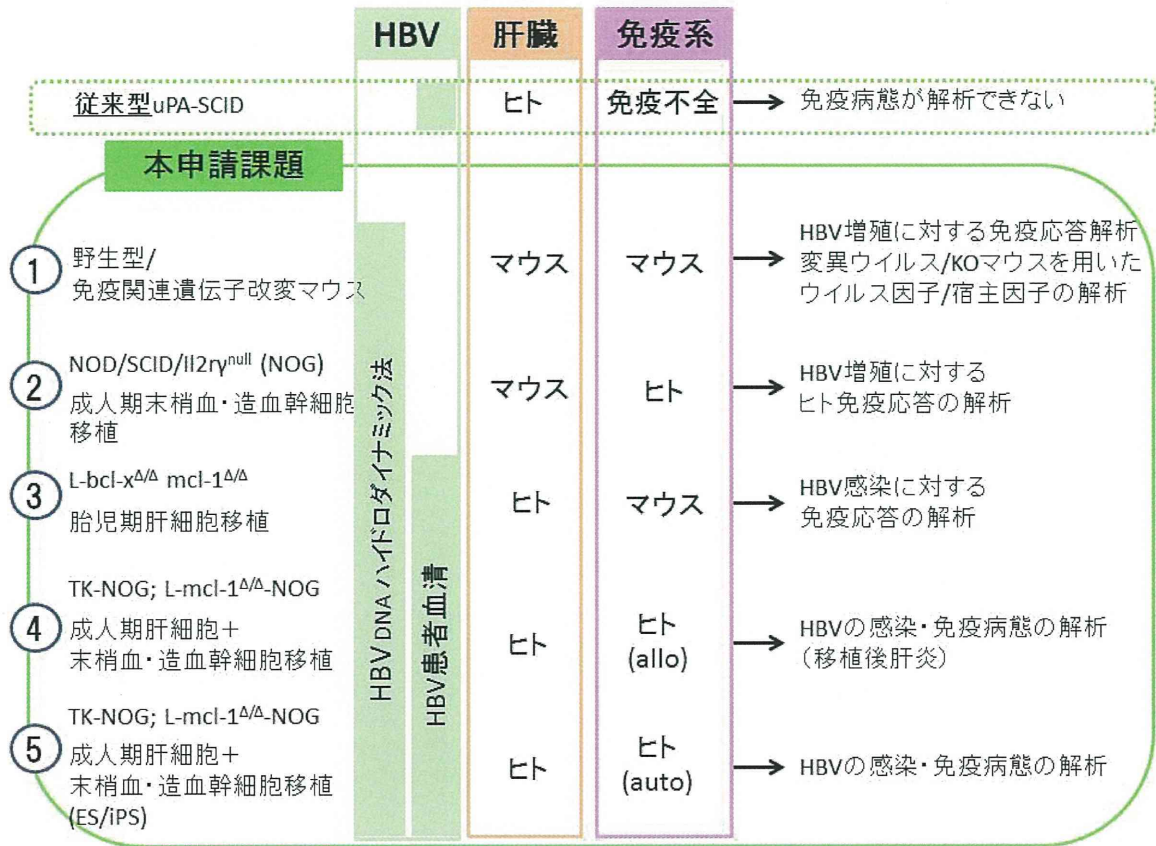
Delayed onset of caspase-dependent liver failure induced by Fas stimulation in Bak and Bax double knockout mice. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara.*

A crucial role of hepatocyte p53 in liver fibrogenesis. *Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi*

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図1 研究計画の概要



## Ⅱ. 分担研究報告

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  
「HBV増殖・感染モデルの作成と免疫応答の解析」

巽 智秀、大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学、助教

研究要旨：本研究課題の目的は、マウス免疫機能のヒト細胞での再構築を行うことにより、免疫機能を有するHBV感染・増殖小動物モデルの開発を行うことにある。本分担研究では、マウス免疫システムのヒト化を目的として、NOD/SCID/I12r $\gamma$ null (NOG) マウス及び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、ヒト末梢血を投与することで、ヒト免疫細胞の再構築を検討した。NOGマウスにヒト末梢血リンパ球を投与するとGVHDが起これ、致命的な肝障害が誘導された。ヒト免疫細胞への置換率は高かったが、B細胞やNK細胞は投与後8日で消失し、CD4+あるいはCD8+T細胞が増加してくることからNOGマウスではマウス免疫システムのヒト化は難しいと考えられた。一方、DKO-NOGマウスでは、ヒト免疫細胞への置換率は高く、GVHDはほぼなく、肝障害も発症しなかった。B細胞や樹状細胞も投与後29日目でも残存していた。DKO-NOGマウスに末梢血単核球を投与することにより免疫系のヒト化が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

我国のB型肝炎ウイルス (HBV) 患者は約150万人存在すると推定され、HBV感染症の制御・克服は重要な課題である。B型肝炎の病態の解明や画期的な治療法の確立にはモデル動物を用いた研究が必要である。チンパンジーの感染実験は倫理的な問題から実施が困難であり、ウッドチャックなどの感染モデルではHBVそのものの感染を解析することはできない。実験動物として長く使用され遺伝的な解析もすすんだ小動物としてマウスの感染モデルの開発が望まれている。

マウスを用いたHBVモデルとしては、マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換することにより、HBV感染を可能にするシステムであるuPA-SCIDモデルが代表的である。しかし

ながらuPA-SCIDはマウスの体内でHBVの感染と増殖を再現できる優れたモデルであるが、ウイルスに対する免疫応答が解析できない。本研究班の目的は、uPA-SCIDモデルとは異なるより制御された肝障害マウスを用いた肝臓のヒト化マウスを作成し、同時にマウス免疫機能のヒト細胞での再構築を行うことにより、免疫機能を有し、より取扱いが容易で安定したHBV感染・増殖小動物モデルの開発を行うことにある。本分担研究においては、マウス免疫システムのヒト化を目的として、まずヒト末梢血単核球 (PBMC) 移入によるヒト化すること、さらにはそのヒト化モデルを基盤として臍帯血幹細胞移入 (HSC) による免疫ヒト化を目指す。本年度はPBMCをNOD/SCID/I12r $\gamma$ null (NOG) マウス及び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、ヒトPBMCを投与することで、マウス免疫システムのヒト化を行うことを目的としている。

## B. 研究方法

NOGマウス及びNOG-MHC class I/class II KOマウスの尾静脈より、ヒト末梢血単核球を $1 \times 10^7$ 個移植し、移植後継時的

(Day0, 1, 8, 15, 29)に血清を採取し、ALT値測定による肝障害の評価をおこなった。またHE染色による肝組織の評価、およびマウス肝及び脾の単核球をフローサイトメトリーにて解析し、移入ヒト免疫細胞の生着及びその頻度解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究遂行にあたっては、事前に大阪大学医学部附属病院倫理委員会にて実験内容を承認され、B型肝炎患者に文書を用いて説明の上、署名による同意を得た上で、採血し解析を行っている。

## C. 研究結果

### 1. 組織学的検索

NOGマウスではヒト末梢血単核球移植後1日目、8日目では肝組織学的変化は軽微であったが、15日では、脈管周囲のリンパ球浸潤が著明であり、その周囲の肝細胞のアポトーシスも認められた。29日目には血管周囲のリンパ球浸潤はさらに増加しかつ肝組織内までリンパ球浸潤が著明となり、肝細胞のアポトーシスも多数認められ、GVHD様変化と考えられた。一方DKO-NOGマウスでは、ヒト末梢血単核球移植後1日目8日目15日では肝組織学的変化は軽微であった。29日目には血管周囲のリンパ球浸潤を認め

たが、肝細胞のアポトーシスの像は全く認められなかった。

### 2. 血清ALT

血清ALT値の上昇は、肝組織の変化と同様で、NOGマウスでは8日目に著明に増加し、その後低下傾向になったが、DKO-NOGマウスではALTの上昇は認めなかった。

### 3. ヒトリンパ球置換率とリンパ球構成

フローサイトメトリーでは、肝、脾におけるヒトリンパ球置換率はNOGマウス、DKO-NOGマウスいずれも経時的に増加しており、29日目には肝臓では両者とも90%程度のヒトリンパ球に置換しており、脾臓でも70%程度ヒトリンパ球に置換していた。いずれのマウスも移植後1日目にはNK細胞、8日目にはB細胞、樹状細胞などが増加し、それに引き続き15日目頃よりCD4、CD8陽性T細胞の著明な増加を認めたが、NOG-MHC class I/class II KOマウスはNOGマウスに比しCD8陽性T細胞の増加が緩徐であった。NOGマウスでは29日目にはT細胞以外のリンパ球はほぼ焼失したのに対して、DKO-NOGマウスではB細胞や樹状細胞も残存していた。

### 4. マウス生存率

移植後の生存率は、37日目までの観察においてNOGマウスで50% (4/8匹)、NOG-MHC class I/class II KOで100% (7/7匹)であった。

## D. 考察

NOGマウスへのヒト末梢血リンパ球の投与は、GVHDが起り致死的な肝障害が起りうる。ヒト免疫細胞への置換率は高いがB細胞やNK細胞は投与後8日で消失し、

CD4+あるいは CD8+T 細胞が増加してくる。      なし  
ことから NOG マウスの免疫抑制ではマウス      3. その他  
免疫システムのヒト化は難しいと考えられ      なし  
た。一方 DKO-NOG マウスでは、ヒト免疫細  
胞への置換率は高く、GVHD はほぼなく、  
肝障害もない。B 細胞や樹状細胞も投与後  
29 日で残存し、末梢血単核球を用いたヒ  
ト化の可能性が示唆された。今後さらに  
DKO-NOG マウスにおいて生着したリンパ球  
の免疫学的機能解析を行う予定である。ま  
たヒト臍帯血血液幹細胞の移入についても  
既に大阪大学倫理委員会の承認を得ており、  
今後検討する。

#### E. 結論

DKO-NOG マウスにおいてヒト末梢血リ  
ンパ球により免疫ヒト化の可能性が示唆さ  
れた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本年は、本研究に基づく論文発表はなし

##### 2. 学会発表

本年は本研究に基づく学会発表はなし

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

## ヒト化マウスの作成とHBV増殖・感染モデルの作成

正田 隼人 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 特任助教

研究要旨：免疫機能の保たれた HBV 増殖・感染マウスモデルの作成に向けて、2つのアプローチを行った。1つは HBV 発現プラスミドの急速静注による HBV のマウス肝細胞への強制発現であり、もう一つは胎児期ヒト肝細胞移植によるヒト肝細胞キメラマウスの作成である。まず、強制発現モデル作成のためにゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 遺伝子をそれぞれ 1. 2-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドを作成した。Balb/cA マウスにこれらのプラスミドを急速静注法にて投与したところ、約 5%の肝細胞において HBc 抗原が陽性となり、HBs 抗原血症およびウイルス血症が成立した。ゲノタイプ A 投与群はゲノタイプ C 投与群に比し、有意に肝障害が軽微で、HBs 抗原血症が長期に持続し、また、肝細胞における HBc 抗原の陽性が長く遷延した。ハイドロダイナミック法でマウスに成立するウイルス増殖システムがヒトの B 型肝炎急性感染でみられる応答と酷似していることが示された。今後このモデルを用いて、ウイルスゲノタイプ間の免疫応答の違いなどの解明が期待できる。次に、ヒト肝細胞置換キメラマウス作成に向けて、C57BL/6J マウスの胎生 16.5 日の胎児の卵黄嚢静脈より同系異種である GFP トランスジェニックマウス由来の初代培養肝細胞を投与した。胎生 18.5 日目において、投与した GFP 陽性肝細胞が胎児肝臓内に生着していることが示された。今後この技術を用いて、ヒト初代培養肝細胞投与によるヒト肝細胞キメラマウスの作成が期待される。

### 共同研究者

名和 敏誉 大阪大学消化器内科学  
田中 聡司 大阪大学消化器内科学  
横山 恵信 大阪大学消化器内科学  
齋藤 義修 大阪大学消化器内科学

のため培養細胞レベルの実験では限界があり、個体レベルでの研究を行う必要がある。すなわち、HBV が解析できる小動物モデルが必要である。しかしマウス肝細胞に HBV は感染しないため、免疫不全マウスの肝細胞をヒト肝細胞で置換したヒト肝細胞キメラマウスを用いて HBV 感染実験が行われているが、免疫不全マウスであるため免疫応答は解析できない。そこで免疫の保たれた HBV 増殖・感染マウスモデルの作成が必要であり、新規 HBV 増殖・感染マウスモデルの確

### A. 研究目的

B 型肝炎の新規治療薬の開発には、肝細胞におけるウイルスの感染・増殖だけではなく、ウイルスや感染肝細胞と免疫機構との複雑な相互関係も解析する必要がある。そ

立に向けて開発研究を行った。

## B. 研究方法

HBV 増殖・感染マウスモデルとして2つのアプローチを行った。1つは免疫システムが保たれているマウスに HBV 発現プラスミドを急速静注して HBV をマウス肝細胞に強制発現させる方法であり、もう1つは免疫寛容が成立している胎児期のマウスにヒト肝細胞を投与してヒト肝細胞置換を試みる方法である。

まず、強制発現モデルのために、ゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 遺伝子をそれぞれ 1.2-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドを作成した。このプラスミドを Balb/cA マウスに急速静注法にて投与し、肝細胞における HBV 発現・増殖を検討した。肝細胞における HBV 発現は HBc 抗原の免疫染色にて、HBV 増殖は血清中の HBs 抗原量、HBV-DNA 量を測定し行った。また、肝障害の評価を血清 ALT の測定にて行った。

次に、マウス胎児期ヒト肝細胞投与による新規キメラマウスの開発に向けて、胎児期の移植により、同種異系のマウス肝細胞が生着するかを検討した。C57BL/6J マウスの胎生 16.5 日に、卵黄嚢静脈より CAG-GFP トランスジェニックマウスの初代培養肝細胞を  $1-5 \times 10^4$  個投与した。胎生 18.5 日に帝王切開により胎児を摘出し、胎児肝における生着を検討した。

### (倫理面への配慮)

組み替え遺伝子を用いた実験は、大阪大学遺伝子組み換え安全委員会の承認のもと行った。また、すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛

護的に行った。

## C. 研究成果

HBV 強制発現モデルとして、ゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 遺伝子をそれぞれ 1.2-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドを作成し、Balb/cA マウスに急速静注法したところ、投与 1 日目でいずれのプラスミド投与においても、約 5% 程度のマウス肝細胞で HBc 抗原の発現を認めた。また、血清中の HBs 抗原、HBV-DNA も検出され、HBV プラスミド投与による HBs 抗原血症およびウイルス血症成立が確認できた。

ゲノタイプ A 投与マウスの HBc 抗原陽性肝細胞は、投与 5 日目で 1 日目より少し高い割合で認められたが、13 日目では減少し、わずかに認める程度であった。これに対して、ゲノタイプ C 投与マウスの HBc 抗原陽性肝細胞は、投与 5 日目ですでに陽性細胞はほとんど認めず、投与 13 日目では全く認めなかった。同様に HBs 抗原も、ゲノタイプ A 投与マウスでは、投与 1 日目より 5 日目の方が高かったが、ゲノタイプ C 投与マウスでは投与 5 日目ではほとんど消失していた。一方、肝障害の指標である ALT は、投与 1 日目では空ベクタープラスミドを急速静注したマウスに比し HBV プラスミドを投与したマウスではいずれも大きく上昇を認めたが、ゲノタイプ Cの方が A よりも ALT の上昇率は高かった。

次に、マウス胎児期ヒト肝細胞投与によるキメラマウス作成に向けて、胎児期マウスの卵黄嚢静脈からの同系異種の細胞投与で、胎児肝臓に投与細胞が生着するかを検討した。母体マウスの開腹手術下で、胎生 16.5 日の C57BL/6J 胎児に卵黄嚢静脈より GFP 陽

性初代培養肝細胞を投与したところ、胎生 18.5 日では細胞非投与胎児と同様に生存・発育していることを確認した。また、細胞投与胎児の肝臓では、一部 GFP 陽性となる細胞集塊を認め、胎児に移植した GFP 陽性肝細胞が生着していることを確認した。

#### D. 考察と結論

今回の HBV 強制発現モデルでは、HBV 発現プラスミドを用いて HBV ウイルス血症を作成することができた。さらにゲノタイプ A と C の異なるプラスミドを作成したところ、ゲノタイプ A 投与群はゲノタイプ C 投与群に比し、肝障害が軽微で、HBs 抗原血症が長期に持続し、また、肝細胞における HBc 抗原の陽性が長く遷延した。臨床的に、ゲノタイプ A による HBV 急性感染はゲノタイプ C よりも慢性化しやすい一方で、ゲノタイプ C による HBV 急性感染はゲノタイプ A よりも劇症化しやすいことが知られている。今回の研究結果はこのような臨床経過とも一致しており、今後このモデルを用いて、ウイルスゲノタイプ間の免疫応答、肝障害の違いなどの解明が期待できる。

また、胎児期肝細胞移植では、同種異系細胞の初代培養肝細胞が免疫機構保持マウスでも生着することが確認できた。今後は、持続的に肝障害が惹起されている、もしくは肝形成が抑制される肝細胞特異的 Bcl-xL and/or Mcl-1 ノックアウトマウスを用いて移植実験を行うことで、生着率（キメラ率）の更なる向上が期待される。また、ヒト初代培養肝細胞を用いることで、免疫機能の保持されたヒト肝細胞キメラマウスの作成が期待される。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

HBVコンストラクトの作製とHBV増殖能の評価

大阪大学大学院医学系研究科 教授 上田啓次

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）には簡便なin vitro、in vivo感染系が存在せず、感染サイクルには解決すべき不明な点が多々残されている。分担課題では、異種遺伝子を携えたりコンビナントHBVを含め、種々HBV変異体を作製し、既存のin vitro感染系で感染・増殖能を解析する。そして、本班の究極の目標である“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”が達成された際には、感染経路を含めた個体レベルにおけるHBVの感染・増殖機構、病態発症機構の解明とそれに関わるウイルス側因子の解明に迫るものである。今年度は、VSV-G型HBV pseudotypeとEGFP遺伝子をコードしたリコンビナントHBV粒子が作製可能かどうかについて検討した。

A. 研究目的

簡便な感染増殖系が存在しないHBVは感染・増殖機構に不明な点が多い。種々のHBV変異体や異種遺伝子をコードするHBVゲノムをもつHBVを作製し、既存するHBV肝炎系（primary human hepatocytes [PHH]、HepaRG）を駆使して、その感染・増殖能、宿主細胞へ与える影響について解析する。本ベクター開発により、将来的に可能になるであろう“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”に際して、感染経路を含めた様々な視点でHBVの感染・増殖機構、病態発症機構が解明されると思われる。今年度は、VSV-G型HBV pseudotype（HBV膜蛋白を発現しない非増殖型）とEGFP遺伝子をコードしたリコンビナントHBV粒子が作製可能かどうかについて検討した。

B. 研究方法

1) VSV-G HBV pseudotype. HBV膜蛋白遺伝子開始コドンに変異を加え発現しないよう仕組んだHBVゲノムを構築した（HBV-4M）。本変異はHBVポリメラーゼ遺伝子には変異が入らない様、はいりよしてある。HBV-4Mを3タンデムに連結した、3HBneo-4Mベクターを構築した。本ベクターからは、複製や粒子形成に必要なpgRNAを含むすべてのHBV関連mRNAが発現し、HBV膜蛋白以外の遺伝子産物が生成される。本ベクターとともにVSV-G発現ベクターを肝癌由来培養細胞株へトランスフェクションし、細胞及び培養上清を回収した。細胞から細胞質蛋白を抽出し、抗HBc抗体を用いて、HBVコア粒子を免疫沈降した。培養上清中培養上清中からは、抗VSV-G抗体を用いて、VSV-G膜粒子を回収した（陰性コントロールとして、抗HBs抗体を用いて免疫沈降を行っ