

図4 テノビル投与後の組織学的壊死炎症反応所見の改善

348例のB型肝炎(96例の肝硬変を含む)に対するテノビル投与後、Knodellの壊死炎症反応スコアは有意に低下している。(文献7より改変)

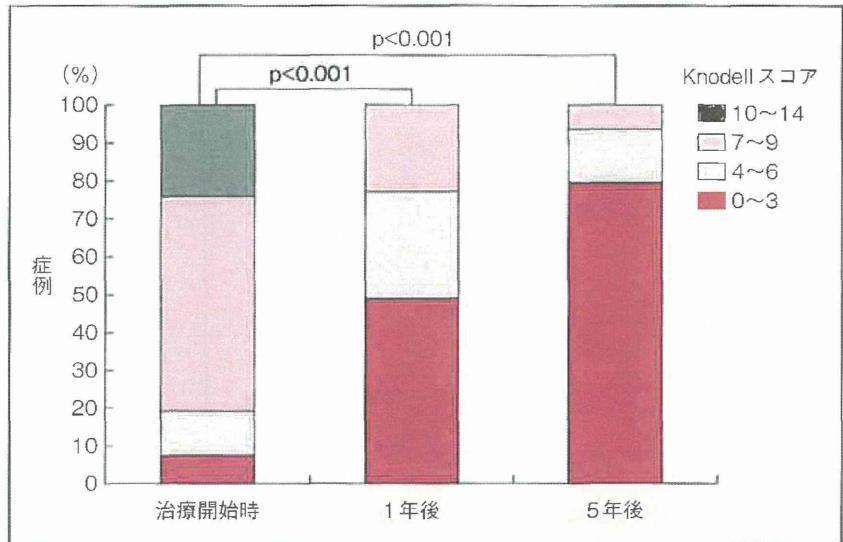
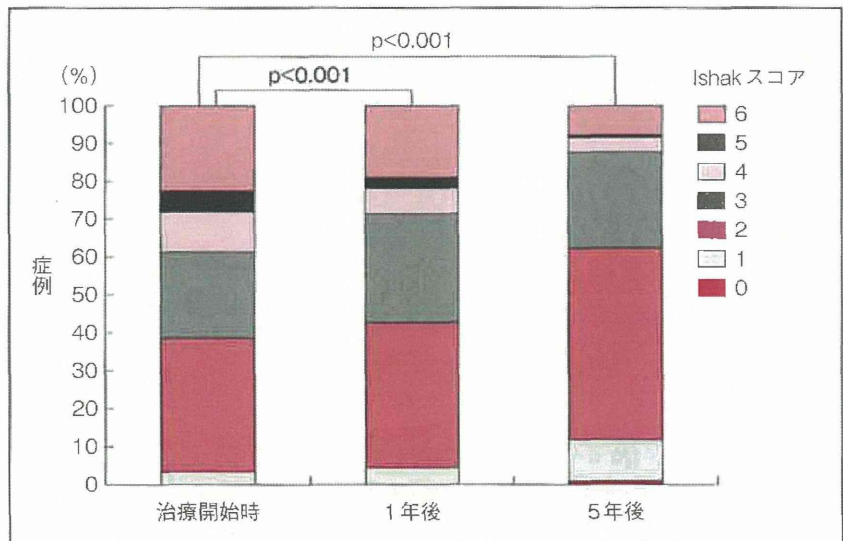


図5 テノビル投与後の線維化の改善

テノビル投与後、Ishakの線維化スコアは有意に低下している。Ishakのmodified histological activity indexでは5点以上が肝硬変を示す。(文献7より改変)



である。

Shimら⁶⁾は、非代償性肝硬変55例へのエンテカビル投与開始1年後におけるHBV DNA陰性化(DNA量が測定感度の50 copies/mL未満に低下)例は92.3%で、慢性肝炎を含む代償例144例への陰性化と同等であったことを報告している。

2 組織学的効果；壊死炎症反応・線維化の改善

肝硬変に対しても、長期間、抗ウイルス治療を継続することにより、組織学的に改善効果を示す。

Marcellinら⁷⁾は、肝硬変96例を含む348例に

テノビルを投与し、開始1年後、5年後に組織学的評価を行った。組織の壊死炎症反応が軽度である症例は、治療開始前、1年後、5年後に、それぞれ、8%、49%、80%と増加した(図4)。また、線維化の改善もみられ、開始時に肝硬変と診断された96例中71例(74.0%)は、治療開始5年後に肝硬変の所見を認めなかった(図5)。

3 肝予備能改善効果

核酸アナログ製剤の投与によるHBV DNA量の減少、肝炎活動性の低下、肝線維化の改善の結果として、肝予備能の改善が期待される。

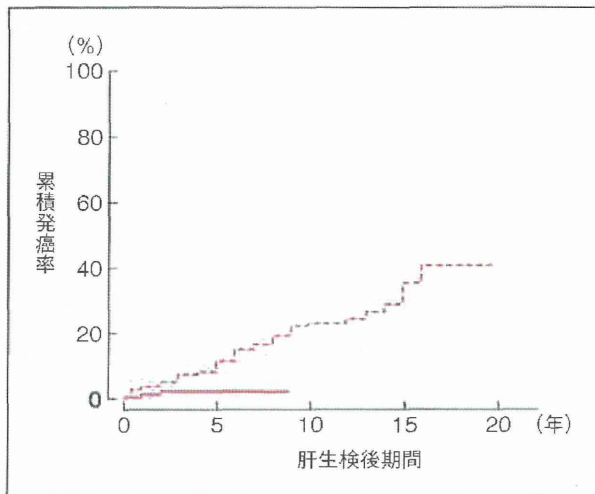


図6 B型肝硬変症例におけるラミブジン投与例と対象例の累積発癌率

ラミブジン投与群(実線)からの発癌はコントロール群(破線)より有意な低下を示した。(p < 0.001, Log-rank test)
(文献8より改変)

これまでに報告された非代償性肝硬変症例へのエンテカビル投与の臨床試験では、治療開始1年後のALT正常化が41~76%、Child-Turcotte-Pughスコアが2以上改善を示す例が35~49%で、MELDスコアも平均で2前後の低下を示している³⁾。

Wongら⁴⁾は、エンテカビル治療を行った肝硬変症例をMELDスコアで調整して非治療群と比較すると、腹水、特発性細菌性腹膜炎(SBP)、静脈瘤破裂、肝性脳症、肝腎症候群などの発生はハザード比0.51に、肝発癌はハザード比0.55に、肝関連死はハザード比0.26に、それぞれ低下したことを示した。

4 肝発癌抑制効果

a. 肝癌発生抑制

B型肝硬変に対する抗ウイルス治療には肝発癌のリスクを軽減する効果があることが報告されている。

わが国からは、Matsumotoら⁸⁾がラミブジン投与で、Hosakaら⁹⁾がエンテカビル投与で、それぞれ、肝硬変症例に対する核酸アナログ製剤投

与による発癌抑制効果があることを報告している。Matsumotoらは、ラミブジン投与肝硬変症例からの肝発癌が0.4%/年、非投与例からは2.5%/年と有意差を示した(図6)。Hosakaらの報告では、Kaplan-Meier法による5年発癌率は、無治療肝硬変例の38.9%に対して、エンテカビル投与例では7.0%に抑制されていた(図7)。

b. 肝癌の再発予防効果

肝癌治療後の再発予防においても、HBV DNAを低値に維持することの有用性が示されている。

Wuら¹⁰⁾は、4,569例(うち、肝硬変例2,748例)の肝癌切除例を、核酸アナログ製剤投与の有無別で群別して予後を解析したところ、核酸アナログ製剤投与例に肝硬変例の比率が高かったが、肝癌再発は有意に抑制されていたことを報告している。また、Chumaら¹¹⁾は、初回治療として外科切除、あるいはラジオ波焼灼術(RFA)を施行した肝癌196例(うち、肝硬変例49例)において、HBV DNA量高値持続例に比べて、低値例で肝癌再発リスクが軽減することを示した。さらに、肝癌初発以前から抗ウイルス療法を開始し、肝癌初発時HBV DNAレベルが低い症例の方がより低リスクの傾向を認めている。

5 予後改善効果

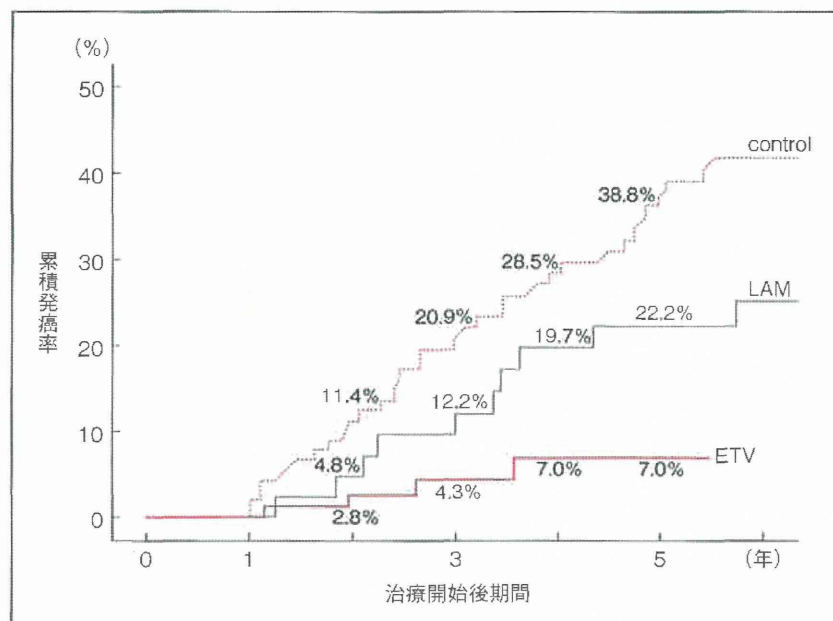
B型肝硬変症例に対する核酸アナログ製剤の長期投与が、最終的に予後改善に有用かについても、解析結果が報告されてきている。

Zhangら¹²⁾は、核酸アナログ製剤投与により代償性肝硬変症例の肝疾患関連死を改善するかmeta-analysisにより解析し、長期的合併症(HBV関連死、肝発癌、非代償性肝硬変への進行など)発症のリスクが、抗ウイルス治療によりリスク比0.24に低下させたと報告した。また、Wongら⁴⁾は、エンテカビル投与の有無別にB型肝硬変例の肝関連合併症発生を累積5年発現率で比較し、非投与例(45.8%)に対し、エンテカビル投与例(25.5%)が低率であることを報告した。

Zoutendijkら⁵⁾は、肝硬変症例へのエンテカビル投与で肝癌、非代償期への進展、死亡などの事

図7 B型肝硬変症例の累積発癌率

ラミブジン(LAM)投与群, エンテカビル(ETV)投与群と propensity スコアを一致させた無治療肝硬変(control)群の5年後累積発癌率では, ETV群/対象群, ETV群/LAM群, LAM群/対象群のそれぞれに有意差を認めた。(文献9より改変)



象が有意に低下することを報告した(図8)。この傾向は, HBV DNA量を(アメリカ肝臓学会の指針で核酸アナログ製剤投与勧奨レベルである)2,000 IU/mLで群別比較した場合には有意差が得られず, 閾値を200 IU/mLとした場合に有意な低下傾向を認めており, 肝硬変症例に対するHBV DNA低値維持が予後改善に重要であることを示している。

おわりに

B型肝硬変症例における長期的な問題点は, 肝硬変の進行による肝予備能や代償性の低下, 肝発癌などによるHBV関連死であり, 治療の目標は, これらの事象を抑制, 減少させることである。根本的な治療は抗HBV治療であり, 現実的には核酸アナログ製剤の長期投与を行う。近年, これらの治療による肝硬変症例への長期予後改善効果が明らかにされつつある。

(髭 修平)

文献

1) 青柳豊, 西口修平, 道堯浩二郎, 他: 本邦の肝硬変の成因と現状 第44回日本肝臓学会総会主題ポスター「肝硬変の成因別実態」のまとめ, 肝硬変の成因別実態

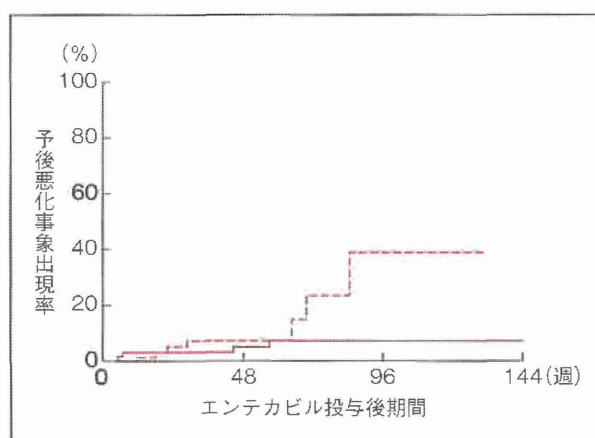


図8 エンテカビル投与肝硬変症例のウイルス学的効果と予後の悪化

HBV DNA量が80 IU/mL未満に低下した反応群(実線)と無効群(破線)における予後悪化事象(発癌, 非代償化, 死亡)の累積出現率に有意差を認めた。(p=0.04 Log-rank test)

(文献5より改変)

2008(恩地森一監修), 中外医学社, p1-10, 2008

- 2) Wong VW, Chan SL, Mo F, et al.: Clinical scoring system to predict hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B carriers. J Clin Oncol 28:1660-1665, 2010
- 3) Peng CY, Chien RN, Liaw YF.: Hepatitis B virus-related decompensated liver cirrhosis: benefits of antiviral therapy. J Hepatol 57:442-450, 2012
- 4) Wong GL, Chan HL, Mak CH, et al.: Entecavir treat-

- ment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2013 in press.
- 5) Zoutendijk R, Reijnders JG, Zoulim F, et al. : Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B patients with cirrhosis. *Gut* 62 : 760-765, 2013
 - 6) Shim JH, Lee HC, Kim KM, et al. : Efficacy of entecavir in treatment-naïve patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 52 : 176-182, 2010
 - 7) Marcellin P, Gane E, Buti M, et al. : Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B : a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* 381 : 468-475, 2013
 - 8) Matsumoto A, Tanaka E, Rokuhara A, et al. : Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B : A multicenter retrospective study of 2795 patients. *Hepatol Res* 32 : 173-184, 2005
 - 9) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. : Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2013 in press.
 - 10) Wu CY, Chen YJ, Ho HJ, et al. : Association between nucleoside analogues and risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma recurrence following liver resection. *JAMA* 308 : 1906-1914, 2012
 - 11) Chuma M, Hige S, Kamiyama T, et al. : The influence of hepatitis B DNA level and antiviral therapy on recurrence after initial curative treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 44 : 991-999, 2009
 - 12) Zhang QQ, An X, Liu YH, et al. : Long-term nucleoside analogues therapy for adults with chronic hepatitis B reduces the risk of long-term complications : a meta-analysis. *Virology* 438 : 72, 2011

IV B型肝炎を理解するための基礎研究

4 HBVの感染実験系

要点

- B型肝炎ウイルス (HBV) は、チンパンジーやツパイといった限られた動物にのみ感染し、マウスやラットといった小動物には感染しない。
- 2000年以降、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発された。
- B型慢性肝炎患者血清やHBV発現培養細胞の培養上清から採取したHBV粒子は、ヒト肝細胞キメラマウスに持続感染するが、肝炎は生じない。
- HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスに、インターフェロンや核酸アナログ製剤を投与し、マウス血清HBV DNA量の変化を測定することにより、薬効評価が可能である。
- HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスからマウス肝臓内のヒト肝細胞を採取し、ヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を解析することにより、HBVのヒト肝細胞への直接的な影響を観察することが可能である。

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) は、チンパンジーやツパイといった限られた動物への感染は成立するものの一過性感染であり、マウスやラットといった小動物には感染しない特徴をもつ。このため、HBVが高率に感染し、良好に複製するような小動物モデルが存在せず、*in vivo*におけるHBVの

感染、複製機構の解析は困難であった。2000年以降、マウス肝臓がヒト肝細胞に置換された**ヒト肝細胞キメラマウス** (以下、キメラマウス)が開発され、キメラマウスへのB型・C型肝炎ウイルス感染が報告された^{1,2)}。その後、本学においても、より高度にマウス肝臓がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスの作製に成功し³⁾、同キメラマウスを用いて*in vivo*でのHBV持続感染・複製系を確立した^{4,5)}。さらに、さまざまな薬物耐性変異を有するHBVクローンから作製されたHBV粒子をヒト肝細胞キメラマウスに感染させることによる各種HBVクローンの薬物感受性評価や^{6,7)}、ヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を解析することによるHBV感染が及ぼすヒト肝細胞への影響の評価に応用している⁸⁾。本稿では、これまでに確立してきたHBV感染・複製系と薬物感受性評価系・HBV感染によるヒト肝細胞への影響について解説する。

I ヒト肝細胞キメラマウスの構築

ヒト肝細胞キメラマウス (以下、キメラマウス) とは、マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたマウスである。キメラマウス作製の概略を図1に示す。アルブミン (Alb) プロモーター下に urokinase-type plasminogen activator (uPA) 遺伝子を組み込んだ Alb-uPA トランスジェニックマウスと重症免疫不全を呈する severe combined

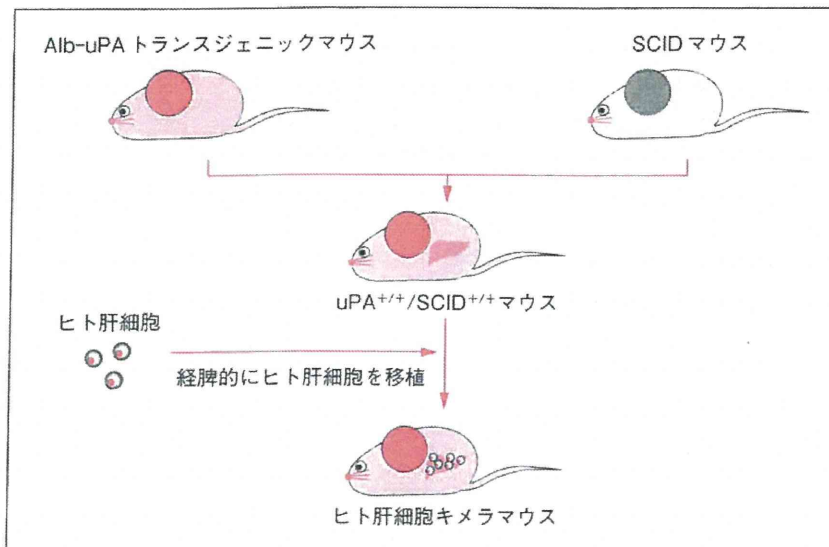


図1 ヒト肝細胞キメラマウスの構築

Alb-uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウスを交配させ、uPA^{+/+}/SCID^{+/+}マウスを作製。同マウスに対し、経脾的にヒト肝細胞を移植。ヒト肝細胞は、マウス肝臓内で生着し、ヒト肝細胞キメラマウスが作製される。(文献3より引用)

immune deficient (SCID) マウスとを交配し、uPA-SCID マウスを作製する。uPA-SCID マウスは、Alb-uPA トランスジェニックマウスの表現型を有することから、マウス肝細胞特異的にuPA が高発現し、マウス肝細胞のアポトーシスが生じ、肝不全に至る。そこで、このuPA-SCID マウスに手術検体などで得られた正常なヒト肝細胞を、経脾的に移植することで、ヒト肝細胞がマウス肝臓に生着、増殖することにより、高度にヒト肝細胞に置換された(90%以上置換された)キメラマウスを作製することが可能となる³⁾。本キメラマウスは、SCID マウス由来であることから、高度に免疫が障害されており、肝炎ウイルスを感染させてもマウス生体内の免疫反応に伴うウイルス排除が起こらないことが特徴となっている。

II HBV 持続感染マウスモデルの構築

キメラマウスの肝臓はヒト肝細胞に置換されていることから、肝炎ウイルスを接種すると、感染が成立し、高率にウイルスが増殖する**持続感染マウスモデル**が作製できる。HBV キャリアから得た血清 50 μ L をマウス尾静脈より接種し、2週間ごとにマウス血清中のHBV DNA の変化を観察すると、接種後2週目よりマウス血清中の

HBV DNA は陽性となり、その後も徐々にウイルス量は増加し、8~10週間目には8~10 Log copies/mL 程度でプラトーとなり、ウイルス血症は24週以上持続する(図2)。また、図3に示すように、HBV が感染したキメラマウス肝を免疫染色にて観察すると、マウス肝細胞ではHBc 発現が認められず、ヒト肝細胞で発現していることから、HBV の感染がヒト肝細胞でのみ成立していることが確認できる。さらに、キメラマウスはSCID マウス由来であることから、T細胞、B細胞の機能が欠失しており、HBV が感染してもマウス肝臓内で肝炎は生じないことがわかる(図3)。

III HBV 発現細胞株の樹立とキメラマウスへの感染

これまで、感染性を保持したHBV を恒常的に産生する細胞株として HepG2.2.15 株が使用されてきたが、同細胞株ではウイルスゲノムへのさまざまな変異導入や、薬物耐性変異の評価は不可能であった。当研究室では、*in vitro* にてHBV を産生する新たな細胞株を構築し、産生されたHBV が感染性を保持していることを、キメラマウスを用いて示した。

まず、HBV キャリア血清よりHBV ゲノムを抽出し、それを鋳型とした1.4倍長のHBV ゲノ

図2 HBV 持続感染キメラマウスの作製

ヒト肝細胞キメラマウスに HBV 感染患者血清を接種。マウス血清中の HBV DNA は徐々に上昇し、8~12 Log copies/mL に達した。ウイルス血症は、24 週以降も持続し、7 Log copies/mL 以上の高い HBV DNA titer が持続した。

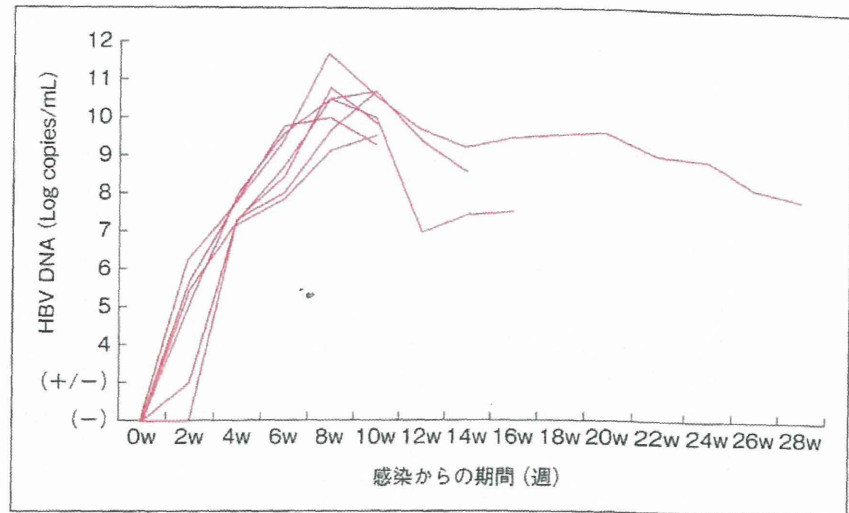
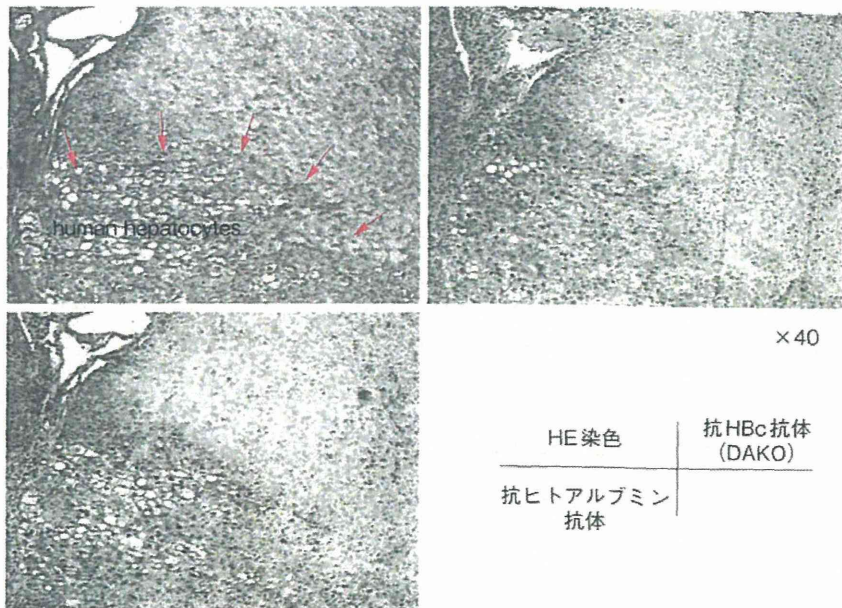


図3 HBV 感染キメラマウス肝の免疫組織学的検討

HBV 感染が成立したマウスを sacrifice し、マウス肝内での HBe 抗原の産生を免疫組織染色にて検討。ヒトアルブミンを産生する細胞つまり生着したヒト肝細胞でのみ HBe 抗体で染色され、HBV が生着したヒト肝細胞に感染していることが示された。

(文献 5 より引用)



ムを組み込んだ HBV 発現プラスミド (野生株) を作製した。このプラスミドを、肝癌細胞株である HepG2 細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションしたところ、培養上清中に HBs 抗原、HBe 抗原の発現と高濃度の HBV DNA (8~9 Log copies/mL) が確認され、一過性発現により、培養細胞からウイルスが産生されたことが示唆された (図 4A)。また、培養上清中のウイルス粒子からポリメラーゼを抽出し、内在性ポリメラーゼ反応を行ったところ、HBV DNA の複製が確認されたことから、自己複製能を保持した

HBV 粒子が産生されたものと考えられた (図 4B)。

そこで、培養細胞より産生させた HBV 粒子が感染能を保持しているか否かを検討するため、キメラマウス尾静脈より培養上清を接種した。その結果、マウス血清中の HBV DNA は、接種後 2~8 週目より定量可能となり、患者血清を接種した場合と同等の 8~10 Log copies/mL までウイルス量は増加し、感染は 12 週以上持続した (図 5)。以上の結果から、*in vitro* にて作製した HBV クローンが感染性を有し、キメラマウス肝臓内のヒト肝細胞に感染し、複製・増殖することが示され

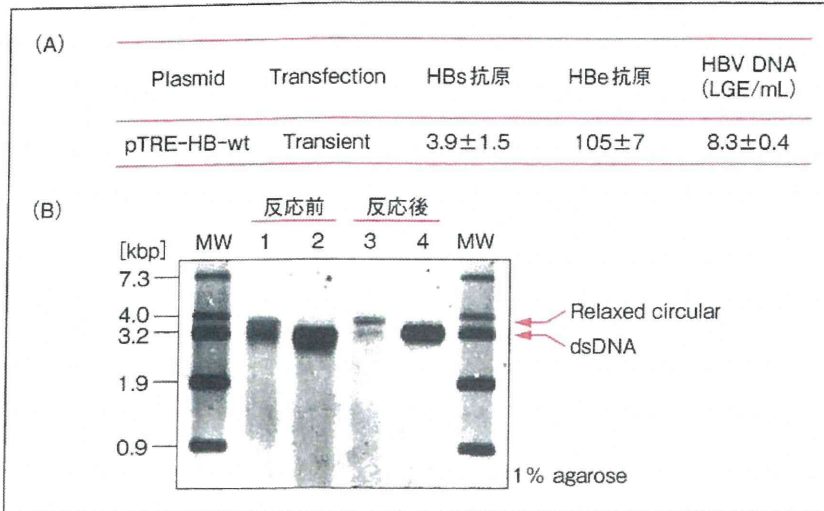


図4 HBV 発現プラスミドの構築と HBV 粒子の作製

A: HBV 発現プラスミドを, HepG2 細胞にリン酸カルシウム法を用いて transient transfection し, 培養上清中に分泌される HBV マーカーを検討. その結果, 高力価の HBV DNA が培養上清中へ放出されていることが確認された.

B: 内在性ポリメラーゼ反応を用いて, 産生された HBV 粒子の自己複製能を検討. その結果, 反応により, relaxed circular のバンドが増加したことから, 産生された HBV 粒子が自己複製能を保持していることが確認された (レーン 3).

(文献 5 より引用)

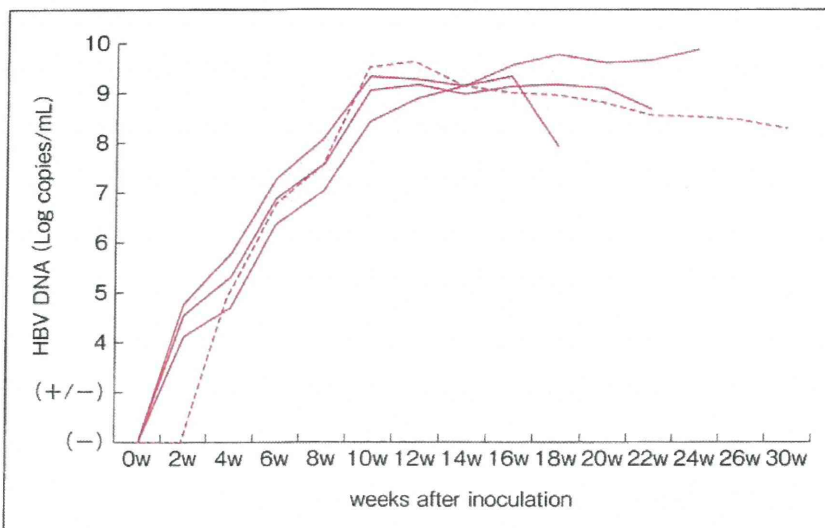


図5 培養細胞由来の HBV 粒子を用いたキメラマウスへの感染

キメラマウスに培養細胞由来の HBV 粒子を接種したところ, マウス血中 HBV DNA は 2~4 週目より定量可能となり, 10 週目には 8~10 Log copies/mL まで上昇した. また, ウイルス血症は, 24 週以降まで持続した.

た.

IV *In vitro* および *in vivo* における HBV の薬物感受性評価

次に, 先程紹介した *in vitro* および *in vivo* での HBV 感染・複製系を応用し, HBV ゲノムの遺伝子変異がもたらす薬物感受性変化の評価系を構築した. 前述した HBV 発現プラスミド (野生株) に対し, 組み込んだ HBV ゲノム領域に点変異を導入し, ラミブジン耐性変異株である YVDD 株を発現するプラスミドを作製した.

まず初めに, 前述した野生株の HBV 発現プラ

ズミドと YVDD 株を用いて, 各 HBV クローンの薬物感受性の評価を *in vitro* にて行った. HBV 発現プラスミド (野生株および YVDD 株) をそれぞれ HepG2 細胞にトランスフェクションし, 24 時間後より培養上清中にラミブジンを加え, ラミブジン添加 72 時間後の細胞内の HBV 複製中間体量の変化を Southern blot 法を用いて検討した (図 6). その結果, 両株ともラミブジンの濃度上昇に伴い, 複製中間体量の減少が確認されたものの, 野生株に比べ, YVDD 株では, 明らかに細胞内の複製中間体量の変化は乏しく, 約 200 倍程度の抵抗性を示した.

さらに, *in vivo* においても各 HBV クローンが

図6 野生株、YVDD株に対するラミブジンの抗ウイルス効果 (*in vitro*)

HepG2細胞に野生株またはYVDD株を発現するHBV発現プラスミドをトランスフェクション。トランスフェクション24時間後よりラミブジンを添加し、72時間後の細胞内HBV複製中間体量の変化を観察。野生株では、ラミブジンの濃度依存的に複製中間体量が低下したのに対し、YVDD株ではラミブジンの濃度を上昇させても十分な抗ウイルス効果は認められない。

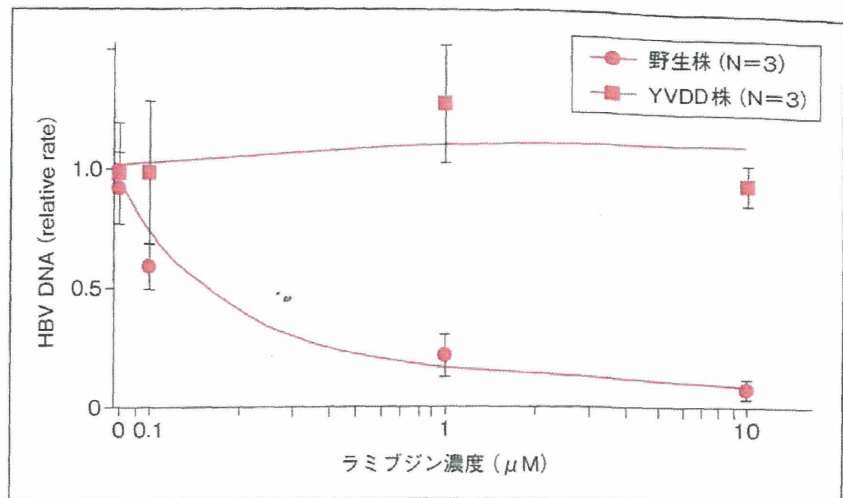
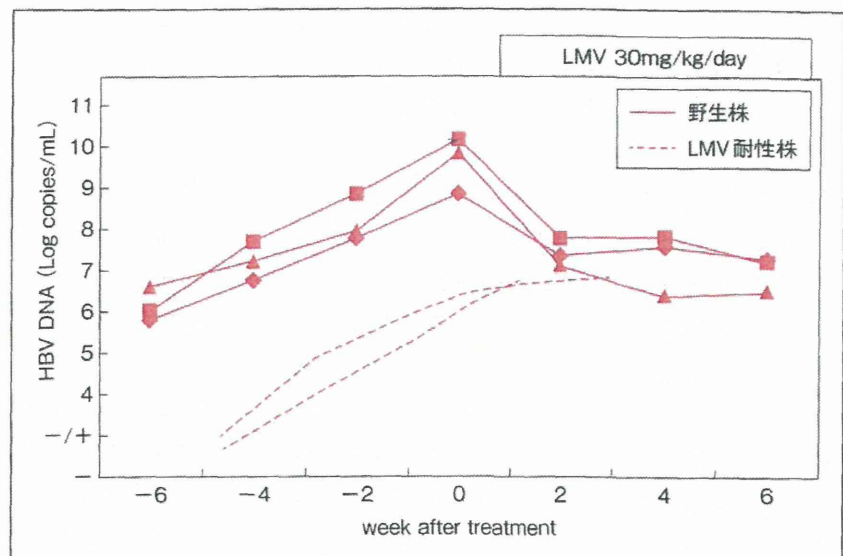


図7 野生株、YVDD株に対するラミブジンの抗ウイルス効果 (*in vivo*)

野生株およびYVDD株の感染が成立したキメラマウスに対し、ラミブジンを経口投与。野生株が感染したキメラマウスでは、速やかなマウス血中HBV DNAの低下を認めたが、YVDD株感染キメラマウスでは、HBV DNAの低下は認められなかった。



持続感染したキメラマウスを作製し、ラミブジンの感受性を評価した。いずれのウイルスを接種したキメラマウスも感染は成立し、マウス血中のHBV DNAは8~10週間目にはプラトーとなった。これらのマウスにラミブジン30mg/kg/dayを4~6週間経口投与したところ、野生株を感染させたマウスでは、6週間で-2~3 Log copies/mL程度のウイルス量低下が確認されたのに対し、YVDD株を感染させたマウスでは、ラミブジン投与にもかかわらず、HBV DNA量の減少は認められなかった(図7)。

以上の結果から、これらの *in vitro*, *in vivo* での結果は、臨床での経過を良好に反映するもの

であり、両実験系がHBVの遺伝子変異による薬物感受性変化の評価に有用であることが示された。

V キメラマウスを用いた薬物感受性評価系の有用性

これまで、述べてきた結果から考えると、*in vitro*, *in vivo*の実験系は、臨床の結果を良好に反映するものであり、キメラマウスが高価であることや飼育施設の確保や飼育の手間を考えると、*in vitro*の実験系で十分ではないかとの考え方も可能である。しかしながら、各症例でHBVゲノムの配列は少しずつ異なっており、各症例の

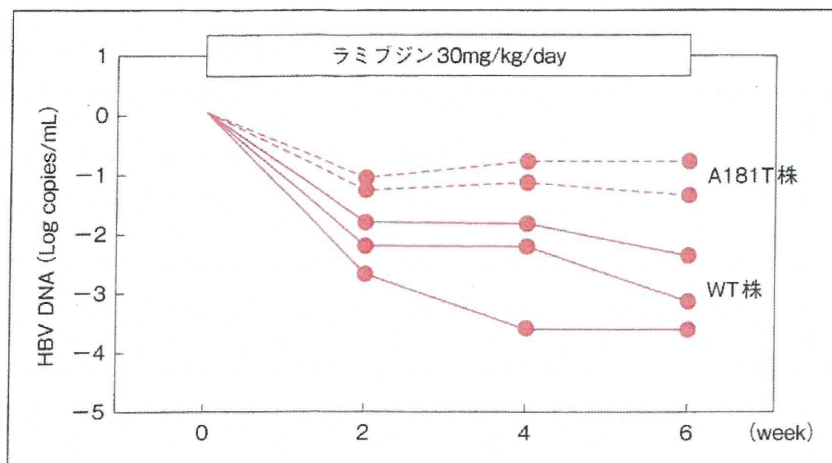


図8 キメラマウスを用いたラミブジン耐性の評価

WT株およびA181T株を感染させたキメラマウスにラミブジンを投与したところ、A181T株感染マウスにおいて、十分な抗ウイルス効果が得られなかった。

HBVをすべてクローニングしていくことは困難である。一方、キメラマウスでは、採取した患者血清を使用することにより、感染マウスを作製することが可能であり、臨床で使用を予定している薬物を投与することで、感染しているHBVが使用薬物に感受性をもつかを判断することが可能と考えられる。以下に、一例を示す。

症例は、44歳、男性。B型慢性肝炎に対してラミブジン治療を行っていたが、治療24ヵ月目にHBV DNAの急上昇を認めた。ラミブジン投与開始前とHBV DNAが急上昇した際の保存血清を用いて、治療に伴うHBVゲノムの遺伝子変異をdirect sequence法にて検討した結果、ラミブジン投与前後でYMDDモチーフに変異は確認されなかったが、RT領域のrtA181T変異を認めた。当初、このアミノ酸の変異がラミブジン耐性変異であることが報告されておらず、薬物感受性にどのように影響するかは不明であった。そのため、同患者血清よりHBV DNAをクローニングし、Pt's strain (rtA181T株)を作製した。さらに、rtA181Tの変異を野生型に戻したHBV発現プラスミドPt's strain (WT株)を作製した。rtA181Tの変異がHBVのラミブジン感受性に影響するか否かを検討するため、作製したPt's strain (rtA181T株)、Pt's strain (WT株)をそれぞれHepG2細胞にトランスフェクションし、HBV粒子を回収後、キメラマウスに接種し、*in vivo*における薬物感受性を検討した。感染成立

後、ラミブジン30mg/kg/dayを8週間投与したところ、WT株を接種した2頭のマウスでは3~4 Log copies/mLのHBV DNA低下を認めたとにもかかわらず、rtA181T株を接種したマウスでは1 Log copies/mL程度の低下にとどまり、この変異がHBVのラミブジン耐性獲得に関与していることが確認された(図8)。

本症例では、HBV発現プラスミドを構築した後、核酸アナログ製剤の有効性を評価したが、患者血清を感染させたキメラマウスでも同様の抗ウイルス効果が再現されており、明らかな薬物耐性変異が認められない症例では、患者血清をキメラマウスに接種することにより、より迅速な薬効評価や薬物耐性ウイルスに対する対応策の構築が可能であると考えられる。

VI HBV感染が及ぼすヒト肝細胞への影響

近年、HBV感染がヒト肝細胞に及ぼす影響については、いくつかのマイクロアレイ解析が報告されているが、培養細胞を用いた解析や生体内における免疫応答存在下での解析である⁹⁻¹¹⁾。これまで述べてきたようにキメラマウスはSCIDマウス由来であり、T細胞、B細胞系の免疫応答が欠如し、肝炎が生じないことから、このキメラマウスを用いて、HBV感染が、ヒト肝細胞に及ぼす直接的な影響について検討を行った。通常、ヒト