

201321014A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成26（2014）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 樹状細胞制御治療学	寄附講座助教
	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
	北島 健二	公益財団法人東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野	主席研究員
	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

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・・・7
巽 智秀
2. マウスにおける B 型肝炎ウイルスの感染と増殖・・・11
疋田 隼人
3. HBV コンストラクトの作製と HBV 増殖能の評価・・・16
上田 啓次
4. ヒト iPS/ES 細胞由来肝細胞の作成・・・19
水口 裕之
5. 造血幹細胞移植系の確立に関する研究・・・23
北島 健二
6. TK-NOG キメラマウスの作成に関する研究・・・25
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・・・26
に関する研究
高橋 武司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・29

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・35

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、動物モデルの解明が必要である。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、SCID を基盤としていることからウイルスに対する免疫応答を解析することができない。また、uPA そのものが劇症肝炎を発症することから、管理・維持にコストがかかり、比較的短命であるという欠点を有している。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2年度において、i) Genotype A、Genotype C の増殖可能 HBV DNA コンストラクトをハイドロダイナミック法を用いてマウスに投与し、ウイルス増殖動態が前者で遷延することを明らかにした。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 (PBMC) の投与を行い、このモデルでは NOG マウスに比し、GVHD 応答が軽微で長期にヒトリンパ球が生着し、B 型肝炎に対する抗体レスポンス、CTL 誘導が起こることを明らかにした。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た。B 型肝炎患者血清の接種により全頭で 1~2 週以内にウイルス血症が成立した。B 型肝炎モデルにヒト PBMC を接種すると、肝障害が誘導され血清 HBV DNA 量は低下した。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) ヒト iPS 細胞により誘導した肝細胞からシートを作成し、良好な肝細胞の移植成績を得た。このような成績を踏まえて、3 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 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^{null} (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。

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 (図 1 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。これらの遺伝子をハイドロダイナミック法を用いてマウスに投与し、ウイルス増殖能と免疫応答を評価する。

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 (図 1 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 (PBMC) 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、HBs ワクチン接種、HBV DNA ハイドロダイナミック投与を行い、HBV に対する免疫応答を解析する。

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 (図 1 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マウスは種々の程度の肝臓の表現型を呈する：肝形成不全 (L-bcl-x^{ΔΔ} mcl-1^{ΔΔ} マウス (Albumin-Cre Bcl-xL^{fl/fl} Mcl-1^{fl/fl}))、持続的肝障害 (L-bcl-x^{Δ+} mcl-1^{Δ+} マウス (Albumin-Cre Bcl-xL^{fl/+} Mcl-1^{fl/+}))。胎生 16.5 日のこれらのマウスの卵黄嚢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成を行う。

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 (図 1 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^{fl/fl} マウスに NOG マウスを戻し交配し L-mcl-1^{ΔΔ}-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可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 (図 1 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 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。NOD マウス、NOD-SCID マウス (T、B 細胞欠損)、NOG マウス (T、B、NK 細胞欠損) 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 抗原血症およびウイルス血症が成立した。NOD マウスではウイルス血症は一過性であったが、NOD-SCID、NOG マウスでは遷延化し、また NOD-SCID に比し NOG マウスで高いウイルス血症を示したことから、獲得免疫応答、自然免疫応答の双方がウイルス排除には関与していることが示唆された。また Genotype A では Genotype C に比し高いウイルス血症を示し、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静注すると、肝臓より分離される単核球は経時的に増加し、移植後 28 日で約 90%がヒト細胞に置換した（移植後当初は NK 細胞、B 細胞、DC の増加を認め、その後徐々に T 細胞の増加を認めた）。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。このようなマウスに HBs ワクチンを投与したところ、50%のマウスで HBs 抗体の上昇がみられた。また、ハイドロダイナミック法による HBV の投与により、HBc ペプチドに対する T 細胞応答が誘導されたことから、移植されたヒト免疫細胞がマウス個体内で HBV に対して機能的に応答し得ることが明らかとなった。

新生児型ヒト肝細胞キメラマウスの作成

Bcl-xL/Mcl-1 KO マウスおよび野生型マウスの ED16.5 の胎児の卵黄嚢静脈より 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、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を確認した。Mcl-1 KO (C57BL 系統) マウスを免疫不全化するため、スピードコンジュニック法による NOG マウスへの戻し交配を N5 世代まで行った。

TK-NOG キメラマウスを用いた B 型肝炎モデル

ヒト肝細胞への置換率が 30～70%の TK-NOG マウスに Genotype C の患者血清を投与することにより、1～2 週間で持続的な感染が成立することを明らかにした。感染が成立したマウスに、ヒト PBMC を投与することにより、肝障害が誘導され、血中ウイルス量が低下することを明らかにした。ヒト PBMC 移入後も GVHD が起こりにくい NOG-MHC class I/class II KO マウスと、ヒト肝細胞移植可能な TK-NOG を交配することで、ヒトの肝臓と免疫の両者を有する TK-NOG-MHC class I/class II KO マウスの作成を開始した。

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細胞シートを作成し、肝障害免疫不全マウスへ移植した。血中アルブミン濃度が 100～2000 ng/ml に達し、生着することを確認した。ヒト肝キメラマウス作製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ることでヒト肝細胞からゲノムインテグレーションフリー・ヒト iPS 細胞株を多数樹立することに成功し

た。マウス ES/iPS 細胞に対して、転写因子 Lhx2 をオン-オフ発現することにより、造血幹細胞を誘導し、さらに造血細胞、免疫細胞への分化が誘導できることを明らかにした。

D. 考察と結論

図1に示す5つのステップについて2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、1) ヒト末梢血単核球を用いたマウス免疫系のヒト化についてさらに解析をするとともに、造血幹細胞の移植実験を推進する、2) ヒト HLA を発現する NOG マウスを用いて免疫系のヒト化を行う、3) TK-NOG マウスを用いた B 型肝炎モデルについて、免疫系のヒト化を行い、B 型肝炎に対するヒト免疫応答の解析を行う、4) TK-NOG マウスの MHC class I / class II をノックアウトし、ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスの免疫系のヒト化を進める、5) NOG 化した Mcl-1 KO マウスを用いて、肝細胞キメラマウスを作成する、6) 胎児期細胞移植法による、肝細胞キメラマウスを作成する、7) iPS 細胞から樹立した肝細胞の TK-NOG マウスへ移植し、キメラマウス作成する、9) ヒト iPS 細胞から血液細胞への分化誘導に必要な転写因子を明らかにする。このような研究を推進し、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

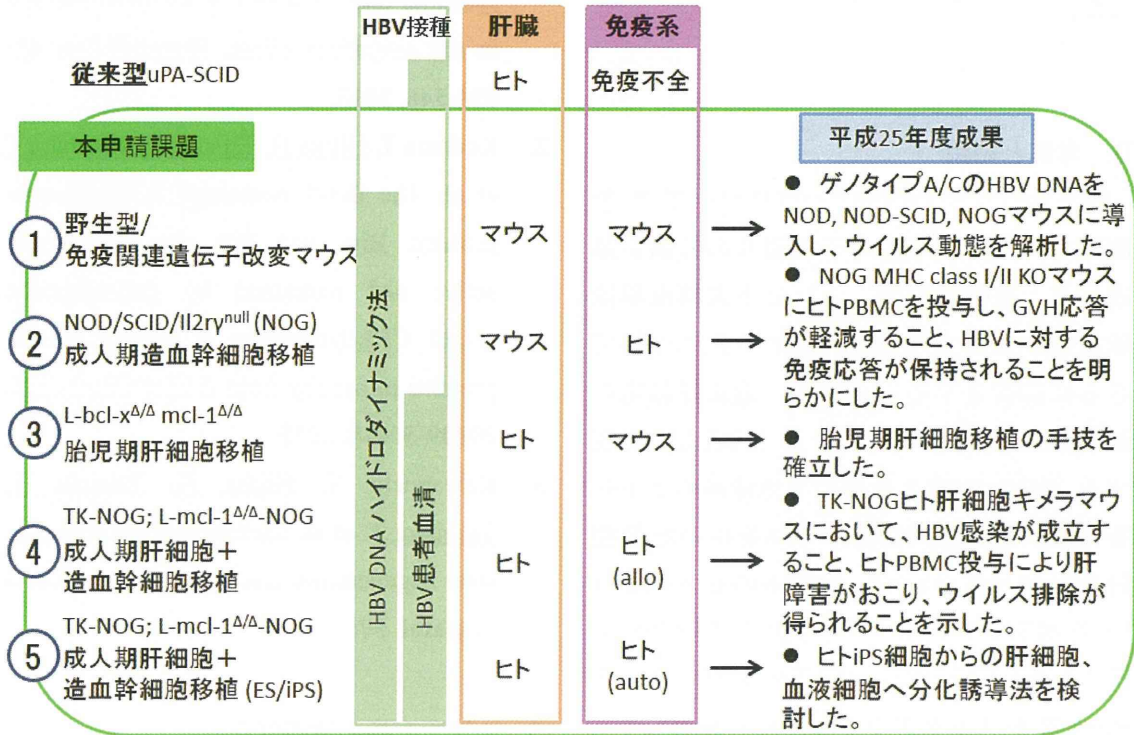
1. Nishida T, Tatsumi T, Takehara T, et al. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. **Hepatol Res** **43: 339-346, 2013.**
2. Kodama T, Hikita H, Tatsumi T, Takehara T, et al. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. **J Biol Chem** **288: 30009-30018, 2013.**
3. Kawaguchi T, Hikita H, Tatsumi T, Takehara T, et al. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. **J Hepatol.** **59: 1239-1245, 2013.**

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

目的: HBVと肝細胞、免疫細胞の複雑な相互作用をマウス個体内で再現できる次世代型のHBV感染・増殖小動物モデルを開発する



II. 分担研究報告

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）

分担研究報告書

免疫能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、マウス免疫機能をヒト細胞で再構築を行い、ヒト免疫機能を有するHBV感染・増殖小動物モデルの開発を行うことである。本分担研究では、マウスの免疫システムのヒト化を目的として、NOD/SCID/I12r γ 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) にヒト末梢血リンパ球を投与した。NOGマウスにヒト末梢血リンパ球を投与するとGVHDにより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、肝障害も認めなかった。B細胞や樹状細胞も投与後29日目でも残存していた。免疫ヒト化DKO-NOGマウスでは、マウス肝由来ヒトリンパ球をCD3&CD28にて刺激するとIFN- γ の産生を認め、HBVワクチン投与により50%のマウスで血清中HBs抗体の産生誘導を認めた。またhydrodynamic法によってHBVを強制発現した免疫ヒト化DKO-NOGマウスでは、HBV特異的CTLの誘導を認めた。ヒト末梢血リンパ球を用いた免疫ヒト化DKO-NOGマウスは、HBV感染における免疫応答解析に有用である可能性が示唆された。

共同研究者

青野悟志 大阪大学消化器内科学 大学院生
俵 誠一 大阪大学消化器内科学 大学院生

A. 研究目的

我が国の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出来ない。実験動物として長く使用され遺伝的な解析も進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出来ない。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・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) 移入によるヒト化をすること、さらにはそのヒト化モデルを基盤として造血幹細胞 (HSC) 移入による免疫ヒト化を目指す。本年度はNOD/SCID/I12r γ 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) にヒト末梢血リンパ球を投与し、マウス免疫ヒト化モデルの構築と、同免疫ヒト化マウスのHBVに対する免疫反応の解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

NOGマウス及びDKO-NOGマウスの尾静脈より、ヒト末梢血単核球を 1×10^7 個移植し、移植後継時的 (Day1, 8, 15, 29) にフローサイトメトリーによるヒトリンパ球の生着及びその頻度解析を行った。またヒトリンパ球移植後の肝臓の病理学的検索を行った。PBMCを移植後15日目のマウス肝よりT細胞を採取し、CD3及びCD28刺激によるIFN- γ 産生を評価した。次に免疫ヒト化DKO-NOG

マウスにB型肝炎ワクチンを投与し、血清HBs抗体価を測定した。また免疫ヒト化DKO-NOGマウスにHBVコア蛋白由来ペプチド添加樹状細胞を投与し、HBVコア特異的細胞傷害性T細胞 (以下CTL) の誘導を解析した。さらに免疫ヒト化DKO-NOGマウスにhydrodynamic法にてHBVを強制発現し、HBV特異的CTL誘導を検討した。

C. 研究結果

1. 組織学的検索

NOGマウスではPBMC移植後1日目、8日目では肝組織的变化は軽微であったが、15日、29日目と脈管周囲のリンパ球浸潤が著明であり、その周囲の多数の肝細胞にアポトーシスも認められた。これらの変化はGVHDに伴うものと考えられた。一方DKO-NOGマウスではPBMC移植後継時的に脈管周囲のリンパ球増加は認められるものの、組織内への浸潤は認めず、アポトーシスもわずかであった。

2. 血清ALT値

血清ALT値の上昇は肝組織の変化と同様で、NOGマウスではDay15より著明に増加したが、DKO-NOGマウスではALTの上昇は認めなかった。

3. 肝、脾臓におけるヒトリンパ球置換率とリンパ球分画

肝、脾臓におけるヒトリンパ球置換率はNOGマウス、DKO-NOGマウスいずれも継時的に増加しており、29日目には肝臓では90%程度が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、DKO-NOGマウスでは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消失していたのに対し、DKO-NOGマウスではB細胞、樹状細胞も残存していた。PBMC移植後15日目のNOGマウス、DKO-NOGマウスの肝よりT細胞を採取し、疲弊マーカー（PD-1、Tim-3）を測定したところ、いずれもNOGマウス由来のT細胞において有意に高値であった。

4. マウス生存率

移植後の生存率は、NOGマウスでは8匹中7匹が2ヶ月以内に死亡したが、DKO-NOGマウスは7匹全てのマウスが2か月以上生存した。

5. 移植後マウスにおけるB、T細胞機能

ヒトPBMC移植後15日目のDKO-NOGマウスより採取したT細胞をCD3及びCD28刺激すると、ヒトIFN- γ の産生が確認された。免疫ヒト化DKO-NOGマウスにHBVワクチン投与した結果、50%のマウスで血清中HBs抗体の産生を認めた。また免疫ヒト化DKO-NOGマウスにHBVコアペプチドを添加した樹状細胞を投与すると、HBVコアペプチド特異的CTLの誘導が確認された。hydrodynamic法によってHBVを発現した免疫ヒト化DKO-NOGマウスでは、HBV特異的CTLの誘導がtetramer法にて確認された。

D. 考察

NOGマウスへのヒトPBMCの移植はGVHDによる致命的な肝障害が起こるが、DKO-NOGマウスではGVHDを呈さず、T細胞及びそれ以外のB細胞、樹状細胞など各リンパ球の

長期生存が確認された。またDKO-NOGマウスにおいて生着するリンパ球の機能は、本年度の研究により、B細胞によるHBs抗体産生能や抗原特異的細胞傷害性T細胞の誘導が可能であることが明らかとなり、HBVに対する免疫応答解析モデルとして有用と考えられた。

E. 結論

ヒト末梢血リンパ球による免疫ヒト化DKO-NOGマウスは、HBVに対する免疫応答解析に有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aketa H, Tatsumi T, Kohga K, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Nawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hosui A, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice. *Int J Cancer* 133: 1126-1135, 2013
2. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. *J Biol Chem* 288(42):

30009-30018, 2013

なし

3. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. J Hepatol 59: 1239-1245, 2013

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

1. Aono S, Tatsumi T, Hikita H, Tawara S, Nishio A, Nawa T, Ohnishi Y, Shimizu S, Sakamori R, Miyagi T, Hiramatsu N, Suemizu H, Takahashi T, Takehara T. Successful immunological responses against hepatitis B virus in human peripheral blood mononuclear cells-engrafted mice. AASLD 64th Washington DC, Hepatology 58: 419 A, 439, 2013 Nov, 2 (Nov. 1-5) ポスター

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

マウスにおけるB型肝炎ウイルスの感染と増殖

疋田 隼人 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 寄附講座助教

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、3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、NOD、NOD-scid、NOG マウスにHBV 発現プラスミドを投与した。免疫機能の保たれている NOD マウスではウイルス血症は一過性で持続感染を認めなかったが、B細胞及びT細胞の欠損したNOD-scid マウスでHBV 持続ウイルス血症が成立し、さらにNK細胞まで欠損したNOG マウスでは、より高いウイルス血症が持続した。またいずれのマウスでもゲノタイプAの方がゲノタイプCよりウイルス量が高かった。これらから、HBV 持続感染におけるB、T細胞、NK細胞の重要性及び、免疫細胞非依存的なゲノタイプ間によるウイルス増殖率の違いが示唆された。2つ目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。免疫能を保持した野生型マウス、肝障害持続マウス、もしくは肝形成不全マウスの胎児にそれぞれ同種異系のマウス初代培養肝細胞を投与すると、野生型マウス、肝障害持続マウスで高い生着を認めた。この結果から、胎児期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た。3つ目は、ヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスに対する同種異系のヒト末梢血単核球投与である。ヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスはHBV投与で感染し、PBMC投与で感染ヒト肝細胞は細胞死に陥り、劇症肝障害像を呈すと同時にHBVDNAの低下を認めた。この結果は、HBV劇症肝炎モデルの確立につながると考えられた。

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
中堀 輔 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

B型肝炎の新規治療薬の開発には、細胞実験によるウイルスの感染・増殖の検討だけ

では不十分であり、HBVウイルスと感染肝細胞、さらには免疫機構との複雑な相互関係を解析する必要がある。そのため、個体レベルでの研究を行う必要があり、このようなHBVウイルス、感染肝細胞、免疫機構の関係を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 3 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る。このために、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 NOD (B・T・NK 細胞とも存在)、NOD-scid (B・T 細胞が欠損)、NOG (NOD-scid IL-2R γ null) (B・T・NK 細胞が欠損) 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。

2 つ目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。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、野生型マウス、肝障害持続マウス (*Alb-Cre Mcl-1 fl/+ Bcl-xL fl/+*)、肝細胞欠損マウス (*Alb-Cre Mcl-1 fl/fl Bcl-xL fl/fl*) 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。

最後は免疫不全マウスである TK-NOG マウスにヒト肝細胞を移植してキメラ化したヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスに、ヒトの末梢血単核球を移植して免疫再構築をする方

法である。免疫不全マウス TK-NOG マウスにガンクロビルを投与して肝障害を誘導し、ヒト初代培養肝細胞を移植することで、30-80%のキメラ率のヒト肝細胞キメラマウスを作成した。このキメラマウスに B 型慢性肝炎患者由来の血清を 6.1 log copies イノキュラムとして投与した。また、免疫細胞のヒト化として、健康人より摂取した末梢血単核球 (PBMC) 1×10^7 個、ヒト肝細胞キメラマウスに移植した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認もと、インフォームドコンセントを得た上で行った。遺伝子組み換えを用いた実験は、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 発現プラスミドを B・T・NK 細胞が保たれている NOD 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。しかし投与 1 日後に HBV-DNA が 4-6 log copies/ml と最大になった後減少し、28 日後にはほとんど検出できなくなった。一方、B・T 細胞が欠損している NOD-scid マウスに投与したところ、投与 7 日後には血中 HBV-DNA 量は 5-6 log copies/ml と最大とな

るもその後も持続ウイルス血症を示した。また、B・T・NK細胞が欠損しているNOGマウスに投与したところ、投与7日後には血中HBV-DNA量は6-7 log copies/mlと最大となり、その後もNOD-scidマウスより高い持続ウイルス血症を示した。これらより、ウイルス持続感染におけるB・T・NK細胞の関与が示唆された。

また、いずれのマウスにおいてもゲノタイプAのHBV-DNAはゲノタイプCのHBV-DNA量よりも高く、免疫非依存的なゲノタイプの差によるウイルス増殖率の違いが示唆された。

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日の野生型マウス、肝障害持続マウス、肝細胞欠損マウスの胎児に卵黄嚢静脈よりallogeneicの関係にあるGFP陽性初代培養肝細胞を投与したところ、胎生18.5日ではいずれのマウスの肝臓内でもGFP陽性細胞を認め、移植細胞の生着していることを確認した。しかし野生型マウス、肝障害持続マウスでは約30%の置換率を認めたのに対して、肝細胞欠損マウスでは10%と生着率は有意に低かった。興味深いことに、野生型マウス、肝障害持続マウスではレシピエントの肝臓内に、肝梗塞像が散見され、その周囲で多数の移植肝細胞の生着を認めた。一方で、肝細胞欠損マウスでは肝梗塞像は認めなかった。以上より、移植細胞がレシピエントの肝臓で肝梗塞を誘導することが、胎児期肝細胞移植の生着率の向上に寄与する可能性が示唆された。

最後にヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスにHBV 6.1 log copiesを尾静脈より投与し、経時的にHBV-DNAを検討した。投与後1-2週間でHBV-DNAの検出が可能となり、8週間で6-8 log copies/ml程度にまで上昇し、その後ほぼ横ばいとなった。HBV感染は100%成立した。持続感染成立したマウスの肝臓をHBc抗体で免疫染色をしたところ、ほぼすべてのヒト肝細胞が陽性となっていた。またウイルス量が横ばいとなったHBV感染ヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスに、健康人より摂取したPBMCを $1-5 \times 10^4$ 個投与した。その結果、2-3mg/ml程度であった血清ヒトアルブミン濃度は、PBMC移植後1-2週間で測定感度以下にまで低下し、HE染色による肝組織像でもヒト肝細胞置換領域は多数のリンパ球浸潤を伴った壊死像を呈していた。と同時に、血清HBV-DNA量も著明に減少した。

D. 考察と結論

今回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。このウイルス血症の排除には免疫担当細胞の関与が示唆された。さらにゲノタイプAとCの2種類のウイルス発現ベクターを用いて、それぞれのウイルスを発現させることに成功した。今後このモデルを用いることで、ゲノタイプAとCの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、allogeneicの関係である初代培養肝細胞が免疫機能の保たれたマウスでも生着することが確認できた。肝細胞欠損マウスでは生着率が悪かったことより、胎児期の移植細胞の生着に

は、生着のための空間を空けておくことより、肝梗塞を惹起する方が重要であると考
えられた。今後は、移植細胞にヒト初代培
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。

ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスへの HBV
感染実験では、HBV 投与により持続感染が全
例成立した。HBV 感染可能なマウスモデルと
して有用であると同時に、このマウスにヒ
ト PBMC を移植することで、ヒト肝細胞とヒ
ト免疫担当細胞と HBV それぞれの相互作用
を解明することが可能な重要なモデルとな
ると考えられた。

以上 3 つの異なるアプローチで免疫の保
たれた HBV 増殖・感染マウスモデルの作成
を試みた。それぞれのモデルを使い分ける
ことで、HBV 感染症における HBV と免疫細胞、
肝細胞との関係の解明につながると考えら
れた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. (2013) The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. *J. Biol. Chem.* 288: 30009-30018.
- [2] Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T,

Takehara T. (2013) Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. *J Hepatol.* 59: 1239-1245.

2. 学会発表

- [1] 疋田隼人、巽智秀、宮城琢也、阪森亮太郎、清水聡、斎藤義修、田中聡司、竹原徹郎.
(2013) 肝細胞の発生及び維持における BH3-only 蛋白によるレオスタット制御. 第 49 回肝臓学会総会. 東京. 6 月 6 日-7 日.
- [2] 疋田隼人、巽智秀、宮城琢也、阪森亮太郎、清水聡、斎藤義修、田中聡司、竹原徹郎.
(2013) 肝細胞アポトーシスが発生する酸化ストレスの肝発癌に与える影響. 第 49 回肝臓学会総会. 東京. 6 月 6 日-7 日
- [3] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Yoshito Hayashi, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Masahiko Tsujii, Tetsuo Takehara. (2013) Continuous apoptosis in hepatocytes induces liver tumors with DNA hypermethylation but not p53 or beta-catenin mutation. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜 10 月 3 日-5 日.
- [4] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2013) Oxidative stress induced by continuous hepatocyte apoptosis drives liver carcinogenesis independently of regeneration and DNA methylation status. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1 - 5.
- [5] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito,