

201423042A

厚生労働科学研究費補助金

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）

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

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）

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成27（2015）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
	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 …… 31

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
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）

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

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、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3年度において、i) ハイドロダイナミックモデルにおいて Genotype A によるウイルス増殖が Genotype C に比し遷延すること、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）の投与により GVHD 応答が軽減すること、iii) GM-CSF/IL-3 をトランスジェニックした NOG マウスにおいてヒト造血幹細胞移植による細胞の生着と分化が良好におこること、iv) MHC class I/II-KO/NOG マウスに PBMC を投与するモデルにおいて B型肝炎に対する抗体レスポンス・CTL 誘導が起こること、v) TK-NOG マウスにヒト肝細胞を移植したキメラマウスにおいて HBV 感染が高率におこること、vi) 同モデルにおける HBV 感染に NTCP が重要な役割を有していること、vii) Mcl-1 KO の 16.5 日の胎児の卵黄嚢静脈より同種肝細胞移植を行うことにより肝細胞が生着すること、viii) ヒト iPS 細胞より誘導した肝細胞が TK-NOG マウスに生着し、HBV 感染をおこすこと等を明らかにした。このような成績を踏まえて、4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。

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、発がん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初代培養肝細胞、末梢血リンパ球 (PBMC)、臍帯血造血幹細胞を用いるとともに、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の作成も行う。最終的にこのようなマウスに、種々の変異を入れた HBV、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 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、HBV 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1③)

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1④)

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。

iPS 細胞を用いた肝臓と免疫系のヒト細胞再構成 (図1⑤)

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。

なお、遺伝子組み換えウイルス作成実験に該当する実験は、文部科学大臣の拡散防止措置の確認の受けたうえで、各研究実施機関の遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行っている。また、その他の遺伝子組み換え実験も、各研究実施機関の遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行っている。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究は、各研究実施機関において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ている。すべての動物実験は、各研究実施機関の動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行っている。

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、

NOG マウス (T、B、NK 細胞欠損) にハイドロダイナミック法にて投与したところ、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 NOG マウスでは遷延化した。Genotype 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のに対して、Genotype C の HBV を発現させた NOG マウスでは血中ウイルス量は低く、約 3 か月で検出感度以下となった。このことから、HBV ゲノタイプの違いによる免疫担当細胞非依存的な HBV 排除機構が存在することが示唆された

マウス免疫系のヒト化

NOG-MHC class I/class II KO マウスにヒト PBMC 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。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、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 抗体価の上昇がみられた。また、ハイドロダイナミック法による HBV の発現により、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。ヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を hIL-3/hGM-CSF Tg-NOG マウスに移植すると、ヒト血液細胞の生着が良好に得られ、NK 細胞、T 細胞、B 細胞、単球への分化を認めた。

新生児型ヒト肝細胞キメラマウスの作成

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-Tg マウス由来の初代培養肝細胞もしくはヒト初代培養肝細胞を投与した。生下時において、いずれのマウスでも投与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 マウスでは生後 6 週の時点においても投与細胞の生着を確認した。Mcl-1 KO (C57BL 系統) マウスを免疫不全化するため、スピードコンジエニック法による NOG マウスへの戻し交配を行った。

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 A、Genotype C の患者血清を投与することにより、1~2 週間でウイルス血症が出現し、高効率な持続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した。NTCP siRNA を投与すると、ヒト肝細胞の NTCP 発現が低下した。このようなマウスでは HBV 接種後のウイルス量が低下することが示された。

iPS 細胞を用いた検討

ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を TK-NOG マウスへ経脾臓的に肝臓に移植した。アルブミン濃度は 2-4 mg/ml に達し、良好な生着を確認した。またこの作成したキメラマウスに HBV を投与すると血中 HBV-DNA 及び肝組織中 cccDNA を検出し、感染が成立したと考えられた。

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。また、ヒト iPS 細胞から血液細胞の前駆細胞であるヘマンジオブラスト細胞を効率よく分化誘導できる培養システムを開発した。このヘマンジオブラスト細胞は、赤血球・好中球など各種血液細胞へ分化した。

D. 考察と結論

図1に示す5つのステップについて3年度において所期の計画を達成した。来年度以降、1) ヒト末梢血単核球、造血幹細胞を用いたマウス免疫系のヒト化についてさらに解析する、2) TK-NOG マウスを用いたB型肝炎モデルについて、HLA が部分的に一致した免疫系のヒト化を行い、B型肝炎に対するヒト免疫応答を解析する、3) 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、4) 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、5) 胎児期細胞移植法による肝細胞キメラマウスのキメラ率の向上を図る、6) iPS細胞から樹立した肝細胞をTK-NOGマウスへ移植し、キメラマウスのHBV感染性についてさらに解析する、7) 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。

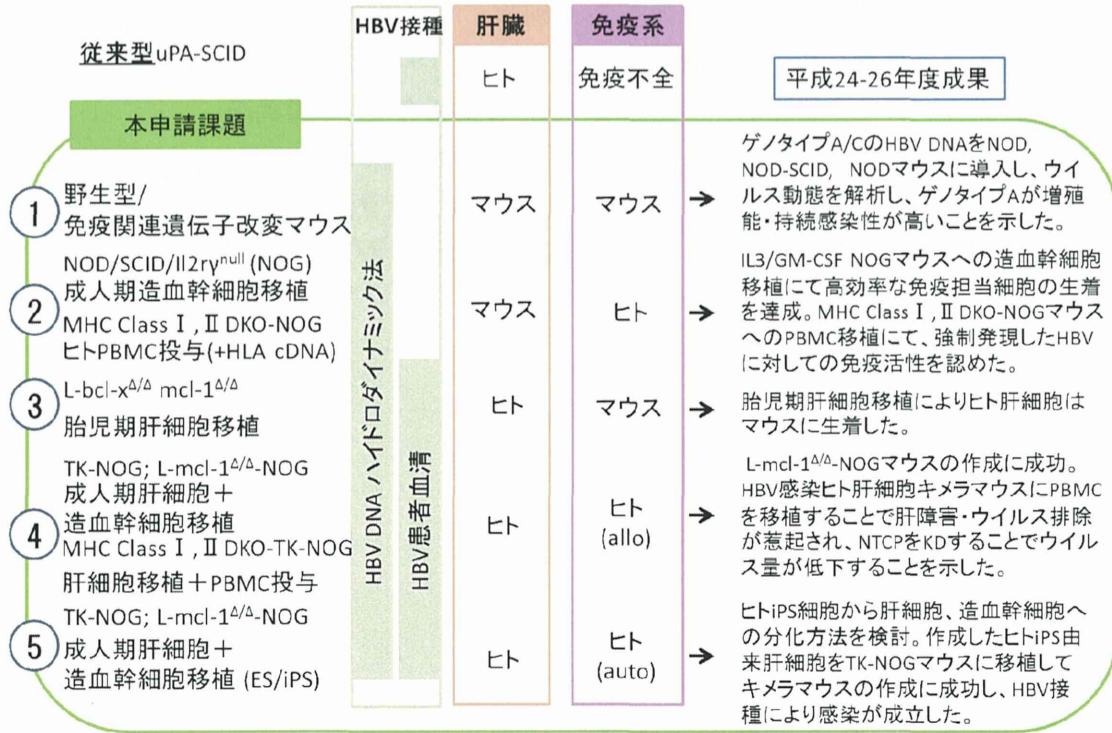
E. 健康危険情報
特記事項なし

F. 研究発表
別添

G. 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

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、NOGマウスと同様T細胞を主としたヒト免疫細胞への置換率を保持したまま、GVHDに伴う肝障害を認めなかった。B細胞や樹状細胞も投与後29日目でも残存していた。またDKO-NOGマウスで生着するT細胞は投与後15日目の時点でNOGマウスのT細胞に比し、疲弊マーカーの発現が軽減されていた。DKO-NOG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PBMCを投与したDKO-NOGマウスに活性化樹状細胞にHBcペプチドを添加して投与すると、HBc特異的CTLの誘導を認めた。またhydrodynamic法によってHBVを強制発現した免疫ヒト化DKO-NOGマウスでも、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・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/Il2r 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、Day15のT細胞の疲弊マーカーの発現の解析を行った。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抗体価を継時的に測定し、さらにワクチン投与後2週間後の形質細胞マーカー (CD138) の発現をフローサイトメトリーにて検出した。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HBVワクチン投与によるday15の脾臓由来humanCD45陽性細胞中のCD138発現細胞の割合はワクチン非投与群に比し有意に高値であった。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

2. 学会発表

1. Aono S, Tatsumi T, Tawara S, Ohnishi Y, Nishio A, Kegasawa T, Takigawa A, Hikita H, Sakamori R, Miyagi T, Hiramatsu N, Suemizu H, Takahashi T, Takehara T. Induction of hepatitis B virus-specific immune responses in immunologically humanized mice. AASLD 65th Boston, Hepatology 60: 1016 A, 1698, 2014 Nov, 11 (Nov.

7-11) ポスター

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

なし

3. その他

なし

マウスにおけるB型肝炎ウイルスの感染と増殖

研究分担者	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
研究協力者	名和 敏誉	大阪大学大学院医学系研究科	リサーチレジデント	
研究協力者	田中 聡司	大阪大学大学院医学系研究科	消化器内科学	大学院生
研究協力者	横山 恵信	大阪大学大学院医学系研究科	消化器内科学	大学院生
研究協力者	齋藤 義修	大阪大学大学院医学系研究科	消化器内科学	大学院生
研究協力者	中堀 輔	大阪大学大学院医学系研究科	消化器内科学	大学院生
研究協力者	甲斐 優吾	大阪大学大学院医学系研究科	消化器内科学	大学院生

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、次の3つの方法でアプローチを行った。①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。②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。③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、続いて HLA が一致したヒト末梢血単核球を移植して免疫再構築をする方法。1つ目の検討から、免疫能の保たれているマウスではウイルス血症は一過性であったが、B・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、NK細胞も欠損した 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のに対して、ゲノタイプ C の HBV を発現させた NOG マウスでは約3か月で検出感度以下となった。これらから、HBV の排除に免疫担当細胞依存的機構だけでなく非依存的機構の存在が示唆された。2つ目の検討から、胎児期細胞移植直後の生着には移植肝細胞による肝梗塞が、その後の長期生着には持続的な肝障害が重要であることが示唆された。今後の肝障害制御による生着向上により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つ目の検討から、ヒト肝細胞キメラマウスには患者血清由来の HBV の接種により持続感染が成立したが、ウイルス接種前にヒト NTCP を発現抑制すると、血中のウイルス量や HB s 抗原量が低下することが明らかとなった。このことからキメラマウスの HBV 感染にヒト NTCP 発現が重要であることが示唆された。また、HLA の一致したヒト末梢血単核球を移植する目標のために、iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いてヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスを作成した。このキメラマウスも HBV 接種により HBV は感染し、今後このマウスに HLA の一致した PBMC を移植することで、HBV 感染肝細胞と末梢血単核球との相互関係の解析が可能な、次世代型 B型肝炎ウイルスマウスモデルが作成できると考えられた。

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。そのためには個体レベルでの研究を行う必要があり、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

新規 HBV 増殖・感染マウスモデルの確立にむけて以下の3つの方法で研究を行った。

①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。この方法のために、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。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、卵黄囊静脈より CAG-GFP トランスジェニックマウスの初代培養肝細胞もしくはヒト初代培養肝細胞を $1-5 \times 10^4$ 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。また、その後 6 週齢まで飼育し、生体における生着を検討した。

③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、続いて HLA が一致したヒト末梢血単核球を移植して免疫再構築をする方法。この方法のためにまず、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV 接種による感染の成立を確認した。次に、免疫系の再構築にはヒト肝細胞 HLA の一致した末梢血単核球を投与する必要がある。分担研究員の水口らがすでに末梢血単核球から iPS を誘導すること、iPS から肝細胞に分化誘導させることに成功している。そこで、iPS から誘導した肝細胞を用いて、ヒト肝細胞キメラマウスが作成できれば、HLA の一致した末梢血単核球の導入が可能となる。そのため今年度はヒト免疫不全マウス 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 iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を移植することで、キメラマウスの作成が可能か、また作成したキメラマウスに HBV が感染するか検討を行った。

遺伝子組み換えウイルス作成実験に該当する実験は、文部科学大臣の拡散防止措置の確認の受けたうえで、大阪大学遺伝子組

換え安全委員会の承認のもと行った。その他の遺伝子組み換え実験は、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。

(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もしくは大歳亜大学医学部倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得た上で行った。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 日目ですべて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。一方ゲノタイプ 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のに対して、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は低く、約 3 か月で検出感度以下となった。このことから、HBV ゲノタイプの違いによる免疫担当細胞非依存的な HBV 排除機構が存在することが示唆された。

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囊静脈からの肝細胞投与で、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囊静脈より 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。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。この梗塞像はヒト初代培養肝細胞を投与した野生型マウスや肝障害持続マウスでも認められた。しかし、肝細胞欠損マウスでは肝梗塞像は認めなかった。このため、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。次に生後 6 週齢の時点で解析したところ、野生型マウスでは移植細胞の生着を認めなかったが、肝障害持続マウスでわずかながたに移植肝細胞の生着を認めた。このことから、移植細胞の持続生

着には肝障害の持続が重要であることが示唆された。

最後に TK-NOG マウスを用いた実験として、ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスに、ゲノタイプ A、ゲノタイプ C の患者血清を接種した。接種後 1-2 週間で血中に HBV-DNA を検出し、その後ウイルス量は 8-12 週にかけて徐々に増加した後プラトーに達し、持続的な感染が成立した。HBV の肝細胞側のレセプターとして報告されているヒト NTCP を HBV の投与前に siRNA にて発現抑制させると、移植されたヒト肝細胞における NTCP の発現は低下し、血中ウイルス量、HB s 抗原量も有意に低下した。また、TK-NOG マウスにヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を経脾臓的に肝臓に移植した。移植後ヒトアルブミン濃度は 2-4 mg/ml に達し、TK-NGO マウスへの iPS 細胞由来分化誘導肝細胞良好な生着を確認した。またこの作成したキメラマウスに HBV を投与すると血中 HBV-DNA 及び肝組織中 cccDNA を検出し、感染が成立したと考えられた。

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 の排除に免疫担当細胞依存的な部分と非依存的な部分があることを明らかにした。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細胞内免疫応答シグナルや、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免疫機能の保たれたマウスでも肝細胞は生着可能であった。胎児期の移植細胞の生着には、肝梗塞を惹起することが、長期にわたる生着には肝障害の持続が重要であると考えられた。

今後は、肝障害の効果的な誘導により長期の生着効率を改善させることで、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。

TK-NOG マウスを用いた実験では、ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスでは HBV が感染し、ヒト NTCP の発現が重要であることが明らかとなった。またヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いたヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスの作成に成功し、HBV の感染も確認できた。今後このマウスに HLA の一致した PBMC を移植することで、HBV 感染肝細胞と末梢血単核球との相互関係の解析が可能な、次世代型 B 型肝炎ウイルスマウスモデルが作成できると考える。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Shimizu S, Sakamori R, Miyagi T, Wada H, Nagano H, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* (in press)

2. 学会発表

5月29-30日 第50回日本肝臓学会総会
ホテルニューオータニ

「B型肝炎ウイルス genotype による宿主免疫応答における差異とその機序に関する基礎的検討」5月29日