

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)
分担研究報告書 (平成26年度)

抗 HBV 免疫応答を惹起する新規肝炎モデルマウスの開発、*in vitro* HBV 感染系の樹立

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 講師

研究要旨：

HBV感染により惹起される多様な免疫応答が、B型肝炎の病態形成や治療効果に深く関与していることが知られている。本研究課題では、薬剤誘導性に肝細胞特異的にHBV ウィルス抗原を発現する新しい遺伝子改変マウスを作成し、ヒト肝炎病態を模倣した免疫応答の詳細な解析を進めている。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析からは、HBs抗原タンパクを肝細胞特異的に発現させた成体マウスの肝組織では、さまざまなサイトカイン関連遺伝子の発現変化が顕著に生じていることが確認された。また*in vitro* HBV感染モデルとして、TALEN/CRSPRを用いた遺伝子破壊技術を活用し、肝培養細胞においてDNAウィルス感染センサー分子のノックアウトを行い、新しいHBV感染細胞系の樹立を進めた。

A. 研究目的

B型肝炎ウィルス(HBV)感染者には、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、無症候性キャリアと、きわめて多様な臨床病像が生じることが知られている。こうしたHBV感染による多様な病態の形成には、ウィルスが感染した肝細胞に対する免疫応答が中心的な役割を果たしている。加えて、インターフェロンや核酸アナログ製剤によるHBVに対する抗ウィルス療法に際しても、背景に存在する免疫系の応答機構の理解が、HBs抗原の消失などの臨床的治癒状態を達成するための必須条件となる。したがって、HBV治療における新しい創薬ターゲットを探求するためには、HBVにより惹起される多様な免疫応答を模倣した*in vivo*モデルの樹立が急務である。しかしながら、幼

少時にHBV感染したヒトの場合には無症候性キャリアとなるのと同様に、モデルマウスにおいても胎児期にわずかでもHBV抗原提示が存在すると免疫寛容状態となってしまう、肝炎を発症しないことが知られている。このため、薬剤誘導性に成人期にHBV抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスがひとつのモデル候補となりうる。しかしながら、HBVは自らのゲノム中にpromoterやenhancerモチーフを有していることから、胎児期から完全にウィルス抗原タンパクの発現を抑止したモデルの構築がきわめて困難である。そこで、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用により内在性ウィルスpromoter配列を含まな

い HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスを作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、肝炎としての免疫応答の惹起が可能なB型肝炎モデルマウスの新規開発を目指すことを本研究課題の目的とする。

一方、DNA ウィルスである HBV が肝細胞に感染する際に、宿主側因子にどのように認識され、どのように抗ウイルス免疫応答が誘導されているかについては不明な点が多い。近年、DNA ウィルス感染時の自然免疫系による細胞内センサーとして、STING-cGAS 経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。DNA センサーである環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS)からの STING の活性化を介してウイルス DNA が認識されることにより、I 型インターフェロンが誘導され、抗ウイルス応答が作動することがわかってきた。しかしながら、HBV が肝細胞に感染した際に、HBV DNA がどのようにして宿主因子に認識され、抗ウイルス応答が誘導されているかについては不明なままである。感染した肝細胞からのウイルスの完全排除を達成するためには、十分な免疫応答の乏しい慢性感染持続状態においても HBV 感染時のセンサー機構を活性化することが、新しい抗 HBV 制御機構につながるものと期待される。そこで、これらの細胞内センサー遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築して HBV 感染感受性を検証することにより、HBV 制御の分子機構を明らかにすることにした。この目的を達成するために、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グ

ループとの共同開発により、TALEN ならびに CRISPR system を用いた新しい遺伝子破壊技術による *in vitro* ノックアウト肝培養細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスとしては、Albumin(Alb)-Cre-ERT2 マウスを活用した。マウス作成のためのコンストラクトとしては、Cre を誘導可能にするために、estrogen 受容体部分に点突然変異を複数導入し、内在性 estrogen に反応せず、tamoxifen に反応する性質を持った変異型 estrogen 受容体 (ERT2)と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したコンストラクトを作成した。また、薬剤誘導前の微量 Cre タンパク質のリークの可能性が否定できないため、非誘導時には Cre 産生が全く生じていない既存の薬剤誘導性 Cre マウスとして、Mx1-Cre マウスも併用して解析を進めることとした。

他方、Cre による LoxP の組換え作用により promoter 配列を含まない HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためには、CAG promoter 下流に loxP で挟んだ緑色蛍光タンパク(GFP)を置き、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したコンストラクトを作成した。すなわち、Cre の存在しない状況ではマーカー分子としての GFP を発現し、Cre の存在下では LoxP の組換え作用によって HBs 抗原を発現することが期待できる構造としている。このコンストラク

トのマウス胚への injection を実施し、目的とする遺伝子改変を達成した F0 マウスを最終的に合計 3 ライン確保した。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

近年、DNA ウィルス感染のセンサー分子として同定された STING, cGAS に着目し、これらの遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築することによる新しい *in vitro* HBV 感染モデルの作成を行った。標的遺伝子のノックアウト技術として、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グループが専門とする人工ヌクレアーゼのひとつである TALEN 技術を用いるとともに、CRSPR/Cas9 system も同時進行で活用することとし、共同研究を開始した。植物病原細菌キサントモナス属がもつ TALE を DNA 結合ドメインとして利用した TALEN では、TALE は約 34 アミノ酸からなるほぼ完全な繰り返し構造からなっている。そのうちの 12,13 番目のアミノ酸の違いが DNA 塩基認識特異性を決定することから、STING, cGAS それぞれに対応するユニットの作成を行った。また、STING, cGAS に特異的な認識配列を有する CRSPR を搭載したレンチウィルスベクターを作成し、HepG2 細胞への導入効率と遺伝子破壊効率を検証した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

Cre による LoxP の組換え作用により HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス(HBsAg-flox マウス)と、誘導型 Cre

発現マウス(Alb-Cre-ERT2 マウス、Mx1-Cre マウス)を交配することにより、薬剤誘導性に HBs 抗原を発現する 2 種類のモデルマウスを樹立した。うち、先行する数ラインからの F1 マウスを用いて、薬剤誘導性に GFP 発現の消失すること、それと同時に血中に HBs 抗原タンパク質が発現・分泌されることを確認した。しかしながら、薬剤誘導 1 週間、2 週間後のマウス肝組織には有意な炎症細胞浸潤が認められなかったことから、顕在性の肝炎としての免疫応答は乏しい可能性が示唆された。しかしながら、同じ肝組織から抽出した RNA を用いた Real-time-RT PCR 解析からは、薬剤誘導によりインターフェロン下流遺伝子の発現が誘導されていることが確認できたため、少なくとも HBs 抗原への免疫応答は惹起されているものと推定された。そこで、Alb-Cre-ERT2 X HBsAg-flox 交配マウスの HBs 抗原発現後の肝組織中の遺伝子発現プロファイルを Agilent 社の SurePrint Mouse gene expression (8X60K)によるマイクロアレイ解析を実施した。興味深いことに、HBs 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現させた成体マウスの肝組織では、さまざまなサイトカイン関連遺伝子の発現変化が顕著に生じていることが確認された。中でも、IFN-lambda 受容体 1、Pin1、IL-17 受容体遺伝子の発現上昇が惹起されていることがわかった。すなわち、HBV 急性感染時の初期免疫応答として、IFN-lambda シグナル経路などが活性化されている可能性が示唆された。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

STING, cGAS それぞれに特異的な TALE ユニットならびに CRSPR の設計を行い、それぞれ TALEN 発現ベクターと CRSPR 導入用レンチウイルスベクターを作成した。TALEN はリポフェクションにより HepG2 細胞に導入し、puromycin でのセレクションを行った。TALEN 導入を行った homo-knockout 細胞では、標的遺伝子の完全破壊が十分に達成できていない可能性が、その後の real-time 定量 PCR の結果から示唆された。これに対して、CRSPR 導入細胞では、高率に cGAS, STING 遺伝子破壊が達成できていることが、標的遺伝子領域の target sequence ならびに real-time 定量 PCR から確認できたため、CRSPR 導入細胞を用いて HBV 感染実験を行った。CRSPR 発現レンチウイルスベクターの HepG2 細胞への導入後に、B 型慢性肝炎症例から採取した HBV 陽性血清を培地に添加し、1 週間後に細胞回収を行ったところ、cGAS ノックアウト細胞では有意に細胞中の HBV 複製中間体量が上昇していることが明らかとなった。これに対して、STING ノックアウト細胞では、コントロール細胞と比較して、HBV 陽性血清の添加による細胞内 HBV 複製中間体量の変化は認められなかった。

D. 考察

薬剤誘導性に任意の時期に HBV 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成することにより、ヒト B 型肝炎病態を模倣した新しい B 型肝炎モデル動物の構築を目指すことを本研究

課題の目標としている。肝細胞への HBs 抗原発現により病理学的な肝炎像は確認することが困難であったが、HBV に対する自然免疫応答を模倣したサイトカイン発現変動が HBs 抗原発現肝組織で認められたため、モデルマウスの表現型としては一定の成果を得ることが出来たものと考えられる。今後は、HBs 抗原発現前にあらかじめ HBV 抗原蛋白により免疫を付加しておくことにより、ウイルスに対する獲得免疫応答の解析も進めていく方針としている。同時に、*in vitro* において培養細胞を用いた HBV 感染系を樹立することにより、薬剤スクリーニングに際して異なる genotype やさまざまな変異ウイルスを含んだ血清検体を感染実験に簡便に試用することを目指していく。

E. 結論

肝炎としての免疫応答の惹起が可能な B 型肝炎モデルマウスの新規開発を目指し、薬剤誘導性に肝細胞特異的に HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスを作成し、HBV に対する自然免疫応答の解析を開始した。また、*in vitro* HBV 感染モデルの樹立をめざし、TALEN/CRSPR を用いた DNA ウィルスセンサー分子の特異的な遺伝子破壊を行った肝培養細胞の樹立を継続していく。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. *J Hepatology*. 2014. 61: 492-501.
- 2) Inuzuka T, Takahashi K, Chiba T, Marusawa H: Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions. *Pathogens*. 2014. 3: 377-389.
- 3) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014. 146(1): 222-232.

2 . 学会発表

- (1) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. The viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2015.3.12-15, Istanbul.
- (2) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H.

Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 11th JSH Single Topic Conferences. 2014.11.20, Hiroshima.

- (3) 犬塚義、上田佳秀、千葉勉、丸澤宏之. B 型肝炎ウイルス再活性化の早期発見と核酸アナログ早期治療の有用性. 第 102 回日本消化器病学会近畿支部例会. 2015.2.21 京都
- (4) 犬塚義、丸澤宏之、上田佳秀、千葉勉. 化学療法・免疫抑制療法により惹起される HBV 再活性化例の臨床像とウイルス学的特徴. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会 2014.5.7-9 山梨
- (5) 犬塚義、上田佳秀、千葉勉、丸澤宏之. 化学療法・免疫抑制療法により再活性化する HBV のウイルスゲノム解析. 第 10 回 広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム 2014.7.5 広島

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし