

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)

トランスジェニックマウスを用いた B型肝炎の免疫機構の解析

研究分担者 阿部 弘美 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授

研究要旨

我々は昨年度、NOG-scid, NOD-scid を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎ウイルス感染モデルを作製し論文として発表した (Kosaka et al., BBRC, 2013)。この改良型モデルマウスに重症 B 型肝炎急性肝炎治癒後の患者から得られたヒト末梢血単核球を投与した結果、肝組織中へのリンパ球浸潤、HBV 感染肝細胞の細胞死、血清中の ALT 上昇、Granzyme A や IFN- γ レベルの上昇が認められた。また、肝臓内には HBV 特異的な CTL が検出され、本モデルは HBV 特異的 CTL による HBV 感染肝細胞死が誘導されたヒト劇症肝炎モデルであると考えられた。また、HBs 抗原は陰性化し、HBs 抗体が陽性となった。さらに T 細胞を標的とした薬剤である CTLA4Ig を用いて T 細胞の活性化を抑制することで HBV 感染肝細胞の傷害が抑制できるか検討を行った結果、HBV 感染肝細胞死は阻害された。CTLA4 はリウマチに安全に使用されている薬剤であることから、B 型重症肝炎の治療として使用できる可能性が示された。また、肝炎モデルは細胞障害性 T 細胞を利用した B 型肝炎ウイルスの排除を行う上での安全策などに利用可能であり、幅広い応用研究が可能である可能性があると考えられる。

A. 研究目的

肝炎モデルを改良しヒト肝炎をマウス内で再現する慢性 B 型肝炎モデルを作製し、HBV 感染細胞の排除機構、cccDNA の排除、HBV 粒子分泌抑制、HBV 蛋白に対する抗体産生促進などに関与する因子の探索を目的とする。

B. 研究方法

重傷免疫不全である NOG マウスに thymidine kinase 遺伝子を transgene した TK-NOG マウスにガンシクロビルを投与することによりマウス肝細胞を傷害し、形成されるニッチを利用してヒト肝細胞を増殖させることができるマウスモデルを用いてヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスに HBV 感染患者由来の血清を用いて HBV 感染させた。HBV DNA 量がプラトーに達した HBV 接種 8 週後に、B 型肝炎急性重症肝炎治癒後の患者から得られたヒト末梢血単核球 (PBMC) を比重遠心法にて分離し、腹腔経由で移

入した。PBMC 移入 2 週後にマウス肝組織および肝灌流液中のヒト PBMC の表現型をフローサイトメーターにて解析した。また血清中の ALT レベル、各種サイトカインレベル、HBs 抗原、抗体、HBV DNA の定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に関わる動物実験は、広島大学動物実験倫理審査委員会の承認を得ている。またヒト血球の使用に関しても臨床研究の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

HBV 感染させたマウスに PBMC 移入 2 週間後、血清中ヒトアルブミン値、ALT を調べたところ PBMC を移入しなかったコントロールマウスに比較して ALT は有意に上昇、ヒトアルブミン値は有意に減少した。HBV を感染させたマウスと感染させていないマウスに PBMC を移入した実験では HBV 感染マウスで生

着率が有意に高率であった。またPBMCを移入したマウスでは有意にHBV DNAレベルが低下していた。さらに、組織学的検討では、PBMC移入マウスでは肝臓内へのリンパ球の集簇が認められ、肝細胞の細胞死も認められた。これらのことから移入したヒトPBMCによってHBV感染肝細胞を傷害しHBV DNA量が低下したと考えられた。次に、血清中の各種サイトカインの産生レベルを調べたところPBMC移入マウスではコントロールマウスに比較して有意にGranzyme A、IFN- γ レベルが上昇していた。さらに本モデルマウスにおけるGranzyme A、IFN- γ 産生細胞は何か調べるためにフローサイトメトリーにより肝臓内に浸潤したリンパ球の表現型を検討した。その結果、HBV感染マウスでは非感染マウスに比較してヒトPBMCの生着率が2.6倍程度上昇しており、またPBMC移入マウスでのみCD8陽性、テトラマー陽性のHBV特異的CTLが検出された。これらのことから本モデルにおける肝障害はHBV特異的CTLが主役であると考えられた。そこで、有効な治療法が確立していないB型劇症肝炎に対する有効な治療法していないためT細胞を標的とした薬剤であるCTLA4Igを用いてT細胞の活性化を抑制することでHBV感染肝細胞の傷害が抑制できるか否かについて検討を行った。PBMC移入前にCTLA4Igを投与したところヒトアルブミン値の減少やHBV DNA量の減少は認められずCTLA4IgによってHBV感染肝細胞の傷害が阻害された。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスにB型急性重症肝炎治癒後の患者から得られたPBMCを移入することで、HBV特異的なCTLによるヒトの劇症肝炎を再現するモデルを作製した。

E. 結論

本モデルマウスにより免疫学的機序によるウイルス排除によるHBVの持続感染から治癒を目指す治療を開発することが可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes

CN, Chayama K. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat.* 21: e89-97. 2014.

2. Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K, Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther.* 2014; in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

提出中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし