

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業  
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究  
分担研究報告書

B型肝炎ウイルスの急速な増殖による肝細胞壊死

研究協力者 茶山 一彰 広島大学 教授

研究要旨: B型肝炎ウイルスは細胞障害性がないとされている。今回当研究協力者は、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、B型肝炎ウイルスにより広範な肝細胞壊死が生じることを明らかにした。Precore, core promoter に変異を有するウイルスは増殖能力が高いことが知られているが、このウイルスが肝細胞内で急速に増殖した場合、HBs抗原が小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスを介した肝細胞の apoptosis をもたらすことを明らかにした。この時、肝細胞が広範に死滅するにも拘わらず、ALT があまり上昇しなかった。この現象は免疫抑制剤による HBV の再活性化の状況に極めて類似しており、再活性化による急性肝不全の予防や治療を考える上で重要な情報を提供するものと考えられた。

A. 研究目的

本研究協力者はヒト肝細胞キメラマウスに様々な HBV を感染させる実験を行っている際に、急速なウイルスの増加後に、ヒトアルブミンの急速な減少を伴う HBV DNA の減少が起きる strain が存在することに気づいた。そこで、この現象の原因を明らかにし、臨床病態との関連を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスに患者由来の HBV 感染血清を静脈内投与した。Wild type, precore/core promoter の有無別にマウス血清中のヒトアルブミン、HBV DNA を測定した。また、ヒト肝細胞キメラマウス由来のヒト肝細胞の初代培養を行い、同様に in vitro における感染実験を実施した。マウス肝内に置いて起きる変化を組織学的に、また電子顕微鏡を用いて解析した。さらに、肝内の遺伝子の発現状況を RNA sequencing により解析した。また、

wild type、pre-core mutation、core promoter mutation のいずれかあるいは両方を導入した over length の plasmid を作製し、これを hepG2 細胞に導入することによりウイルス粒子を作製してヒト肝細胞キメラマウスに投与することにより、変異の影響を解析した。

C. 研究結果

野生型、変異型 (pre-core, core promoter とも変異あり) のウイルスを感染させた結果を図 1 に示した。

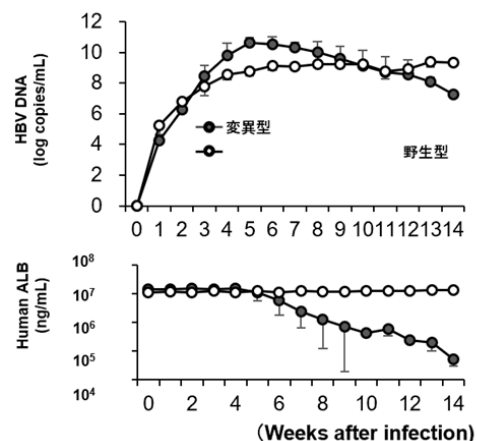


図 1、症例A、野生型○と症例B、変異型●感染後のHBV DNA(上)とヒトアルブミン(下)の変動。

野生型ではHBV DNAは8 log copies/ml程度でplateauに達し、その値が長期間継続した。これに対して変異株では感染5週目あたりで10.0 log copies/mlと高度に増加し、その後ヒトアルブミン、HBV DNAとも低下に転じた。これらのマウスのhuman ALTとHBsAgの変動を図2に示した。hALTは野生型ウイルスの感染したマウスでは週齢が進むにつれて緩やかに上昇したが、変異型のウイルスが感染したマウスではアルブミンの低下が始まる4週目あたりでピークとなるALTの上昇が認められた。しかし、この上昇は200U/L程度であり、以前我々が作製した劇症肝炎モデルでは1,000U/L以上に上昇していたのは大きく

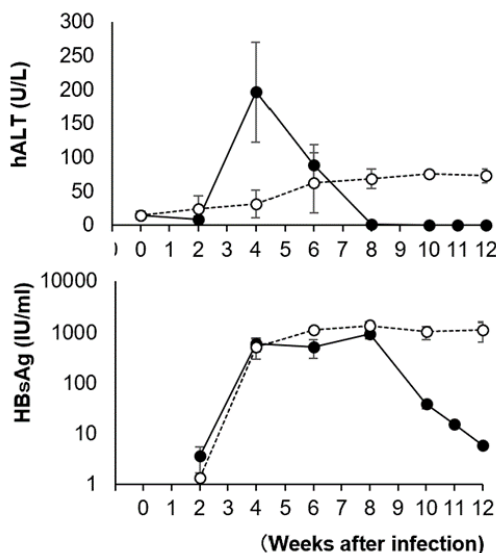


図2、症例A、野生型○と症例B、変異型●感染後のhuman ALT(上)とHBs抗原(下)の変動。

異なっていた。このことは肝炎の炎症による肝細胞の破壊と、本実験で示されたHBVによる直接の肝細胞障害との間には、大きな差異があることが考えられた。これらのマウスの肝組織を組織学的に解析したところ、図3に示すように、野生型のHBVが感染したマウスでは、ヒト肝細胞が保たれ、ほぼ全ての肝細胞にHBVが感染した状態であることが示された。一方変異型のウイルスが感染したマウスでは14週目にはヒトア

ルブミンが染色される細胞はほとんど存在しなくなり、HBc抗体で染色される感染細胞もほぼ完全に消失していた。

これらの肝細胞の消失がapoptosisによるものかどうかを解析するために、terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assayを行ったところ、陽性細胞が認められ、これらの細胞死がapoptosisによるものであることが確認された。電子顕微鏡による観察でも、同様にapoptosisの所見が認められた。

この特徴的なHBV DNAとアルブミンの減

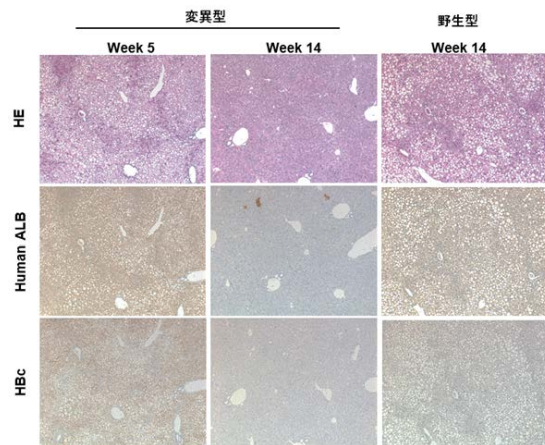


図3、変異型、野生型マウスの肝臓の組織学的解析

少がこの症例Aに感染しているHBVに特異的なものであるか否かを証明するために、eAgが陰性であった3症例、症例C, D, Eから得られた血清を投与したマウスの経過を

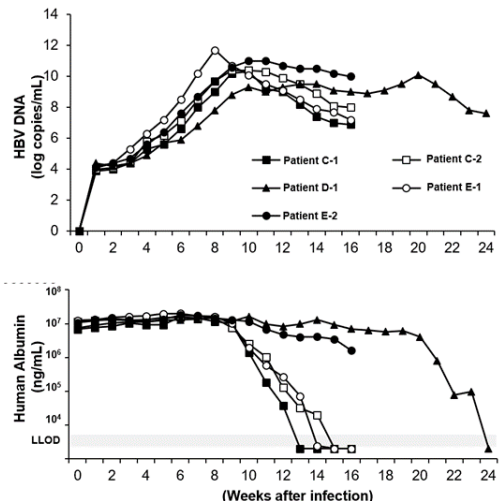


図4、eAg陰性の3症例、症例C、D、Eの血清投与による感染後のHBV DNA(上)とヒトアルブミン(下)の変動。

図4に示す。4例とも、多少の時期のずれはあったものの、高度のHBV DNAの上昇と、その後のヒトアルブミンの減少、HBV DNAの減少が認められ、この現象が症例特異的でなく、eAg陰性の症例に共通のものであることが想定された。なお、これらの症例は全て genotype Cの慢性肝炎の症例であり、特に通常の慢性肝炎の経過と変わらないものであった。

これら、野生株と変異株のウイルス感染の肝細胞障害の差異が In vitro でも同様に認められるかを解析するために、ヒト肝細胞キメラマウスから得られたヒト肝細胞を使用して、初代培養肝細胞を作製し、感染実験を行ったところ、in vivo の実験と同様に、HBV DNAの高度の増加とアルブミン産生の低下が認められた。蛍光免疫染色では変異型ウイルスの感染した肝臓で高度のHBs抗原の集積が認められ、小胞体との共局在が認められた。

#### D. 考察

HBVに感染した症例で、年齢の若いキャリアでは肝障害が起きず、ウイルス量が多いことから、HBV そのものには肝細胞障害がないものと考えられている。我々はこれまで、ヒト肝細胞キメラマウスを使用して、HBVの感染実験を多数行ってきた。この中で、たまたま eAg 陰性の症例を投与したマウスで、急速なウイルスの減少とヒトアルブミンの減少が認められたことから、本研究を行うことを発想した。ヒト肝細胞キメラマウスは scid がベースのマウスであり、T細胞、B細胞は存在しない。このため通常のB型肝炎でみられるような細胞障害性T細胞による肝障害は起きないことが想定される。以前本研究協力者はNK細胞による劇症肝炎モデルを作製し、報告したが、これはヒトNK細胞を移入することにより引

き起こされたものである。従って、本研究の対象とした急速な肝細胞障害と、ヒトアルブミン低下の現象には、通常の肝炎では見られない事象が起きていることが想定された。Tunel染色で陽性の肝細胞が生じることが証明されたことから、この肝細胞死が apoptosis によるものであることが明らかになった。RNA sequence による解析でも小胞体ストレスに関連した遺伝子の発現の変化が認められたことから、この肝細胞死が apoptosis により消失したものであることが確認された。

このモデルで特徴的であったことは、ALTの上昇が極めて軽度であったことである。我々が以前作製して報告したCTLによる肝障害のモデルでは1,000程度まで上昇していたことから、肝細胞障害のメカニズムが異なり、apoptosisによる肝障害ではALTがあまり上昇しないのが特徴であることが示唆された。

このことは、臨床的に二つの重要なポイントを示唆している。一つは、劇症肝炎や免疫抑制剤によるHBVの高度増殖による肝障害ではALTがあまり上昇しないことから、特にHBs抗原が高値の症例においては、ALTの上昇の程度が肝障害の程度と関係がなく、ALTが低いからといって、高度の肝不全に陥るリスクが十分にあるということである。

もう一つの重要なポイントはこのような肝障害が起きた場合には、ALTの上昇が軽度にもかかわらず肝細胞の再生が間に合わず、致命的な経過を取ってしまうことから、このことを勘案した新規治療を考案する必要があることである。これは現在の治療では不可能であるが、将来的に高い抗ウイルス効果(核酸アナログのように効果の発現が遅かったり、IFNのように抗ウイルス効果が弱いものでなく)のある薬物の開発と

早期使用をするという観点からの治療を考案する必要があることである。本研究で示された、ALTの上昇の少ない、HBVの高度な増殖による、急速に進行する肝不全の存在を念頭に置いた治療が開発されることが望まれる。

replication phenotype and causes ER stress-mediated cell death in humanized liver chimeric mice. International HBV meeting, 2023/9/22.

## E. 結論

HBVの急速な高度増殖によるHBs抗原の肝細胞内への蓄積は、massiveな肝細胞壊死を来すことを明らかにした。大量に産生されたHBs抗原の小胞体への蓄積によるapoptosisが肝障害を来す要因となっており、ALTの上昇が少ないことが示され、このような肝細胞死に対する治療の開発の必要性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Uchida T, Imamura M, Hayes CN, Suehiro Y, Teraoka Y, Ohya K, Aikata H, Abe-Chayama H, Ishida Y, Tateno C, Hara Y, Hino K, Okamoto T, Matsuura Y, Aizaki H, Wake K, Kohara M, Liang TJ, Oka S, **Chayama K**, HBV with precore and basal core promoter mutations exhibits a high replication phenotype and causes ER stress-mediated cell death in humanized liver chimeric mice. *Hepatology*, 78(3), 929-942, 2023.

### 2. 学会発表

Takuro Uchida, Yuji Ishida, Chise Tateno, Hideki Aizaki, T. Jake Liang, **Kazuaki Chayama**, Shiro Oka, Kazunari Murakami, HBV with precore and basal core promoter mutations exhibits a high