

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09003

研究課題名(和文) B型肝炎モデルマウスを作製し、急性重症肝炎に対する新規治療薬を探索する

研究課題名(英文) The search of the drug for the acute severe HBV hepatitis using animal model

研究代表者

平賀 伸彦 (Hiraga, Nobuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：50625978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルスHBVに新規に感染している患者は全国で年間10000人と推定されるが、急性B型肝炎に対する治療法が確立していない。本研究では、HBV感染マウスおよびHBV肝炎マウスを用いて、既存の薬剤を候補として急性B型肝炎に対する有用性を検討した。本研究によってインターフェロンと核酸アナログの併用投与によって早期にウイルス陰性化が得られること、中和抗体であるHBsヒト免疫グロブリンによってHBs抗原の陰性化が得られること、CTLA4Igによる肝炎重症化の抑制が得られた。これらの結果より既存の薬剤を用いて急性B型肝炎に対する治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The treatment for acute infection of hepatitis B virus is to control the host immune response and the exclusion of intracellular cccDNA in HBV-infected hepatocytes. The covalently closed circular DNA (cccDNA) forms a stable minichromosome in the nuclei of HBV infected hepatocytes in spite of acute HBV. We established an animal model of fulminant hepatitis caused by HBV infection using human hepatocyte chimeric TK-NOG mice transplanted human peripheral blood monocytes (PBMCs). We found that 1) interferon and nucleotide/nucleoside analogues, which are the main drugs for chronic HBV, are useful for acute HBV. 2) Antibody to HBsAg (anti-HBs) immunoglobulin (HBIG), which can inhibit HBV entry, became hepatitis B surface antigen negative. 3) CTLA4Ig was shown to be effective in suppressing hepatitis. Our results indicate that existing drugs might be useful for treatment for acute HBV.

研究分野：肝炎ウイルス

キーワード：B型肝炎ウイルス マウス

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)に新規に感染している患者は全国で年間10000人と推定され、全身倦怠感、悪心、嘔吐、黄疸を訴える急性B型肝炎にて入院加療されている患者は年間約2000人と報告されている。急性B型肝炎を発症した方のうちの1~2%の患者は、急激に悪化し肝細胞の破壊が進行し、意識障害を伴う劇症肝炎を発症する。劇症肝炎を発症すると現在、生体肝移植以外の確立した治療法がないため死亡率は70~80%と報告されている。劇症肝炎に対する新たな治療法の開発のためには動物モデルが必要であるが、B型急性肝炎を生じる実践的な小動物モデルが存在していないことが問題であった。

また、HBV感染したにも関わらず発症しなかった患者においても、HBVが肝細胞に取り込まれゲノムDNAを含むヌクレオカプシドが細胞質から核内へ移行し covalently closed circular DNA (cccDNA) となりウイルス複製の鋳型として肝臓内に存在し続けることが明らかになり、HBV再活性化として問題となっている。

2. 研究の目的

ヒト肝細胞が移植された免疫不全マウスにHBVを接種することで移植されたヒト肝細胞にHBVが感染、複製増殖し持続的にHBVが感染するHBV感染マウスは作製されているが、感染肝細胞内のcccDNAの検討はなされておらず、薬剤投与後の動態も不明である。今研究において、慢性B型肝炎患者の治療薬である核酸アナログやPEG-IFN製剤やB型肝炎患者の肝移植後にHBV再感染予防の為に投与される抗HBs人免疫グロブリンなどの既存の薬剤の適応拡大を目的に本研究を行った。

また、HBV自体には、肝細胞障害性はなく、宿主の免疫応答を介して肝炎が発症すると考えられているが、HBV感染マウスはT細胞およびB細胞が未熟な免疫不全症であり

HBV感染に対する免疫応答が惹起されないため、HBV肝炎モデルではない。本研究でHBV感染マウスを用いHBV感染肝細胞を排除する免疫応答が起こるマウスモデルの作製および急性肝炎に対する既存の免疫調節薬の適応拡大を目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

ヒト肝細胞が移植された免疫不全マウスにHBVを接種することで移植されたHBV感染マウスへ慢性B型肝炎患者の治療薬である核酸アナログやPEG-IFN製剤を用いて肝細胞内のcccDNA量を検討した。抗HBs人免疫グロブリン投与前後のマウス血中HBs抗原量を経時的に測定する。

また、HBV感染マウスにヒト末梢血単核球PBMCを投与することでHBV感染肝細胞を排除する肝炎モデルの作製を試み、関節リウマチの治療に使用されているT細胞選択的共刺激調整剤CTLA4Igによる肝炎抑制について検討した。

4. 研究成果

核酸アナログ・インターフェロンの併用療法により、単独投与に比べより早期の血中ウイルス陰性化が得られ、肝臓内cccDNAの低下を認めた。肝臓内cccDNAを十分に低下させる治療を行うことにより、治療中止後もdrug freeにて肝内HBVの増殖を制御できる可能性が示された。

抗HBs人免疫グロブリン投与後、HBs抗原は陰性化しHBs抗体は陽性化しウイルス量は投与後3日目に $-1.2 \pm 0.5 \log \text{ copy/mL}$ と有意なウイルス量の減少を認めた。HBVの中和抗体である抗HBs人免疫グロブリン投与によりHBs抗原の陰性化を達成できる可能性が示された。HBV感染マウスへヒトPBMC投与2週間後の生着率は $84 \pm 2\%$ であり、非感染マウスの生着率 $55 \pm 24\%$ と比べ有意に

高値であり，HBV 感染マウスへヒト PBMC 投与前の ALT は 400 ± 100 IU/mL であったが投与 2 週後には 1200 ± 200 IU/mL と有意な上昇を認めた。また，マウス肝組織の病理学検討にて急性肝炎と同様の病理所見であるリンパ球の集簇を認めた。本マウスへヒト PBMC 投与前日に関節リウマチの治療に使用されている T 細胞選択的共刺激調整剤 CTLA4Ig を投与することで，肝傷害が抑制できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Development of a Novel Site-Specific Pegylated Interferon Beta for Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus. Tsuge M, Uchida T, Hiraga N, Kan H, Makokha GN, Abe-Chayama H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Shimozono R, Iwamura T, Narumi H, Suzuki T, Kainoh M, Taniguchi T, Chayama K. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 May 24;61(6). pii: e00183-17. doi: 10.1128/AAC.00183-17. 査読有
2. Persistent Loss of Hepatitis B Virus Markers in Serum without Cellular Immunity by Combination of Peginterferon and Entecavir Therapy in Humanized Mice.: Uchida T, Imamura M, Hayes CN, Hiraga N, Kan H, Tsuge M, Abe-Chayama H, Zhang Y, Makokha GN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K.: *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Aug 24;61(9). pii: e00725-17. doi: 10.1128/AAC.00725-17. Print 2017 Sep. pii: e00725-17. 査読有
3. Development of a Novel Site-Specific Pegylated Interferon Beta for Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus. Tsuge M, Uchida T, Hiraga N, Kan H, Makokha GN, Abe-Chayama H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Shimozono R, Iwamura T, Narumi H, Suzuki T, Kainoh M, Taniguchi T, Chayama K. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 May 24;61(6). pii: e00183-17. doi: 10.1128/AAC.00183-17. 査読有
4. Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. Uchida T, Imamura M, Kan H, Hiraga N, Hayes CN, Tsuge M, Abe-Chayama H, Aikata H, Makokha GN, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. *J Gen Virol.* 2017 May;98(5):1040-1047. doi:10.1099/jgv.0.000726. 査読有
5. Antiviral effects of anti-HBs immunoglobulin and vaccine on HBs antigen seroclearance for chronic hepatitis B infection. :Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Kan H, Miyaki E, Masaki K, Ono A, Nakahara T, Abe-Chayama H, Zhang Y, Naswa MG, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Chayama K.: *J Gastroenterol.* 2016 Nov;51(11):1073-1080. Epub 2016 Mar 4. 査読有
6. Human Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Acute Liver Failure and Rescue by Immunoglobulin in Human Hepatocyte Transplant TK-NOG Mice.: Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C,

Yoshizato K, Ohdan H, Murakami K, Chayama K.: doi: 10.1128/JVI.01126-15. Epub 2015 Aug 5. J Virol. 2015 Oct;89(19):10087-96. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Takuro Uchida, Michio Imamura, C. Nelson Hayes, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, Grace N. Makokha, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama Persistent Loss of HBV Markers in Serum without Cellular Immunity by Combination of PEG-IFN Plus ETV Therapy in Humanized mice AASLD The Liver Meeting 2017 年 10 月 21 日 Washington DC, USA
2. Takuro Uchida, Michio Imamura, Hiromi Kan, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama Reduction of intrahepatic cccDNA levels permits to regulate HBV replication after cessation of the treatment in human hepatocyte chimeric mice AASLD The Liver Meeting 2016 年 11 月 11 日 Boston, USA
3. Takuro Uchida, Michio Imamura, Hiromi Kan, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama Reduction of intrahepatic cccDNA levels permits to regulate HBV replication after cessation of the treatment in human hepatocyte chimeric mice AASLD The Liver Meeting 2016 年 11 月 11 日 Boston, USA
4. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた B 型急

性肝炎モデルの構築と CTLA4Ig による肝炎制御 内田宅郎, 平賀伸彦, 茶山一彰 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016 年 4 月 21 日 京王プラザホテル

5. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた急性 B 型肝炎モデルの構築 平賀伸彦, 今村道雄, 茶山一彰, 第 51 回日本肝臓学会総会, 2015 年 5 月 21 日 ホテル日航熊本
6. B 型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子の発現変化 柘植雅貴, 平賀伸彦, 茶山一彰 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016 年 5 月 19 日 東京都、京王プラザホテル
7. Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Hiromi Kan, Eisuke Miyaki, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama CTL mediated acute liver failure and rescue by CTLA4Ig in human hepatocyte transplanted TKNOG mice 25th Conference of APASL 2016 年 2 月 20 日 Tokyo, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

平賀 伸彦 (HIRAGA NOBUHIKO)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・客員研究員

研究者番号：50625978

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()