

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19528

研究課題名（和文）革新的動物モデルを用いた宿主免疫疲弊誘導によるHBV生存戦略の解明

研究課題名（英文）Elucidation of HBV Survival Strategy by Inducing Host Immune Exhaustion Using Innovative Animal Models

研究代表者

小玉 尚宏（Kodama, Takahiro）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10623275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：HBVによる慢性肝炎や免疫異常が生じる新たな動物モデルを作成し、免疫疲弊誘導を介したHBV生存戦略の分子機序を解明することを目的とした。フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ（FAH）欠損マウスによる肝細胞置換システムとSBトランスポゾンによる任意配列のゲノム上への組み込みシステム、そしてHVTi法によるHBV導入法を組み合わせた結果、HBV持続感染・ウイルス血症とそれに伴う慢性肝炎を呈するマウスの作成が可能であった。その結果、CD8+ T細胞の疲弊がHBVウイルス血症の持続に寄与している可能性を見出し、IFN投与がウイルス抑制を伴う多様な肝内免疫細胞を活性化する仕組みを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型慢性肝炎（CHB）患者の免疫病態を明らかにし、HBV排除を目的とした免疫調節剤を研究するためには、慢性HBV感染とCHB患者の宿主免疫応答を再現する動物モデルを開発することが重要であり、本研究により新たなモデルが作成されたことで世界最大規模の感染症に対する創薬の加速に繋がり、社会的意義は大きい。また、これまで研究が困難であったHBV慢性化の免疫学的分子機構を解析できるモデルであることから、その学術的意義も極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：A new animal model of chronic hepatitis and immune abnormalities caused by HBV was created to elucidate the molecular mechanisms of HBV survival strategies via the induction of immune exhaustion. The combination of a hepatocyte replacement system using fumarylacetoacetate hydrolase (FAH)-deficient mice, an SB transposon system for integration of arbitrary sequences into the genome and an HBV transduction method using the HVTi method, resulted in mice with persistent HBV infection and viraemia and associated chronic hepatitis was possible. We found that CD8+ T-cell exhaustion may contribute to the persistence of HBV viraemia and revealed a mechanism by which IFN administration activates diverse intrahepatic immune cells with viral suppression.

研究分野：B型肝炎

キーワード：B型肝炎 T細胞 免疫疲弊 モデルマウス シングルセル解析 インターフェロン マクロファージ NK細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Hepatitis B virus (HBV) は世界で約 3 億 5 千万人、日本でも約 150 万人が感染している世界で最大規模の感染症である。B 型慢性肝炎患者では、肝障害の持続により肝硬変への進展や肝細胞癌の発症を認めることから、抗ウイルス療法が行われる。核酸アナログ治療により HBV の複製は抑制され、肝炎は沈静化するが、肝細胞からウイルスを完全に排除することは極めて困難である。このため、肝がんや HBV 再活性化のリスクは依然として残り、また治療中止後のウイルス再燃リスクから長期の薬剤服用が必要となる。そこで、HBV を完全に排除できる Drug-free を目指した新規治療の開発が求められている。HBV の自然排除例や急性肝炎例の検討から、HBV の排除においては T 細胞、B 細胞などの獲得免疫系に加えて NK 細胞を中心とした自然免疫系の関与が重要であることが明らかとなっている。一方、B 型慢性肝炎患者ではこれらが有効に機能しておらず、HBV が宿主肝細胞における各種ケモカインの産生やリガンド・受容体の発現を調節することで、免疫系から逃避していることが原因の一つと考えられている。そこで、この免疫逃避機構を標的とした治療は、既存の治療とは異なり HBV 排除を可能とする革新的な治療法となる可能性が考えられる。しかし、B 型慢性肝炎 (CHB) 患者の免疫病態を明らかにし、HBV 排除を目的とした免疫調節剤を研究するためには、慢性 HBV 感染と CHB 患者の宿主免疫応答を再現する動物モデルを開発することが重要である。HBV は高度に種特異的なウイルスであり、ヒト HBV に感受性のある動物として知られているのはチンパンジーとツヴァイだけである。HBV を発現するトランスジェニック (Tg) マウスモデルは、ウイルスのメカニズムの解明に大きく貢献しているが、これらのモデルはもともと HBV に対して免疫寛容であるため、免疫病態の研究には使用できない。トランスフェクションマウスモデルでは、HBV 発現ベクターを肝臓に導入するために尾静脈急速静注法 (HVTi 法) が用いられ、その結果、一過性の高レベルの HBV 複製が生じる。しかし、慢性肝炎よりもむしろ急性肝炎の病態を模倣するモデルとして利用されてきた。AAV を介した移入モデルのように、ウイルス血症が持続するモデルもあるが、これらはもともと活発な免疫応答がなく、ヒトの免疫寛容期をより再現しているモデルと考えられる。最近開発されたヒト肝細胞と造血系を持つ二重キメラマウスモデルは、ウイルス免疫病態生理の理解を促進すると期待されているが、作製やコスト面でかなりの困難がある。我々も、ヒト化肝細胞キメラマウスにヒト PBMC を移植することで肝細胞・免疫細胞ヒト化マウスの作成を試みた。このマウスに HBV を感染させたところ HBV 特異的 CTL 反応や HBs 抗体産生が認められ、ヒトの HBV 感染による免疫動態を再現できる可能性が示唆された (Aono S, Kodama T, et al., BBRC 2018) が、HBV 持続感染による慢性的な免疫動態の変化までを検討することは困難であった。以上から、効果的な免疫調節治療薬を発見するためには、CHB の適切な動物モデルを作成することが極めて重要であった。

2. 研究の目的

本研究は、HBV による慢性肝炎や免疫異常が生じる新たな動物モデルを作成し、免疫疲弊誘導を介した HBV 生存戦略の分子機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

CHB モデルマウスを作製するために、C57BL/6J コンジェニックのフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ (FAH) 欠損マウスを用いて FAH と HBV を同時に発現するプラスミドを肝細胞ゲノムに導入する方法を用いた。この目的のために、まず CMV プロモーターと FAH 全長配列、並びに 1.24mer の全長 HBV ゲノムをタンデムに繋いで Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンベクターに挿入した。コントロールプラスミドとして、CMV プロモーターと FAH のみを挿入したベクターを作製した。次に、HTVi を介して各ベクターを肝臓に導入し、その後ニチシノンで中止することで、免疫能を保持しながら HBV が肝細胞から排除されない B 型慢性肝炎モデルマウスを作成した。このマウスモデルの免疫学的な表現型を、血清学的検査、免疫組織学的検査、遺伝子発現解析、シングルセルトランスクリプトーム解析、Flow cytometry 解析により検討した。また、IFN 治療による免疫動態変化を検討した。

4. 研究成果

CHB マウスでは、肝臓において pgRNA が検出可能であり、免疫組織化学的解析から、HBs-Ag を発現している肝細胞が肝臓に広く広がっていることが示された。HTVi の約 2-4 週間後、血清 ALT 値は CHB マウスとコントロールマウスの両方で一過性に上昇した。コントロールマウスにおいては ALT 値がその後正常化した一方、CHB マウスでは観察期間中約 150 U/L で推移した。CHB マウスでは、炎症細胞の肝内浸潤、TUNEL 陽性肝細胞数の増加、血清カスパーゼ 3/7 活性の上昇が認められ、免疫細胞が HBV 感染肝細胞を認識することによる慢性肝炎を呈していると考えられた。また、CHB マウスの HBV 持続感染・ウイルス血症とそれに伴う慢性肝炎は 10 ヶ月以上持続した(図 1)。

CHB マウスの肝臓の免疫病態を包括的に理解するために、慢性炎症期の肝免疫細胞をシングルセルトランスクリプトーム解析で検討した。肝内の免疫細胞は 34 のクラスターに分類され、特徴的なマーカー遺伝子の発現に基づいて、CD8+ T 細胞、CD4+ T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、従来型樹状細胞(cDC)、形質細胞様樹状細胞(pDC)、B 細胞、

単球、好中球、マスト細胞、肝細胞を含む 11 の細胞タイプが定義された。CHB マウスとコントロールマウスの両群は、それぞれの主要なクラスターに細胞を有していたが、その頻度に差は認めなかった。次に CD8+ T 細胞に注目し、ナイーブ T (Tn) 細胞、エフェクターメモリー T (Tem) 細胞、エフェクター T (Teff) 細胞、疲弊 T (Tex) 細胞の 4 つのサブクラスターに分類した。Tn 細胞では Lef1、Sell、Ccr7、Tem 細胞では Cxcr3、Cd44、Il17r、Teff 細胞では Gzmb、Gzmk、Klrg1、Tex 細胞では Pcd1、Tox といった特徴的なマーカー遺伝子の発現に基づいて分類を行った。CD8+ T 細胞の分化過程を解明するために擬似時間解析を行ったところ、Tn 細胞から Tem 細胞または Teff 細胞、そして最終的に Tex 細胞へと分化が進行し、これらはコントロールマウスの肝臓よりも CHB マウスの肝臓で顕著であった。擬似時間経過に伴う個々の遺伝子発現の変化を検討した結果、分化に伴い、Gzmb の一過性的上昇に続いて、Tox 発現上昇によって特徴づけられる疲弊状態の変化が認められた。CHB マウスの Tex 細胞は、コントロールマウスの Tex 細胞に比べて、疲労スコアや Pcd1、Tox の発現量が有意に高かった。これらのデータから、CHB マウスはコントロールマウスよりも肝内 Tex 細胞が多く、これらの細胞の疲弊がより強いことが示唆された。CHB マウスの肝内 CD8+T 細胞のフローサイトメトリー解析の結果、PD-1+CD8+T 細胞の頻度と血清 HBsAg および HBV-DNA のウイルス発現との間に強い正の相関が認められた。これらのデータから、CD8+ T 細胞の疲弊が CHB マウスにおける HBV ウイルス血症の持続に寄与している可能性が示唆された(図 2)。

次に、マクロファージクラスターに注目した。常在クッパー細胞は Clec4f、Clec2d、Adgre1 (F4/80) の共発現によって特徴づけられ、肝内に誘導されたマクロファージは Itgam、Ly6c1、Ly6c2 の共発現によって特徴づけられた。クッパー細胞と肝内誘導マクロファージの比率は、CHB マウスの肝臓ではコントロールマウスの肝臓よりも有意に高かった。また、CHB マウスの誘導マクロファージは、Cd74、H2-Ab1、H2-Aa な

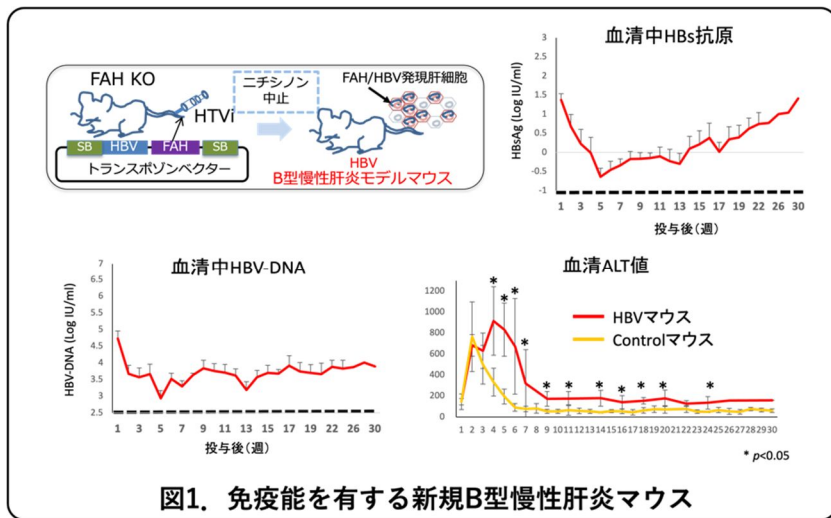


図1. 免疫能を有する新規B型慢性肝炎マウス

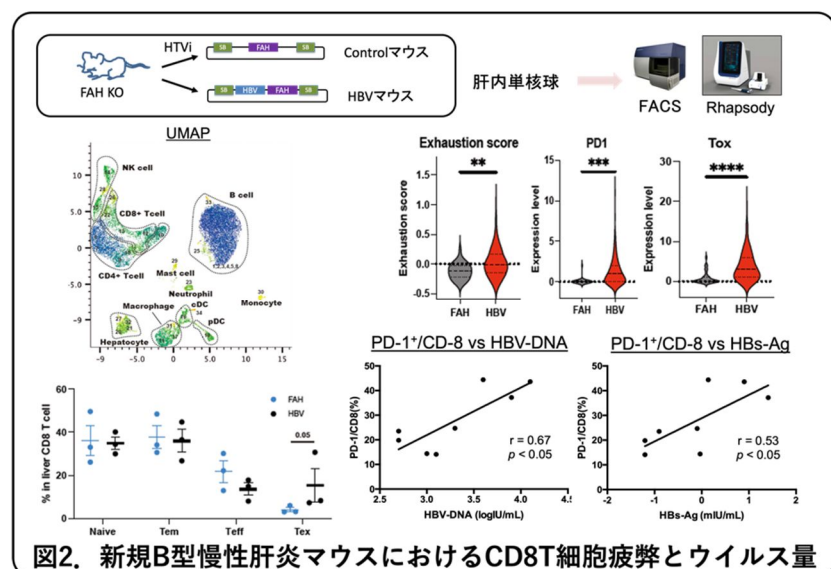


図2. 新規B型慢性肝炎マウスにおけるCD8T細胞疲弊とウイルス量

どの抗原提示関連遺伝子の発現低下や、Klf2、Klf4、Zfp36などの抗炎症制御遺伝子の発現上昇が認められた。GSEA解析では、CHBマウスの誘導マクロファージでは免疫・防御反応に関連する複数の経路が抑制されていた。これらの結果は、CHBマウスにおけるマクロファージの機能障害を示唆するものであった。T細胞とマクロファージクラスター間の細胞間相互作用についてCellChat解析で検討した結果、CHBマウスの肝内に誘導されたマクロファージや常在クッパー細胞は、コントロールマウスと比べて、Texクラスターとの細胞間相互作用が強いことが観察された。これらのデータは、CHBマウスにおけるCD8+ T細胞の疲弊にマクロファージが関与している可能性を示唆する結果と考えられた。

次に、NK細胞に注目した。成熟NK細胞はItgamとKlrg1の共発現によって特徴付けられ、未成熟NK細胞クラスターはCd27とFoxo1の共発現によって特徴付けられた。コントロールマウスの成熟NK細胞に比べて、CHBマウスの肝臓の成熟NK細胞は数が増加し、GzmaとGzmbの発現レベルが有意に高く、細胞傷害性の亢進が認められた。フローサイトメトリーによっても、肝内IFN+NK細胞の頻度は、CHBマウスでコントロールマウスより有意に高値であった。

CHBマウスの免疫動態がヒトのCHBの動態をよく再現していることから、このモデルを用いて、臨床で使用可能なIFNに対する肝内免疫反応を解析した。CHBマウスに組換えIFN（10000 U/body）を連日腹腔内投与したところ、血清HBV-DNA値および肝pgRNA値は有意に低下し、血清ALT値が2~3倍に上昇し、軽度の肝障害が誘発された。IFN投与はCHBマウスのIsg15、Oas2、Gzmbの肝内遺伝子発現を有意に増加させた。以上から、このCHBマウスにおいてIFNにより肝内免疫応答とウイルス抑制が誘導されることを確認した。最後に、IFNを投与したCHBマウスにおける肝内免疫細胞の変化を検討するために、IFN投与マウス、非投与のCHBマウスとコントロールマウスを用いてシングルセルトランスクリプトーム解析を実施した。IFN投与マウスでは、CD8+T細胞におけるTn、Tm、Tex細胞の活性化が生じたが、Teff細胞の活性化は認められなかった。IFNは、マクロファージの炎症関連分子に変化を与えない一方、NK細胞の細胞傷害活性を亢進させた。フローサイトメトリーにおいて、IFNはCHBマウスの肝臓におけるIFN+Gzmb+NK細胞の集団を増加させた。以上の結果から、IFN投与はCHBマウスにおいてウイルス抑制を伴う多様な肝内免疫細胞を活性化することが示された（図3）。

CHB患者の免疫病態を明らかにし、HBV排除を目的とした免疫調節剤を研究するためには、慢性HBV感染とCHB患者の宿主免疫応答を再現する動物モデルを開発することが重要であり、本研究により新たなモデルが作成されたことで世界最大規模の感染症に対する創薬の加速に繋がりが、社会的意義は大きい。また、これまで研究が困難であったHBV慢性化の免疫学的分子機構を解析できるモデルであることから、その学術的意義も極めて大きい。今後このモデルを用いて更にCHB患者の免疫病態の解明、免疫修飾を標的とした創薬開発を進めていく。

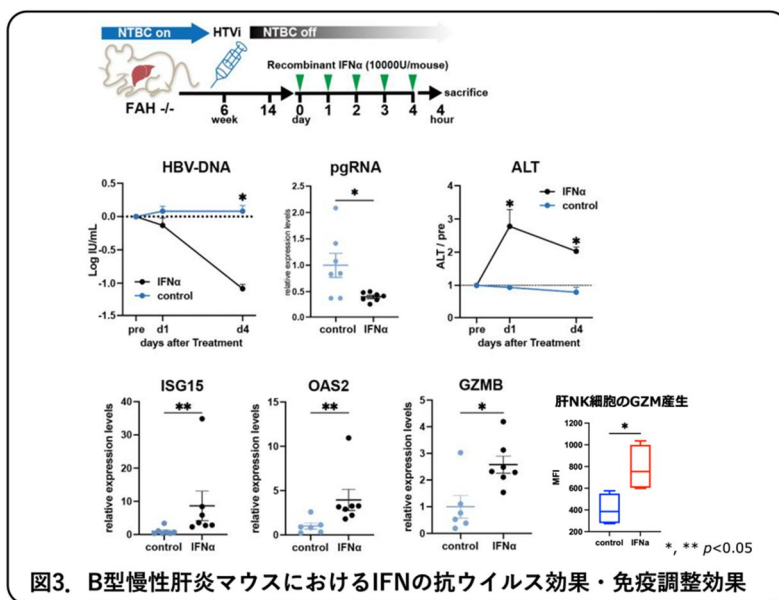


図3. B型慢性肝炎マウスにおけるIFNの抗ウイルス効果・免疫調整効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuoka Makoto, Kodama Takahiro, Murai Kazuhiro, Hikita Hayato, Sometani Emi, Sung Jihyun, Shimoda Akiyoshi, Shigeno Satoshi, Motooka Daisuke, Nishio Akira, Furuta Kunimaro, Tatsumi Tomohide, Yusa Kosuke, Takehara Tetsuo	4. 巻 115
2. 論文標題 Genome wide loss of function genetic screen identifies INSIG2 as the vulnerability of hepatitis B virus integrated hepatoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 859 ~ 870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murai Kazuhiro, Kodama Takahiro, Hikita Hayato, Shimoda Akiyoshi, Fukuoka Makoto, Fukutomi Keisuke, Shigeno Satoshi, Shiode Yuto, Motooka Daisuke, Higuchi Yuichiro, Miyakawa Kei, Suemizu Hiroshi, Ryo Akihide, Tahata Yuki, Makino Yuki, Yamada Ryoko, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 6
2. 論文標題 Inhibition of nonhomologous end joining mediated DNA repair enhances anti HBV CRISPR therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 2474 ~ 2487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.2014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 滋野 聡、小玉 尚宏、竹原 徹郎
2. 発表標題 免疫系を有するB型慢性肝炎マウスモデルの樹立とシングルセル解析による網羅的肝内免疫動態解析
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西尾啓、巽智秀、福富啓祐、村井一裕、田畑優貴、古田訓丸、小玉尚宏、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 B型慢性肝炎患者におけるHBs抗原量とHBV 特異的T細胞反応の相関に関する検討
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村井一裕、疋田隼人、中堀輔、栗木真治、染谷愛美、成志弦、下田彬允、福岡誠、滋野聡、西尾啓、小玉尚宏、巽智秀、末水洋志、竹原徹郎
2. 発表標題 HSPG2発現抑制はcMET発現上昇を介してHBVの侵入ならびに複製を阻害する
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Hayato Hikita, Tasuku Nakabori, Shinji Kuriki, Emi Sometani, Jihyun Sung, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Satoshi Shigeno, Akira Nishio, Takahiro Kodama, Tomohide Tatsumi, Hiroshi Suemizu, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 HSPG2 suppression increases cMET expression, resulted in inhibition of HBV entry and replication
3. 学会等名 2023 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akira Nishio, Tomohide Tatsumi, Keisuke Fukutomi, AkiraDoi, Kazuhiro Murai, Yuki Tahata, Kunimaro Furuta, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, and Tetsuo Takehara
2. 発表標題 The impact of HBsAg level on HBV-specific T cell responses in blood of chronic hepatitis B patients
3. 学会等名 2023 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Shigeno, Takahiro Kodama, Kazuhiro Murai, Akira Nishio, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 CIRCULATING CLASSICAL MONOCYTE-DERIVED IL-1 PRODUCTION IS ASSOCIATED WITH THE REDUCTION OF SERUM HBsAg LEVELS IN CHRONIC HEPATITIS B
3. 学会等名 AASLD 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村井一裕、疋田隼人、下田彬允、栗木真治、染谷愛美、成志弦、福岡誠、滋野聡、西尾啓、小玉尚宏、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 初代培養ヒト肝細胞を用いたHBs抗原量を低下させる化合物ライブラリースクリーニング
3. 学会等名 第45回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村井一裕、小玉尚宏、竹原徹郎
2. 発表標題 B型肝炎根治を目指したCRISPR/Cas9によるウイルスゲノム切断とDNA修復経路阻害併用療法の開発
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 滋野 聡、小玉 尚宏、竹原 徹郎
2. 発表標題 免疫系を保持した新規B型慢性肝炎モデルマウスを用いたTLR7アゴニストの治療効果の検討
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 滋野 聡、小玉 尚宏、村井 一裕、山田 涼子、疋田 隼人、阪森 亮太郎、巽 智秀、竹原 徹郎
2. 発表標題 免疫系を保持する新規B型慢性肝炎モデルマウスの作成と免疫応答解析
3. 学会等名 第59回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井一裕, 小玉尚宏, 竹原徹郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるHBVゲノム切断とDNA 修復経路阻害併用によるB型肝炎根治を目指した新規HBV治療の開発
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Emi Sometani, Jihyun Sung, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Satoshi Shigeno, Yuki Tahata, Akira Nishio, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Olaparib enhances the anti-viral effect of CRISPR/Cas9 therapy targeting HBV genome via NHEJ-mediated DNA repair machinery
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------