

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860574

研究課題名(和文)HBV感染したヒト肝細胞置換キメラマウスにおける肝線維化進展機構の解析

研究課題名(英文)Molecular basis of liver fibrosis progression in humanized mouse model infected with HBV

研究代表者

杉山 真也(Sugiyama, Masaya)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：20612427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝線維化したキメラマウスの血清を使った網羅的解析の結果では、内因性リガンドとして複数の候補分子を得た。それらの分子をマウス肝臓から得たマクロファージに作用させたところ、TNF- α 、IL-6、IL-8といった炎症性サイトカインの誘導を認めた。加えて、ヒトのB型肝炎患者血清においても、内因性リガンドとして上昇している分子を探索し、共通する分子を抽出したところ、4つの候補分子を確認した。それらの機能解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive analysis of serum protein was determined to discover a responsible factor relating with liver fibrosis using chimeric mouse samples with liver fibrosis of hepatitis B infection. We focused on an innate ligand induced by viral infection. Several candidate proteins were detected as innate ligands. These factors were added in the culture medium of macrophages separated from the mouse liver. Then, inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-8 were induced by the treatment. We analyzed innate ligand molecules by the comprehensive analysis using serum from chronic hepatitis B (CHB) patients. The data of CHB patients were compared with that of chimeric mouse. Four candidate factors strongly related with liver fibrosis progression were found by selecting common factors between human and mouse model. These functional analyses were determined during the study period.

研究分野：ウイルス肝炎

キーワード：B型肝炎ウイルス ヒト化マウス 肝線維化 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎はB型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus: HBV)に感染することにより発症し、本邦では約150万人、世界中では約4億2千万人のHBV持続感染者が存在すると推定されている。一般的な病態としては、B型慢性肝炎から肝線維化を経て、肝硬変や肝癌へと進展していくことが知られている。B型肝炎では完全なウイルス排除が困難なため、その治療法としては、ウイルス複製の抑制を目的として、インターフェロン(Interferon: IFN)と核酸アナログ(Nucleotide analogue: NA)製剤が利用され、一定の効果を上げている。

一方、肝線維化進展や肝癌発症といった病態進行の機序については、十分な解明がなされていない。肝炎の中でも特にB型肝炎は、感染期間と肝線維化の進展が一致しないことが多く、各種検査を利用しても線維化の程度を正確に把握することが困難である。そのため、慎重な経過観察が必要で、特に生体肝移植後やHIV感染といった免疫抑制下での肝炎では急速に肝線維化が進展する。このようなことから、B型肝炎における病態進行の機序の解明と対策が急務である。これまで研究が進まなかった原因として、HBV感染を起因とする病態モデル動物がこれまでに存在していなかったことが挙げられる。HBVが安定して感染可能な種属はチンパンジーとヒトに限定されるが、チンパンジーを用いた感染実験は、現在では倫理的に困難な状況にあり、病態進行に関する詳細な研究が不十分なままである。

申請者は、この点を解決するためにヒト肝臓を保有するヒューマノイドマウスであるヒト肝実質細胞置換キメラマウス(キメラマウス)を感染モデルとして利用することで、HBV感染を起因とする病態モデルを樹立し、病態進展に関する研究を世界に先駆けて進めてきた。HBVは、そのゲノム配列に基づいて各遺伝子型(A-J型)に分類され、その遺伝子型の違いは病態の違いとして現れることが臨床的に知られている。この違いが生まれる原因を明らかにするために、培養細胞とキメラマウスを用いた感染実験を実施してきた(Sugiyama M. et al. Hepatology 2006, Hepatology 2007)。その結果、臨床的に予後不良傾向にある遺伝子型C2と劇症肝炎との関連が指摘されている遺伝子型B1のプレコア(PC)変異株において、肝線維化が認められた(Sugiyama M. et al. Gastroenterology 2009)。線維化の進展しているキメラマウス群では、線維化関連遺伝子の高発現が認められ、HBV感染したヒト肝実質細胞のシグナルがマウス非実質細胞へ伝わり、肝線維化が生じていることが明らかとなった。また、感染初期から線維化進展群の活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS)の発現が顕著で、細胞核の酸化傷害が生じる原因となっていた。

この病態と関連する遺伝子を網羅的に探

索したところ、Toll-like receptor (TLR) 4とその関連遺伝子の発現が誘導されており、その下流のIL-6も高値であるという予備データを得た。また、マウスクッパー細胞のTLR4が有意に上昇するという予備データを得ている。そこで、スイスとの共同研究により、既存の抗体よりも特異性に優れた抗TLR4抗体を取得した(Daubeuf B et al. J Immunol. 2007)。そこで、得られた抗ヒトTLR4抗体と抗マウスTLR4抗体をHBV感染キメラマウスに投与することで抗線維化作用を示すか検討したところ、抗マウスTLR4抗体が線維化を抑制することを組織学的に確認した。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から、HBV感染キメラマウスへ抗マウスTLR4抗体を投与することで線維化の進展が抑制されることを確認した。また、クッパー細胞でTLR4の発現が亢進していることから、キメラマウスの自然免疫担当細胞が線維化形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究課題では、抗ヒト・マウスTLR4抗体での阻害試験で得られた肝組織や血液を詳細に比較解析することで、HBV感染により誘導される線維化進展機構を明らかにする。特に、HBV感染したヒト肝細胞がキメラマウスの非実質細胞や血球細胞にどのようなシグナルを伝達しているかを明らかにすることで、線維化進展に関わる分子経路の同定を目指す。TLR4経路の活性化が認められるため、そのリガンドとなる分子を探索・同定することは直接的な原因の解明と予防へとつながる。

3. 研究の方法

肝臓内の免疫細胞の働きを体外からモニターすることは困難であるが、炎症を理解する上で最も重要な部分である。そこで、HBV感染キメラマウスで生じている現象をin vitroで再現するために、キメラマウス肝臓を還流することで肝内の全細胞を含んだ初代培養系を樹立する。

1年目では肝細胞と血球細胞を共培養することで、肝臓内で免疫担当細胞が機能する環境を再現する実験系を確立する。HBV産生や肝臓と免疫の細胞種を様々な組み合わせることで相互作用について解析していく。並行して、前年度に終了した抗TLR4抗体投与したHBV感染キメラマウスの分子生物学的な解析を進める。

2年目以降は、初年度での研究結果を受けて引き続き、TLR4を中心としてその上流と下流の重要因子の同定とその解析を進める。

4. 研究成果

(1) <血球細胞と肝細胞を用いたTLR4経路のin vitro解析> 正常マウスを用いて、肝臓内に存在している免疫担当細胞を分離

回収する手法を確立した。その中から、NK細胞とマクロファージ（クッパー細胞）の分離をフローサイトメトリーにより実施した。それらをHBV発現しているマウス肝細胞やヒト初代培養肝細胞と共培養することで、サイトカインの発現をマルチプレックス解析した。コントロールとしては、HBV発現のないマウス肝細胞とヒト初代培養肝細胞を使い、HBV感染により誘導される特異的なサイトカインの探索を実施した。キメラマウスへ in house 抗 TLR4 抗体を投与し、その線維化阻止効果を検証する実験を行った。その6ヶ月飼育した時点の肝組織と血清を利用して、線維化関連遺伝子とサイトカインを定量した。遺伝子発現解析では、薄切した肝組織からマイクロダイセクションにより、浸潤血球細胞、マウスもしくはヒト肝細胞を分離して核酸抽出を実施した。既に確立済みのマウスとヒトの遺伝子を分けられる種特異的なプライマーセットを利用して遺伝子発現定量解析を実施した。in vitro 解析で得られた結果を確認するために、HBV感染キメラマウスの準備を進めた。線維化発現に関連する TLR4 経路の関連を確認するために、抗 TLR4 抗体でその経路の阻害をしたサンプルも使用した。これらの結果をリアルタイム PCR で確認し、線維化に関連する分子経路の候補をいくつか得た。

（２）＜キメラマウスにおける TLR4 経路の in vivo 解析＞

上記の in vitro のデータを元に、キメラマウスモデルでHBV感染による肝線維化進展機序の確認を行った。キメラマウスへHBV感染をさせて感染が安定するところまで維持した。そこに、一部のマウスで、IL-6、TGF- β 、PDGF-CなどのsiRNAを投与することで飼育を維持した。この間にHBVウイルス量の減少を認めることはなかった。以前の我々の検討から、線維化の形成までに6ヶ月程度の飼育が必要なことがわかっている。剖検時には、肝臓の病理染色や免疫染色を行った。サイトカイン測定と併せて、RNAの抽出を行い、遺伝子レベルでの変動を確認した。HBV感染の中で、IL-6やTGF- β といった炎症性サイトカインと上昇が認められた。また、PDGF-C上昇を確認し、肝線維化への関与が認められた。続いて、マウスでのIL-6、TGF- β 、TNF- α の阻害実験を行ったが、これらの分子を発現抑制しても、顕著な肝線維化阻害には至らなかった。それらのことから、TLR4下流の炎症性サイトカインを抑制することは、抗線維化の面からは効率的ではないと考えられた。

一方で、TLR4活性化に関わるリガンド探索を進めた。血清を使った網羅的解析の結果で、内因性リガンドとして複数の候補分子を得たため、それらの分子をマウス肝臓から得たマクロファージに作用させたところ、TNF- α 、IL-6、IL-8といった炎症性サイトカインの誘導を認めた。加えて、別のHBV感染キメラマ

ウスの血清中とヒトのB型肝炎患者血清においても、内因性リガンドとして上昇している分子を探索し、共通する分子を抽出したところ、4つの候補分子を確認した。

外来性リガンドの探索については、マウスの無菌化を試みた。キメラマウスの作成過程の関係で、Germ Freeでは飼育が困難であるため、抗生物質カクテルによる除菌を施したマウスを準備した。現在、このマウスにおける肝線維化の進展を検討している。

過去の報告に従って、過酸化脂質がTLR4のリガンドとなっている可能性を元に検討したが、in vitroとin vivoにおいてHBV感染下では過酸化脂質の関連を見出すことは出来なかった。そこで、in vitro系で得られた培養上清とキメラマウスの感染後の肝臓と感染血清をTOF-MS/MS分析にかけて関連する分子の探索を行った。現在解析を進めており、来年度に候補分子について検討を行い、真に関連のあるものを同定する。

本研究課題を通して、肝線維化に関わるTLR4経路を中心に、その上流と下流の経路について解析を実施した。TLR4抗体を用いた検討で、肝線維化の抑制が可能であることをin vivoモデルで明らかとした。これらのリガンド分子は、血中での測定も可能となるため、肝線維化の分子マーカーとして利用できる可能性があり、臨床応用を検討する。

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3件）

1. Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Mita E, Okamoto T, Matsuura Y, Okuno A, Takikawa O, Mizokami M, Kanto T. Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B. *Hepatology*. 2016 Jan;63(1):83-94. doi: 10.1002/hep.28282.
2. Komada K, Sugiyama M, Vongphrachanh P, Xeuatvongsa A, Khamphaphongphane B, Kitamura T, Kiyohara T, Wakita T, Oshitani H, Hachiya M. Seroprevalence of chronic hepatitis B, as determined from dried blood spots, among children and their mothers in central Lao People's Democratic Republic: a multistage, stratified cluster sampling survey. *Int J Infect Dis*. 2015 May 6;36:21-26. doi: 10.1016/j.ijid.2015.04.020.
3. Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña

JR. In vitro replication competence of a Hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes. J Gen Virol. 2013 Dec;94(Pt 12):2724-8. doi: 10.1099/vir.0.053595-0.

〔学会発表〕(計3件)

1. TLR4 signaling mediate liver fibrosis in chimeric mice persistently infected with HBV. Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami. The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology. Fukuoka, Nov 23, 2015 Workshop W2-B-11
2. Effect of toll-like receptor 4 signaling on liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus. Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, and Masashi Mizokami. 2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses Bad Nauheim, October 8, 2015 Oral 0-174
3. Impact of toll-like receptor 4 signaling on liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus. Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, and Masashi Mizokami P-1658 The Liver Meeting 2015: The 66th Annual Meeting of AASLD at San Francisco 16th November 2015

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：インターフェロン治療効果予測方法及びそれを用いたB型肝炎患者の治療用医薬組成物

発明者：溝上雅史、村田一素、杉山真也

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2016/ 60553

出願年月日：平成 28 年 3 月 30 日

国内外の別： 国外

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 真也 (SUGIYAMA, Masaya)

国立国際医療研究センター研究所・主任研究員

研究者番号：20612427