

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16265

研究課題名（和文）B型肝炎ウイルスの持続感染の成立および維持における制御性T細胞の寄与の解明

研究課題名（英文）Contribution of regulatory T cells in the establishment and maintenance of persistent hepatitis B virus infection

研究代表者

浦木 隆太 (Uraki, Ryuta)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・ウイルス感染動態研究部 上級研究員

研究者番号：70843027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、B型肝炎ウイルスの表面蛋白質であるS抗原を発現するトランジェニック(Tg)マウスおよび、制御性T細胞を選択的に薬剤で除去できるTgマウスを用いて、制御性T細胞がHBV持続感染状態の成立・維持に及ぼす影響をウイルス学的、免疫学的視点から解析した。制御性T細胞を一過性に除去すると肝炎マーカーであるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)が上昇することを見出した。また、制御性T細胞の一過性の除去によって、制御性T細胞と相互作用する樹状細胞の活性化マーカーである、CD86やCD80の発現が上昇していることが明らかとなった。ALT上昇と樹状細胞の活性化の関連性については今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルスキャリアの患者が肝炎を発症する際に、細胞障害性T細胞などが関与していることは報告されているが、B型肝炎ウイルスの持続感染が成立する機序や持続感染が維持される機序に関しては十分な解析が行われていない。

本研究では、一時的な制御性T細胞の除去によって、肝臓において炎症が引き起こされることを明らかにした。これらの結果は、HBVキャリアでは制御性T細胞が存在することで肝炎発症が抑制されている可能性を示唆している。今後、本知見を発展させ、B型肝炎ウイルスキャリアに対する新たな免疫治療法の開発などに役立たせることができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effects of regulatory T cells on the establishment and maintenance of a persistent HBV infection using transgenic (Tg) mice expressing the S antigen, a surface protein of hepatitis B virus, and Foxp3-DTR mice that can selectively remove regulatory T cells with drugs. We found that transient removal of regulatory T cells increased alanine aminotransferase (ALT), a hepatitis marker. We also found that transient depletion of regulatory T cells induces maturation/activation of dendritic cells that interact with regulatory T cells. The relationship between ALT elevation and dendritic cell activation will be investigated in the future study.

研究分野：ウイルス学/免疫学

キーワード：B型肝炎ウイルス 制御性T細胞 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

持続感染から、慢性肝炎、さらには肝癌を引き起こす **B 型肝炎ウイルス(HBV)** は、世界中で 20 億人にもものぼる感染者があり、公衆衛生上重要な感染症である。HBV に感染した患者は、不顕性感染となる場合が多いものの、一部の患者は急性肝炎を発症する。一方、インフルエンザウイルスなどの急性ウイルス感染症を引き起こす病原体とは異なり、HBV は肝細胞に潜伏感染することができる。特に出産時や幼児期に感染した患者は、免疫系が未熟であるが故に HBV の潜伏感染が起こりやすいことが知られている。しかし、**HBV 持続感染が成立する機序や持続感染が維持される機序**に関して、免疫学的に十分な解析は行われておらず、様々な課題が残されている。

HBV 持続感染時、宿主では抗ウイルス応答が活性化されていないことから、そのような応答を抑制する機序があると予測される。そこで、本研究課題では、免疫抑制能を有する制御性 T 細胞および制御性 T 細胞と相互作用する免疫細胞に焦点を当て、ウイルス学・免疫学的視点から **HBV 持続感染の成立および維持に重要な機序の解明を目指す**。

2. 研究の目的

本研究では、B 型肝炎ウイルスの表面蛋白質である S 抗原を発現するトランジェニック(Tg) マウスおよび、制御性 T 細胞を選択的に薬剤で除去できる Tg マウスを用いて、制御性 T 細胞が HBV 持続感染状態の成立・維持に及ぼす影響をウイルス学的、免疫学的視点から解析する。

3. 研究の方法

ジフテリア毒素(DT)を投与することで Foxp3(制御性 T 細胞の発生・分化と機能を制御するマスター転写因子)を発現している制御性 T 細胞を選択的に除去することが可能なマウス(Foxp3-DTR マウス)を用いた。本実験では、B 型肝炎モデルマウス(HBs-Tg マウス)および Foxp3-DTR マウスを掛け合わせ、薬剤選択的な制御性 T 細胞欠損 B 型肝炎モデルマウス(HBs-Foxp3-DTR マウス)を作成し、その後の実験を試みた。

HBs-Foxp3-DTR マウスで、一過性に制御性 T 細胞を除去できる条件を検証したのちに、一過性の制御性 T 細胞の除去が肝臓への与える影響の解析を行った。まず、DT を接種し肝炎のマーカーであるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)を測定した。

また、

4. 研究成果

B 型肝炎モデルマウス(HBs-Tg マウス)および Foxp3-DTR マウスを掛け合わせ、薬剤選択的な制御性 T 細胞欠損 B 型肝炎モデルマウス(HBs-Foxp3-DTR マウス)を作成した。ジフテリア毒素の接種条件としては、2020 年度に我々の発表した成果(Shime and Odanaka et al. PNAS 2020)を参考に決定した。DT 接種後、制御性 T 細胞が一過性に除去されたことを確認したのちに、肝機能傷害マーカーを測定したところ、ALT が一過性に上昇することを明らかにした。

これらの結果は一時的な制御性 T 細胞の除去によって、肝臓において炎症が引き起こされている、つまり、HBV キャリアでは制御性 T 細胞が存在することで肝炎発症が抑制されている可能性を示唆している。

制御性 T 細胞は樹状細胞と相互作用することが報告されている。そこで、Foxp3-DTR マウスを用いて、一過性に制御性 T 細胞を除去した際に樹状細胞の性状に変化があるか検証を行った。本来であれば、HBs-Foxp3-DTR マウスを用いるべきだが、新型コロナウイルスの

流行に伴い、マウスの維持数を減らさなければならなかったため、Foxp3-DTR マウスを用いて検証を行った。

制御性 T 細胞を一過性に除去すると、樹状細胞の活性化マーカーである、CD86 や CD80 の発現がコントロールマウスと比べて、有意に上昇していることが明らかとなった。

また、外来抗原を接種した際には、活性化した樹状細胞が外来抗原を積極的に取り込んでおり、その結果、細胞性免疫や液性免疫が強く誘導されていた(Uraki et al. *PLOS Pathogens*, 2021)。

興味深いことに、制御性 T 細胞の一過性除去によって誘導される外来抗原に対する細胞性免疫および液性免疫は、既知の有効なアジュバントの一つである poly IC と同程度の効果を示した。本研究によって、制御性 T 細胞-樹状細胞のクロストークの重要性の一端を明らかにできた。制御性 T 細胞一過性除去による HBs-Foxp3-DTR マウスにおける ALT 上昇と樹状細胞の活性化がどのように関連しているかについては、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shime Hiroaki, Odanaka Mizuyu, Tsuiji Makoto, Matoba Takuma, Imai Masaki, Yasumizu Yoshiaki, Uraki Ryuta, Minohara Kiyoshi, Watanabe Maiko, Bonito Anthony John, Fukuyama Hidehiro, Ohkura Naganari, Sakaguchi Shimon, Morita Akimichi, Yamazaki Sayuri	4. 巻 117
2. 論文標題 Proenkephalin+regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20696 ~ 20705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000372117	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 Uraki Ryuta, Imai Masaki, Ito Mutsumi, Shime Hiroaki, Odanaka Mizuyu, Okuda Moe, Kawaoka Yoshihiro, Yamazaki Sayuri	4. 巻 17
2. 論文標題 Foxp3+ CD4+ regulatory T cells control dendritic cells in inducing antigen-specific immunity to emerging SARS-CoV-2 antigens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1010085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦木隆太、今井優樹、伊藤睦美、志馬寛明、河岡義裕、山崎小百合
2. 発表標題 制御性T細胞を標的としたSARS-CoV-2に対する新規予防法の開発
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuta Uraki, Masaki Imai, Hiroaki Shime, Yoshihiro Kawaoka and Sayuri Yamazaki
2. 発表標題 Transient depletion of Treg cells induces adaptive immunity to SARS-CoV-2 antigens.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------