

令和元年5月13日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09351

研究課題名(和文) HSV-TKマウスを用いた新規HBV感染症モデルの開発

研究課題名(英文) Development of an HBV infection mouse model using HSV-TK-WT mouse

研究代表者

伊藤 弘康 (Ito, Hiroyasu)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80373075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性HBV感染ではHBVに対する免疫応答が破綻しHBVを完全排除することは困難である。HBV感染症に対する十分な治療法の確立が困難である理由に、小動物を用いた適切なHBV感染マウスモデルがないことが挙げられる。本研究ではHSV-TK-WTマウスを使用し、宿主肝細胞を脱落させた後HBV-Tg肝細胞を移入することで新規HBV感染マウスモデルを作製した。移入後20週までの病理組織学的検討でHBsAgを認めている。HBV遺伝子発現においても同様の結果が得られた。細胞性免疫応答の解析では宿主ごとにHBV反応性IFN- γ 産生細胞数に差を認め、置換率が低い宿主のIFN- γ 産生能は増強していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までHBVTgマウスを用いてHBV感染症について様々な検討がされてきたが、HBVTgマウスの宿主免疫応答はHBV抗原に対して寛容状態であると考えられ、十分な宿主免疫応答の解析ができなかった。本研究においてTK-NOGマウスにMHCを同様にしたHBVTgマウスからの肝細胞の移入・定着は可能であった。これまでにない新規手法による小動物でのHBV感染モデル開発であり、HBVに対する宿主免疫応答の解析も十分可能であることが示された。現在、慢性HBV感染症に対する治療の開発が重要であるが、本研究で開発されたモデルでは、さまざまな薬剤の抗HBV作用の正確な評価が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) is noncytopathic DNA virus with a circular, double-stranded genome. More than 350 million people are infected as chronic carriers and are at risk of developing end-stage hepatocellular carcinoma. The chronicity of HBV infection is involved in impaired HBV-specific immune responses that cannot eliminate or cure the infected hepatocytes efficiently. Treatment for HBV infection is difficult. The cause is that the HBV infected mouse model using small animals has not been established. In this study, HSV-TK-WT mice were intraperitoneally with ganciclovir (GCV) and transplanted with hepatocytes of HBV-Tg mice. HBsAg positive area in the liver tissue were observed for at least twenty weeks after HBV-Tg hepatocyte transplantation. IFN- γ producing cells increased in HSV-TK-WT mice with low HBsAg positive area in the liver tissue. The present mouse model will help to understand the mechanisms of HBV tolerance.

研究分野：消化器病学

キーワード：HBV 小動物疾患モデル 宿主免疫応答 抗HBV剤 HSV-TK

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝臓がんの原因となる DNA ウイルスである。HBV 感染後、約 20～30%の割合で急性肝炎を発症し、その 1～2%が劇症化する。その後、慢性肝炎、肝硬変、肝臓がんへと病態が進行し、肝臓がんまで進展すると予後不良となることから、出来るだけ早期に病態の進行を止めることが最重要と考えられる。そのためには HBV の完全排除が理想だが、現在のところ、HBV を宿主から完全排除する治療法は確立されていない。

HBV 感染症に対する十分な治療法開発が困難である理由の一つに、小動物を用いた HBV 感染モデルが確立されていないことが挙げられる。近年、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染症の研究が行われている。Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK)の遺伝子を肝臓特異的に発現する遺伝子改変マウスと免疫不全マウスである NOG マウスを掛け合わせた HSV-TK-NOG マウスを作製し、ガンシクロビル(GCV)を投与することにより、Thymidine Kinase 特異的に肝細胞の障害と脱落を起こす。その後ヒト肝細胞を経静脈的に移入することによりマウス内でヒト肝細胞によって肝臓が再構築される。本モデルはヒト肝細胞由来のため、HBV や HCV などヒトおよびチンパンジーにしか感染しないウイルスでも持続感染し、抗ウイルス薬の検討などに役立てられている。しかしながら、本モデルは免疫不全マウスのため、本来ヒトで起きている病態を正確に反映しているとは言えず、宿主免疫応答の解析は困難である。

このように HBV 感染症モデルが開発されてきたが、現在のところヒトでの病態を正確に反映しているモデルはほとんどみられない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HSV-TK-WT(野生型)マウスを使用し、宿主肝細胞を GCV で脱落させた後、HBV 抗原を恒常的に肝細胞特異的に発現する HBV-トランスジェニック(Tg)マウスから採取した肝細胞を移入することで、新規 HBV 感染マウスモデルを確立することである。さらに、本モデル樹立後宿主免疫応答の解析も行う。

3. 研究の方法

1) HSV-TK-WT マウスに GCV を投与することで Thymidine Kinase 特異的に肝細胞を脱落させた宿主マウスを作製する。宿主マウスを作製するために GCV を容量別に腹腔内投与した。投与して 1 週間後の血清 ALT を測定し、既報の通り ALT 600 U/L 以上のマウスを宿主マウスとして使用した。

2) ドナーマウスである HBV-Tg マウスの肝細胞をコラゲナーゼ還流法にて採取する。コラゲナーゼ還流法には、採取できる肝細胞数と細胞生存率を向上させる目的で、リペラーゼ(コラゲナーゼ およびと中性プロテアーゼを含む酵素)を加えた還流液を使用した。採取した肝細胞の細胞数をカウントし、 1×10^6 個/200 μ l に調節した。

3) GCV 投与後 1 週の宿主マウスに経脾臓的に HBV-Tg 肝細胞 1×10^6 個/200 μ l を移入した。移入後 2 週間ごとに体重測定と採血を行った。経時的に採取した血清を用いて、ALT (日本光電 BM6070)、HBsAg、HBsAb (シスメックス HISCL5000)を測定した。

4) HBV-Tg 肝細胞移入後の病理用肝組織における免疫組織学染色(HBsAg)を行い、HBsAg 陽性部分の面積をイメージ J で評価した。

5) HBV-Tg 肝細胞移入後の凍結肝組織から DNA 抽出液を作製し、オリゴヌクレオチドプライマーを用いて HBV 遺伝子の発現を評価した。同様に凍結肝組織から肝タンパク抽出液を作製し、HBsAg(シスメックス HISCL5000)を測定した。

6) HBV-Tg 肝細胞移入後の脾臓細胞における宿主細胞性免疫応答の解析を行った。MHC クラス II と結合する HBs 抗原ペプチド(28-39)誘発性の IFN- γ 産生能を ELISPOT アッセイにて評価した。

4. 研究成果

1) 宿主マウスの作製とドナーマウス肝細胞採取について

HSV-TK-WT マウスに GCV を容量別に投与した。GCV 50 μ g/g の量で腹腔内投与から 1 週間後、血清 ALT 値が 600U/L 以上となった。GCV 投与による ALT 値が 600U/L 以上のマウスを宿主マウスとし、GCV 投与後の ALT と体重を雄と雌で比較したところ有意差が認められなかったため、宿主マウス作製には雄雌両方のマウスを使用した。また、HBV-Tg マウスの肝細胞を採取する際、リベラーゼを加えたコラゲナーゼ還流法は、通常のコラゲナーゼ還流法に比べて採取できる細胞数および生存細胞数が明らかに高かった。

2) HBV-Tg 肝細胞移入後肝組織における HBsAg 陽性細胞置換率の評価

HBV-Tg 肝細胞 1×10^6 個/200 μ l を経脾臓的に移入して 6 週、8 週、20 週の肝組織を用い HBs 抗原の免疫組織学的検討を行った。HBsAg 陽性域は、6 週 : 6.1%、21.2%、8 週 : 45.5%、0%、43.3%、20 週 : 15.9%、17.2%となり、HBV-Tg 肝細胞を移入して少なくとも 20 週まで肝組織における HBsAg 陽性域を認めた。それら HBsAg 陽性域は、ヒト化肝臓 TK-NOG マウスを用いた HBV 感染マウスモデルの肝組織と同様、移入した HBV-Tg 肝細胞がクラスターを形成して定着していることが示された。また、non-Tg 肝細胞 1×10^6 個/200 μ l で移入して 9 週後の肝組織では HBsAg を認めないことも確認された。

3) HBV-Tg 肝細胞移入後凍結肝組織における HBV 遺伝子解析と HBsAg タンパク解析

肝細胞移入後、2 週、6 週、8 週、20 週の HSV-TK-WT マウスから採取した凍結肝組織を用いて、DNA 抽出液とタンパク抽出液を作製した。DNA 抽出液による HBV 遺伝子を定量した結果、移入後 2 週、6 週、8 週の順で上昇傾向を示し、20 週では低下傾向を示した。タンパク抽出液による HBsAg 値も HBV 遺伝子の定量結果と同様の傾向を示した。

4) HBV-Tg 肝細胞移入後脾細胞における宿主免疫応答の解析

肝細胞移入後 6 週、8 週、20 週でサンプル採取したそれぞれのマウスにおける血清 HBsAb の経時的測定(HBV-Tg 肝細胞移入から 2 週ごとに採血)を行い、血清 HBsAb と置換率の関連を評価したが、明らかな関連は認められなかった。しかしながら、肝細胞移入後 6 週、8 週、20 週それぞれのマウスの脾臓細胞における IFN- γ 産生能を ELISPOT アッセイで評価した結果、8 週で HBsAg 陽性域 0%の IFN- γ 産生能が高かったのに対して、HBsAg 陽性域を認めた IFN- γ 産生能は低い傾向を示した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

1. Ito H, Kanbe A, Hara A, Ishikawa T. Induction of humoral and cellular immune response to HBV vaccine can be up-regulated by STING ligand. *Virology*. 2019 May;531:233-239. (査読あり)

2. Kanbe A, Ito H, Omori Y, Hara A, Seishima M. The inhibition of NLRP3 signaling attenuates liver injury in an α -galactosylceramide-induced hepatitis model. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 19;490(2):364-370. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. 第 55 回日本肝臓学会総会、東京、2019.5.30、> 新規 HBV 感染マウスモデル作製と宿主免疫応答の解析、神戸 歩、伊藤弘康、石川哲也 (査読あり)

[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:

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:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 <http://www.med.gifu-u.ac.jp/labo/labmed/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 清島 満

ローマ字氏名: Mitsuru Seishima

所属研究機関名: 岐阜大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 教授

研究者番号(8 桁): 10171315

研究分担者氏名:石川 哲也
ローマ字氏名:Tetsuya Ishikawa
所属研究機関名:名古屋大学
部局名:医学系研究科(保健)
職名:教授
研究者番号(8桁):10288508

(2)研究協力者

研究協力者氏名:神戸 歩
ローマ字氏名:Ayumu Kanbe

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、研究者個人に帰属されます。