

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08873

研究課題名(和文) ツパイを用いたHBV高感受性系統樹立と自然免疫影響下でのHBV遺伝子の変異解析

研究課題名(英文) Establishment of breeding colony of tree shrews (*Tupaia belangeri*) for HBV chronic infected animal model and genome sequence analysis

研究代表者

高野 淳一郎 (Takano, Jun-ichiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：20416275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究でヒトと類人猿以外で唯一B型肝炎ウイルス(HBV)に感受性のあるツパイ(*Tupaia belangeri*)を用いて、HBV感染動物モデルの作製を目的としてHBV高感受性ツパイ系統の樹立を目的とした。血中ウイルス量としては低いレベルしか確認はできなかったが、検出率の比較では雑系動物であるツパイにおいてHBV分子クローンの有用性が確認でき、F1群とF2群で比較したところ、2倍以上の検出率であることが確認できた。また、1頭だけだが、肝臓の腫瘍化も確認できた。これらの結果から、HBV高感受性ツパイ系統樹立の高い可能性と今後のHBV研究での有用性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でのツパイを用いたHBV感染実験では、まだ規模が小さいながら、300週齢の個体で肝臓の腫瘍化が確認できた。また、血中ウイルス量は低いものの検出率での比較ではF2群ではF1群の2倍の検出率であり、世代を重ねることによって感受性を高められる可能性も示唆された。ヒトとチンパンジー以外で唯一自然免疫状態で感受性のあるツパイの感染モデルの可能性が確認でき、治療効果の判定などでヒトへのトランスレーショナルリサーチが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to establish a chronic HBV infection animal model, HBV molecular clone was constructed for obtaining highly sensitive tree shrew (*Tupaia belangeri*) lines and evaluating HBV genomic mutation in tree shrews which have functional immune systems. However low-level HBV viral loads were confirmed and we could not evaluate DNA sequence variation, detection rates indicated that helpfulness of HBV molecular clone in tree shrews. The comparison detection rate between F1 and F2 showed F2 tree shrews were highly sensitive for HBV. Furthermore, hepatocellular carcinoma was confirmed in a F1 tree shrew. Our study showed the possibility of establishment of chronic HBV infection tree shrew model and its usefulness for future studies.

研究分野：感染症

キーワード：B型肝炎ウイルス 感染動物モデル ツパイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっている。HBVの種類については、遺伝子型による分類が進んでいるが、現在少なくとも10の遺伝子型 (Genotype A~J) が確認されている。これら遺伝子型の多くは Subgenotype としてさらに細かく分類されている。肝疾患の重篤度は、種々の宿主 (患者) 側の要因にも依存するが、HBVの遺伝子型や血中ウイルス量のレベルで違いがあることも示唆されている。また、HBVは複製段階で一度DNAのような校正機能を持たないRNAが鋳型となることから、DNAウイルスでありながら遺伝子変異が多く生じることが知られており、臨床経過に影響を与えると考えられる特徴的な遺伝子変異がいくつか確認されている。

HBVは宿主特異性が高く、ヒト以外ではチンパンジーに感染することが知られていたが、チンパンジーは動物福祉の観点から実験動物として使用することが事実上不可能であることから、代わりとなる実験動物モデルの確立が求められている。近年になり、ヒト肝細胞を Scid マウスに移植したヒト肝細胞キメラマウスが開発され、HBV研究の様々な領域で利用されている。しかしキメラマウスは機能的な免疫系が存在しないためにヒトでの感染を示しているとは言えず、ウイルスの病原性解析や治療効果の判定については限定的な利用となっている。

一方、過去には最も原始的なサルとして分類されていたツパイ (現在はツパイ目ツパイ科) も、HBVに感染することが報告されている (Walter et. al. Hepatology 1996)。ツパイについては、HBV同様に高い宿主特異性を示すC型肝炎ウイルス (HCV) にも感染することが知られており、数年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症することが報告されている (Amako et. al. J. virol. 2010)。

機能的な免疫系を保持したまま HBV に感受性のあるツパイは、マウスに比べて寿命が7年以上と長いことから、HCVと同様に、HBV感染によっても慢性肝炎、肝硬変、肝癌を発症することが期待できる。これらのことから、ツパイはキメラマウスでは困難な病原性解析や治療効果の判定等で、チンパンジーに代わる HBV 感染動物モデルになり得ると考えられる。HBVの遺伝子型や遺伝子変異と、感染によって引き起こされる病原性との直接的な関係は研究されていない。

2. 研究の目的

我々の所属する施設では、2013年に雄8頭、雌14頭の中国産ツパイが導入されており、これらを種動物として繁殖を試みた結果、これまでの3年間で100個体以上のF1動物と25個体のF2動物が離乳され、繁殖・育成方法が確立されつつある。また、我々はこれまでに、高いウイルス力価を維持する HBV ヒト肝細胞キメラマウス血清 (血中ウイルス量の多いヒト患者血清を接種して作製) 及び、同マウス血清中に含まれる HBV ゲノムを基に作製した分子クローンを新生仔ツパイに接種する感染実験を行い、持続感染する個体を確認している。

これらを用いて、HBV高感受性ツパイ系統の作出と、ツパイにおける自然な免疫の影響下での HBV の遺伝子変異解析及び変異が臨床経過に与える影響の解析が目的であり、具体的に研究期間内で明らかにすることは以下の点である。

ツパイは実験動物として確立しておらず雑系動物であるため、ウイルスに対する感受性においても個体差が大きい。ヒト患者材料由来の HBV ウイルス量の高いキメラマウス血清を接種した個体で、血中ウイルス量を指標にして HBV に感受性が高い F1 個体を選抜して繁殖を行い、HBV高感受性系統を樹立する。

で使用したキメラマウス血清から得られた HBV ゲノムで、最も多く検出された遺伝子配列を基に作製した遺伝子配列が明らかなリファレンスクローンをを用いて感染実験を行う。雑系動物のツパイに配列の明らかな分子クローン由来ウイルスを感染させることで、感受性の高い個体選抜の精度を高めると共に、ツパイでの病態をフォローし、機能的な免疫系を保持したツパイにおける *in vivo* での HBV ゲノムの変異を解析する。

これまでに報告されている代表的な HBV の遺伝子変異を、で作製したリファレンスクローンに組み込み変異導入クローンを作製する。ツパイでの感染実験を行い、ヒトで推察されている HBV の遺伝子変異と臨床経過に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

これまでにヒト血清を接種したヒト肝細胞キメラマウス血清と、それを基に作製したリファレンス分子クローンをを用いて、機能的な自然免疫を持つツパイでの HBV 持続感染を確認できている。本研究では、これまでの実験で血中ウイルス量の多い F1 個体を選抜して交配を行い、HBV に感受性の高い系統の作出を試みる。遺伝子変異の解析を中心に血中ウイルス量、血中マーカー、CT 画像解析による臨床経過等の解析を行う。また、これまでに報告されている臨床症状と関連が推察されている代表的な HBV ゲノムの変異をリファレンスクローンに組み込み、機能的な自然免疫を持つツパイにおける HBV の遺伝子変異と臨床症状との関連性を解析する。

4. 研究成果

本研究では、初年度に雑系動物であるツパイを用いることから接種する HBV を、キメラマウス

血清に加えて、品質が均一である分子クローンをを用い HBV に感受性の高いツパイ系統の選別を目的として定量 PCR による血中ウイルス量の測定を行った。F1 群と F2 群の不定判定も含めたウイルス検出率の比較を行った結果、50%以上の検出率を示した個体は F1 群の 17% (11/63)、F2 群は 46% (19/41)、33%以上では F1 群 51% (32/63)、F2 群 34% (14/41) と F2 群で高い血中での HBV ゲノムの検出率が確認されたが、血中ウイルス量については大きな変化は認められなかった。この結果については、F2 個体が若く検査数が少ないためにウイルスの検出率が高いためとも考えられるが、高感受性ツパイ系統樹立への可能性も示唆された。また、F2 個体の 41 頭中 27 頭は分子クローンを接種しており、F2 個体群においてもキメラマウス血清と同等のウイルス検出率が認められた。

2 年目では初年度に引き続き分子クローンをを用いた感染実験を行い、HBV に感受性の高いツパイ系統の選別を目的として定量 PCR による血中ウイルス量の測定を行った。生後 52 週齢までの HBV 感染キメラマウス血清を感染させたマウス血清群とリファレンスクローンを感染させた群との比較を行った結果、F1 群において 50%以上の検出率を示した個体はマウス血清群で 21% (11/52)、リファレンスクローン群で 17% (2/12) であり、リファレンスクローンを感染材料とした場合でも、キメラマウス血清と同等のウイルス検出率であることが改めて確認された。また、リファレンスクローンを感染させた F2 群での生後 52 週までの血中ウイルス量は 50% (16/32) であり、F1 群の結果と比較して 2 倍以上の検出率であることが明らかとなった。この結果から HBV に高感受性なツパイ系統の樹立への可能性が強く示唆された。

	Detection rate > 50%		50% > D rate > 33%		25% > D rate	
	N=	%	N=	%	N=	%
F1 with mouse serum (Total 52)	11	21%	19	37%	22	42%
F1 with molecular clone (Total 12)	2	17%	3	25%	7	58%
F2 (Total 32)	16	50%	11	34%	5	16%

3 年目では実験感染と血中ウイルス量の定量を測定するとともに、変異導入分子クローンでの感染実験も行った。現在のところ A1762T/G1764A の変異だけを導入した分子クローン 2 個体と G1896A の変異だけを導入した 1 個体において血中ウイルスが検出されているが、両方の変異を導入したクローンでは検出されていない。サンプル数がまだ少ないが、ウイルスの複製を増強すると言われている変異であっても、血中ウイルス量には影響が少ないと示唆された。また、キメラマウス血清を接種した 300 週齢の F1 個体の 1 個体で、肝臓の腫瘍が確認でき、現在病理解析を進めているが、分子クローンでも肝臓の腫瘍化への可能性が示唆された。



これらの結果から、ツパイを用いた HBV 感染実験では、まだ規模が小さいながら、300 週齢の個体で肝臓の腫瘍化が確認できた。また、血中ウイルス量は低いものの検出率での比較では F2 群では F1 群の 2 倍の検出率であり、世代を重ねることによって感受性を高められる可能性も示唆された。コロニーの規模と実験期間の関係で、残念ながら DNA シークエンスによる解析が可能ほどの高い血中ウイルス量は確認できなかったが、ヒトとチンパンジー以外で唯一自然免疫状態で感受性のあるツパイの感染モデルの可能性が確認でき、治療効果の判定などでヒトへのトランスレーショナルリサーチが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----