

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05987

研究課題名(和文) 経口伝播する肝炎ウイルスに対する腸管の自然免疫応答の解明

研究課題名(英文) Intestinal innate immune response to enterically transmitted hepatitis virus

研究代表者

結城 明香 (Hirai-Yuki, Asuka)

国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官

研究者番号：50450557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでA型肝炎ウイルス(HAV)の経口感染を再現するマウスモデルは報告されていない。新世界ザルはHAVに経口感染することが知られているが、本研究では世界で初めてマウスにHAVを経口感染させることに成功し、新しい動物モデルを確立した。経口感染性ウイルス性肝炎が自然感染経路で感染し人の病態を再現する唯一のマウスモデルであり、ウイルス性疾患に普遍的な感染阻害薬の開発や、予防・治療法開発基盤となることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HAVが腸管上皮で初期増殖しないことは予想外であったが、今後このマウスモデルを用いて、腸管組織に感染しないウイルスが腸管から血中そして標的臓器へ到達するメカニズムを明らかにすることは、新たな感染予防法の開発に繋がる。また、このマウスモデルを用いて研究開発を行うことは、国際的な動物実験倫理原則「3R」の一つである「Replacement」の観点から、サル類から系統発生的に下位な動物種への代替の成功例としても評価され、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a novel murine model of hepatitis A virus (HAV) infection that recapitulates critical features of type A hepatitis in humans. Most importantly, the mice can be infected via oral route which is the natural route of this fecal-oral transmitted virus. Previous studies have relied on new world monkeys which are permissive for oral infection of HAV, to investigate pathogenesis to orally transmitted hepatitis virus. This murine model thus offers an excellent platform for research and development of inhibitors for oral viral infections. Further studies are necessary to elucidate the molecular mechanisms by which this hepatotropic virus overcomes intestinal barrier without replicating in the epithelium, get into bloodstream and reach the target organ. This could be applicable to other oral viral infections and may provide a basis for developing effective prophylaxis.

研究分野：実験動物学、ウイルス学、獣医学

キーワード：A型肝炎 マウスモデル 経口感染

様式C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

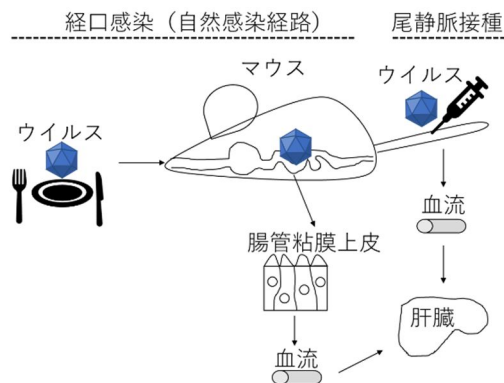
A および E 型肝炎はウイルスに汚染された水や食物の摂取により罹患する。ウイルスは腸管から侵入し、血流に乗って標的臓器である肝臓に到達すると考えられているが、腸管からのウイルス侵入を制御する宿主免疫応答については未解明である。これまでに申請者は A 型肝炎マウスモデルを確立し、肝臓でのウイルス複製が I 型インターフェロン（IFN）応答により制御されることを明らかにした（結城ら、Science, 2016, 353:1541）。腸管でも同様に、ウイルスに対する生体防御の最前線である自然免疫が、肝炎ウイルスの侵入/感染を制御する可能性がある。A 型肝炎ウイルス（hepatitis A virus; HAV）に経口感染したサルでは、免疫組織染色で肝臓にウイルス抗原が検出されるよりも早く、小腸の上皮細胞内にウイルス抗原が検出されることから（Asher ら、Medical Virology, 1995, 47:260）HAV が腸管組織に感染して初期増殖する可能性がある。しかし HAV が腸管上皮のどの細胞に感染するのかわ不明で、HAV に対する免疫応答も未解析である。IFN のうち III 型 IFN は腸管の粘膜上皮細胞の自然免疫応答の中心的な役割を担い、ノロウイルス（Nice ら、Science, 2015, 347:269）ロタウイルス（Pott ら、PNAS, 2011, 108:7944）の感染を制御する。肝臓で I 型 IFN 応答が HAV 感染を制御しているように、腸管では III 型 IFN 応答が HAV の感染を制御していると予想される。

2．研究の目的

本研究では、マウスモデルと培養細胞の両システムを用いて、A および E 型肝炎ウイルスの腸管からの侵入を制御する自然免疫応答の解明を試みる。これにより、経口感染するウイルス性疾患に普遍的な感染阻害薬の開発や、IFN 応答不全者の重症化予測・予防・治療法開発のための基盤的研究となることを目指す。

3．研究の方法

申請者による既報の A 型肝炎マウスモデルは、ウイルスを静脈内に接種する。血中に注入されたウイルスは腸管を経由せずに肝臓へ到達するため、腸管からのウイルス侵入や、腸管での免疫応答を解析できない。そこで本研究では、新たに経口感染モデルの確立を試みた。また、腸管上皮における抗ウイルス応答の主役である III 型 IFN 応答を中心に腸管での免疫応答とウイルス侵入機構の解明を試みた。



経口感染と尾静脈接種でのウイルスの肝臓への到達経路の違い

具体的には下記について検討した。

III 型 IFN 応答は HAV 感染を制御するか

I 型・III 型 IFN 受容体二重欠損マウス ($Ifnar1^{-/-}Ifnl1^{-/-}$) および I 型 IFN 受容体欠損マウス ($Ifnar1^{-/-}$) に HAV を尾静脈接種した後、感染の急性期に腸管を含む種々の臓器（肝臓、脾臓、小腸、大腸、腎臓、肺、脳）、糞便、血清中のウイルス量をリアルタイム PCR で測定した。また、血清肝酵素（ALT）値の経時的な変動、および感染急性期の肝臓病理組織像を調べ、肝炎を評価した。その結果、 $Ifnar1^{-/-}Ifnl1^{-/-}$ の肝臓および糞便のウイルス RNA 量は、 $Ifnar1^{-/-}$ と比較して 5 ~ 10 倍に増加したが、ALT 値や肝臓の病理組織像では両マウス系統間で差が見られなかったことから、III 型 IFN 応答が肝臓での HAV 感染をある程度抑えるが、それは肝障害を軽減するほどではないことがわかった。一方、 $Ifnar1^{-/-}Ifnl1^{-/-}$ の小腸および大腸では、肝臓や脾臓に比べて低レベルではあるがウイルス RNA が検出されたことから、腸管でウイルスが複製した可能性があるが、肝臓で増殖して糞便中に排泄されたウイルスと区別することが困難であった。そこで、

別の方法（後述）で腸管でのウイルス感染を調べる必要があると考えられた。

I 型・III 型 IFN 受容体重欠損マウスは HAV に経口感染するか

HAV は pH 1.0 で 2 時間処理しても感染性が失われないため（Scholz ら、J Gen Virol, 1989, 70:2481）胃内の低 pH 環境でも失活しない。そこで、*Ifnar1*^{-/-}/*Ifnlr1*^{-/-} に HAV を胃内投与し、種々の臓器、糞便、血清のウイルス RNA 量、および血清 ALT 値を経時的に調べ、ウイルスが肝臓に到達して感染が成立するか調べた。その結果、人の A 型肝炎と同様に潜伏期の後に糞便へのウイルス排出、肝臓でのウイルス複製、血清 ALT 値の上昇、ウイルスに対する抗体産生が認められたことから、経口感染が成立し、人での感染経路と病態を再現するマウスモデルが確立された。HAV の非標的臓器である肺、腎臓、脳でウイルス RNA が検出されなかったことから、このマウスモデルは HAV の肝指向性を再現していることが確認された。

経口感染したマウスの腸管で HAV が初期増殖するか

腸管でのウイルス複製の有無を調べるために、経口感染したマウスの小腸、大腸、肝におけるウイルス RNA 量を経時的に測定した。その結果、ウイルスが肝に到達して増殖する前に腸管での初期増殖が検出されなかったことから、HAV が腸管から侵入する際に腸管上皮で複製するのではなく、何らかの方法で通過する可能性が示唆された。HAV の侵入機構として M 細胞のトランスサイトシスも考えられる。M 細胞は腸管上皮細胞の一種で、腸内抗原を積極的に取り込み、ノロウイルスやレオウイルスの侵入門戸となる（Gonzalez-Hernandez ら、Journal of Virology, 2014, 88:6934）。M 細胞はマウス鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）上皮にも存在するため（Mutoh ら、Cell Tissue Res, 2016, 354:175）腸管だけでなく NALT からウイルスが取り込まれる可能性もある。そこで HAV の経鼻感染を試みたが、HAV を経鼻接種した *Ifnar1*^{-/-}/*Ifnlr1*^{-/-} では感染が成立しなかった。M 細胞の関与については、M 細胞機能不全マウス（Spi-B 遺伝子欠損マウスや抗 RNAKL 抗体投与マウス）を用いて HAV の経口感染が阻止されるか調べる必要があると考えられた。また、他のウイルス侵入機構として遊走細胞やエクソソームによる輸送についても検討する必要があると考えられた。今のところ通過のメカニズムの解明には至っていない。

同居によりマウス間で水平感染するか

糞便中にウイルスを排出している感染マウスと同居させることで、未処置マウスへの感染伝播が認められた。これはマウスの食糞行動による糞口感染と考えられる。*Ifnar1*^{-/-}/*Ifnlr1*^{-/-} は予想以上に経口感染に対する感受性が高いことがわかった。家族や異性間での水平感染を再現するモデルとなり得る。

4. 研究成果

これまで HAV の経口感染を再現するマウスモデルは報告されていない。新世界ザルは HAV に経口感染することが知られているが、本研究では世界で初めてマウスに HAV を経口感染させることに成功し、新しい動物モデルを確立した。経口感染性ウイルス性肝炎が自然感染経路で感染する唯一のマウスモデルであり、ウイルス性疾患に普遍的な感染阻害薬の開発や、予防・治療法開発基盤となることが期待できる。腸管上皮で HAV が初期増殖しないことは予想外であったが、今後、このマウスモデルを用いて、腸管上皮に感染しないウイルスが腸管から血中そして標的臓器へ到達するメカニズムを明らかにすることは、新たな予防法の開発に繋がる。また、このマウスモデルを用いて研究開発を行うことはサル類からマウスへの代替の成功例として、国際的な動物実験倫理原則「3R」のひとつ「Replacement」の観点からも評価される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Sun Lu, Li You, Misumi Ichiro, Gonzalez-Lopez Olga, Hensley Lucinda, Cullen John M., McGivern David R., Matsuda Mami, Suzuki Ryosuke, Sen Ganes C., Hirai-Yuki Asuka, Whitmire Jason K., Lemon Stanley M. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Pathogens | 6. 最初と最後の頁 e1009960 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009960 | 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 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Yamane D, Feng H, Rivera-Serrano EE, Selitsky SR, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight KL, Misumi I, Hensley L, Lovell W, Gonzalez-Lopez O, Suzuki R, Matsuda M, Nakanishi H, Ohtonakanishi T, Hishiki T, Wauthier E, Oikawa T, Morita K, Reid LM, Sethupathy P, Kohara M, Whitmire JK, Lemon SM | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Microbiology | 6. 最初と最後の頁 1096 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-019-0425-6 | 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 該当する |

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名 Hirai-Yuki Asuka, Whitmire Jason K., Joyce Michael, Tyrrell D. Lorne, Lemon Stanley M. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Murine Models of Hepatitis A Virus Infection | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine | 6. 最初と最後の頁 a031674 ~ a031674 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a031674 | 査読の有無 無 |
| 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 該当する |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Shiota Tomoyuki, Matsuda Mami, Zheng Xin, Nagata Noriyo, Ishii Koji, Suzuki Ryosuke, Muramatsu Masamichi, Takimoto Kazuhiro, Hanaki Ken-Ichi, Lemon Stanley M., McGivern David R., Hirai-Yuki Asuka | 4. 巻 96 |
| 2. 論文標題 Macrophage Depletion Reactivates Fecal Virus Shedding following Resolution of Acute Hepatitis A in <i>Irfnar1</i> ^{−/−} Mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Virology | 6. 最初と最後の頁 e0149622 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01496-22 | 査読の有無 無 |
| 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 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daisuke Yamane, Asuka Hirai-Yuki, Michinori Kohara, and Stanley M. Lemon. |
| 2. 発表標題 RARRES3 mediates interferon regulatory factor 1-induced suppression of hepatitis A virus replication through modulation of the mTOR activity. |
| 3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Daisuke Yamane, Asuka Hirai-Yuki, Michinori Kohara, Stanley M Lemon. |
| 2. 発表標題 MAVS-independent activity of interferon regulatory factor 1 restricts replication of hepatotropic RNA viruses. |
| 3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 結城明香、塩田智之、松田麻未、Xin Zheng、永田典代、石井孝司、鈴木亮介、村松正道、滝本一広、Stanley M Lemon、David R McGivern、花木賢一 |
| 2. 発表標題 急性A型肝炎が寛解した後も肝臓で長期間持続するウイルスRNA複製：マウスモデルを用いた解析 |
| 3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 山根 大典 (Yamane Daisuke) (60782761) | 公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員 (82609) | |

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 | | | |
|---------|------------------------------|--|--|--|
| 米国 | University of North Carolina | | | |