

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460991

研究課題名(和文)新規B型肝炎自然発症モデルマウスを用いた宿主免疫応答の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of immune response in hepatitis B using novel disease mouse model

研究代表者

高橋 健 (Takahashi, Ken)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60594372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HBV駆除のための効果的な治療法開発にはHBVに対する宿主免疫応答の解明が必須である。本研究では、二種類の新たなB型肝炎モデルマウスと三つの異なる実験系由来のHBV感染細胞を対象としてトランスクリプトーム解析を行い、B型肝炎における免疫応答の網羅的な解明を目指した。モデルマウスを用いた実験では、肝炎発症時の肝内でTh1型免疫遺伝子と同時に抑制系免疫遺伝子の発現上昇が確認され、B型肝炎における免疫応答は正と負の制御バランスのうえに成立していることが示唆された。また、HBV感染細胞での解析では、自然免疫関連遺伝子の有意な発現上昇はみられず、HBVに対する自然免疫応答は減弱していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deeper understanding of the immunopathogenesis of hepatitis B is needed to develop an effective therapy for terminating HBV infection. The aim of this study was to gain comprehensive insight into the immune response to HBV at the transcriptional level. Highly sensitive transcriptome analysis of newly developed HBV model mouse in which HBs antigen is expressed in a liver-specific and time-controlled manner showed that immunological status of inflamed liver was Th1-biased but concomitantly immunosuppressive. The unexpected upregulation of co-inhibitory genes observed in our model implies that adaptive immunity against HBV is regulated by the balance between stimulatory and inhibitory forces as early as the acute phase of infection. In another series of experiments, transcriptome analysis of HBV-infected cells was also performed. The results showed that HBV does not induce a measurable innate immune response in the hepatocytes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：ウイルス肝炎 免疫学

1. 研究開始当初の背景

HBVは複製の鋳型となるcccDNAが核内に存在するため、HCVと異なり排除困難なウイルスである。HBV駆除のための効果的な治療法の開発にはHBVに対する宿主免疫応答の解明が必須といえるが未だ十分とはいえない。B型肝炎の免疫研究には小動物モデルを用いたHBVに対する免疫応答の解析が有用と考えられるが、従来のマウスを利用したB型肝炎研究は、HBVトランスジェニックマウスに抗原特異的T細胞を養子移入する実験系が主であり、B型肝炎における免疫応答の一側面しか捕らえることができなかった。また、HBV感染細胞内で生じる自然免疫応答に関しては、HCVのそれと比べ不明な点が多く、HBVがマウス肝細胞に感染しないことや、これまで適切なHBV感染培養系が存在しなかったことから、研究が行いにくい状況であった。

2. 研究の目的

ウイルス抗原(HBs抗原)を肝特異的に任意の時期に発現させることにより肝炎を発症する新たなHBVモデルマウスを構築し、このマウスを用いて新技術のトランスクリプトーム解析(RNA-seq、もしくはnCounter system)を行い、B型肝炎における免疫応答を遺伝子発現レベルで包括的に明らかにする。また、HBV感染初期に惹起される自然免疫応答は、このマウスの実験系では解析できないため、この点を補完すべく、*in vitro* HBV感染培養細胞系やヒト肝細胞置換キメラマウス由来HBV感染肝細胞を用いて同様のトランスクリプトーム解析を行い、B型肝炎における自然免疫応答の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

① 任意の時期に肝臓特異的にHBs抗原を発現するHBVモデルマウスを二種類作成する(ALB-CreERT2-HBsAg cTgマウス、HDI-HBsAgマウス)。② 異なる実験系を用いた三種類のHBV感染細胞(ヒト肝細胞置換キメラマウス由来HBV感染肝細胞、HBV感染HepG2-NTCP細胞、HBV感染iPS由来肝細胞)を作成する。③ ①、②で得られたサンプルを対象としてRNA-seq、もしくはnCounter systemによる高感度トランスクリプトーム解析を行う。

4. 研究成果

① 新規B型肝炎モデルマウスの作成
1) 肝特異的HBV抗原発現コンディショナルトランスジェニックマウス：過去にHBVトランスジェニックマウス作成に使用されたHBVのfunctional clone (AYW1.3)のプラスミドの供与を海外研究室より受け、それをもとにHBs抗原をCre存在下に発現するHBs抗原発現ベクターを作成し、HBs抗原発現マウスを作成した。このマウスを、アルブミンプロモーター下にCre組換え酵素と変異型エストロゲン受容体のリガンド結合ドメインとの融合タンパクであるCreERT2を発現するマウス、すなわち、タモキシフェン投与により任意の時期に肝臓特異的にCreを発現するAlb-Cre-ERT2マウスと交配し、タモキシフェン投与により任意の時期に肝臓特異的にHBs抗原を発現するHBs抗原コンディショナルトランスジェニックマウス(ALB-CreERT2-HBsAg cTgマウス)を作成した。タモキシフェン投与による肝内のHBs抗原発現は、ELISAでは検出感度以下であったが、qPCRによるmRNAレベルで確認した。

2) プラスミドの水圧注入法により HBV 抗原を肝内発現するマウス (HDI-HBsAg マウス) : 既報に準じて HBsAg の遺伝子配列を組み込んだプラスミドを尾静脈より注入した。ただし、本研究では、CpG 配列のないプラスミドを使用し、プラスミド内 CpG 配列の Toll like receptor 9 活性化による非特異的自然免疫活性が生じない実験系とする新たな工夫をおこなった。このモデルにおいては、ELISA と qPCR の両方で肝内の HBs 抗原の発現を確認した。

② HBV 感染細胞の作製

1) ヒト肝細胞置換キメラマウス由来 HBV 感染肝細胞 : 免疫不全マウス (Fah^{-/-}Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}マウス) の肝臓をヒト肝細胞に置換させたキメラマウスに HBV を感染させた後に HBV 感染肝細胞を採取した。
2) HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞 : HBV の entry factor である NTCP を HepG2 に安定発現させた HepG2-NTCP 細胞に HBV を *in vitro* で感染させた。
3) HBV 感染 iPS 由来肝細胞 : iPS 細胞より分化誘導して作成した肝細胞に HBV を *in vitro* で感染させた。

③ 作成モデルマウスと HBV 感染細胞を対象とした RNA-seq と nCounter system によるトランスクリプトーム解析

予備実験 : 本研究では、主に RNA-seq を解析手法として用いた。RNA-seq と nCounter system とともに新しい実験手法であり、特に RNA-seq はプロトコールも多くの手順を要するため、予備実験による実験系の確立を試みた。健康人末梢血単核細胞を採取後、IFN α , IFN γ , TNF α による *in vitro* でのサイトカイ

ン刺激を行い RNA-seq を行った。その結果、各サイトカインで誘導されることが報告されている既知のサイトカイン誘導遺伝子、或いは未知の遺伝子が検出されることが確認された。また、インターフェロン治療中の B 型肝炎急性増悪患者から採取した末梢血単核球増悪期から回復期に至る過程の血球細胞を採取し、RNA 抽出のうえ RNA-seq を行い、免疫関連遺伝子の発現変動を解析したところ、治療前・中・後の末梢血単核球で、自然免疫関連遺伝子を含む多くの遺伝子で発現変動を認め、内因性のインターフェロン誘導遺伝子の発現が一部示唆された。

本実験 : ALB-CreERT2-HBsAg cTg マウス、HDI-HBsAg マウスの両モデルともに、HBs 抗原の発現のみでは組織学的に明かな肝炎は惹起されず、nCounter システムを用いた高感度のトランスクリプトーム解析でも有意な免疫応答は確認されなかったが、HBs 抗原ワクチン接種後の抗原発現で肝炎と免疫応答が確認された。特に、HDI-HBsAg マウスの肝臓では、Th1 型免疫遺伝子と同時に CTLA4 や PD-L1 などの抑制系免疫遺伝子の発現上昇が確認され、B 型肝炎における免疫応答は正と負の制御バランスのうえに成り立っていることが示唆された。HBV 感染肝細胞内での自然免疫応答の RNA-seq 解析では、ヒト肝細胞置換キメラマウス由来 HBV 感染肝細胞、HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞、HBV 感染 iPS 由来肝細胞の全ての細胞において、自然免疫関連遺伝子の有意な発現上昇はみられず、HBV 感染細胞の自然免疫応答は減弱しており、少なくとも RNA-seq の検出感度以下のレベルであることが明かとなった。

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 2 件)

1. Wieland SF, Takahashi K, et al. Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. J Virol. 88 :752-7, 2014.

2. Inuzuka T, Takahashi K, et al. Mouse Models of Hepatitis B Virus Infection Comprising Host-Virus Immunologic Interactions. Pathogens. 3: 377-89, 2014.

[学会発表] (計 2 件)

1. Takahashi K, Fujii, K, et al. RNA-seq analysis of innate immune response in hepatitis B. AASLD, San Diego, 2016.

2. 高橋健, 丸澤宏之. B型肝炎の免疫応答解析における RNA-seq の有用性. 第 41 回日本肝臓学会西部会, 名古屋, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋健 TAKAHASHI, Ken

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 60594372