

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：免疫系を保持した次世代型 B 型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用
2. 研究開発代表者： 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 医学専攻 教授 竹原 徹郎
3. 研究開発の成果
 - ゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 発現プラスミドを作成し NOD マウス、NOG マウス (T、B、NK 細胞欠損) にハイドロダイナミック法にて投与したところ、HBs 抗原血症およびウイルス血症が成立した。ウイルス血症は NOD マウスに比し NOG マウスで遷延した。ゲノタイプ A の HBV を発現させた NOG マウスは 5 か月以上にわたり高いウイルス血症を示したが、ゲノタイプ C の HBV を発現させた NOG マウスでは血中ウイルス量や肝内 cccDNA 量、HBs 抗原陽性細胞数が低く、約 3 か月でいずれも検出感度以下となった。ゲノタイプ C の HBV 発現肝臓において HBs 抗原陽性かつ cleaved-caspase-3 陽性肝細胞が多いことから、HBV ゲノタイプ C は A より細胞障害性が高いことを明らかにした。
 - ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスに患者血清を接種することにより、1-2 週間で徐々に HBs 陽性細胞が出現し、接種後 10 週でほぼすべての肝細胞へと感染が広がり、持続感染することを明らかにした。ヒト肝細胞の NTCP を siRNA にて発現抑制させると、HBV 接種後の HBs 陽性細胞の拡大は抑制され、血中ウイルス量も抑制されたことから、NTCP を標的とした治療薬の可能性が示唆された。
 - NOG-IL-6Tg マウスの樹立によりヒト成熟単球、マクロファージの誘導が高率に分化するモデルを作製し、ヒト骨髄細胞由来免疫抑制細胞 (MDSC) の誘導に成功した。また、NOG マウスに RORgt プロモーター下で IL-2Rg 遺伝子を発現させ、リンパ節が再生する NOG-RORgt-gc マウスを樹立した。さらに雄性不妊を回避する改良型 TK-NOG マウス (TTR-TKmut30-NOG マウス) を作成した。
 - NOG 及び hIL-3、hGM-CSF をトランスジェニック (Tg) した hIL-3/hGM-CSF-NOG マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を移植し、継時的に各種リンパ球の生着を確認した。hIL3/hGM-CSF を Tg したマウスには non-Tg マウスに比較し、生着率の向上と B 細胞、樹状細胞の良好な生着を認めた。
 - ヒト PBMC を移植した MHC クラス I クラス II ダブル KO (DKO) -NOG マウスに B 型肝炎ワクチンを投与し、移植した B 細胞の活性化を確認した。HLA-A 2 を発現する HBV 発現細胞 (2.2.15) を移植した後、ヒト PBMC を投与することで HBV に特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導された。
 - 肝障害持続マウスおよび野生型マウスの ED16.5 の胎児の卵黄嚢静脈より GFP-Tg マウス由来の初代培養肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、iPS 細胞由来肝細胞を投与し、生下時においてはいずれのマウスでも投与肝細胞がマウス肝臓内に生着していることを確認した。肝障害持続マウスでは生後 6 週の時点においても投与細胞の生着を確認した。
 - EGFP を持つリコンビナント HBV (rHBV-EGFP)、分泌型 nanoLuc を持つ rHBV (rHBV-NL1.3) の作製に成功した。rHBV (rHBV-NL1.3) の感度はよく、その感染性が示された。
 - マウス iPS 細胞では、転写因子 Lhx2 を用いることにより、造血幹細胞への分化誘導に成功した。GSK3 β 特異的阻害剤を用いて、効率良くヒト iPS 細胞から血液細胞へ分化する培養システムを開発した。また、低分子化合物 StemRegenin-1 により造血前駆細胞の増幅に成功した。
 - ヒト iPS 細胞由来肝細胞を肝障害免疫不全マウスに移植した結果、高い濃度のヒト A1b が継続的に検出された。ヒト iPS 細胞由来肝細胞移植による急性肝障害マウスの生存率改善効果は、移植細胞による HGF 産生が主要な要因であることを明らかにした。同一ドナー由来のヒト iPS 細胞由来肝細胞と PBMC を TK- MHC クラス I クラス II DKO-NOG マウスに移植することで、GVHD 反応を起こすことなく肝および免疫双方がヒト化されたキメラマウスを作成することに成功した。
4. その他： 特記事項無し