

免疫系を保持する新規B型慢性肝炎モデルマウスの作成と免疫応答解析

滋野 聰 小玉 尚宏 村井 一裕 山田 涼子 斎田 隼人 阪森 亮太郎 畿 智秀 竹原 徹郎
大阪大学 大学院 医学系研究科 消化器内科学

背景：B型慢性肝炎患者では、肝障害の持続により肝硬変への進展や肝細胞癌の発症を認めるところから、HBs抗原の陰性化を目標として抗ウイルス療法が行われる。これまでに開発された核酸アナログ等の治療によりHBVの複製は抑制され肝炎は沈静化するが、肝細胞からウイルスを完全に排除することは極めて困難であり、肝発がんやHBV再活性化のリスクは依然として残る。B型慢性肝炎患者では、HBVが宿主肝細胞における各種ケモカインの産生やリガンド・受容体の発現を調節することで、免疫系から逃避していると考えられており、この免疫逃避機構を標的とした治療は、既存の治療とは異なりHBV排除を可能とする治療法となることが期待されている。しかし、CHBにおける免疫動態を模倣した動物モデルの開発は十分ではない。我々は免疫系を保持した新規CHBモデルマウスを作製し、IFN治療に対する免疫応答の解析を行った。

方法：HBVゲノムまたはスマリルアセト酢酸ヒドローゼ(FAH)のcDNA、もしくはその両方を単一のSleeping Beauty(SB)トランスポゾンベクターへクローニングした(SB-HBV, SB-FAH, SB-HBV-FAH)。FAH欠損マウスは、ヒトの高チロシン血症1型のモデルであり、チロシン代謝経路の途中で產生されるスマリルアセト酢酸が蓄積するため肝障害を起こすが、高チロシン血症の治療薬でもあるニチシノン(NTBC)を投与すると、代謝経路の上流がブロックされ肝障害が回避される。このFAH欠損マウス(C57BL6由来)を用いて、作成ベクターをSB転移酵素発現ベクターと共に尾静脈急速静注法により肝細胞に導入した。NTBCの中止によりベクター非導入細胞を排除し、HBVとFAHを共発現する肝細胞で肝全体を置換することで、免疫を保持し持続的なウイルス血症を呈するCHBマウスを作製した(図1)。経時的に血清HBV-DNA量およびALT値を測定し、またフローサイトメトリー(FCM)にて肝内単核細胞の免疫動態解析を行った。次にCHBマウスにIFN α (10000Unit/匹、皮下注射)を連日投与し、抗ウイルス効果や肝内・脾臓の各免疫細胞への影響を解析した。また、肝内単核細胞について、BD社Rhapsodyシステムを用いてシングルセル全トランスクリプトーム(scRNAseq)解析(全10415細胞、20000reads/細胞)を行い、Seuratパッケージを用いてデータ分析を行った。

結果：各ベクター導入後NTBC中止により、SB-HBV導入群は体重減少が続き6週目までに死亡したが、SB-FAH群(Controlマウス)及びSB-HBV-FAH導入群(CHBマウス)は一過性の体重減少の後も生存し続けた。CHBマウスでは観察期間中血清HBV-DNAは3.5 log IU/ml程度で推移し(図2A)、肝全体にHBsAgとFAHの発現を認めた。またControlマウスに比して経時に血清ALT値の有意な上昇を認め、ウイルス血症の持続に伴う慢性的な

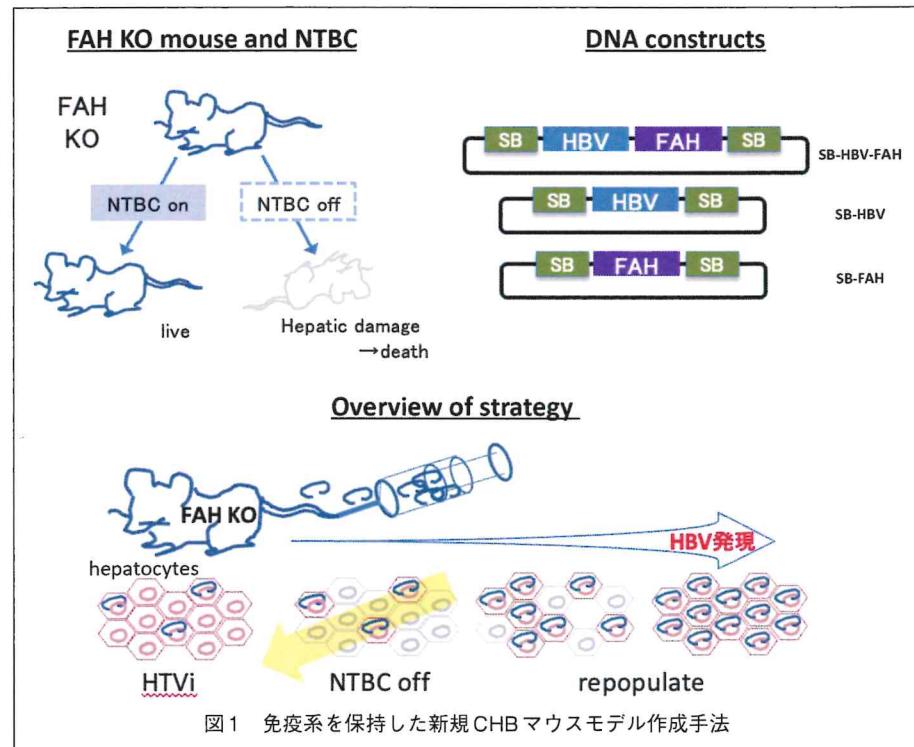


図1 免疫系を保持した新規CHBマウスモデル作成手法

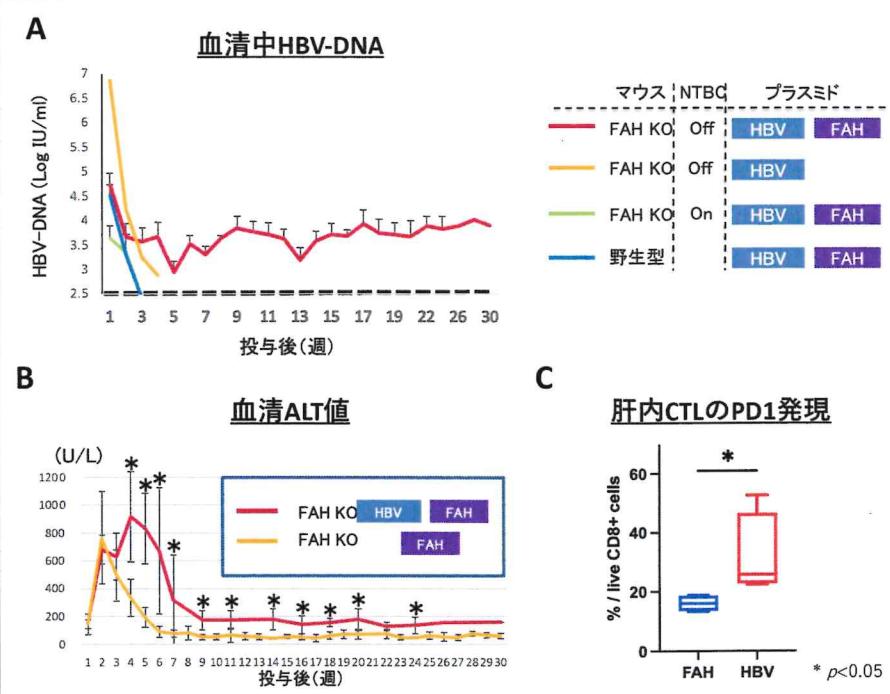


図2 CHBマウスモデルでは長期に渡るウイルス血症と慢性肝障害を呈し、肝内CTLの疲弊マーカー発現上昇を認めた

肝障害を認めた(図2B)。CHBマウス肝内ではPD-1およびTim-3陽性の疲弊したCD8+T細胞(CTL)が増加し(図2C)、疲弊CTLの頻度は血清HBV-DNA量と正の相関を示した。CHBマウスにおいて、

IFN α 治療により血清ALT値が増加し、血清HBV-DNAと肝内pgRNA量は有意に減少した。FCM解析の結果、肝内および脾臓におけるNK細胞の頻度並びにグランザイムB(GZB)産生能増加が認められた。

scRNAseqの結果、肝内单核細胞は全17クラスターに分類され、それぞれのクラスターについて既知の発現マーカーを用いることでannotationが可能であった。IFN治療マウスにおいてはNK細胞・CTLクラスターのGZB発現上昇を認めた。また、マクロファージや樹状細胞など広範な免疫細胞におけるISG15発現上昇が認められた。

結論：FAH欠損による肝細胞置換システムと、尾静脈からの急速静注法による肝細胞へのゲノム導入、Sleeping Beautyトランスポゾンによる任意配列のゲノム上への組み込みシステムを組み合わせることで、長期に渡るウイルス血症と慢性肝障害を呈

し、免疫応答を解析可能な新規CHBマウスマodelを樹立した。IFNのHBVに対する抗ウイルス効果においては、NK細胞等の自然免疫を中心として、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞を含めた多様な免疫細胞の活性化が関与する可能性が示唆された。HBVの完全な排除—“functional cure”—を目指した治療法探索において、本マウスマodelを用いた抗ウイルス効果評価や免疫動態解析が一助となることが期待される。今後は新規治療薬候補による治療効果について、scRNAseq等の網羅的遺伝子発現解析手法を用いた免疫動態の解明を進めたいと考えている。

奨励賞受賞 | 第59回日本消化器免疫学会総会（2022年7月28日、29日 大阪国際会議場）

虫垂切除による大腸炎制御機構の解明

この度は第59回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を頂戴し大変光栄に存じます。日頃よりご指導頂いております、竹原徹郎教授はじめ当教室の諸先生方に、この場を借りて心より感謝申し上げます。研究内容を一層発展させるべく精進してまいります。今後ともご指導・ご鞭撻の程よろしくお願い致します。（滋野聰）

畠井 俊哉¹ 本村 泰隆¹ 茂呂 和世^{1,2}

¹大阪大学 大学院 医学系研究科 感染症・免疫学講座 生体防御学教室

²理化学研究所 生命医科学研究センター(IMS) 自然免疫システム研究チーム

背景・目的：潰瘍性大腸炎(UC)は、直腸から近位結腸にかけての連続的な粘膜炎症により下痢や血便を引き起こし、寛解期と再燃期を繰り返す炎症性腸疾患である。全世界で500万人以上が罹患しており、20~30代に発症するケースが多いと言われている。近年、抗TNF- α 、 α 4 β 7、IL-12/23p40抗体などの生物学的製剤が開発され、臨床応用されている一方、多くの臨床試験が失敗していることからもわかるように、その病態の全体像は未だ不明である。コホート研究により、20歳未満で虫垂切除術(APX)を経験すると、UCの生涯リスクが低下することが明らかになった。盲腸は、体の中で最も頻繁に炎症を起こす部位であるため、その必要性が長い間疑問視されてきたが、近年の研究により、虫垂は腸内フローラの隠れ家であることや免疫グロブリンAを大量に産生するリンパ組織であることが報告されている。これらの知見から、虫垂は宿主にとって有益な機能を持つ組織であると認識されるようになった。一方、潰瘍性大腸炎のごく初期に炎症が認められることから、潰瘍性大腸炎のプライミングサイトと考えられている。これらのことから、大腸炎の病態には虫垂と大腸の連関が重要であり、この連関を理解することで大腸炎の病態解明と根治療法につながると考えられる。本研究では、“なぜ虫垂切除術がUCの発症リスクを下げるのか?”という長年不明であった点を解決することを目的とした。

方法・結果：まず、我々はAPXモデルと、大腸炎モデルを作製した。盲腸先端に存在する虫垂リンパ節を含む組織を取り取り縫合することでAPXモデルを作製した。大腸炎はデキストララン硫酸塩(DSS)を自由飲水させることで誘導した。APXマウスにDSSで大腸炎を誘導すると、偽手術(Sham)と比較して体重減少の抑制(図1A)、大腸の短腸化の抑制(図1B)、炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-6、TNF- α の产生低下といった表現型を示していたことから、マウスモデルにおいてもヒトと同様の結果が得られることがわかった。この時、APXを行うだけで、大腸の長さが長くなっているということに気が付いた。そこで次に、APXを行うことによる変化に着

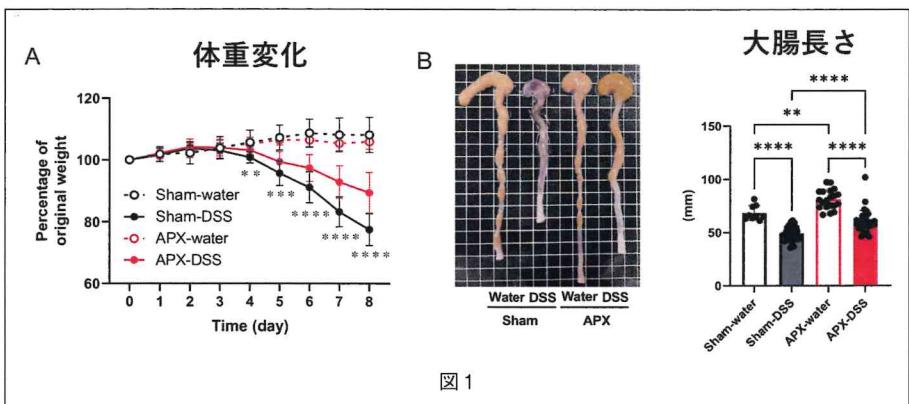
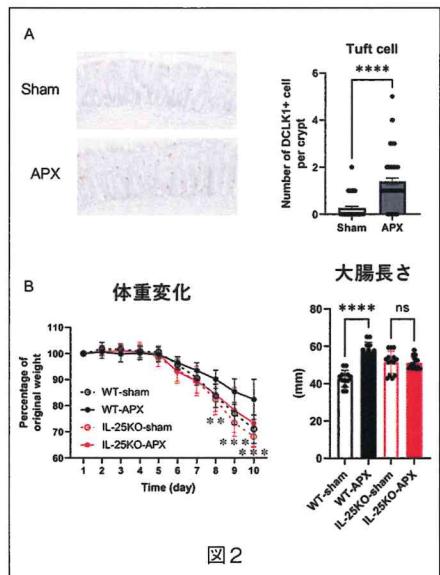


図1

目した解析を行ったところ、APXを行うことで大腸ホモジネート中のIL-5、IL-13といった2型サイトカインが上昇していることを見出した。2型サイトカインの産生源として知られている細胞であるT helper 2 cells (Th2), Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s)の変化を調べたところ、APXにより大腸のTh2に変化はないもののILC2sが増加することがわかった。ILC2sは抗原認識受容体を発現しておらず、上皮細胞がネクローシスした際に放出されるIL-33や、タフト細胞と呼ばれる上皮細胞が産生するIL-25と呼ばれるサイトカインの刺激を受け取り活性化することが知られている。大腸ホモジネート中のIL-33、IL-25の量を測定すると、APXをおこなったマウス大腸上皮特異的にIL-25が亢進していた。免疫組織学的にタフト細胞特異的マーカーであるDCLK1を染色するとAPXマウス大腸上皮にてタフト細胞の過形成を認めた(図2A)。

APXマウスで亢進するIL-25が重要であるかを調べるために、IL-25ノックアウトマウスを用いた解析を行った。IL-25ノックアウトマウスにAPXを行ってもタフト細胞の過形成、ILC2sの増加、2型サイトカインの亢進といった表現型は見られず、この応答はIL-25に依存していることがわかった。このマウスにDSS大腸炎を誘導したところ、体重減少や大腸の長さ、炎症性サイトカインの結果から大腸炎はSham群と同程度起き、APXによる大腸炎緩和



効果が消失していることがわかった(図2B)。IL-25を投与するとタフト細胞の増加、ILC2の増加といったAPXによって確認された表現型を呈し、このマウスはDSS大腸炎が緩和することが示された。最後に、なぜAPXによってタフト細胞が過形成するのかを調べるために、腸内細菌に着目した解析を行った。ShamマウスとAPXマウスを同ケージにて飼育すること

