

# 論文内容要旨

Human Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Acute Liver Failure  
and Rescue by Immunoglobulin in Human Hepatocyte Transplant  
TK- NOG Mice

(ヒト肝細胞キメラマウスを用いた B 型急性肝炎モデルの構築と  
CTLA4Ig による肝炎制御)

Journal of Virology, 89(19):10087–10096, 2015.

主指導教員：茶山 一彰 教授  
(応用生命科学部門 消化器代謝内科学)  
副指導教員：田妻 進 教授  
(広島大学病院 総合診療医学)  
副指導教員：田中 信治 教授  
(広島大学病院 内視鏡医学)

内田 宅郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】B型肝炎ウイルス (HBV) はレセプターを介して細胞内に進入すると考えられており、そのレセプターを有する種は限られている。近年、免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスが作製され、肝炎ウイルスの感染モデルとして広く用いられるようになった。今までの HBV に対する免疫応答の解析にはチンパンジーやトランスジェニックマウスが用いられてきたが、このヒト肝細胞移植免疫不全マウスにヒト末梢血単核球 (PBMC) を投与することによる免疫の再構築が試みられている。岡崎らは、ヒト PBMC を HBV 感染マウスに移植することで NK 細胞を介した肝細胞障害を誘導するモデルを報告している (Okazaki et al. *Hepatology*.56: 555–566, 2012.)。B型急性肝炎においてはHBV特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が重要な役割を果たしていると考えられているが、HBV特異的CTLを検出できるようなキメラマウスを用いた動物モデルは存在しない。

【目的】HBV特異的CTLによるHBV感染肝細胞を標的としたB型急性肝炎モデルを構築し、B型急性肝炎の新規治療法を探索する。

【方法】ヒト肝細胞を移植した免疫不全マウスであるTK-NOGマウスにHBV感染血清を接種し、HBV感染マウスを作製した。感染成立後にB型急性肝炎治癒後の患者から比重遠心法により分離したヒトPBMCを $5 \times 10^6$ 個を腹腔内移植した。PBMC移植後のヒトアルブミン値、HBVDNA量、ALT値、サイトカイン値を経時的に測定し、移植2週後のマウス肝臓の組織学的検討、および肝灌流液中のヒトPBMCの表現型の解析を行った。また、作製した肝炎モデルマウスを用いてB型急性肝炎に対する新規治療薬の探索を行った。CTLA4Igは、抗原提示細胞とT細胞間の共刺激シグナルを阻害することでT細胞の活性化を抑制する。PBMC移植前日と1週間後、および1週間後のみにCTLA4Ig 1.5mgを腹腔内投与し、T細胞の活性化を抑制することでHBV感染肝細胞の傷害が抑制できるかについて検討した。

## 【結果】

### 1. TKNOGマウスを用いたB型急性肝炎モデルの構築

ヒトPBMCを移植後、HBV感染マウスではヒトアルブミン値とHBVDNA量の減少、ALT値の上昇を認め、組織学的にはヒト肝組織領域に著明なリンパ球浸潤とヒト肝組織の破壊を認めた。マウス血中のサイトカインを測定するとGranzyme A、IFN- $\gamma$ の有意な増加を認めた。移植2週後のキメラマウスの肝還流液中のヒトPBMCの生着率を比較すると、HBV感染マウスでは非感染マウスに比べ高値であった。肝還流液のヒト単核球の表現型を解析するとHBV感染マウスで非感染マウスに比べてCD8陽性細胞の割合が増加し、CD4陽性細胞の割合が減少していた。また、HBV感染PBMC投与マウスでのみHBV特異的CTLを検出し、HBV感染においては制御性T細胞(Treg)の割合が有意に低下していた。本モデルがCTLによる肝障害モデルであることを確認するため、ヒトPBMCよりCD8陽性細胞を除いてHBV感染マウスに移植するとヒトアルブミン値、HBVDNA量の低下は見られず、組織学的にも肝細胞の破壊は認めなかった。このことから本モデルマウスにおける肝細胞障害はHBV特異的CTLによるものと考えられた。また、HBV感染マウスにおいてヒトPBMC移植前のマウス血中のHBs抗原は高値だったが、移植2週間には検出感度以下まで低下し、移植前に認めなかったHBs抗体の出現を認めた。

PBMC 移植 2 週後の肝灌流液中にはヒト B 細胞を検出できており、非感染マウスでは HBs 抗体を検出していないことから HBs 抗体はマウス体内で産生されたものと考えられた。

## 2. CTLA4Ig による肝炎抑制効果の検討

作製した B 型急性肝炎モデルマウスに PBMC 移植前、および移植 1 週後に CTLA4Ig を投与した。CTLA4Ig を投与した群では ALT、GranzymeA、IFN $\gamma$  の上昇を認めず、PBMC 接種 2 週後の組織学的検討においても炎症細胞の浸潤および肝細胞の破壊を認めなかった。また、肝灌流液中のヒト PBMC のキメラ率も Control-Ig を投与した群に比べて低値を示した。CTLA4Ig を PBMC 移植 1 週後に投与しても、移植 2 週後のヒトアルブミン値、HBVDNA の低下を抑制した。

**【結論】** ヒト肝細胞キメラマウスを用いて HBV 特異的 CTL による HBV 感染肝細胞を標的とした急性肝炎モデルを構築した。本モデルにおいて CTLA4Ig は HBV 特異的 CTL による肝障害を抑制した。本モデルは HBV 感染のウイルス学的、免疫学的な検討、および重症 B 型急性肝炎の新規治療法の探索に有用になるものと思われた。