

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	内田 宅郎
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主査	教授	田中 純子	印
審査委員	教授	坂口 剛正	
審査委員	准教授	田中 友加	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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ヒト、チンパンジー、ツパイに限られている。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。これまでの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って免疫を再構築したマウスの使用が試みられている。Okazaki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。今回著者は、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した。</p> <p>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 5×10^6 個を腹腔内移植した。PBMC移植後のヒトアルブミン値、HBV DNA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を行った。</p>			

結果は以下のように要約される。

ヒト PBMC を移植後、HBV 感染マウスではヒトアルブミン値と HBV DNA 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。また、マウス血中に Granzyme A、IFN- γ 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率であった。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、HBV DNA 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 週間後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。

さらに、治療に関して以下の検討を行った。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- γ 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 は PBMC 移植 1 週間後のみにも投与しても、移植 2 週後のヒトアルブミン値、HBV DNA の低下を抑制した。

以上の結果から、本論文は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、CTLA4Ig が HBV 特異的 CTL による肝障害を抑制することを明らかにした。本モデルは HBV 感染のウイルス学的、免疫学的な検討の機会を提供し、さらに重症 B 型急性肝炎の新規治療法を開発した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。