

---

# 動物モデルを用いたB型劇症肝炎発症機序の解析

---

一般研究（C） 課題番号06670586

平成6年度—平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書



平成9年3月

研究代表者 長谷川 潔  
(東京女子医科大学医学部)

## 研究組織

研究代表者 長谷川 潔 (東京女子医科大学医学部)

## 研究経費

平成 6 年度	90万円
平成 7 年度	50万円
計	140万円

## 研究発表

### (1) 学会誌

1 Kato, J., Hasegawa, K., Torii, N., Yamauchi, K., Hayashi, N. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*. 23: 389-395, 1996.

2 Baumert, TF., Rogers, SA., Hasegawa, K., Liang, TJ. Two core promotor mutations identified in a Hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J. Clin. Invest.* 98: 2268-2276, 1996.

### (2) 口頭発表

1 Hasegawa, K., Kojima, S., Ishikawa, K., Shizuma, T., Torii, N., Kato, J., Yamauchi, K., Hayashi, N., Liang, TJ. Hyperimmune response in mice to viral antigens produced by transgene of full-length HBV from fulminant hepatitis patient. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 6, 1995.

2 長谷川潔、加藤純子、小島真二、石川賀代、静岡徹、山内克巳、林直諒。劇症肝炎患者におけるHBVに対する免疫亢進のメカニズムの解析。日本肝臓学会総会。1996年4月20日。

## 目的

B型肝炎の肝障害の機序として、宿主の免疫反応によるウイルス感染肝細胞の攻撃が考えられている。これまで、*in vitro*の実験系を用いて、このことが精力的に調べられてきた。また、近年の遺伝子操作技術の発達により、B型肝炎ウイルス（HBV）の蛋白を発現するトランスジェニックマウスが確立され、免疫反応を中心とした肝細胞障害のメカニズムが明らかにされつつある。しかし、トランスジェニックマウスはその作成法が煩雑であることや、トランスジェニックマウスは、もともとウイルスに対して免疫学的な寛容状態にあることから、ウイルスと主要組織適合抗原（MHC）との関連を詳細に調べるには適していない。そこで我々は、リポゾームを用いて成体マウスの肝臓にHBV遺伝子を導入し、肝細胞にウイルス蛋白を発現させるシステムの確立を試みた。この方法を用いれば、ウイルスの免疫に対するかわりとともに、蛋白を免疫する方法では困難な、ウイルス変異の、宿主の免疫系に与える影響も調べることも可能となると考えられる。

## 方法

### HBVコンストラクトの作成

B型慢性肝炎患者の血清より互いにオーバーラップし、また、オーバーラップする領域にそれぞれユニークな酵素サイトを持つ3個のフラグメントをPCR法により増幅した。増幅の後それぞれの酵素で切断し、ライゲートしたのち、AatII(1412)から、DraI(2182)の間の領域を付加して、Fig.1に示すようなコンストラクトを作成した。このコンストラクトは、HBVの全長に、AatIIから、DraIまでをさらに加えた構造になっている。この間の領域は、HBVが複製するのに必要な、DR1,DR2,さらにpolyAシグナルを重複して有しているために、in vitroの実験系で、培養肝細胞のなかで、ウイルス蛋白を合成するとともに、複製する能力を持っている。

### in vitroトランスフェクションの実験

6穴細胞培養プレート(Corning)に、HepG2細胞を $1 \times 10^6$ 個まき、80%コンフルエントとなったところでOpti-MEM mediumに培養液を交換し、あらかじめ室温で5分incubateした40 $\mu$ lのlipofectin(GIBCO-BRL)と100 $\mu$ lのプラスミドを加え、18時間37°C、10% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。その後、10%FCS入りMEM溶液中で培養し、培養上清中のHBs抗原量をEIA Kit (Abbott)により、経時的に測定した。

### in vivoトランスフェクションの実験

4週齢オスのBALB/c, C3H, C57BL/6マウスをエーテルで麻酔したのち開腹し、肝被膜下にlipofectinとプラスミドのconjugateを局注し、閉腹した。その後、経時的に、マウスの眼窩より採血し、HBs抗原、HBs抗体量をEIA法により測定した。また、局注後3日目のマウスを屠殺し、肝組織内のHBs抗原、HBc抗原を各々に対するモノクローナル抗体(Dako)を用いて、酵素抗体法により染色し、その肝細胞内での発現を調べた。肝細胞内のHBVのtranscriptは、肝組織のホモジネートをグアネチジン法により抽出した後、RT-PCRを行いそのproductをアガロースゲルに泳動し、Southern blot analysisで、その存在とサイズを同定した。

Structure of transfected HBV DNA construct

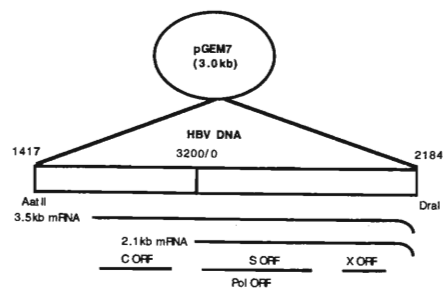


Fig.1

## 結果

まずin vivoでlipofectinによるトランスフェクションが可能かどうかを調べるために、作成したコンストラクトをin vitroでHepG2細胞に導入した。その結果、トランスフェクション後翌日から、培養上清中にHBs抗原が検出され、7日後にピークに達した。(Fig.2) コントロールとして用いたpGEM7ではHBs抗原は検出されなかった。サブタイプでadwとaywの2種類のコンストラクトを導入したが、in vitroの実験では、HBs抗原の産生量に差は認められなかった。そこで以後の実験には、adw由来のウイルス株を用いて解析した。

次いで、in vivoで成体マウスの肝臓にHBVのコンストラクトが導入可能かどうかを調べた。4週齢オスのC57BL/6の肝被膜下に、lipofectinとHBVコンストラクトのconjugateを局注し、経時的にマウスの血中のHBs抗原とHBs抗体を測定した。その結果、ほとんどのマウスで、局注後2日目に血中のHBs抗原量はピークに達し、以後減少していくことがわかった。(Fig.3) したがって、HBs抗原の推移を見るかぎり、このトランスフェクション法によるHBVの

マウスでの発現は一過性であることが考えられた。血中のHBs抗原はどのマウスでも局注後、約1週間で検出されなくなった。代わって、HBs抗体が局注後10日より検出されるようになった。Fig.3では局注後16日目まで表してあるが、その後生存中のマウスを調べたところ、少なくとも2か月目までHBs抗体は高力価のまま存在し続けることがわかった。

HBsAg Secretion of HepG2 Cells after Lipofection-mediated HBVDNA Transfection

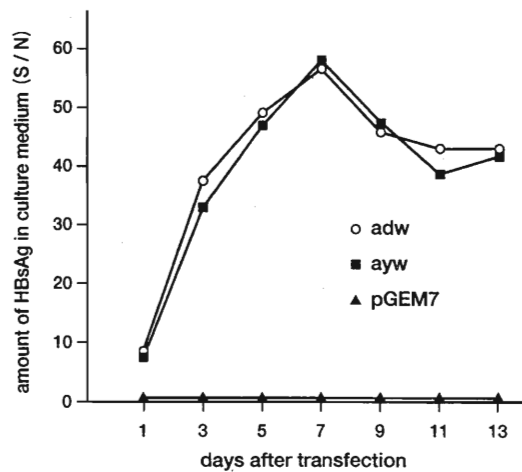


Fig.2

Time course of seropositivity of HBV markers

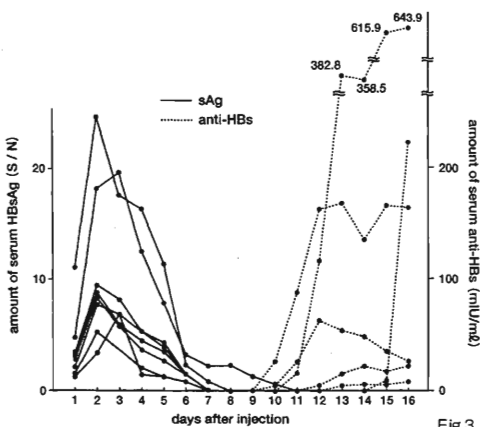


Fig.3

次にHBVのtranscriptの発現を調べた。マウスの肝組織よりRNAを抽出し、RT-PCR法でHBV RNAの存在を確認した。用いたプライマーは、HBVのcoreとenvelopeの領域をカバーする2組を用いた。その結果、core, envelopeいずれの領域のプライマーでも、期待されたサイズのバンドが検出された。(Fig.4) 逆転写酵素を加えないRNAではPCR産物が検出されなかった。これらの結果より、HBVコンストラクトを導入された肝組織内で、HBVの転写産物が特異的に発現していることがわかった。

次いで、HBV関連蛋白が、確かに肝細胞の中で発現しているかどうかを調べるために、マウスの肝組織を採取し、酵素抗体法でHBs抗原とHBc抗原の局在を調べた。その結果、予想されたように、HBs抗原はcytoplasmに、HBc抗原は主に核内に局在していることがわかった。(Fig. 5) 小葉内の局在に関しては特に偏りはなく、肝小葉内に一様に存在していた。以上の結果より、導入されたHBV遺伝子は、マウスの肝細胞内で発現し、そのウイルス蛋白を血中に分泌していることがわかった。

これまでの実験では、C57BL/6 (H-2B)を用いたが、MHCによるHBVに対する反応性の違いを調べる為に、BALB/c (H-2D), C3H (H-2K)についても同様のトランスフェクションの実験を行った。その結果、BALB/c (H-2D)では、C57BL/6 (H-2B)と同様のHBs抗体の産生を認めたが、C3H (H-2K)では、局注15日目まで、抗体の産生はほとんど起こらなかった。(Fig.6) このことから、H-2BとH-2Dは、HBs抗原に対し、high responderであるが、H-2Kは、non-responderあるいは、low responderであり、このin vivoのトランスフェクションの実験系で、HBV関連蛋白に対するMHCの反応性の違いを検索できることがわかった。

## HBV Transcripts in Murine Hepatocytes

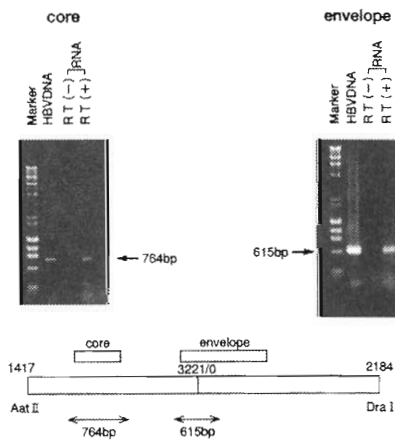


Fig.4

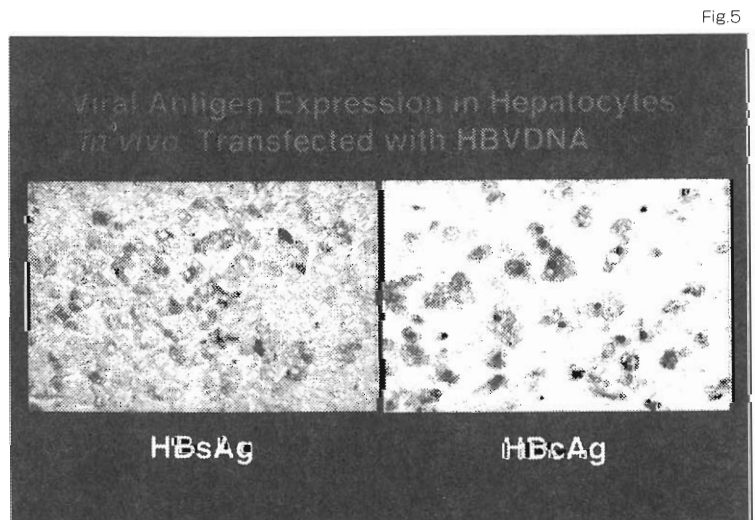


Fig.5

## 考 案

これまでに、HBVのin vivoへの導入実験としては、transgenic mouseの作成（1）、ウイルスベクターを用いた導入法（2）、センダイウイルスを用いたラットへの導入（3）などが報告されている。このうち、transgenic mouseの作成は、その手技が煩雑であるだけでなく、生下時から、マウスが免疫学的な寛容状態にあるために、マウスのウイルスに対する免疫反応の解析に制約を生じるという欠点がある。また、ウイルスベクターの使用は、施設によっては、バイオハザードの観点からかならずしも可能ではない。センダイウイルスについても同様の問題点がある。ところが、cationic liposome (lipofectin)は、すでにin vitroの実験でその導入効率は、カルシウム燐酸法とほぼ同様であることが確認されており、またその取り扱いも容易である。そこで我々は、本研究において、lipofectinを用いたin vivoでのHBVの肝臓における発現系の確立を試みた。まず導入するプラスミドの作成については、in vivoあるいは、in vivoでも複製が可能なように、HBVの全長にHBVのDR1, DR2, Poly Aシグナルを含む部分を余分に付加した。このコンストラクトは、in vivoの導入実験に先立って行われた、培養肝癌細胞への導入実験により、細胞内で発現し、培養上清中に、HBs抗原を分泌することがわかった。また、in vivoでも、局注後2日目には、血中のHBs抗原はピークに達し、10日目には、HBs抗原から、HBs抗体へとseroconversionが起こることがわかった。また肝細胞内でもHBVの転写産物や、酵素抗体法でウイルス関連抗原が肝細胞内に発現していることが証明された。抗原の局在も、HBs抗原がcytoplasmに、HBc抗原が核内に存在し、人におけるB型肝炎の場合と同一であった。（4）ところが本研究では、肝臓内に肝細胞壊死や、リンパ球浸潤など、肝障害の所見を得ることはできなかった。この原因としては、本研究の遺伝子発現が一過性であり、短時間の抗原暴露では、宿主のT細胞系が活性化され難いためと考えられる。そこでデータには示していないが、初回局注後1週間の間隔において、2回目の局注を行い、その3日後にマウスを屠殺して、肝臓の組織所見を調べてみたが、やはり肝障害は起こっていなかった。ただしこの場合には、前に示したが、初回局注後10日でHBs抗体が流血中で検出されており、これによって中和されてウイルス抗原の発現が抑制されていたものと考えられる。本研究では、まず最初にC57BL/6にHBV遺伝子を導入したが、MHCの異なるほかのstrainのマウスにも導入可能であった。本研究では、C57BL/6のほかに、BALB/c, C3Hの肝臓にもトランスフェクションを行った。その結果、それぞれのマウスでHBs抗原は検出されたが、HBs抗体の産生能には、各strain間で違いが見られ、BALB/cでは、C57BL/6と同程度の抗体量がみられたのにたいし、C3Hでは、抗体はほとんど産生されなかった。C3Hは、そのMHCのclass IIが、H-2Kであるが、このクラスが、HBs抗原に対するlow responderであることはすでに報告されている。（5）

以上のように、本研究において、lipofectinを用いて、成体マウスの肝臓に、HBVの遺伝子を導入するシステムを確立した。さらにこの方法で、ヒトにおけるHBVの急性感染の場合と同様に、HBs抗原からHBs抗体へのseroconversionを起こさせることができた。また宿主の免疫学的なバックグラウンドの違いによる、ウイルス抗原に対しての反応性の違いを調べることが可能であった。このように、これまで、H

B Vはその限定された感染宿主のために動物モデルの作成が容易でなく、したがって、肝障害や、持続感染のメカニズムなどを調べるのが困難であったが、このモデルを用いれば、比較的容易にH B Vのin vivoにおける生物学的特性を解析できることが可能となり、病態の解明のために有用となりうると考えられた。

1. Chisari, FV., et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6909-6913, 1987.
2. Davis, HL., et al. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum. Mol. Gen.* 2: 1847-1851, 1993.
3. Kato, K., et al. Direct injection of Hepatitis B virus DNA into liver induced hepatitis in adult rats. *J. Biol. Chem.* 266: 22071-22074, 1991.
4. Bianchi, L., et al. Chronic hepatitis. In: MacSween, RNM., et al., eds. *Pathology of the liver*, 2nd edn. Churchill Livingstone, 1987: pp310-341.
5. Milich, DR., et al. Immune response to the pre-S(1) region of the Hepatitis B surface antigen (HBsAg): A pre-S(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HBsAg. *J. Immunol.* 137: 315-322, 1986.