

Title	Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication
Author(s)	鈴木, 貴弘
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46322
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	すず 鈴 木 たか 貴 ひろ 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 19840 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 11 月 11 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication (HBV 慢性感染非トランスジェニックマウスモデルでの HBV CCC DNA の産生について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 林 紀夫 (副査) 教 授 松浦 善治 教 授 金田 安史

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 B型肝炎ウイルス (HBV) は、肝硬変、肝細胞癌の大きな原因であり、近年ワクチンの開発によりある程度の予防は可能になったが、慢性感染が成立すると極めて治療困難な感染症ある。現在でも多くの新規抗ウイルス剤が開発中で、今後も多くの薬剤の登場が期待される。しかし新薬の臨床応用にはその前段階として動物実験が不可欠である。HBV は極めて高い種特異性を有し、宿主はヒトのみで、人為的にチンパンジーに一過性感染は可能であるが、費用面や倫理的な問題が挙げられている。今回我々はマウスを用い、比較的簡便な B 型慢性感染動物モデルの作成を試みた。

【方法ならびに成績】 動物は、5 から 6 週齢の雌の Balb/cA マウスもしくはヌードマウスを用いた。これに HBV を発現させる目的で、HBV の遺伝子を 1.5 倍長含むプラスミド DNA (pHBV1.5) を用いた。投与方法は Hydrodynamics-based transfection に従い、マウス尾静脈に 25 μ g の pHBV1.5 を 2.5 ml の細胞外溶液に溶解し 8 から 15 秒で投与した。遺伝子の評価として、HBV RNA を、ノーザンブロットで解析した。この遺伝子導入法では、pHBV1.5 は全身に供給されるにもかかわらず、RNA の発現は肝臓のみに認め、肝臓以外の主用な臓器である大脳、胸腺、心臓、肺、脾臓、腎臓では特異的なシグナルは認めなかった。次にこの発現の経時的推移を検討した結果、直後から急速に減少し 2 週間目で僅かなシグナルを認めるのみで、4 週間後には完全に消失した。次に HBV 関連蛋白質の発現を検討するため HBs 抗原を CLIA 法で測定した。また HBV DNA の測定にはプラスミドを除去した状態の血清サンプルからリアル タイム PCR 法を用いた。HBs 抗原は投与直後高値を示すも、4 週目には消失し、HBV DNA も 8 週目に消失した。またこの HBV DNA は HBV ウイルスと同じく粒子性を有しているかを検討するため血清の蔗糖密度勾配法を行った。その結果、HBV ウイルスと同じく 1.21 g/ml の fraction から DNA が検出された。次に、ヌードマウスを使用した。ヌードマウスは T 細胞の機能異常がある為 HBV の発現の長期化が期待された。その結果、このマウスでも RNA の発現が肝臓のみであるという臓器特異性は変わらず、発現期間については、投与後 1 年間以上持続した。また pHBV 投与直後の 3 日目では血清 HBs 抗原と HBV DNA を定量したが、Balb/cA マウスと比べ有意差はなかった。発現期間は検討した全てのヌードマウスで 1 年以上持続した。pHBV のヌードマウスの尾静脈投与

で、一年以上の長期間安定して HBV を発現する感染モデルが作成可能であった。

次にマウス内での HBV の合成経路について検討した。HBV は 3.2 kb の不完全 2 本鎖ウイルスで、感染細胞の核内に移行することにより、CCC DNA が形成される。通常 CCC DNA から HBV が増殖開始される。このモデルでも HBV の自然感染と同じように、肝細胞の核内にプラスミドが導入され、HBV RNA、pregenome を経てウイルスが増幅され、更に細胞内再感染により CCC DNA が合成されている可能性があった。そこで CCC DNA の有無を確かめる為、2 本鎖 HBV DNA を特異的に検出する PCR を用いた。結果このモデルでも CCC DNA が検出された。

更に HBV の感染が投与した pHBV1.5 の単純な発現によるものか或いは HBV のライフサイクルが完成されそこからのウイルス供給によるものなのかを検証した。pHBV1.5 の HBV 領域の *pol* 遺伝子を変異させた変異型 pHBV1.5 をヌードマウスに投与し調べた。結果、ウイルス合成能のない変異型の場合は、HBV の感染は 2 ヶ月間であり、pHBV1.5 を投与した場合に比べ明らかに短く、このモデルの HBV 感染は CCC DNA を鋳型とした HBV のライフサイクルにより支持されたものである事が判明した。

またこのモデルで、抗ウイルス薬での *in vivo* の評価が可能であった。このモデルにインターフェロン α 発現プラスミド (pCMV-mIFNa) を、Hydrodynamics-based transfection により投与した。結果 pCMV-mIFNa 投与後 3 日目をピークに、7 日以内は強く HBV DNA を抑制するが、CCC DNA は持続してマウス肝臓内に残存し、一方 pCMV-mIFNa はマウスから数週間で排除される為、HBV が再増殖し、14 日目には投与前と同等になった。

〔総括〕 Naked DNA のヌードマウス尾静脈投与は、CCC DNA を鋳型にすることにより、長期にマウス肝臓において HBV 産生が可能あり、このモデルは抗ウイルス剤のスクリーニングに有用であった。

論文審査の結果の要旨

B 型肝炎ウイルス (HBV) は高い宿主特異性を有し、未だ有用な小動物モデルは存在しない。鈴木貴弘君は HBV 増殖動物モデルの作成のため、マウスにプラスミドを尾静脈より急速かつ大容量の細胞外液とともに投与する Hydrodynamics based transfection 法により、HBV 発現プラスミドを用いて動物モデルの作成を試みた。結果免疫不全マウスであるヌードマウスを用いてこのモデルを完成させた。

また、更にこの動物で HBV CCC DNA を介して、ヒトの HBV 増殖過程と同じ経路で HBV が増殖していることを解明し、またこのモデルが抗 HBV 剤の評価に利用可能であることも証明した。

以上の研究業績より、鈴木貴弘君は学位の授与に値すると考えられる。