慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone.
Sub Title	C型肝炎ウィルスの感染性クローンを用いたヒト肝組織移植マウスへの感染実験
Author	前田, 憲男
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.33-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050302-0033

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone.

(C型肝炎ウィルスの感染性クローンを用いたヒト肝組織移植マウスへの感染実験)

前　田　　憲　男

内容の要旨

C型肝炎ウィルス（HCV）は持続感染し、肝硬変から高率に肝癌を合併することが社会問題となっている。近年、ゲノム解析とクローニング技術の進歩により、HCVの感染性クローンが実験的研究において利用可能となった。しかし、感染性クローンを用いたこれまでの感染実験は、チンパンジーまたは単離したヒト肝細胞モデルでの報告に限られてきた。本研究では、ヒト肝組織片を免疫不全マウスに移植し、C型肝炎患者血清と感染性クローンを用いてHCVの感染を追究した。nested RT-PCR, real-time detection PCRおよび*in situ* PCRを用いてHCV RNAを評価し、さらに組織学的・免疫組織学的検討を加えた。

ヒト正常肝（非HCV感染）組織片をnon-obese diabetic/severe combined immunodeficiency（NOD/SCID）マウスの腎被膜下へ移植することにより、growth supportなしに、ヒト肝組織が形態を良好に保ったまま、約60%のマウスに4週間生着した。albumin, α-1-antitrypsin, cytokeratin 8, cytokeratin 19といった種々の肝組織に関連するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学から、移植片がヒト由来であり、機能も保たれていることが示された。慢性肝炎患者より得たHCV感染肝組織片も同様にNOD/SCIDマウスに良好に生着した。

次にヒト正常肝組織を移植後、C型肝炎患者血清または感染性クローンをマウスに静注にて接種し、マウス血清中のHCV RNAをnested RT-PCR法とreal-time detection PCR法により検討した。患者血清接種後、positive strand HCV RNAは4週間検出され、ウィルス量は450～910copies/mlであった。またHCVのnon-structural protein 3に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学でも、肝細胞の細胞質にHCVのシグナルが検出された。さらに、感染性クローン接種1週間後に回収したヒト肝組織片の*in situ* PCR法による検討でも、10～20%の肝細胞の細胞質に明瞭なHCVのシグナルが検出され、マウス血清中のウィルス量は440copies/mlであった。一方、組織学的検討では感染した肝細胞に明らかな形態変化を認めなかった。

以上より、HCVの感染性クローンが、NOD/SCIDマウスに移植したヒト肝組織に対して、患者血清と同様に肝細胞に感染しうることを明確に示すことができた。今後さらにこの手法を改良し、種々の感染性クローンを用いることで、HCVの感染、増殖および肝障害の病態解明に向けたアプローチが可能になるものと期待される。

論文審査の要旨

C型肝炎ウィルス（以下HCV）にはin vitroでの効率良いウィルスの複製系や適切な小動物モデルがないため、HCV疾患研究の障壁となってきた。近年、HCVの感染性クローンが実験的研究に応用可能となったが、感染性クローンを用いたこれまでの感染実験は、チンパンジーまたは培養細胞系での報告に限られており、ヒト"肝組織"を用いた実験系の確立が課題であった。本研究では、HCVの感染性クローンがNOD/SCIDマウスに移植したヒト肝組織に、患者血清と同様に感染しうることを免疫組織化学と*in situ* PCR法により明確に示した。

審査ではまずNOD/SCIDマウスに移植されたヒト肝組織について質疑がなされた。免疫組織化学により移植片からcapillaryの血管新生が認められ生着に寄与することが示唆されており、今後VEGFといったgrowth supportにより生着率が改善する可能性もあると回答された。また、単離した肝細胞を移植する方法論との比較についても質疑がなされた。単離肝細胞をマウスに効率良くキメラ移植するためには、HGF受容体抗体投与や肝障害を惹起するtransgenic mouseを用いるなどのgrowth supportが重要であったが、本手法はシンプルな移植のみで肝組織全体を検討可能なモデルとして有用と考えられると回答された。また、最近新たに開発されたNOD/SCID/γc-/-（NOG）マウスでは移植片の拒絶反応がNOD/SCIDマウスよりも更に乏しく、肝組織および肝細胞の生着率の改善が期待されており、今後の検討課題であろうとの助言があった。

次に感染性クローンおよび患者血清を用いたHCVの感染実験について質疑がなされた。肝組織を移植しないコントロールマウスへのHCV接種においてはウィルスが速やかに消失しnested RT-PCR法にてウィルス血症がみられなかったこと、一方ヒト肝組織移植マウスにおいてHCV感染性クローン接種後の*in situ* PCR法による検討ではコントロールのマウス肝臓にHCVのシグナルは検出されなかったことが述べられ了解された。またマウス血清中のウィルスtiterが低かったことについては、血清中に放出されるウィルス粒子は肝組織の10^{-2}程度と少ないことや、血清中でのクリアランスが数時間から一日のオーダーと早いことなどが原因と考えられると回答された。

最後に、現在C型肝炎の肝移植症例が増えていることから、本実験を臨床にどのように活かすことができるのかが今後の最も重要な課題であり、再感染を早期に予測し抗ウィルス薬を効率よく投与してゆくための臨床応用が望まれるとの指摘があった。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、種々の感染性クローンに応用することで、HCVの感染、増殖および肝組織障害の病態解明に向けたアプローチを可能とするものと考えられ、消化器病学上価値ある有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　日比　紀文
　　外科学　北島　政樹　微生物学・免疫学　小安　重夫
　　微生物学・免疫学　石川　博通
学力確認担当者：北島　政樹
　　審査委員長：北島　政樹

試問日：平成16年12月29日