

氏名 (本籍)	佐竹 真一 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 714 号
学位授与日付	平成 19 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Inhibition of nuclear factor-kappa B induces inflammatory cell migration and exacerbates severe liver injury in hepatitis B virus transgenic mice
審査委員	(主査) 教授 森 脇 久 隆 (副査) 教授 高 見 剛 教授 清 島 満

### 論文内容の要旨

#### 背景と目的

劇症肝炎は、極めて予後不良の疾患であり、その病態は、広範囲に進展した肝細胞死と肝再生不全によって特徴づけられる。そのため、肝細胞死のメカニズムの解明は有効な治療法の開発に繋がると考えられる。近年、細胞死の機構にアポトーシスの概念が導入され、その詳細な分子機構が解き明かされつつある。転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) は、サイトカインを初めとした多くの遺伝子発現を誘導する。

一方、細胞に抗アポトーシスシグナルを伝えることが知られている。また、B 型肝炎ウイルス (HBV) による肝炎発症のメカニズム解明に HBV トランスジェニックマウスが応用されている。HBV トランスジェニックマウスに HBV 特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) を投与すると、CTL によって直接肝細胞がアポトーシスに陥り、その後その周囲に炎症細胞浸潤が誘導され、劇症肝炎に類似した肝障害が生じることが知られている。

しかし、HBV 感染によって誘発される肝障害における NF- $\kappa$ B の役割は、いまだ十分解明されてない。本研究では、HBV トランスジェニックマウスを用いた肝障害モデルにおいて、NF- $\kappa$ B が CTL によって惹起される肝障害の劇症化においてどのような役割を果たすか検討した。

#### 方法

- (1) HBV トランスジェニックマウスは、Dr Chisari から供与された。HBs 抗原の残基 28 と 39 の間に位置するエピトープ (IPQSLDSWWTSL) を認識する CD8<sup>+</sup> CTL クローン (HBV 特異的 CTL) を尾静脈から注射することによって B 型劇症肝炎モデルを作製した。
- (2) NF- $\kappa$ B 活性を抑制するために、NF- $\kappa$ B のインヒビターである I $\kappa$ B superrepressor をアデノウイルスベクターに組み込んだ Ad5I $\kappa$ B を  $2 \times 10^9$  plaque-forming units 静注し、72 時間後に HBV 特異的 CTL クローンを注射した。また、コントロールアデノウイルスとして Ad5LacZ を Ad5I $\kappa$ B と同様に投与した。
- (3) NF- $\kappa$ B の発現は、Electrophoretic Mobility Shift Assay にて検討した。血清 ALT 活性の測定並びに組織学的所見 (H. E., TUNEL 染色) にて肝障害の程度を検討した。RNase protection assay を用いて肝臓内サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) mRNA を測定した。肝内リンパ球を分離し、表面抗体で染色後、分画を flow cytometry で解析した。

#### 結果

- i) HBV トランスジェニックマウスに抗原特異的な CTL クローンを注射すると、2, 6 時間後にコントロールマウスにおいて NF- $\kappa$ B 活性の上昇が認められた。Ad5I $\kappa$ B を前投与したマウスでは CTL 投与後の NF- $\kappa$ B 活性の上昇は抑制された。
- ii)  $1 \times 10^7$  個の CTL を投与されたマウスでは、12, 24 時間後の血清 ALT 活性の著明な上昇が認めら

れたが、 $1 \times 10^6$  個の CTL 投与マウスでは血清 ALT の上昇は軽度であった ( $P < 0.01$ )。しかし、Ad5I  $\kappa$ B を前処置したマウスに、 $1 \times 10^6$  個の CTL を投与すると、24 時間後で血清 ALT 活性の著明な上昇が認められた ( $P < 0.01$ )。組織学的解析では、Ad5I  $\kappa$ B を投与したマウスにおいて、著明な炎症細胞浸潤が認められ、TUNEL 陽性細胞数の増加が認められた ( $P < 0.05$ )。

iii) RNase protection assay にて解析した肝臓内サイトカインは、 $1 \times 10^7$  個の CTL を投与したマウスにおいて、TNF- $\alpha$  mRNA と IFN- $\gamma$  mRNA の発現の誘導がみられたが、 $1 \times 10^6$  個の CTL を注射したマウスでは、これらのサイトカインの発現は殆ど認められなかった。しかし、Ad5I  $\kappa$ B 前処置マウスにおいて、TNF- $\alpha$  mRNA と IFN- $\gamma$  mRNA の発現は、 $1 \times 10^6$  個の CTL を投与後 24 時間での上昇が認められた。

iv) Ad5I  $\kappa$ B 前処置マウスと Ad5LacZ 前処置マウスにおいて肝内浸潤白血球を flow cytometry にて検討したところ、Ad5I  $\kappa$ B マウスの肝内白血球の総数は、Ad5LacZ マウスに比べ著明に増加していた。それぞれの細胞分画を検討したところ、NK 細胞と CD8+細胞で特に著明な増加が認められ、また CD4+細胞、マクロファージ、NKT 細胞、顆粒球についても増加が認められた。

#### 考察・結語

HBV トランスジェニックマウスを用いた一連の研究により、HBV 起因性肝障害の機序は次のように考えられている。ウイルス感染肝細胞を認識した CTL は、直接周囲の肝細胞をアポトーシスに陥らせる一方、IFN- $\gamma$  を分泌する。IFN- $\gamma$  はマクロファージを活性化し、活性化したマクロファージは TNF- $\alpha$  を産生し、自らをさらに活性化するとともにウイルス感染細胞を障害し、また類洞内皮細胞などのケモカイン産生を促し、好中球などを動員することにより肝組織障害が進展するものと考えられている。

しかしながら、肝細胞内で生じている細胞内シグナルに関しては不明な点が多い。本研究では、少量の CTL 投与では殆ど肝障害が認められないにもかかわらず、肝細胞の NF- $\kappa$ B 活性を抑制することによって強い肝障害が認められた。このことは、肝細胞の NF- $\kappa$ B の抑制が肝炎ウイルス起因性の肝炎の重症化にもつながることを意味している。CTL 投与により分泌された IFN- $\gamma$  はマクロファージを活性化し、TNF- $\alpha$  を分泌する。

しかし、CTL の量が少ない場合 RNase protection assay で示したように TNF- $\alpha$  の分泌は少量である。また、NF- $\kappa$ B が抑制されていた場合には、少量の TNF- $\alpha$  によっても肝細胞は容易にアポトーシスを引き起こす。それに伴い誘導されたマクロファージはウイルス感染細胞を障害し、さらにケモカイン産生を誘導し、肝内浸潤白血球の解析でも示したように好中球など炎症細胞を動員することにより強い肝障害が発現するものと考えられた。

これらの結果は、NF- $\kappa$ B が HBV 特異的 CTL の投与に起因する肝炎において、重要な役割を果たすことを示すと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 佐竹 真一は、B 型肝炎ウイルス・トランスジェニックマウスにおいて特異的細胞障害性 T リンパ球静注によって誘導される劇症肝炎モデルを用い、NF- $\kappa$ B が炎症細胞の動員と肝細胞アポトーシスの誘導に深く関与することを解明した。この知見は消化器病学、肝臓学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Inhibition of nuclear factor-kappa B induces inflammatory cell migration and exacerbates severe liver injury in hepatitis B virus transgenic mice  
Hepatology Research (in press).