

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19120

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス遺伝子型Aに特有のHBs蛋白質発現制御機序の解明

研究課題名(英文) Regulation of HBs antigen expression in HBV genotype A infection

研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：10547780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)の抗原蛋白質はHBV特異的免疫応答の抑制に関わっている。そして、遺伝子型(Gt)Aウイルスの感染細胞ではGt-Cウイルス感染細胞よりもHBs抗原が多く発現していた。本研究は、HBs抗原蛋白質発現制御機序を解析することを目的として転写と翻訳効率を検討した。その結果、Gt-AとGt-CのS1またはS2プロモーターからの転写活性は同程度であることが明らかになった。また、HBs抗原蛋白質の翻訳効率も同程度であることが示された。以上のことから、HBs抗原蛋白質の発現は翻訳後に制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) antigens are involved in the suppression of the immune response to the virus. HBs antigens in cells infected with genotype A (Gt-A) virus were more abundantly expressed than those in cells infected with genotype C (Gt-C) virus. In the present study, transcription and translation efficiency were examined to analyze the regulatory mechanisms of HBs antigen expression. The results revealed that the transcription activities of the S1 and S2 promoters derived from Gt-A and Gt-C are comparable. In addition, no significant difference was observed in translation efficiency. These results suggest that HBs antigen expression is regulated after translation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス抗原発現制御

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は感染細胞核内において閉環状二本鎖DNA(cccDNA)となり、そこから4種類のウイルスRNA(3.5、2.4、2.1及び0.7kb)が転写される。3.5kb mRNAからはPreCore、Core、HBe抗原及びポリメラーゼ蛋白質が翻訳され、2.4と2.1kb mRNAからはHBs抗原(PreS1、PreS2及びS蛋白質)が翻訳される。そして、0.7kb mRNAからはHBx蛋白質が翻訳される。HBVはウイルスゲノムの塩基配列の差異からAからHの遺伝子型(Genotype: Gt)に分類される。

HBV感染者は国内に約140万人おり、近年はGt-A感染者が増加傾向にある(Kobayashi *et al.*, J Gastroenterol 2003)。HBVは1歳未満で感染すると90%以上で持続感染化するが、成人感染においてはGt-Aを除き持続感染化率は1%未満と稀であり、一過性感染を経てウイルスは排除される。一方、Gt-Aは成人感染において他のGtよりも高い確率で持続感染化することが知られている。しかし、その機序は不明である。これまでの研究から、HBV持続感染にはウイルス抗原(HBs、HBe蛋白質)によるHBV特異的免疫応答の抑制が関与していると考えられている(Chen *et al.*, PNAS 2004, Schirmbeck *et al.*, Eur J Immunol 2003, Nagaraju *et al.*, J Viral Hepat 1997)。

HBVはヒトとチンパンジーに感染するウイルスである。しかし、ヒトの肝癌由来株化細胞及び凍結初代ヒト肝細胞への感染効率は極めて低く持続感染が成立しない。研究代表者が所属する研究室ではこれまで、アルブミンプロモーター制御下にウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター遺伝子(uPA)のcDNAを導入したcDNA-uPA/SCIDマウスを作成し、凍結初代ヒト肝細胞を移入することで70~90%がヒト肝細胞に置換したヒト肝臓キメラマウスを作成してきた。そして、そこから取り出した初代ヒト肝臓キメラマウス肝細胞を凍結させることなく播種することで、HBVが肝臓と同様に自然感染で感染拡大し、持続感染化する*in vitro*培養系を構築した(図1, Yamamoto *et al.*, J Hepa 2016)。

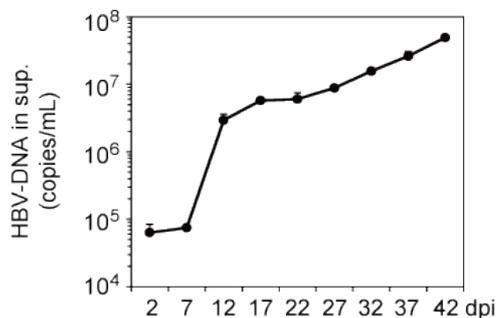


図1. 初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞におけるHBV持続感染

このような背景の基、研究代表者はHBV Gt-Aの成人感染における持続感染化機序を明らかにすることを旨として、*in vitro*持続感染

培養系において上清中のウイルス抗原及びHBV-DNA量をGt-AとGt-Cで比較した。その結果、Gt-AにおいてHBs抗原が多く放出されていることが示された(図2)。

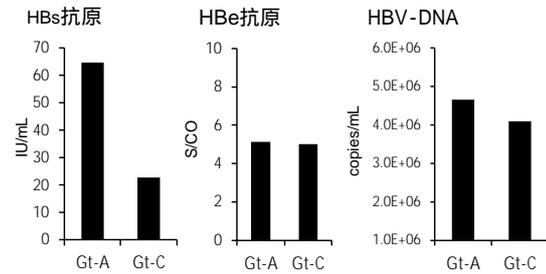


図2. HBV持続感染初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞における上清中ウイルス抗原量とHBV-DNA量

2. 研究の目的

HBs抗原を含むウイルス蛋白質はHBV特異的免疫応答の抑制に関わっていると考えられている。Gt-A持続感染においてGt-Cよりも多くのHBs抗原量が認められたことから、本研究はHBs抗原の発現制御機序を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*におけるHBs抗原量を比較する為、ヒト肝臓キメラマウスにHBV Gt-AのAe_JPN株を含む2株、またはGt-CのC_JPNAT株をそれぞれ感染させた。経日的に血清中のHBV-DNA量を測定した。また、血清中のHBV-DNA量が定常状態に達した段階のHBs抗原量を測定した。

(2) 転写産物量と翻訳産物量を検討する為、HBVゲノム全長の1.24倍長を有するプラスミドをHepG2-hNTCP細胞に導入した。HBsコード領域を標的としたプローブを用いたTaqMan定量PCRでmRNA発現量を定量すると共に上清中HBs抗原をELISAで測定した。

(3) HBs抗原発現におけるプロモーター活性を検討する為、2.1と2.4kb mRNAの転写を制御するGt-A及びGt-CのS1及びS2プロモーター配列をリポーター遺伝子の下流に連結したプラスミドをそれぞれ構築した。HepG2-hNTCP細胞に導入し、転写活性を比較した。

(4) HBs抗原蛋白質の翻訳効率を検討する為、HBs抗原の下流に翻訳後自己切断するペプチドを挟んで分泌型ルシフェラーゼを連結したプラスミドを構築した。これをHepG2-hNTCP細胞に導入し、翻訳効率を比較した。

4. 研究成果

(1) Gt-A(Ae_JPN株)持続感染ヒト肝臓キメラマウスにおける血清中の単位HBV-DNA量あたりのHBs抗原量はGt-C(C_JPNAT株)感染個体

に比べて有意に多かった(図 3)。また、他の Gt-A の株(A2)においても同様だった。これは、*in vivo* においても Gt-A 感染細胞は HBs 抗原を多く細胞外に放出していることを示している。

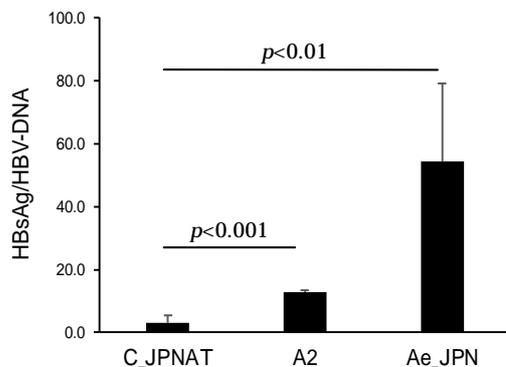


図 3. HBV 持続感染ヒト肝臓キメラマウスにおける血清中 HBs 抗原の比較

(2) Gt-A と Gt-C の 1.24 倍長プラスミドを導入した HepG2-hNTCP 細胞の培養上清中 HBs 抗原量を測定した。また、それぞれの細胞における HBV mRNA を定量した。その結果、先の実験結果と同様に Gt-A プラスミド導入細胞は Gt-C よりも HBs 抗原が高発現していた。しかし、HBV mRNA の発現量においては Gt-A の高発現は認められなかった。

(3) 上記の実験で検出される HBV mRNA は 2.1 と 2.4kb mRNA と共に 3.5kb mRNA も含まれている。そこで、HBs 抗原発現に用いられる 2 種類の mRNA それぞれのプロモーター活性を比較した。その結果、Gt-A 及び Gt-C の S1 及び S2 プロモーター活性は同程度であることが示された(図 4)。

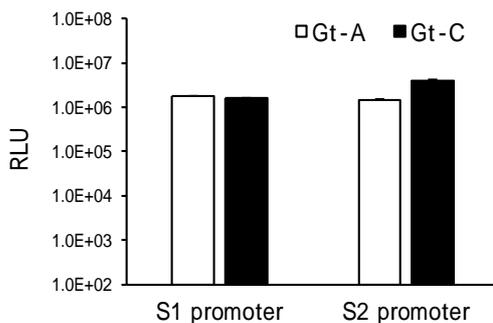


図 4. S1 及び S2 プロモーター活性の比較

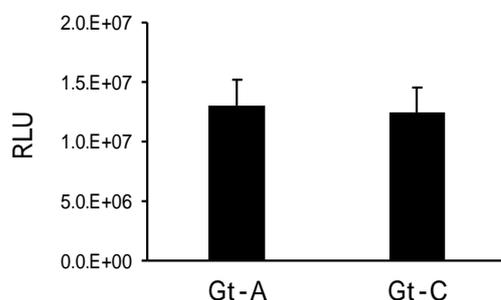


図 5. HBs 抗原蛋白質翻訳効率の比較

(4) Gt-A と Gt-C の転写活性に差が認められなかったことから、翻訳効率を比較した。その結果、翻訳効率は同程度であることが示された(図 5)。以上の結果から、Gt-A の HBs 抗原の高発現は翻訳後過程において制御されていることが示唆された。今後は HBs 抗原の翻訳後過程における制御機序について解析を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Sato Y, Matsui H, Yamamoto N, Sato R, Munakata T, Kohara M, Harashima H. Highly specific delivery of siRNA to hepatocytes circumvents endothelial cell-mediated lipid nanoparticle-associated toxicity leading to the safe and efficacious decrease in the hepatitis B virus. *J Control Release*. 2017 Nov 28;266:216-225. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.044. (査読有り)
2. Kayesh MEH, Ezzikouri S, Chi H, Sanada T, Yamamoto N, Kitab B, Haraguchi T, Matsuyama R, Nkogue CN, Hatai H, Miyoshi N, Murakami S, Tanaka Y, Takano JI, Shiogama Y, Yasutomi Y, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Interferon- response is impaired by hepatitis B virus infection in Tupaia belangeri. *Virus Res*. 2017 Jun 2;237:47-57. doi: 10.1016/j.virusres.2017.05.013. (査読有り)
3. Sanada T., Hirata Y., Naito Y., Yamamoto N., Kikkawa Y., Ishida Y., Yamasaki C., Tateno C., Ochiya T., and Kohara M. Transmission of HBV-DNA mediated by ceramide-triggered extracellular vesicles. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 Oct 24;3(2):272-283. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.10.003. (査読有り)
4. Kouwaki T., Fukushima Y., Daito T., Sanada T., Yamamoto N., Mifsud E. J., Leong C. R., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M., Matsumoto M., Seya T. and Oshiumi H. Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol*. 2016 Aug 31;7:335. doi: 10.3389/fimmu.2016.00335. (査読有り)
5. Yamamoto N, Sato Y, Munakata T, Kakuni M, Tateno C, Sanada T, Hirata Y, Murakami S, Tanaka Y, Chayama K,

Hatakeyama H, Hyodo M, Harashima H, Kohara M. Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection. J Hepatol. 2016 Mar;64(3):547-555. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.014. (査読有り)

6. Sanada T, Tsukiyama-Kohara K, Yamamoto N, Ezzikouri S, Benjelloun S, Murakami S, Tanaka Y, Tateno C, Kohara M, Property of hepatitis B virus replication in Tupaia belangeri hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jan 8;469(2):229-235. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.121. (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

1. 山本直樹, HBV 持続感染に最適な培養系の構築, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017 年
2. 山本直樹, 新規肝臓特異的 pH 応答性 DDS(MEND/HBV-siRNAmix)を用いたHBV持続感染の制御, 第 26 回抗ウイルス療法学会 2016 年
3. Naoki Yamamoto, siRNA-based therapies to chronic HBV infection using a novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice, 2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2015 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・主任研究員
研究者番号: 10547780

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし