

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09335

研究課題名(和文) HBVジェノタイプ特異的免疫抑制反応解析による新規治療法開発

研究課題名(英文) The developing the novel therapy by analyzing HBV-genotype specific immune-response

研究代表者

近藤 泰輝 (Kondo, Yasuteru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70455822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHBVジェノタイプBとCで異なる免疫反応を誘導しうるmiRNAsを同定することを目的とした。結果としてmiR34cのみHuh7細胞内とエキソソーム中の両方においてジェノタイプBとCで有意に異なる発現をしていることを見出した。ネットワーク解析の結果、miR34cはPD-L1発現とアポトーシス誘導に関わりうることを見出した。細胞内にmiR34c mimicを導入した結果、単球のPD-L1発現が抑制された。エキソソーム中のmiR34cはジェノタイプCでBと比較して有意に低いため、PD-L1の免疫細胞での発現がジェノタイプCで抑制されていない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVジェノタイプBとCでは免疫反応が異なることが想定されていたが、メカニズムについては未だ不明な点が多かった。本研究によりmiR34c発現がジェノタイプBとCで異なることを見出した。このmiR34cの発現をコントロールすることによりHBV特異的な免疫反応を効率良く誘導出来る可能性があり、その結果としてウイルスの排除に役立つ可能性がある。HBVは未だ生体内から排除することが難しく、今回の結果は、これらの問題の解決に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the specific miRNAs that could induce the differential immune response between HBV genotype B and C. One miRNA (miR34c) expression in the hepatocytes and exosomes was different between genotypes B and C ($p < 0.01$). The network analysis indicated that miR34c could affect the apoptosis and PD-L1 expression. The transfection of the miR34c mimic could significantly suppress the expression of PD-L1 in monocytes. The amount of miR-34c in exosomes of Genotype C was significantly lower than that of Genotype B. Therefore, the expression of PD-L1 on the immune cells might not be suppressed in genotype C.

研究分野：肝臓病学

キーワード：miRNAs PD-L1 HBV

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)では遺伝子8%の相違により異なったジェノタイプと規定されるが、ジェノタイプにより肝線維化の進展、発がん率、インターフェロン感受性、免疫反応性が異なることが報告されている。また、B型肝炎ウイルスの制御にはエフェクター免疫細胞が重要な役割を果たしているが、制御性T細胞(Tregs)や骨髄由来免疫抑制細胞(MDSCs)などにより抑制されている。肝臓局所ではこれらの免疫抑制細胞群の相互作用の解析が重要である。しかしながら、HBV感染における免疫抑制機序は複雑であり、未だ不明な点が多い。研究代表者は、多因子共培養系と次世代シーケンサーを用いた解析系を確立し、相互関係が複雑である免疫抑制機序の解析を正確に行うことが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、HBVジェノタイプ間における免疫抑制細胞誘導、増強のメカニズムの相違を明らかにすることを目的に、特にジェノタイプ間のmiRNAの発現の相違について検討を行った。

3. 研究の方法

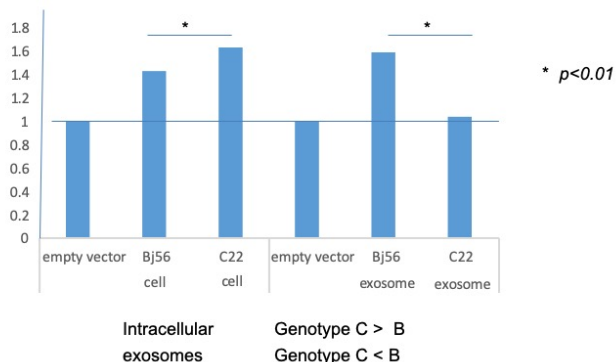
HBV培養系:HepG2肝癌細胞株、Huh7肝癌細胞株に1.24倍長ジェノタイプB、CのHBV複製プラスミドをトランスフェクトする。細胞内外のHBcAg, HBsAg, HBxAgを定量する。培養上清よりエキソソームを分離し、エキソソームの定量をCD63 ELISAにて施行した。また、分離エキソソームを電子顕微鏡にて確認した。HBV感染肝細胞と培養上清より分離したRNAを用いて、ライブラリーを作成し、Deep Sequencing analysisにて網羅的にmiRNAを解析した。コンピューター解析によりジェノタイプ間で異なるmiRNAsのターゲットとなる分子を予測し、その下流のシグナル解析を行った。ジェノタイプ間で異なるmiRNAを免疫細胞株と肝細胞株に導入して機能解析を行った。

4. 研究成果

HBV発現プラスミドのHepG2とHuh7への4D-Nucleofectorを用いたトランスフェクション効率は88.6%と76.2%と良好な結果であった。HBV未発現、HBV-ジェノタイプB発現、HBV-ジェノタイプC発現によるエキソソーム発現量は変化が見られなかった。また、エキソソーム中のコントロールのsmall RNAs (18s rRNAとRNU6B)もHBV発現による変化がみられなかった。分離エキソソームの形態を電子顕微鏡にて確認して、エキソソームの形態に矛盾しないことを確認出来た。HBV発現肝細胞と培養上清エキソソームよりRNAを抽出し、ライブラリーを作成し、Deep Sequencing analysisを施行した。肝細胞内とエキソソーム中でHBVジェノタイプBとCで異なるmiRNAsはHuh-7細胞に導入した時に1種類(miR34c-5p)が同定された。肝細胞内ではジェノタイプBと比較してジェノタイプCでmiR34c-5pの発現が高く、エキソソーム中ではジェノタイプBでmiR34c-5pの発現が高いという結果であった。(図1)

図1

The expression of miR-34c after the HBV expression



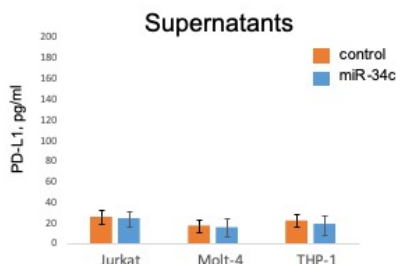
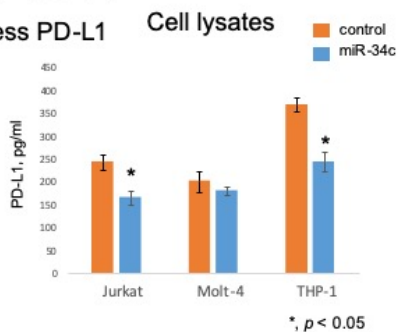
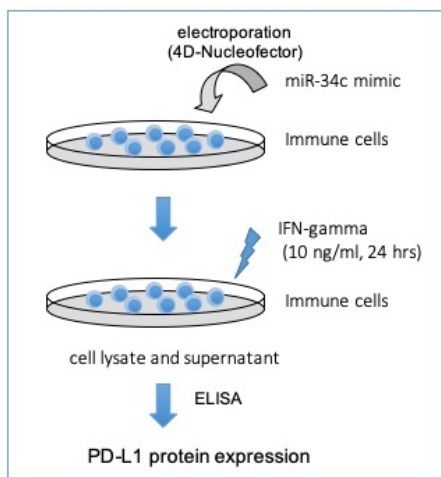
miR34cはPD-L1の発現に影響を与えることが想定されたため、miR34c mimicを免疫細胞株、Jurkat細胞株(T細胞系)、Molt-4細胞株(T細胞系)とTHP-1細胞株(単球系)に導入してPD-L1

の発現を比較した。結果、miR34c mimic は Jurkat 細胞株と THP-1 細胞株において PD-L1 の発現を有意に低下させた。また miR34c 発現がアポトーシスと関連することが想定されたため、PLC/PRF/5 細胞株 (肝細胞系) と HepG2 細胞株 (肝細胞系) に導入して morphology 解析と caspase-3/7 活性の解析を行った。結果、どちらの細胞株においても miR34c の導入によりアポトーシスを誘導した。(図 2)

図 2

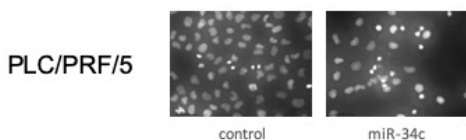
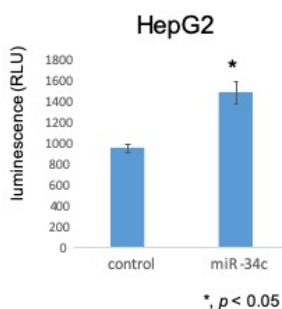
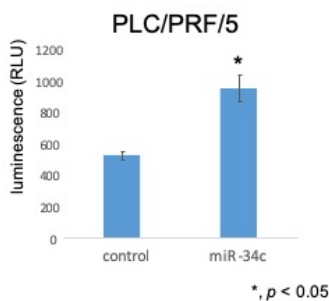
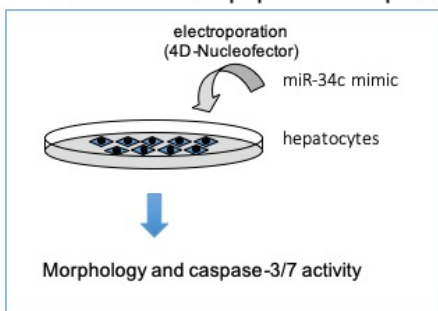
The miR34c expression could affect the expression of PD-L1 (The effect of HBV expression)

➡ miR34c mimic could significantly suppress PD-L1 in Jurkat and THP-1 cells.



The expression of miR34c mimic could induce apoptosis of hepatocytes

➡ The expression of miR34c mimic could induce apoptosis of hepatocytes



これらの結果より HBV ジェノタイプ B と比較してジェノタイプ C ではエキソソームを介して免疫抑制系細胞の PD-L1 発現を低下させることが出来ないため、効率的なウイルスコントロールが難しい可能性が示唆された。一方、肝細胞に対してはアポトーシスを誘導するため、ジェノタイプ C ではジェノタイプ B と比較して肝障害が進みやすい可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

1. Fukuda R# and **Kondo Y**# #The authors are equally contributed to this manuscript. Hepatitis C Virus infection could affect the pathogenesis of ischemic heart diseases in northern part of Japan Hepatol Res. 2019 Mar;49(3):355-359. doi: 10.1111/hepr.13283. (査読あり)
2. Katsume Y, Isawa T, Toi Y, Fukuda R, **Kondo Y**, Sugawara S and Ootomo T Complete atrioventricular block associated with pembrolizumab-induced acute myocarditis: the need for close cardiac monitoring Intern Med. 2018 Nov 1;57(21):3157-3162. doi: 10.2169/internalmedicine.0255-17. (査読あり)
3. Honma M, Sawada S, Ueno Y, Murakami K, Yamada T, Gao J, Kodama S, Izumi T, Takahashi K, Tsukita S, Uno K, Imai J, Kakazu E, **Kondo Y**, Mizuno K, Kawagishi N, Shimosegawa T, and Katagiri H Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers Int J Obes (Lond). 2018 May 1. doi: 10.1038/s41366-018-0062-9. (査読あり)
4. Matsuura K, Sawai H, Ikee K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Komori A, Toyoda H, Kumada T, Namisaki T, Yoshiji H, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwara E, Itoh Y, Ide T, Tamori A, Matsubara M, Kawada N, Shirabe K, Tomita E, Honda M, Kaneko S, Nishina S, Suetsugu A, Hiasa Y, Watanabe H, Genda T, Sakaida I, Nishiguchi S, Takaguchi K, Tanaka E, Sugihara J, Shimada M, **Kondo Y**, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Tanaka Y Genome-wide association study identifies a TLL1 variant associated with development of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus Gastroenterology 2017 May;152(6):1383-1394. doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.041. (査読あり)
5. Asai Y, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Maekawa M, Honma M, Ikeda M, Murakami K, Munakata Y, Shirai Y, Kodama S, Sugisawa T, Chiba Y, **Kondo Y**, Kaneko K, Uno K, Sawada S, Imai J, Nakamura Y, Yamaguchi H, Tanaka K, Sasano H, Mano N, Ueno Y, Shimosegawa T, Katagiri H Activation of the Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit Pathway in Steatotic Liver Contributes to Formation of Cholesterol Gallstones Gastroenterology 2017 May;152(6):1521-1535.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.001. (査読あり)
6. **Kondo Y** Hepatitis C infected patients need vitamin D3 supplementation in the era of direct acting antivirals treatment World Journal of Gastroenterology 2017 Feb 28;23(8):1325-1327. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1325. (査読あり)
7. Kai Y, Hikita H, Morishita N, Murai K, Nakabori T, Iio S, Hagiwara H, Imai Y, Tamura S, Tsutsui S, Naito M, Nishiuchi M, **Kondo Y**, Kato T, Suemizu H, Yamada R, Oze T, Yakushijin T, Hiramatsu N, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T Baseline quasispecies selection and novel mutations contribute to emerging resistance-associated substitutions in hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment Sci Rep. 2017 Jan 30;7:41660. doi: 10.1038/srep41660. (査読あり)
8. Chen CL, Huang J, Wang CH, Zhou L, **Kondo Y**, Schechter J, Su L, Lai MM, Wakita T, Cosset FL, Jung JU, Machida K Hepatitis C virus has a genetically determined lymphotropism through receptor B7.2 Nature Communications 2017 Jan 9;8:13882. doi: 10.1038/ncomms13882. (査読あり)
9. Iwata T#, **Kondo Y**#, Kimura O, Morosawa T, Fujisaka Y, Umetsu T, Kogure T, Inoue J, Nakagome Y, Shimosegawa T #The authors are equally contributed to this manuscript. PD-L1+MDSCs are increased in HCC patients and induced by soluble factor in the tumor microenvironment Sci Rep. 2016 Dec 14;6:39296. doi: 10.1038/srep39296. (査読あり)
10. Nojima M, Matsui T, Tamori A, Kubo S, Shirabe K, Kimura K, Shimada M, Utsunomiya T, **Kondo Y**, Iio E, Naito Y, Ochiya T, Tanaka Y. Global, cancer-specific microRNA cluster hypomethylation was functionally associated with the development of non-B non-C hepatocellular carcinoma. Mol Cancer. 2016 Apr 30;15(1):31. doi: 10.1186/s12943-016-0514-6. (査読あり)
11. Inoue J, **Kondo Y**, Wakui Y, Kogure T, Morosawa T, Fujisaka Y, Umetsu T, Takai S, Nakamura T, Shimosegawa T Reactivation of resolved hepatitis B virus infection with immune escape mutations after long-term corticosteroid therapy Clin J Gastroenterol. 2016 Apr;9(2):93-8. doi: 10.1007/s12328-016-0631-1. (査読あり)
12. Ninomiya M, **Kondo Y**, Kimura O, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Morosawa T,

Tanaka Y, Nakayama K, and Shimosegawa T The Expression of miR-125b-5p is Increased in the Serum of Patients with Chronic Hepatitis B Infection and Inhibits the Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen J Viral Hepat. 2016 May;23(5):330-9. doi: 10.1111/jvh.12522. (査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. **近藤泰輝**、福田遼、田中靖人 次世代シーケンサーを用いた HBV ジェノタイプ間で異なる発現をする miRNAs の網羅的探索と機能解析 第 42 回日本肝臓学会東部会 2018 年
2. **Yasuteru Kondo**, Takayuki Kogure, Kazuho Ikeo, Ryo Fukuda, Yasuhito Tanaka Differential expression of miR34c could affect the immune response of HBV infection AASLD2018 2018 年
3. **近藤泰輝**、小暮高之、福田遼 HCV 発がんに関与する末梢血単核球と血清中 miRNAs の網羅的検討 第 26 回日本消化器病関連学会週間 2018 年
4. **近藤泰輝**、福田遼、田中靖人 免疫細胞における miRNA 発現変化は NF- κ B シグナルを介して抗ウイルス免疫病態に不利に影響する 第 54 回日本肝臓学会総会 2018 年
5. **近藤泰輝** 肝細胞癌治療におけるルストロンボパグ複数回使用による影響 JDDW2017 2017 年
6. **近藤泰輝** 糖質制限食の NAFLD 患者に与える治療効果と免疫細胞解析 第 53 回日本肝臓学会総会 2017 年
7. **近藤泰輝** B-TACE と C-TACE の早期治療効果の比較 第 53 回日本肝臓学会総会 2017 年
8. **近藤泰輝** 慢性 C 型肝炎、透析症例における免疫細胞プロファイルとインターフェロンフリー治療効果の関係 第 53 回日本肝臓学会総会 2017 年
9. **Yasuteru Kondo**, Takayuki Kogure, Norikazu Monma, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Kazuho Ikeo, Yasuhito Tanaka Differential expression of miRNAs could affect the immunopathogenesis of HBV infection APASL2017 Annual Meeting (国際学会) 2017 年
10. **近藤泰輝**、岩田朋晃、諸沢樹 骨髄由来免疫抑制細胞の新規肝癌バイオマーカーとしての応用 第 52 回 日本肝臓学会総会 2016 年
11. **近藤泰輝**、諸沢樹、藤坂泰之 パネルディスカッション 4 「B 型肝炎ウイルス排除にむけて～創薬への新知見～」核酸アナログ-IFN Sequential 療法反応性予測因子の同定 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

1. HBV ジェノタイプ測定と HBs 抗原量測定の意義 連載：検査値の読み方 臨床消化器内科 Vol.32 No12:1637-1640 (2017) **近藤泰輝** 福田遼
2. 急性 C 型肝炎の臨床経過を検査値から読み解く 連載：検査値の読み方 臨床消化器内科 Vol.32 No.6; 726-729 (2017) **近藤泰輝**

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。