

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09403

研究課題名（和文）HBV感染細胞の脂質クオリティ解析から展開する肝疾患治療の研究

研究課題名（英文）Lipid Quality Analysis of HBV-Infected Cells for Liver Disease Treatment

研究代表者

上野 紀子（Ueno, Noriko）

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90546631

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）：HBV感染のメカニズムを知るために、キメラマウス由来ヒト化肝細胞を用いたHBV感染細胞の脂質画分の質量分析を試みてきた。非感染細胞では脂肪酸の分泌が増加するが、HBVに感染することにより抑制されることがわかった。次にHBV感染細胞由来の脂質についてノンターゲット分析を行い、HBV感染により変動する新奇脂質の探索を主成分分析により行った。その結果HBV感染により変動するユニークな4ピークを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではHBV感染により変動する脂質を見つけることで、HBV感染メカニズムや治療につながるものと考えられる。HBV感染により変動する分泌される脂質の変動やノンターゲット分析を適応することでユニークな脂質4ピークを検出した。

また本研究の過程で派生した、脂質分析における質量分析計のイオンモビリティ値の法則の発見など研究シーズを見出したこと、ジアシルグリセロール測定系の構築など、派生的な研究にも寄与した。これらの結果は、これからのHBV感染のメカニズムの発見や脂質のMSにおける新しい分析技術に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanism of HBV infection, we have attempted mass spectrometry of the lipid fraction of HBV-infected cells using mouse-passaged primary human hepatocytes. It was found that while the secretion of fatty acids is increased in uninfected cells, it is suppressed by HBV infection. Next, non-targeted analysis of lipids from HBV-infected cells was performed to search for novel lipids that are altered by HBV infection by principal component analysis. We found four unique peaks that were altered by HBV infection.

研究分野：脂質分析学

キーワード：脂質 質量分析 HBV

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞がんに進展する慢性 B 型肝炎は治療の奏効率も低く、C 型肝炎の研究より遅れている。ごく最近 B 型肝炎ウイルス (HBV) が簡便に持続感染できる細胞が開発された。そこで申請者が構築した質量分析計 (MS) による高感度トリアシルグリセロール (TAG) 測定系に HBV 感染細胞を適応した。その結果申請者らは、HBV が宿主細胞に複製抑制効果のあるドコサヘキサエン酸 (DHA) を TAG として貯蔵させることを見出した。本研究では DHA が HBV 感染や肝細胞がんの治療薬になりうる可能性の検討とそのメカニズムの解明を目的とし、HBV 感染と他の肝細胞がん原因疾患における普遍性の検討、脂質分子種への疾患の影響の探索を行う。これらの結果は慢性 B 型肝炎や肝細胞がん治療への貢献が期待される。

### 2. 研究の目的

申請者は HBV 複製抑制効果のある DHA が HBV 感染細胞の DHA 含有 TAG 分子種を増加することを見出した。本研究では、その法則性について、またメカニズムの解明のため DHA 代謝物など責任分子の探索を行う。また HBV 感染細胞をノンターゲットの質量精度の高い MS に適応する事で、現在想定していない DHA 含有脂質や DHA 代謝物などを探索し、メカニズムの解明を目指すとともに、今後の研究のシーズ探索を行う。この研究を通じ HBV 感染などの治療薬になりうる可能性の脂質分子の検討やメカニズムの解明を目的としている。

### 3. 研究の方法

キメラマウス由来ヒト化肝細胞に HBV 感染させた。感染前または HBV 感染細胞の細胞または培養上清より脂質画分を抽出し、液体クロマトグラフィー (LC) / MS により脂質分析を行った。

### 4. 研究成果

(1) HBV 感染のメカニズム解明の一環として HBV 感染細胞において上清に分泌された脂肪酸測定を行った。その結果、未感染細胞培養 5 日後に測定対象である脂肪酸 (全 8 種) の増加が見られたが、HBV 感染細胞上清ではその増加が見られなかった。HBV 感染によるリポタンパク質の分泌抑制が報告されており、HBV 感染によって脂肪酸分泌が増加しないことは、分泌が抑制されたりリポタンパク質に含まれる脂肪酸量を反映している可能性が考えられた。しかし本現象は脂肪酸選択性が見られない、すなわち DHA やオメガ 3 系脂肪酸に特有な現象ではないことから、HBV 感染細胞における DHA 含有 TAG 分子種増加への寄与は低いものと考えられた。

(2) ノンターゲット法による新奇脂質の探索を、Vion IMS Q-Tof (waters) の HDMSE で試みるため、その測定系と解析系の構築を試みた。Vion のデータがオートピーキングにしか対応しないため、LC のピーク形状を、使用するカラムなどの工夫によりテーリングの強いごく一部の脂質を除きオートピーキング可能なレベルに改良する事が出来た。また、溶媒の工夫により親水性の高めな脂質から疎水性の高い脂質まで網羅的に溶出可能な LC 系の構築に成功した。

次に解析ソフトウェアである UNIFI で解析を行うために成分リストの構築を行った。成分リスト登録に必要なイオンモビリティの値である衝突断面積 (CCS) のデータベースを作成する中、それらのデータを用い位置異性体の多い脂質においてその分離が出来る可能性について検討した。その結果、CCS は位置異性体により数 程度の差が出るものの、その差は LC のピーク分離があった上で算出される CCS 値であり、LC の分離そのものが不十分な場合 CCS の値での位置異性体の分離によるレスキューは困難であった。これはイオンモビリティのピークは LC よりはるかにブロードであることに起因すると考察した。一方この過程で、イオンモビリティの新たな法則性を見出した。また、この手法を生体サンプルに応用により、ジアシルグリセロールの測定系も行った。

実験の過程で、発見した脂質分子とイオンモビリティの値 (CCS) との法則性については、文献報告値と実測 CCS 値に差分があることがわかった。この CCS 値の差分は、実験回毎に正または負に全体的にシフトしているようにみえるため、相対的な関係性である本法則性の概念に影響しないと考えている。安定した CCS の算出法については、本研究期間では解決できなかった。別途新規の研究課題として申請し採択されている。

(3) ノンターゲット法による HBV 感染で変動する新奇脂質の探索を行った。サンプルは、キメラマウス由来ヒト化肝細胞へ HBV 感染させた 12 日後の細胞 (HBV d12) と、その対象として感染なしに 12 日間培養した細胞から Bligh & Dyer 法にて抽出した脂質画分を用いた。質量分析計 Vion IMS Q-Tof の negative ion mode、HDMSE でデータを取得し Progenesis Q1 にて HBV 感染により変動のある分子を探索した。Progenesis Q1 の条件として、HBV d12 で増加す

る  $p < 0.05$ 、 $CV < 20\%$ 、 $Max\ abundance > 50$ 、 $fold\ change > 1.5$  のピークを検討した結果、58 ピークが抽出された。このうち同定候補のない新奇脂質の候補となる 17 ピークを見出した。同様に HBV d12 で減少する分子の探索を行ったところ、124 ピークが抽出され、このうちデータベースの同定候補のない 40 ピークを見出した。一方、同定候補のあるピークについて検証したところ、同定候補の分子について、これまで UNIFI のソフトウェアで解析し蓄積してきたデータと比較した際に妥当性に疑義が認められた。

次に、課題として見つかった MS のイオンモビリティ部分の調整を行ったうえでノンターゲット法による HBV 感染細胞で変動する新奇脂質の探索を行った。サンプルは、キメラマウス由来ヒト化肝細胞へ HBV を感染させた 2, 5 日後の細胞 (HBV d2, HBV d5) と、その対照として未感染で培養した細胞の脂質抽出物を用いた。液体クロマトグラフィーで分離し Vion の negative または positive ion mode、HDMSe で分析し、Progenesis Q1 と EZInfo のソフトウェアにて HBV 感染により変動する分子を探索し、UNIFI にて詳細解析を行った。主成分分析 (PCA) を negative ion mode のデータで解析し、特徴的な 14 ピークを見出した。このうち  $m/z$  400-500 の 5 ピークの 1 種はこれまでの分析でも変動が認められたリゾリン脂質であった。残り 4 種について組成解析し探索した結果、これまで測定対象外のステロールや脂溶性ビタミン関連を含む数十の構造異性体が候補として示された。そのうち酸素原子を 3 つ含有する分子群で HBV 感染による増加傾向が、酸素原子を 5 つ含有する分子で HBV 感染による減少傾向が示唆された。この結果は HBV 感染による水酸化酵素の活性への影響を示しているのかもしれない。positive ion mode のデータでは PCA での分離が不十分で解析困難であった。そこで Progenesis Q1 で HBV d2, HBV d5 両者で変動する分子を探索し 19 ピークが抽出された。本研究で見つかったこれらの候補分子は HBV 感染により変動する新奇脂溶性分子の可能性がある。

本研究の結果は、これからの HBV 感染のメカニズムの発見や MS 分析における新しい研究シーズにつながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakehi Saori, Tamura Yoshifumi, Ikeda Shin-ichi, Kaga Naoko, Taka Hikari, Ueno Noriko, Shiuchi Tetsuya, Kubota Atsushi, Sakuraba Keishoku, Kawamori Ryuzo, Watada Hirotaka	4. 巻 321
2. 論文標題 Short-term physical inactivity induces diacylglycerol accumulation and insulin resistance in muscle via lipin1 activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E766 ~ E781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00254.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野紀子、中西広樹、李賢哲、横溝岳彦
2. 発表標題 リン脂質におけるイオンモビリティ値である衝突断面積の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	深澤 征義 (Fukasawa Masayoshi)  (20291130)	国立感染症研究所・細胞化学部・部長  (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------