

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09414

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスが引き起こす肝組織構成細胞の変化と癌化の解明

研究課題名(英文) Pathological deterioration of liver component cells by hepatitis B virus infection and the mechanism of hepatocarcinogenesis

研究代表者

川口 和紀 (Kawaguchi, Kazunori)

金沢大学・医学系・特任教授

研究者番号：90579632

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)：B型肝炎ウイルスは肝炎および肝細胞癌を引き起こすが、肝組織内において肝細胞以外に内皮細胞、胆管細胞、免疫細胞など各構成細胞が存在し、ウイルス感染によってこれら各細胞がどのような相互作用を起こすかが明らかとなっていない。そこで一細胞遺伝子解析を行うことにより、各構成細胞での遺伝子発現変化が明らかとなり、Notchシグナルをはじめとする細胞間シグナル変化は感染細胞におけるウイルス関連転写因子を制御させることが判明した。また、臨床肝組織検体において転写因子の解析を行った結果、核酸アナログによる影響はこのような細胞間シグナルに変化を与え、肝組織における構成細胞間の病態と密接に関与すること示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸アナログ製剤によりB型肝炎の鎮静化がなされるが、治療後も肝細胞核内に完全二本鎖の形でウイルスが残存しており、発癌や再活性化を引き起こす。この問題を解決するために、肝組織内の構成細胞における感染による変化、細胞間の相互作用やシグナル伝達系を明確にした。本研究はこのウイルス残存の問題を解決し、従来の薬剤では解決できない創薬にも関連するので、社会的意義のある研究となった。

研究成果の概要(英文)：Liver tissue consists from endothelial cells, bile duct cells, immune cells and hepatocyte. Hepatitis B virus induces hepatitis and liver cancer, but the interaction and virus infection related signaling between these component cells are not still clarified. We analyzed these interactions by measuring gene expression in each component cells using single cell gene analysis. We clarified the intercellular signaling including Notch signaling activation and this interaction resulted in the involvement of transcription factors in hepatitis B virus infected cells. Results of analyzing clinical liver tissue found that these transcription factors or intercellular signaling were affected under nucleos(t)ide analogues treatment. In conclusion, intercellular signaling were found to be important in hepatitis B virus infected liver tissue.

研究分野：消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス 肝細胞癌 核酸アナログ Notchシグナル HBV cccDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝癌は肝内転移や多中心性多発の特徴があるため、治療後の再発・治療による効果が不十分で長期予後は依然不良である。その背景として癌微小環境や組織環境の細胞間の相互作用を明らかにすることができていないことがあり、その複雑な体系を分かりやすくするような研究の一つとして single cell 解析が挙げられる。

また、B 型肝炎ウイルス(HBV)を背景とする HBV 肝細胞癌の発生は感染肝細胞における HBV 蛋白の癌原的な働きが作用するとこれまで多く報告されている。B 型肝炎は核酸アナログ製剤投与により、多くの症例で治療中の鎮静化が期待できるようになったが、肝発癌の可能性が完全に消失することにはならない。HBV による慢性肝炎の患者のみならず、急性肝炎もしくは不顕性感染であった既感染の患者も発癌のリスクが存在する。

以上の病態に関する背景から、肝細胞に HBV が感染して発癌を起こす機構として、肝細胞とその近傍・周辺にある間質系の細胞、免疫細胞を含めた各種肝非実質細胞との相互作用に着目し、single cell のレベルで解明する研究が必要であると考えた。

2. 研究の目的

HBV 感染環境下における肝組織の周辺細胞が肝細胞の癌化を含めた感染病態に与える影響を single cell レベルで遺伝子発現解析することにより HBV 感染のメカニズムを明らかにする。

また、組織内構成細胞間の相互作用を解明し、また HBV 感染の状態、特に肝細胞内の HBV の転写や複製に影響を与えるのかを確認する。

抗ウイルス治療により B 型肝炎が鎮静化したにも関わらず HBV 肝癌を呈する症例を関係するウイルスマーカーもしくはバイオマーカーを測定して検討することにより、single cell 解析結果を元に開発された薬が利用できるような症例に対し速やかに臨床応用を可能とすることも研究の目的とする。

3. 研究の方法

HBV 感染肝組織における肝細胞とその近傍・周辺にある間質系の細胞、免疫細胞を含めた細胞との相互作用や細胞間伝達系の変化に関し single cell 解析を利用して、HBV 既感染環境下における肝組織を構成する細胞が癌化に与える影響の解析を行う。HBV 感染肝組織周辺細胞の遺伝子変化を明らかにする。その結果をもとに、HBV 感染肝組織周辺細胞が発癌シグナルを発することを証明する。さらに、慢性肝炎が鎮静化したにも関わらず HBV 肝癌を発症する症例の血清マーカーが存在することを明らかにし、臨床応用も可能なことを示す。

4. 研究成果

(1) 平成 29 年度の成果

HBV を背景とする肝癌患者において、外科的手術より得られた癌組織及び背景肝組織に対し細胞分離酵素反応を行った。それぞれの肝組織内各種構成細胞が分離された状態となり、これら各細胞内の遺伝子発現を次世代シーケンサーで解析するために、まず肝組織を一細胞に分離する至適条件の検討を行った。肝組織は他の臓器と比較して RNase の含有が多く、かつ肝硬変等進展した慢性肝疾患においては組織内のコラーゲンも多く、状態によっては分離が困難な検体もあり、組織を迅速に処理することや細胞分離酵素を肝組織の硬度により使い分けることが重要であるとされた。また、HBV 感染培養細胞株においてがん関連遺伝子並びに細胞増殖能に関連した遺伝子について検討を行った。その結果、Notch シグナル関連遺伝子の高発現を認め、これらの細胞に Notch 阻害剤投与や関連遺伝子の shRNA による抑制を行うと、HBV の複製が減弱し、さらに HBV 感染後の残存に関与する肝細胞核内 HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) の減弱も認められた。Notch シグナルは細胞の分化や幹細胞、さらにはがん化にも関連する細胞間伝達因子であり、かつ、これまで HBV-x 遺伝子領域をコードする HBx 蛋白の発現を制御する報告があるので、HBV における発癌状態と関連することが示唆された。

(2) 平成 30 年度の成果

肝組織環境を構築するのに重要な細胞間シグナルが HBV 感染とも関連することが判明したので、このシグナルに関連した分子機構の研究を行った。この候補として Notch シグナルは、ヒトのみならず各個体における様々な臓器の発生と関連が強いが、肝においては再生や癌化、胆管形成と密接に関与するとされ、肝組織構成細胞間で HBV 感染と関連して疾患特異的に相互作用を呈することも予測された。まず HBV 感染培養細胞および臨床肝組織のサンプルを利用して、HBV の転写因子が細胞間シグナルと密接に関連することを示した。特に Notch レセプターにおけるユビキチン・プロテアソーム系の機構が HBV の転写に作用することを示した。Notch シグナルと HBV の転写や複製がどの程度関連しているかについて HBV 感染培養細胞や HBV 感染臨床肝組織で、Notch レセプターである Notch1 の細胞内ドメイン NICD が CREB 誘導蛋白である PKA を介して HBV の転写に影響することを示した。また NICD の活性化に関してユビキチン・プロテアソーム系の変化が関連することも証明し、それを制御するものとして E3 リガーゼが関与し、 γ セクレターゼ阻害剤やプロテアソーム阻害剤を投与して、下流標的遺伝子の変

化やHBVの転写状態の変化を確認した(図1)。この実験によりNotchシグナルがHBV cccDNAの転写に大きく関与することを証明した。さらにこの細胞間シグナルはHBVに対する抗ウイルス剤である核酸アナログの作用にも影響を与えることが判明した。核酸アナログはラミブジン(LAM)、エンテカビル(ETV)を含むヌクレオシド類似体とテノホビル(TDF)、アデホビル(ADV)を含むヌクレオチド類似体との2

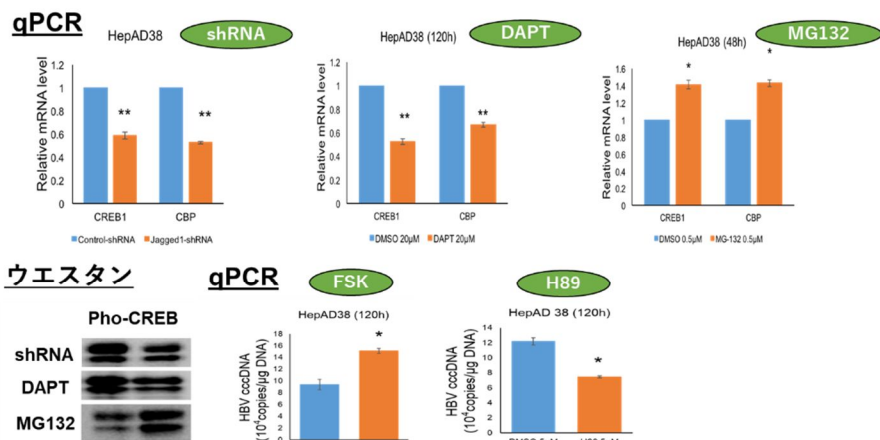


図1 Notch阻害(DAPT)により転写因子であるCREB、CBPが抑制され、プロテアソーム阻害(MG132)で逆に増強する。また、この転写因子を活性化するFSK投与はHBV cccDNAを増強させ、一方H89投与によりHBV cccDNAは抑制される。

種類があり、前者はNotchシグナルを古典的な経路で抑制させ、HBV cccDNAに作用する転写因子を抑制させるが、後者ではNotchシグナルの非古典的な活性経路依存的にmTORC2を活性化させ、HBVの複製を抑制することが判明した(図2)。これは、核酸アナログのHBVに対する逆転写酵素阻害以外の作用になることが示唆された。以上のように、HBV感染による肝組織環境の変化

が細胞間シグナル経路を変化させて、複数の経路で抗ウイルス作用を呈することが判明し、HBVに関連した発癌にも作用することが予測され、以上を学会及び論文報告を行った。

ウエスタン

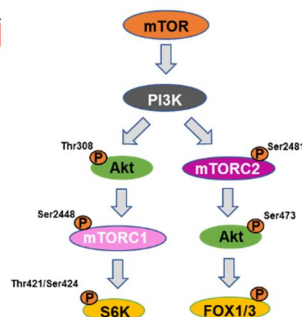
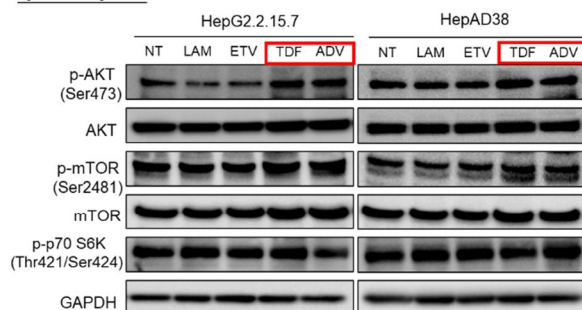


図2 核酸アナログのうち、ヌクレオチド類似体(TDF、ADV)はmTORC2経路の活性化を介して抗ウイルス作用を呈する。一方でmTORC1経路には作用しない。

(3) 令和元年度の成果

HBV感染が慢性肝疾患の進展や肝発癌に至る上でどのように肝組織環境が影響しているかについて、HBVのみならず他の背景肝疾患因子の臨床検体を用いて検討を行った。その結果、アルドケト還元酵素の発現が、肝線維化の進展と大きく関連し、肝組織内での産生のみならず、細胞外への蛋白分泌が認められ、血清より検出が可能であった。B型慢性肝疾患症例においても同様に検討を行い、その結果抗核酸アナログ製剤投与下の肝発癌予測が、本蛋白の測定がこれまで報告してきたWFA(+)-M2BPやHBコア関連抗原とともに有用であることが判明した。これまでの報告からは、肝線維化のシグナルは類洞内皮細胞や星細胞から肝細胞に各因子が伝達され、慢性肝疾患進展の病態が出現されうる。B型慢性肝疾患症例で一細胞遺伝子解析を行い、線維化シグナルが内皮細胞や肝細胞において変動を呈し、かつHBV感染肝細胞における遺伝子動態を包括的に解析し、役割を果たす各種因子が存在することを明らかにした。本研究では、HBV感染肝細胞における慢性肝疾患としての病態やHBVそのものの動態は、これまで報告してきたように、Notchシグナルのような直接細胞間のリガンド・レセプターを介して伝達する系、また接触した細胞間で伝達しない、例えば液性因子が関与した相互作用があり、その関連した蛋白が病態とともに血清中に分泌されることが判明した。以上を体系的にとらえることにより、HBVが感染した肝組織環境の変化がより明確となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wang Zijing, Kawaguchi Kazunori, Honda Masao, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi	4. 巻 501
2. 論文標題 Distinct notch signaling expression patterns between nucleoside and nucleotide analogues treatment for hepatitis B virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 682 ~ 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.236	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 -
1. 著者名 Wang Zijing, Kawaguchi Kazunori, Honda Masao, Hashimoto Shinichi, Shirasaki Takayoshi, Okada Hikari, Orita Noriaki, Shimakami Tetsuro, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Mizukoshi Eishiro, Murakami Seishi, Kaneko Shuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Notch signaling facilitates hepatitis B virus covalently closed circular DNA transcription via cAMP response element-binding protein with E3 ubiquitin ligase-modulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38139-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi Kazunori, Honda Masao, Ohta Hajime, Terashima Takeshi, Shimakami Tetsuro, Arai Kuniaki, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Komura Takuya, Unoura Masashi, Kaneko Shuichi	4. 巻 53
2. 論文標題 Serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein predicts hepatocellular carcinoma incidence and recurrence in nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 740 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-017-1386-2	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 -
1. 著者名 川口和紀、本多政夫、金子周一	4. 巻 51
2. 論文標題 B型肝炎ウイルス感染状態における肝の細胞間シグナル機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 547 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 川口和紀、本多政夫、金子周一	4. 巻 4
2. 論文標題 B型慢性肝疾患核酸アナログ治療例の予後を肝臓の硬さから評価する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 肝臓クリニカルアップデート	6. 最初と最後の頁 167 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 川口和紀、本多政夫、金子周一
2. 発表標題 HBV cccDNAに作用する転写因子を標的とした抗HBV効果
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口和紀、本多政夫、金子周一
2. 発表標題 HBV生活環におけるNotchシグナルを介した核酸アナログの作用点に関する検討
3. 学会等名 第54日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王紫静、川口和紀、本多政夫、金子周一
2. 発表標題 Notchシグナルのユビキチン・プロテアソーム系を介したB型肝炎ウイルスへの影響
3. 学会等名 第23回日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口和紀、本多政夫、金子周一
2. 発表標題 B型慢性肝炎患者の核酸アナログ投与下における肝線維化と肝発癌および再発予測
3. 学会等名 2018 JDDW
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi Kazunori, Wang Zijing, Honda Masao, Okada Hikari, Shirasaki Takayoshi, Nio Kouki, Shimakami Tetsuro, Arai Kuniaki, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi
2. 発表標題 mTORC2-related protein kinase B phosphorylation is associated with Notch signaling activation by nucleotide analogues for chronic hepatitis B virus infection
3. 学会等名 2018 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi Kazunori, Wang Zijing, Honda Masao, Shirasaki Takayoshi, Okada Hikari, Shimakami Tetsuro, Nio Kouki, Arai Kuniaki, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi
2. 発表標題 Nucleos(t)ide analogues and interferon affect intranuclear HBV genome in vitro via Notch signaling modification, independent of the ubiquitin-proteasome system
3. 学会等名 2017 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1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
研究協力者	王 紫静 (Wang Zijing)		

6. 研究組織（つづき）

	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	本多 政夫 (Honda Masao) (00272980)	金沢大学・保健学系・教授 (13301)	
連携研究者	橋本 真一 (Hashimoto Shinichi) (00313099)	和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授 (24701)	