

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08385

研究課題名(和文)小胞輸送機構を基軸としたB型肝炎ウイルス感染の病態解明と臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of hepatitis B virus infection focusing on vesicle trafficking system and its clinical application

研究代表者

井上 淳 (Inoue, Jun)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60455821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)が肝細胞の小胞輸送システムに与える影響について、Rabタンパク質を中心に検討を行なった。Rab5BはHBV放出を制御しているが、急性感染の臨床検体や培養細胞を用いた検討でHBVはRab5B発現を低下させており、HBV放出が増加する方向に働くことが分かった。一方、慢性感染においてはその発現が増加しており、血清中HBV DNA量と有意な相関を認めることから別な機序によりB型慢性肝炎の病態形成と小胞輸送システムの変化がリンクしていることが示唆された。また、HBVのエンベロップの形成過程において、エクソソームのマーカーであるCD63が必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVは一度持続感染すると排除が困難なウイルスであり、持続感染メカニズムの解明は新たな治療法の開発において必要とされている。本研究ではHBV感染がRab5Bの発現に影響し、自身の肝細胞からの放出をコントロールしていることが明らかとなった。急性感染ではウイルス放出を増加させて感染肝細胞を増加させている一方、慢性感染では放出を抑制して免疫から逃れている可能性が示唆された。また、ウイルスを覆っているエンベロップの形成にCD63という分子が必要であることも明らかとなったが、これらの分子は新しい治療法のターゲットの候補となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed effects of hepatitis B virus (HBV) infection on the intracellular vesicle trafficking system, focusing on Rab proteins. We have shown that Rab5B inhibited the release of HBV particles from hepatocytes previously. In this study, we showed that HBV infection downregulated Rab5B expression using clinical samples from patients with acute infection and cultured cells. This downregulation was considered to increase HBV release. In contrast, Rab5B expression was increased during chronic infection of HBV and, there was a significant association between Rab5B mRNA and serum HBV DNA, suggesting a possible link between the pathogenesis of chronic hepatitis B and changes of vesicle trafficking system through different mechanisms. In addition, it was revealed that CD63, one of exosome markers, is required for the efficient formation of HBV envelope.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：HBV 小胞輸送 Rab5B CD63

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HBV 感染は世界的な問題であり、肝硬変や肝癌のリスクのある慢性感染者は全世界で約 4 億人、日本では約 150 万人と推定されている。現在、臨床的には核酸アナログ製剤で HBV の増殖を抑制することが可能であるが、中止すると HBV が再増殖することが多く、長期間の内服が必要とされている。また、同剤を投与しても HBV による肝癌の発生を完全に抑制することができず、疫学的にも HBV 関連肝癌による死亡者数が減少していないことが示されている。HBV 排除が可能な治療法の開発や HBV による発癌メカニズムの解明が求められている。

HBV は肝細胞に侵入して細胞内で複製され、放出されるという生活環を形成する。その過程において肝細胞の持つ小胞輸送(膜輸送とも呼ばれる)機能が利用されていると考えられているが、実際に HBV 粒子ないしその構成成分が輸送され、放出される経路については不明な点が多い。HBV のエンベロープは小胞体(ER)において形成されると考えられていたが、最近になり多胞体(MVB)であるとする報告も増えている。申請者らは小胞輸送の分子スイッチとして機能している低分子量 GTPase の Rab タンパク質ファミリーに着目して研究を行って来たが、HBV と関連のある Rab タンパクとして特定できたのはごく一部であり、MVB や ER にウイルス構成成分が輸送される経路や、成熟した HBV 粒子が細胞外に輸送される経路は未だ不明である。また、これまでの申請者らの検討で HBV 感染が小胞輸送を利用だけでなく修飾していることが分かり、ウイルスタンパクである HBe 抗原が Rab7 を活性化して MVB 内のウイルスを変性させる方向に働くと考えられた。このような修飾がエクソソーム放出などを変化させて肝細胞機能に影響し、HBV 関連肝疾患の病態に関連している可能性があるが詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は B 型肝炎の病態理解を深め、抗 HBV 療法開発の基盤を作るため、以下のような HBV と小胞輸送の関わりを明らかにすることを目的とした。(1) HBV の感染が肝細胞内の Rab タンパク質発現の変化を介して小胞輸送やウイルス発現自体に与える影響を明らかにする。(2) 細胞外小胞に関連する分子の HBV 複製における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

HBV 感染による細胞内の小胞輸送経路に対する影響を検討するため、HBV 発現肝細胞株(HepG2.2.15 細胞, HepAD38 細胞)や HBV 感染培養細胞系(HepG2-NTCP-C4 細胞)を用いて Rab タンパク質ファミリーおよび輸送関連タンパク質、エクソソーム関連タンパク質の発現量を HBV の有無により mRNA 及びタンパクレベルで検討した。これらの分子の HBV 感染における意義について、培養細胞を用いてノックダウンを行い、ウイルス粒子や関連タンパクの放出の変化を検討した。また、培養細胞を用いた検討で HBV 感染により発現に変化の認められた Rab タンパク質について、B 型慢性肝炎患者の肝生検組織の一部を用いて mRNA の定量を行い、mRNA 発現量とウイルス量・肝線維化・発癌の有無・予後などの臨床的パラメーターを合わせて検討した。

4. 研究成果

我々は以前 Rab タンパク質ファミリーの中で Rab5B が特に HBV 放出を制御していることを報告したが(Inoue J et al. J Virol 2019) 逆に HBV が肝細胞に感染した際に Rab タンパク質発現に与える影響は不明であった。そのため、HBV 発現細胞(HepG2.2.15 細胞)と非発現細胞(HepG2 細胞) HBV 感染細胞と非感染細胞で mRNA 発現を比較したところ、HBV 感染に伴って Rab5B の mRNA 転写が減弱する可能性が示唆された。HBV 感染は Rab5B 発現を低下させて自身の

複製を亢進させるものと考えられ、感染を成立させる一つの機序となると思われた。

一方、データベース上のマイクロアレイのデータを検討すると、HBV 持続感染患者では逆に Rab5A,B,C のいずれも有意に肝臓内の mRNA レベルが上昇していた。肝生検組織を用いて検討すると、B 型慢性肝炎患者では B 型急性肝炎患者よりも有意に Rab5B 発現量は上昇していたことから、慢性感染においては免疫応答等の別な要因によって Rab5B の発現が回復・上昇している可能性が示唆された。培養細胞において poly(I:C) で自然免疫シグナルを刺激すると Rab5B の mRNA は上昇しており、その仮説を支持するデータが得られた。すなわち、HBV の感染が慢性期になると Rab5B の発現が増加して HBV 放出量は低下し、宿主の免疫から逃避しやすくなっていると考えられた。また、慢性肝炎患者では Rab5B の mRNA レベルは血清中 HBV DNA 量と有意に相関しており、B 型慢性肝炎の病態形成と小胞輸送システムの変化がリンクしていることが示唆された。

エクソソームの分子マーカーである CD63 に着目すると、エンベロープタンパクの一つであり感染に必要な LHBs がエンベロープ上に効率よく保持さえるために CD63 が必要であることが分かった。CD63 はエンベロープ形成器官と考えられる MVB にも多く存在しており、CD63 と LHBs の相互作用が存在している可能性が示唆された。また、CD63 はエンベロープタンパクの mRNA である 2.4/2.1 kb mRNA の転写を抑制していることが分かり、CD63 発現制御により感染性 HBV 粒子とエンベロープタンパクのみから形成される中空粒子のバランスが変化していた。(Ninomiya M, Inoue J et al. Hepatol Comm 2021)

本研究では HBV 感染が Rab5B の発現に影響し、自身の肝細胞からの放出をコントロールしていることが明らかとなった。急性感染ではウイルス放出を増加させて感染肝細胞を増加させている一方、慢性感染では放出を抑制して免疫から逃れている可能性が示唆された。今後はこのような変化が肝硬変や肝癌といった重篤な病態とどのように関連するかを明らかにする必要がある。また、ウイルスを覆っているエンベロープの形成に CD63 が必要であることも明らかとなり、これらの分子は新しい治療法のターゲットの候補となり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ninomiya Masashi, Inoue Jun, Krueger Eugene W., Chen Jing, Cao Hong, Masamune Atsushi, McNiven Mark A.	4. 巻 5
2. 論文標題 The Exosome Associated Tetraspanin CD63 Contributes to the Efficient Assembly and Infectivity of the Hepatitis B Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1709	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 該当する

1. 著者名 Inoue Jun, Ninomiya Masashi, Umetsu Teruyuki, Nakamura Takuya, Kogure Takayuki, Kakazu Eiji, Iwata Tomoaki, Takai Satoshi, Sano Akitoshi, Fukuda Mitsunori, Watashi Koichi, Isogawa Masanori, Tanaka Yasuhito, Shimosegawa Tooru, McNiven Mark A., Masamune Atsushi	4. 巻 93
2. 論文標題 Small Interfering RNA Screening for the Small GTPase Rab Proteins Identifies Rab5B as a Major Regulator of Hepatitis B Virus Production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00621-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00621-19	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 該当する

1. 著者名 Inoue Jun, Sato Kosuke, Ninomiya Masashi, Masamune Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Envelope Proteins of Hepatitis B Virus: Molecular Biology and Involvement in Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13061124	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Inoue, Masashi Ninomiya, Kosuke Sato, Eiji Kakazu, Tomoaki Iwata, Akitoshi Sano, Mio Tsuruoka, Atsushi Masamune
2. 発表標題 Hepatitis B virus infection affects expression of a small GTPase Rab5B resulting in the alteration of viral release
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 淳、二宮匡史、正宗 淳
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス粒子形成におけるCD63の役割に関する検討
3. 学会等名 第43回 日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 淳、二宮匡史、正宗 淳
2. 発表標題 Rab5BによるHBV粒子放出制御メカニズムの解明と治療応用に向けた検討
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 淳、二宮 匡史、正宗 淳
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスに対するミリストイル化阻害の治療応用の可能性
3. 学会等名 第55回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 淳、二宮匡史、正宗 淳
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス感染による小胞輸送の変化がウイルス放出に与える影響
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Inoue, Masashi Ninomiya, Atsushi Masamune
2. 発表標題 Exosome-associated tetraspanin CD63 is a potential target for the inhibition of infectious envelope formation of hepatitis B virus
3. 学会等名 第25回 日本肝臓学会大会 (JDDW2021)
4. 発表年 2021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
研究分担者	嘉数 英二 (Kakazu Eiji) (20509377)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	岩田 朋晃 (Iwata Tomoaki) (30803647)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	二宮 匡史 (Ninomiya Masashi) (70583938)	東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教 (11301)	

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		
米国	Mayo Clinic		