

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08482

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスのコア領域の変異がウイルスのライフサイクルに与える影響の解析

研究課題名(英文) Amino Acid Polymorphism in Hepatitis B Virus Associated With Functional Cure

研究代表者

加藤 孝宣 (Kato, Takanobu)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：20333370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：B型慢性肝炎の臨床的治癒に関与していることが報告されているコア領域I97Lの変異がHBVのライフサイクルに与える影響を解析した。その結果、I97L変異を持つHBVでは通常のHBVと比較して感染性が低下しており、ウイルス粒子中に一本鎖ゲノムを持つ未成熟なウイルスが産生されることが明らかとなった。また、I97L変異株ではHBVの細胞への吸着や侵入効率には差を認めなかったが、感染後のcccDNA生成効率が低下しており、またリサイクル依存性cccDNAの生成効率の低下も確認された。これらの特徴がI97L変異が関わる臨床的治癒に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のB型慢性肝炎治療では臨床的治癒が治療目標とされている。これまでにB型慢性肝炎症例のHBVゲノムの解析から、コア領域I97Lの変異が臨床的治癒に関与していることが報告されている。そこで、このI97Lの変異がHBVのライフサイクルに与える影響を解析した。その結果、I97L変異は一本鎖ゲノムを持つ未成熟なウイルスを産生し、cccDNA生成効率の低下に関与していることが明らかとなった。そして、このcccDNA合成効率の低下が、感染HBV量を減少を引き起こし臨床的治癒の成立に寄与していると考えられた。臨床的治癒の達成のためには感染細胞中のcccDNA量を低下させる治療法の確立が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The substitution of isoleucine to leucine at amino acid 97 (I97L) in the hepatitis B core region has been reported as a key predictor among patients with stable hepatitis. In this study, we attempted to identify the point at which I97L affects the HBV lifecycle and to elucidate the underlying mechanisms governing the stabilization of hepatitis. The effects of I97L on viral characteristics were evaluated by in vitro HBV production and infection systems with the HBV reporter virus and cell culture-generated HBV. HBV-I97L exhibited lower infectivity than HBV-I97wt in both infection systems with reporter HBV and cell culture-generated HBV. HBV-I97L virions exhibiting low infectivity primarily contained a single-stranded HBV genome. The lower efficiency of cccDNA synthesis was demonstrated after infection of HBV-I97L or transfection of the molecular clone of HBV-I97L. The I97L substitution reduces the level of cccDNA through the generation of immature virions with single-stranded genomes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：B型慢性肝炎 臨床的治癒 遺伝子変異 cccDNA

1. 研究開始当初の背景

現行の慢性 B 型肝炎治療では主に核酸アナログ製剤が用いられている。これらの薬剤の投与により多くの患者では肝炎のコントロールが可能であり、肝硬変への進行阻止や肝発癌率の低下が期待できる。しかしその一方で、核酸アナログ製剤を用いた治療では HBV を患者体内から排除することは難しいため、肝炎の沈静化と HBs 抗原の陰性化を目指した機能的治癒が現在の治療目標となっている。最近、コア領域に I97L の変異を持つ HBV 株が検出された患者では、この変異を持たない株に感染している患者と比べて、肝炎の沈静化と HBs 抗原量の低下、さらに HBV DNA 量の低下が期待できることが報告された。しかし、これらの変異株が肝炎の沈静化を引き起こすメカニズムについては明らかになっていない。

HBV は培養細胞で増殖させることが難しく、ウイルスのライフサイクルの評価が不可能であったため、これまでウイルス学的検討が十分に進まなかった。1980 年代から HBV の 2 倍長のゲノムを持つコンストラクトを培養細胞に導入することで感染性 HBV 粒子が産生されることが知られていたが、培養細胞への感染は観察できなかった。2012 年に HBV のレセプターとして NTCP が同定され、HepG2 などの培養細胞に NTCP を発現させることにより培養細胞への HBV 感染の観察も可能になった。現在ではこれらの感染性 HBV 粒子の産生系と感染系を組み合わせることにより、HBV のすべてのライフサイクルが培養細胞で再現可能となっている。また近年の HBV 研究の進歩により、HBV レポーターウイルスを用いて HBV の感染効率を定量化して評価できるようになっている。そこで、これらの培養細胞での HBV 感染系を用いてコア領域の I97L の変異が HBV のライフサイクルに与える影響を明らかにし、B 型肝炎の HBs 抗原陰性化や HBV DNA 量の低下を引き起こすメカニズムの解析を行うことを考えた。

2. 研究の目的

我々は HBV ゲノムの 1.38 倍長を持つ各種遺伝子型株の複製モデルコンストラクトを用いて培養細胞内での HBV 複製を評価する系を構築した。これまで、この系を用いて HBV のポリメラーゼ領域の変異が核酸アナログ製剤に対する薬剤耐性に与える影響を評価し報告している。現在はさらに検討を進めて、遺伝子型 C 株の複製モデルコンストラクトを培養細胞に導入し、得られた HBV 粒子を精製することで効率的な培養細胞への感染が観察可能な系も構築している。そこで本研究では、この培養細胞での HBV 感染系を用いて HBV コア領域の I97L の変異が HBV のライフサイクルに与える影響を明らかにすることを目的とする。この変異が HBs 抗原の産生や HBV DNA の維持に与える影響を解明することで、この変異が持つ臨床的意義を明らかにしたい。

3. 研究の方法

HBV コア領域の I97L 変異が HBV の感染過程に与える影響を、感染力価の定量が可能な HBV レポーターウイルスを用いて解析した。また、感染性 HBV の産生が可能な遺伝子型 C 株の 1.38 倍長 HBV ゲノムを持つプラスミドに I97L 変異を導入し、野生型 (HBV-wt) と I97L 変異株 (HBV-I97L) のプラスミドを作製した。これらのプラスミドを培養細胞に導入し、培養上清中に放出される HBV の性状を密度勾配超遠心法で解析した。得られたウイルスの感染効率は HBV の感染受容体である NTCP を発現させた HepG2-NTCP 細胞で確認した。さらに、感染の各過程における I97L 変異の影響についても検討を行った。また、I97L 変異が HBV ウイルス粒子形成過程に及ぼす影響を粒子のエンベローピングに関わる HBc 抗原と L-HBs 抗原の結合効率を測定することにより評価した。

4. 研究成果

(1) HBV レポーターウイルスを用いた I97L 変異が HBV 感染に与える影響の解析

I97L 変異を持たない HBV レポーターウイルス (HBV/NL-wt) と I97L 変異を持つ HBV レポーターウイルス (HBV/NL-I97L) を作製し、これらの感染能を比較した。これらのレポーターウイルスを HBV のレセプターである NTCP を発現させた HepG2 細胞に同じコピー数で感染させたところ、HBV/NL-I97L は HBV/NL-wt と比較して感染力価が低下していた。

(2) HBV 1.38 倍長コンストラクトを用いた I97L 変異の解析

次に HBV 1.38 倍長コンストラクトを培養細胞に導入して得られるウイルスについて検討を行った。培養細胞にこれらのコンストラクトを導入して得られた HBs 抗原量は細胞内及び

培養上清中とも差を認めなかった。HBcr 抗原量については、細胞内の発現量に差を認めなかったが、培養上清中では HBV-197L 導入細胞で高値となった。培養上清中に放出された HBV DNA 量の比較では、HBV-wt と比較して HBV-197L で低値であった。産生されたウイルスの感染力価の比較では、レポーターウイルスによる検討と同様に HBV-197L での感染力価の低下が認められた。この産生された HBV を密度勾配超遠心法で分画し、サザンブロット法によりウイルス粒子に含まれるゲノムを解析したところ、HBV-197L の感染ピークに存在するウイルスは不完全二本鎖ではなく主に一本鎖ゲノムを含む未熟なウイルスであることが明らかとなった。

(3) 感染の各過程で 197L 変異が与える影響の解析

そこで HBV 感染の各過程における 197L 変異の影響を解析した。まず、HBV-wt と HBV-197L において NTCP 発現 HepG2 細胞への吸着と侵入、さらに感染後の cccDNA 産生効率について評価した。その結果、HBV-197L では細胞への吸着や侵入効率には差を認めなかったが、感染後の cccDNA 産生効率が低下していた。さらにリサイクル依存性の cccDNA 産生能についても解析を行った。HBV-wt と HBV-197L の 1.38 倍長 HBV ゲノムコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、導入後のプレゲノム RNA (pgRNA) と cccDNA の産生を評価した。その結果、コンストラクト導入後の pgRNA 産生量には差を認めなかったが、リサイクル依存性 cccDNA の産生効率の低下が観察された。

(4) 197L 変異が HBV ウイルス粒子形成効率に与える影響の解析

HBV ウイルス粒子の形成に関わる L-HBs 抗原と HBc 蛋白質の結合に 197L 変異が与える影響について、Nano-BiT を用いて解析した。L-HBs 抗原に SmBiT を融合させたコンストラクトと HBc 抗原に LgBiT を融合させたコンストラクトを培養細胞に導入し、発現した蛋白質同士の結合により産生される Nano Luc 活性を測定した。その結果、197L 変異を持つ HBc 抗原では L-HBs 抗原との結合能が増強しており、この HBc 抗原と L-HBs 抗原の高い結合能が、197L 変異に関わる一本鎖ゲノムを含む未熟なウイルス産生に関与している可能性が示唆された。

5. 考案

上記の結果から、197L 変異を持つ HBV は不完全二本鎖ではなく一本鎖ゲノムを持つ未熟なウイルスを主に産生していることが明らかとなった。さらに、この未熟なウイルスは感染後の cccDNA 産生能が低下しており、その結果感染力価が減弱していることも明らかとなった。また、HBV 197L 変異株では、リサイクル依存性の cccDNA の産生効率も低下していた。そして、この 197L 変異による cccDNA 産生効率の低下が HBV 量の減少をきたし、機能的治癒の成立に寄与していると考えられた。従って機能的治癒を目指した治療法確立のためには cccDNA 量を低下させる治療法の樹立が有効であると考えられた。

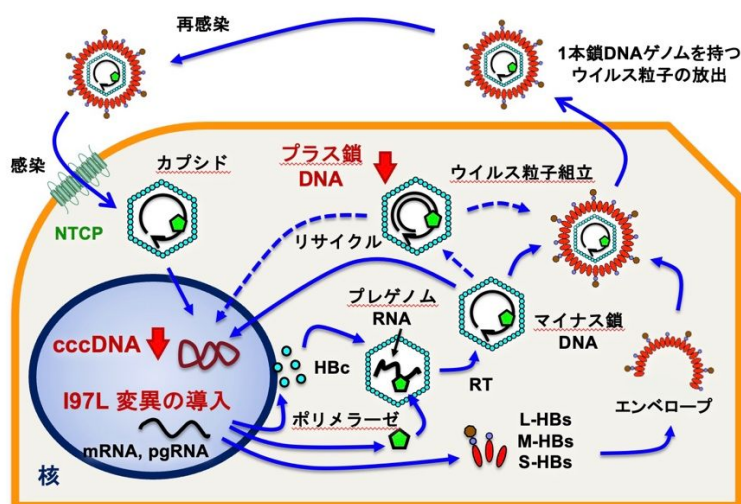


図 1. コア領域 197L 変異に関わる一本鎖ゲノムを含む未熟なウイルス産生と感染由来及びリサイクル由来の cccDNA 産成能の低下

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 1件）

1. 著者名 Honda T, Yamada N, Murayama A, Shiina M, Aly HH, Kato A, Ito T, Ishizu Y, Kuzuya T, Ishigami M, Murakami Y, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Shimotohno K, Ishikawa T, Fujishiro M, Muramatsu M, Wakita T, Kato T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Amino Acid Polymorphism in Hepatitis B Virus Associated With Functional Cure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1583 ~ 1598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2021.07.013	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤孝宣、山田典栄、本多 隆
2. 発表標題 Functional cureに関するコア領域のアミノ酸変異がHBVライフサイクルに与える影響の解析
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 Takashi Honda, Norie Yamada, Asako Murayama, Asuka Kato, Takanori Ito, Yoji Ishizu, Teiji Kuzuya, Masatoshi Ishigami, Yoshiki Murakami, Tetsuya Ishikawa, Mitsuhiro Fujishiro, Takanobu Kato.
2. 発表標題 Amino Acid Polymorphism in Hepatitis B Virus Associated with Natural Clearance of HBV DNA and HBsAg.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------