

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17488

研究課題名（和文）単一細胞解析によるB型肝炎ウイルス複製に影響を与える宿主因子の解明

研究課題名（英文）Investigation of host factors which regulate HBV replication using single cell RNA-sequencing

研究代表者

中堀 輔（Nakabori, Tasuku）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・肝胆膵内科副部長

研究者番号：60795160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：B型肝炎患者の肝臓では、HBs抗原陽性細胞と陰性細胞が不均一に分布している。HBs抗原陽性細胞が集簇している領域では、陰性細胞が集簇している領域よりも、pgRNAやcccDNAは有意に高く、宿主の遺伝子についてはBCAT2（branched chain amino-acid transaminase 2）の発現は有意に高かった。リベラゼ灌流法を用いると、非硬変肝からは80%程度の高い生細胞率にて単一細胞分離が可能だった。一方、硬変肝から単一分離した細胞の生細胞率は30%であった。肝臓から単一分離した細胞の生細胞率は背景肝の炎症や線維化に依存する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞では、近年代謝リプログラミングとして、アミノ酸代謝が癌細胞の生存や分裂増殖、転移などに必要なエネルギーやタンパク質・核酸などの供給に関与していることが報告された（Hattori A, et al. Nature. 2017）が、B型肝炎ウイルス複製においても分岐鎖アミノ酸代謝に関与している可能性が示唆された。リベラゼ灌流法では、非硬変肝からは高い生細胞率にて単一細胞を分離することができたが、硬変肝から単一分離した細胞では高い生細胞率を維持することはできなかった。線維化や炎症の程度が強い肝臓からの単一細胞分離の手法について改善や見直しが必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：HBsAg-positive and -negative cells are heterogeneously distributed in the liver of hepatitis B patients. PgRNA, cccDNA, and BCAT2 (branched chain amino-acid transaminase 2) were significantly higher in the region where HBsAg-positive cells are clustered than in the region where HBsAg-negative cells are clustered.

It was possible to isolate single cells from non-cirrhotic liver with a high viability of about 80% using the liberase perfusion method. On the other hand, the viability of single cells isolated from cirrhotic liver was only about 30%. It was suggested that the viability of cells isolated from the liver may depend on background liver inflammation or fibrosis.

研究分野：B型肝炎

キーワード：B型肝炎 アミノ酸代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) B型慢性肝炎はB型肝炎ウイルス(HBV: hepatitis B virus)の持続感染が原因であり、肝硬変や肝発癌の危険を伴う。本邦では100万人以上のB型肝炎患者が存在し、国内最大の感染症の一つであるが、未だB型肝炎の病態生理については不明な点が多い。核酸アナログ製剤やインターフェロンなど既存の治療薬では、効果は肝炎の鎮静化や肝線維化進展の抑制および肝細胞癌発生の抑止に留まり、HBVの排除という最終的な目標を達成することはできない。ウイルス感染や複製に伴う肝細胞の生理機能の変化を詳細に解析し、新たな抗ウイルス治療標的を同定する必要がある。

(2) B型肝炎患者の肝組織では、HBsAgに対する抗体を用い免疫染色を行うと、すべての肝細胞がHBsAg陽性となるのではなく、HBsAg陽性細胞とHBsAg陰性細胞が混在していることを報告した(Nakabori T, et al. Sci Rep. 2016)。HBsAg陽性細胞の比率は、血清HBV DNA値およびHBsAg値と有意な正の相関関係にあった。核酸アナログ製剤にて治療中のB型肝炎患者では、治療歴のないB型肝炎患者と比較し、HBsAg陽性肝細胞比率は低いが、HBsAg陽性肝細胞は消失せず、残存していた。核酸アナログ製剤では血清中のHBsAgの消失を期待することはできないことから、HBsAg陽性肝細胞の遺残が血清中のHBsAgの残存に関与していることが推察される。そのため、HBsAg陽性肝細胞を解析することにより、核酸アナログ製剤との併用により抗ウイルス効果の上乗せが期待される治療標的を探索することができる。

2. 研究の目的

(1) HBs抗原陽性が集簇する領域およびHBsAg陰性細胞が集簇する領域におけるウイルスの感染動態および宿主の遺伝子発現を解析する。

(2) 単一細胞レベルにおいて、pgRNA発現量と宿主遺伝子発現の相関を解析し、HBV感染肝細胞内でのHBV複製による宿主の遺伝子発現制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) B型肝炎由来の肝臓の手術切除検体非癌部を用い、laser capture microdissection法により、HBs抗原陽性細胞が集簇している領域およびHBs抗原陰性細胞が集簇している領域をそれぞれ採取し、遺伝子発現を解析した。ウイルス側の遺伝子発現(pregenomeRNA [pgRNA]やcovalently closed circular DNA [cccDNA])はRT-PCR法にて、宿主の遺伝子発現は次世代シーケンサーを用い、網羅的に解析した。

(2) HBs抗原陽性細胞が集簇している領域とHBs抗原陰性細胞が集簇している領域の宿主の遺伝子発現を比較検討し、差異を認める遺伝子を選定した。

(3) (2)にて選定した遺伝子のHBV感染動態における意義を、ヒト肝細胞キメラマウスおよびそのマウスより単離した初代培養ヒト肝細胞にHBVを接種したin vivo、in vitro感染モデルを用いて検討した。

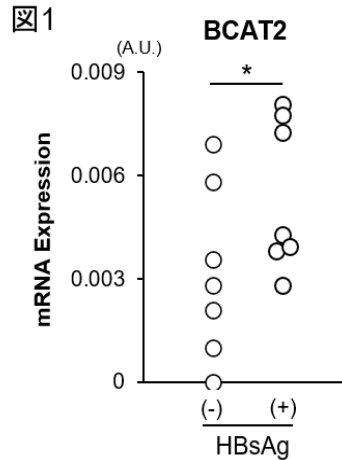
(4) B型肝炎由来の肝細胞癌の手術切除検体非癌部を用い、門脈から全灌流液を用いて脱血した後、リパーラーゼを灌流させ、細胞を単離した。

4. 研究成果

(1) B型肝炎患者の肝臓には、HBs抗原陽性細胞とHBsAg陰性細胞が不均一に分布しており、HBs抗原陽性細胞が集簇している領域およびHBs抗原陰性細胞が集簇している領域をlaser capture microdissection法を用いて、それぞれ採取し、ウイルス側の遺伝子を解析したところ、HBs抗原陽性細胞が集簇している領域ではHBs抗原陰性細胞が集簇している領域と比較し、pgRNAやcccDNAの発現が有意に高かった。一方、宿主の遺伝子については、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析したところ、HBsAg陽性領域ではHBsAg陰性領域と比較し、7遺伝子は2倍

以上発現が上昇し、4 遺伝子は 2 倍以上発現が低下した (p<0.01)

(2) 発現に差異を認めた上記の遺伝子の中に、分枝鎖アミノ酸のアミノ基転移酵素である BCAT2 (branched chain amino-acid transaminase 2)が含まれていた。HBs 抗原陽性細胞が集簇している領域および HBs 抗原陰性細胞が集簇している領域からそれぞれ抽出した RNA を用い、RT-PCR 法にて、HBs 抗原陽性細胞が集簇している領域では HBs 抗原陰性細胞が集簇している領域と比較し、BCAT2 の発現が高いことを検証した(図1)。癌細胞では、近年代謝リプログラミングとして、アミノ酸代謝が癌細胞の生存や分裂増殖、転移などに必要なエネルギーやタンパク質・核酸などの供給に参与していることが報告された (Hattori A, et al. Nature. 2017) が、HBV 感染における BCAA 代謝の意義については、これまで詳細な検討は行われておらず、本研究では HBV 感染における BCAA 代謝のリプログラミングに注目した。



(3) HBV 接種 10-12 週後のほとんどすべてのヒト肝細胞が HBs 抗原陽性となったヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、HBV を接種していないヒト肝細胞キメラマウスと比較し、BCAT2 の発現は高かった。

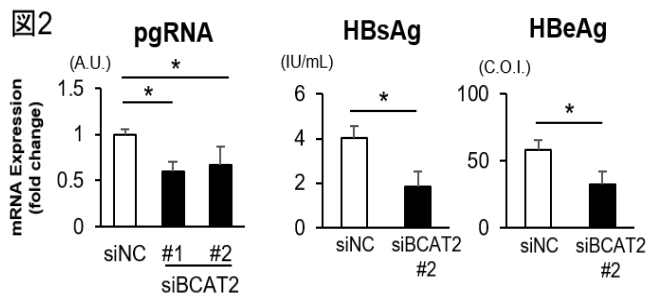
(4) ヒト肝細胞キメラマウスより単離した初代培養ヒト肝細胞(PHHs: Primary human hepatocytes)では、HBV を感染させると、BCAT2 の発現は上昇した。

(5) HBV が感染した PHHs の BCAT2 の遺伝子発現を抑制すると、細胞内の pgRNA は低下し、ウイルス複製は抑制された。また、培養上清中の HBsAg、HBeAg 値は低下した (図2)。

(6) B 型肝炎由来の肝癌の手術切除検体非癌部を用い、シングルセル解析のため、細胞を単離した。予備実験として、転移性肝癌患者の切除組織非腫瘍部を用い、単一細胞を分離したところ、 8.34×10^5 個の細胞を単離することができ、生細胞率は 82%であった。引き続き、肝細胞

癌切除検体非癌部 5 例より肝細胞の単離を試みたが、1 例は単離できず、4 例では生細胞率は 24-

34%であり、採取できた細胞数は $0.73-1.58 \times 10^5$ 個であった。転移性肝癌患者の切除組織非腫瘍部の背景肝はほぼ正常であったが、肝細胞癌切除検体非癌部の背景肝は炎症を伴い、線維化の程度は強かった。これらの背景肝の差が、採取できる細胞数や生細胞率に参与している可能性が示唆された。



癌切除検体非癌部 5 例より肝細胞の単離を試みたが、1 例は単離できず、4 例では生細胞率は 24-34%であり、採取できた細胞数は $0.73-1.58 \times 10^5$ 個であった。転移性肝癌患者の切除組織非腫瘍部の背景肝はほぼ正常であったが、肝細胞癌切除検体非癌部の背景肝は炎症を伴い、線維化の程度は強かった。これらの背景肝の差が、採取できる細胞数や生細胞率に参与している可能性が示唆された。

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 Nakabori Tasuku, Abe Yutaro, Higashi Sena, Hirao Takeru, Kawamoto Yasuharu, Maeda Shingo, Daiku Kazuma, Urabe Makiko, Kai Yugo, Takada Ryoji, Yamai Takuo, Ikezawa Kenji, Uehara Hiroyuki, Ohkawa Kazuyoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Feasibility of immunotherapy in cancer patients with persistent or past hepatitis B or C virus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 309 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12737	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中堀 輔、疋田 隼人、下田 彬允、福岡 誠、福富 啓祐、村井 一裕 山井 琢陽、山田 涼子、小玉 尚宏、阪森 亮太郎、巽 智秀、竹原 徹郎
2. 発表標題 BCAT2 (branched-chain amino acid (BCAA) transaminase 2)抑制はde novo核酸合成経路を介してB型肝炎ウイルス複製を抑制する
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tasuku Nakabori, Hayato Hikita, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Keisuke Fukutomi, Kazuhiro Murai, Takuo Yamai, Ryoko Yamada, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Hidetoshi Eguchi, Hiroshi Suemizu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Branched-chain amino acid transaminase 2 contributes to HBV pregenome RNA synthesis via de novo nucleotides supply.
3. 学会等名 2019 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasuku Nakabori, Hayato Hikita, Akiyoshi Shimoda, Makoto Fukuoka, Keisuke Fukutomi, Kazuhiro Murai, Takuo Yamai, Ryoko Yamada, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Hidetoshi Eguchi, Hiroshi Suemizu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.
2. 発表標題 INHIBITION OF BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2 SUPPRESSES HEPATITIS B VIRUS REPLICATION THROUGH DE NOVO NUCLEOTIDES SYNTHESIS
3. 学会等名 The Liver Meeting 2019 (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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