

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2009

課題番号：20590789

研究課題名（和文） B型肝炎ウイルス複製モデルを用いた肝病態進展メカニズムの解明

研究課題名（英文） Clarification of liver condition progress mechanism that uses Hepatitis B virus reproduction model

研究代表者

田中 靖人 (TANAKA YASUHITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90336694

研究成果の概要（和文）：(1) B型肝炎ウイルス(HBV) 感染・複製機構の解明 ①HBVの複製とコア蛋白の産生量に相関があり、コアプロモーター領域の変異が複製に大きな影響を与えていることがわかった。②臨床的に単独感染の報告がない遺伝子型Gの複製メカニズムにもコア蛋白が関与していた。③HBVが感染可能な三次元肝細胞培養系を構築した。(2) 肝病態進展メカニズムの解明：免疫不全状態で、遺伝子型Cやプレコア変異株による免疫系を介さない直接的な肝傷害を確認し、酸化ストレスが関与していた。

研究成果の概要（英文）：(1) Mechanism of hepatitis B virus (HBV) infection and replication: ①HBV core protein as well as core promoter mutations are associated with viral replication. ②The replication of genotype G was supported by core proteins of the other genotypes. ③The hollow-fiber 3D culture system is superior to conventional monolayer culture allowing maintenance of HBV replication for a substantially longer duration. (2) Clarification of liver condition progress mechanism: Infection with HBV/C2 as well as PC mutant in immunosuppressive conditions can induce direct cytopathic effect in “humanized” part of the murine liver due to the activation of hepatic stellate cells mediated by oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学点消化器内科学

キーワード：HBV、肝発癌、共感染、キメラマウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) B型肝炎ウイルス (HBV) は約 40 年前に発見されたが、未だに本邦で約 150 万人、アジアで約 2 億人、世界中で約 4 億 2 千万人の持続感染者が存在し、本邦では年間約 6,000 人、世界中で年間百万人が HBV による肝硬変や肝細胞癌で死亡している。しかし、HBV による発癌メカニズムは不明であり、その治療法は確立されていない (WHO 2004)。我々は HBV 感染の臨床像が世界各国で大きく異なる点に着目して研究を進めてきた。その結果、臨床像の地域差は、HBV 遺伝子型 (genotype) に依存していることを明らかにした (2004 年 J Virol, Hepatology, 2006 年 J Virol.) さらに我々は HBV genotype のウイルス学的特徴を明らかにするため、以下の通り、*in vitro* 及び *in vivo* での HBV 複製モデルを確立した。

① 効率良く HBV を発現する細胞培養系を確立し (2006 年 Hepatology)、さらに世界中の全ての HBV genotype の細胞培養系をすでに確立していた。

② HBV 基礎研究の発展のためには、感染実験に使用可能な小動物が必須であったが、近年 HBV が容易に感染し得るヒト肝細胞移植キメラマウスが開発された。このヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV の genotype により *in vivo* における感染増殖能が異なることを明らかにした (2006 年 Hepatology、2007 年 Hepatology)。

## 2. 研究の目的

### (1) HBV 感染・複製様式の解明

① 臨床的にも血中 HBV DNA 量と病態進展は有意な関連性があり、HBV 複製メカニズムを知ることがウイルス学的・臨床的に重要な課題

である。複製を規定する領域や特異的変異の同定を目指す。

② 異なる HBV genotype や HCV との共感染によるウイルス複製や肝組織進展に与える影響を検討する。

### (2) 肝病態進展メカニズムの解明

① HBV genotype の違いによる細胞ストレスの有無を検討する (*in vitro*)。

② 各 HBV genotype クローンをキメラマウスへ感染させ、経時的な肝組織の変化を病理学的及び分子生物学的に解析する。免疫反応を介さない HBV の直接の細胞障害性を検討できる。

③ 肝発癌に寄与する HBV 特異的変異の同定。変異挿入クローンの作成。

④ キメラマウスへの感染実験及び変異遺伝子導入 (transgenic) マウスの作成：Phenotype の比較、ジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子異常の解析。

(3) 肝発癌抑止を目指したテラーメイド治療の確立：治療介入による HBV 複製制御は肝発癌抑止に繋がる。新規標的分子薬剤の探索や薬剤感受性試験により各 genotype に対応したテラーメイド治療の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) HBV 感染・複製様式の解明

① HBV 複製メカニズムの解明：臨床的にも血中 HBV DNA 量と病態進展は明らかに関連性があり、HBV 複製メカニズムを知ることがウイルス学的・臨床的に重要な課題であった。特に、genotype の違いがウイルス複製やウイルス蛋白合成の違いとして現われており、各 genotype に特異的な変異がいくつか報告されていたので、それらを利用し原因となり得

る領域の候補をあげる。次に、複製効率の高い遺伝子型と低い遺伝子型のゲノムを入れ替えたキメラウイルスを作製し、複製を規定する領域や特異的変異を探索。

② 異なる HBV genotype や HCV との共感染によるウイルス複製や肝組織進展に与える影響の検討：既に臨床的に単独感染の報告がない HBV genotype G の複製メカニズムに関してヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて解明していた。異なる HBV genotype の共感染によるウイルス組み換えの可能性やウイルス複製・病態進展への影響を検討。さらに、HBV と我が国における肝癌の主要な原因である HCV との相互作用について、キメラマウスを用いた共感染実験によりそれぞれのウイルス複製や病態進展へ与える影響を検討。

③ 三次元肝細胞培養系を用いた新規感染モデルの確立：この培養系は1ヶ月程度の長期培養が可能であり、各種変異体の感染効率の違いやインターフェロン等のサイトカインの経時的推移が検討可能である。将来的に HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析するために、米国 (BD Biosciences) より入手した初代肝細胞のみならず、京都大学ウイルス研究所から供与された不死化肝細胞 (正常肝細胞) を用いた効率的な三次元肝細胞培養系の確立を目指した。

## (2) 肝病態進展メカニズムの解明

① 各 HBV genotype クローンをキメラマウスへ感染させ、経時的な肝組織の変化を病理学的及び分子生物学的に解析：培養上清より得られた異なる genotype A, B, C, D の感染粒子をキメラマウスに感染させ、ウイルスの複製効率を比較検討。さらに HBV genotype による細胞内 HBV 蓄積や病理組織学的な違いを検討した。さらに、肝線維化

に寄与する星細胞の活性化や酸化ストレス (8-OHdG など) の有無を確認。HBV 感染による細胞ストレスなどの関与を明らかにするために、マイクロアレイ解析により病態進展に寄与する宿主側の因子を遺伝子レベルで探索した。

② 肝発癌に寄与する HBV 特異的変異の同定。変異挿入クローンの作成：我が国に多い HBV genotype C は、従来より報告されている BCP 変異 (A1762T/G1764A) に加えて、X 蛋白変異を伴う C1653T 変異が肝細胞癌へ関与していることを既に示していたので、(2006 年 Clin Infect Dis.) こうした発癌に寄与する変異を含む遺伝子導入 (transgenic) マウスを作成し、臨床病理学的な検討で、炎症や繊維化、発癌の有無を比較した。

(3) 肝発癌抑止を目指したテーラーメイド治療の確立：新規薬剤の探索や薬剤感受性試験により各 genotype に対応した適切な治療法を確立：各 genotype による薬剤感受性や不応性 (耐性) の違いを明確にする。特に、インターフェロン、ヌクレオチドアナログ及び新規薬剤の併用による相乗効果の可能性を探る。併用療法や新規薬剤の感受性試験は、三次元肝細胞培養系による新規感染モデルやヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて検証する。

## 4. 研究成果

### (1) HBV 感染・複製機構の解明

① HBV の複製とコア蛋白の産生量に相関があり、それは HBV 遺伝子型間の違いとしても現われていた。その詳細に検討するために、まずコア蛋白を外部から供給する検討を行った。それにより、コア蛋白量依存的に複製が亢進した。一方、HBs 蛋白ではその効果は認められなかった。この効果は、どの遺伝子型由来のコアを

用いても同様であり、HBV複製効率の限定条件となっているのはコア蛋白であると考えられた。さらに、各種キメラクローンを作成して検討した結果、コアプロモーター領域の変異が複製に大きな影響を与えていることがわかった。

② 複数のHBV遺伝子型もしくはHCVとHBVの共感染を再現し、臨床的に観察される共感染機構を明らかにするため、キメラマウスを用いて検討したが、HCVとHBVの共感染の効率が悪い事が分かった。

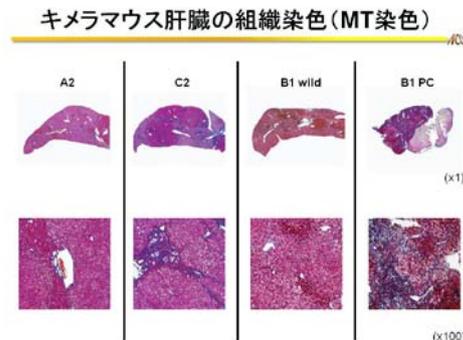
③ 三次元肝細胞培養系を用いた新規感染モデルの確立: この培養系は1ヶ月程度の長期培養が可能であり、各種変異体の感染効率の違いやインターフェロン等のサイトカインの経時的推移が検討可能である。引き続き、細胞や条件設定を調節して、より効率的なモデルの作成を検討している。

## (2) 肝病態進展メカニズムの解明

① 各HBV遺伝子型につき複数株をキメラマウスへ感染させ、長期に飼育し肝病態を観察した所、臨床的での報告例と相関して、遺伝子型Cが感染したマウスでは肝傷害が認められ線維化の進展が観察された。一方で、遺伝子型Aの感染ではそのような病態は見られず、遺伝子型により肝傷害の程度に違いが生まれた。このマウスは、免疫不全(抑制)化でのB型肝炎による急速な線維化の進展という臨床病態(Fibrosing cholestatic hepatitis)を模倣したモデルマウスであると考えられた(図1)。さらに、HBV感染が成立したキメラマウス肝臓を経時的にcDNAマイクロアレイで解析し発現遺伝子の動態を確認した。また免疫不全下でのHBV感染により自然免疫系の働きとその変化を解析し、特にHBVの持つ病原性発現機構に関しては検討を重ね、獲得免疫系を介さずに肝傷害が起こることを示し、こ

れらの結果はHBVには細胞傷害性がないと言われてきた定説を実験的に覆すものであり移植後肝炎モデルとなり得ると分かった。

(図1)



② 肝癌特異的なウイルス変異であるC1653TとA1762T/G1764A変異に関して、これらの変異を組合せて持つX遺伝子を作製した。それらをマウスに遺伝子導入し、変異遺伝子導入マウスを3種類作出した。それらのマウスのホモ化と変異遺伝子導入部位の同定を進め、導入遺伝子の発現量とコピー数を定量しこれらのマウスの形質を確認した。今年度までに肝腫瘍が散見されており、引き続き検討を進める。

(3) 肝発癌抑止を目指したテーラーメイド治療の確立: エンテカビル耐性株に対して、低分子化合物を複数検討した結果、インターフェロンとの併用により、相乗効果がみられる化合物を同定した。その結果は、ヒト肝細胞置換キメラマウスでも検証された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Tatematsu K, Tanaka Y, Mizokami M. (10人中2番目) A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype

- J. J Virol. 2009, 83(20):10538-10547. 査読有
- ② Kusakabe A, Tanaka Y, Mizokami M. (23人中2番目) Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. Hepatol Res. 2009, 39(7):648-656. 査読有
- ③ Matsuura K, Tanaka Y, Mizokami M. (22人中2番目) Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. J Clin Microbiol. 2009, 47(5):1476-1483. 査読有
- ④ Ikegami T, Matsuki Y, Tanaka Y, Matsuzaki Y. (8人中3番目) Impact of determination of hepatitis B virus subgenotype and pre-core/core-promoter mutation for the prediction of acute exacerbation of asymptomatic carriers. Hepatol Res. 2009, 39(4):341-345. 査読有
- ⑤ 田中 靖人, 向出 雅一, 菅内 文中, 溝上 雅史. B型肝炎の治療最前線 B型慢性肝炎に対するエンテカビル治療. 臨床消化器内科. 2009, 24(6):691-699. 査読無
- ⑥ 田中 靖人, 菅内 文中, 溝上 雅史. (11人中1番目) 「イムニス HBV ゲノタイプ EIA」の基礎的・臨床的検討. 臨床病理. 2009, 24(6):42-47. 査読有
- ⑦ Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. (10人中2番目) Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1\_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. Hepatol Res. 2008, 38(5):457-464. 査読有
- ⑧ Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M. (11人中1番目) Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in chimeric mice carrying human hepatocytes. Virology. 2008, 376(2):408-15. 査読有
- ⑨ Kurbanov F, Tanaka Y, Simmonds P, Mizokami M. (5人中2番目) When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype?. J Virol. 2008, 82(16):8241-8242. 査読有
- [学会発表] (計16件)
- ① 松浦 健太郎. B型肝炎に対する Entecavir の治療成績と各種血清マーカーの推移. 第38回日本肝臓学会西部会. 2009年12月4-5日. 米子コンベンションセンター (米子)
- ② Matsuura K. Identification of genetic variants associated with chronic hepatitis B or C in a genome-wide association. The 8<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference. November 21-22 2009. International Medical Center of Japan (Tokyo)
- ③ Sugauchi F. Clinical significance of a novel high-sensitivity hepatitis B surface antigen immunoassay in patients with hepatitis B virus infection. 60th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). Oct 30-Nov 3 2009. HYNES CONVENTION CENTER (Boston MA, USA.)
- ④ Matsuura K. A genome-wide association study identifies genetic variants in the HLA-DP associated with chronic hepatitis B. 60th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). Oct 30-Nov 3 2009. HYNES CONVENTION CENTER (Boston MA, USA.)
- ⑤ 田中 靖人. B型肝炎ウイルス感染による肝細胞障害の機序. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009年10月25日-27日. 都市センターホテル (東京)
- ⑥ 菅内 文中. B型慢性肝炎難治例への対策 B型肝炎に対する Adefovir, Entecavir の治

療成績と多剤耐性 HBV 変異株に対する Tenofovir の有効性. 第 13 回日本肝臓学会大会. 2009 年 10 月 14-16 日. 京都国際会議場 (京都)

⑦ 田中 靖人. コンセンサスミーティング B 型肝炎: HBV 遺伝子型と病態・予後. 第 45 回日本肝臓学会総会. 2009 年 6 月 4 日-5 日. 神戸ポートピアホテル (神戸)

⑧ 木村 達治. HBV genotype A, B, C, D における HBs 抗原定量の臨床的意義. 第 45 回日本肝臓学会総会. 2009 年 6 月 4 日-5 日. 神戸ポートピアホテル (神戸)

⑨ 田中 靖人. 変わり行く B 型肝炎の臨床. 第 304 回日本消化器病学会関東支部例会. 2009 年 5 月 16 日. 海運クラブ (東京)

⑩ Shinkai Noboru. Complete genomic analyses of 153 hepatitis B virus genotype C2 strains in Japan reveal association of T1497V, C1653T and T1753V mutations with hepatocellular carcinoma. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Mar 24 2009. MARRIOTT WARDMAN PARK HOTEL (Washington DC, USA.)

⑪ Sugiyama Masaya. Direct Cytopathic Effects by Hepatitis B Virus Infection in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Mar 24 2009. MARRIOTT WARDMAN PARK HOTEL (Washington DC, USA.)

⑫ Roman Sonia . Heterogeneity in HBV genotype distribution and high prevalence of occult hepatitis B in native Mexican population. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Mar 24 2009. MARRIOTT WARDMAN PARK HOTEL (Washington DC, USA.)

⑬ Panduro Arturo. Molecular epidemiology study of hepatitis B virus suggests origin of genotype G in Mexico. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Mar 24 2009. MARRIOTT WARDMAN PARK HOTEL (Washington DC, USA.)

⑭ Fujiwara Kei . Clinical and virological characteristics of Hepatitis B Virus Genotype E: key mutation in seroconversion, and similarity of regulatory sequence to genotype D. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Feb 13 2009. HONG KONG CONVENTION AND EXHIBITION CENTER (Hong Kong, CHINA)

⑮ Matsuura Kentaroh. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting Toward an Increase of Genotype A. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Feb 13 2009. HONG KONG CONVENTION AND EXHIBITION CENTER (Hong Kong, CHINA)

⑯ 田中 靖人. B 型・C 型肝炎ウイルス genotyping/sequencing の臨床的意義. 第 12 回日本肝臓学会大会. 2008 年 10 月 2 日. (東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 靖人 (TANAKA YASUHITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90336694