

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07940

研究課題名（和文）肝非実質細胞がもたらすB型肝炎ウイルス感染肝細胞におけるウイルス動態の解明

研究課題名（英文）Viral impact of hepatic non-parenchymal cells on Hepatitis B virus infected hepatocytes

研究代表者

川口 和紀（KAWAGUCHI, Kazunori）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90579632

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）：肝組織内には肝細胞以外に内皮細胞、胆管細胞、免疫細胞など非実質細胞が存在するが、B型肝炎ウイルスの感染が引き起こす各細胞間の相互作用については十分検討されていない。これまでの研究では、各構成細胞の遺伝子発現変化を解析し、細胞間シグナルがウイルス感染でも相互作用と関連していることを示した。本研究では、肝非実質細胞のうち血管内皮細胞や類洞内皮細胞が、感染肝細胞にどのように影響するかについて評価した。内皮細胞と感染肝細胞との共培養を行うとウイルス複製の有意な増加を認め、液性因子の中でも肝細胞増殖因子の関与が示唆され、肝細胞内のシグナルとしてPI3K/Akt/mTOR経路が介在することも判明した。

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すべきと考えた。本研究では特に、肝組織を構成する各種細胞間の作用に関わる実験的検討を行い、詳細に条件設定しながら実行し、どのような相互作用が存在するかが明らかとなった。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新たな創薬にも関連するので、社会的意義のある研究とされた。

研究成果の概要（英文）：Nonparenchymal cells such as endothelial cells, bile duct cells, and immune cells exist in liver tissue in addition to hepatocyte, however the interactions among these cells by hepatitis B virus infection have not been fully investigated. Previous studies we examined changes in gene expression by single cell analysis among liver component cells and found that intercellular signaling are closely related to the pathogenesis between these cells. In this study, we evaluated how vascular endothelial cells and sinusoidal endothelial cells could affect hepatitis B virus infected hepatocytes. Co-culture of endothelial cells with infected hepatocytes showed a significant increase in viral replication, suggesting the involvement of hepatocyte growth factor, and the PI3K/Akt/mTOR pathway was also found to be mediated as important signaling in hepatitis B virus infected hepatocytes.

研究分野：消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス 血管内皮細胞 類洞内皮細胞 肝細胞増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は、炎症、線維化、発癌など様々な病態を惹起するが、そのウイルスがもたらす病態形成には、HBV感染肝細胞内での動態のみならず、肝組織環境と密接な関係があるとされる。それゆえ、肝組織におけるHBV感染下の肝細胞と肝非実質細胞との相互関係が重要である。B型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療として核酸アナログ(NA)が広く投与されている。その作用としてHBVの複製を阻害させ血清HBV-DNAを減少させ活動性の肝炎を鎮静化させるが、核内に潜伏しているHBVのDNA(完全閉環二本鎖DNA:cccDNA)を排除することができない。従ってHBVのウイルス動態解明としてHBVcccDNAの役割に関する研究が重要であるとされる。これまでHBVcccDNAの転写制御にNotchシグナルをはじめとする細胞間シグナルが役割を果たすことに関して研究を行い、報告を行ってきた。肝組織を構成する肝非実質細胞により血管内皮細胞、類洞内皮細胞が肝実質細胞にもたらすシグナルとしてPI3K/Akt/mTOR経路やWnt経路が関与するとされる。また、これまで示してきたNotchシグナルは細胞間が接触して伝達するシグナルであり、一方で構成細胞間には様々な液性因子が介在し、その一部はこのような経路も関与した細胞間相互作用に役割を果たす可能性が高い。HBVは生体に対するHBV感染後の病態が様々であり、それは宿主因子もしくは感染肝細胞以外の肝非実質細胞から発する因子がHBV感染肝細胞に影響を与え、感染後の病態を規定することも予測される。

2. 研究の目的

肝組織に存在する肝非実質細胞、とりわけ血管内皮細胞や類洞内皮細胞が、HBV感染肝細胞のウイルス動態に影響を与えるか明らかにする。これらを同一環境下にするために共培養を行い、どのような細胞間で作用する因子が肝非実質細胞とHBV感染肝細胞間に作用してHBVcccDNAを含めたウイルス動態に影響を与えるかを明らかにする。HBV持続感染の成立には、T細胞疲弊や樹状細胞の機能低下を含めた免疫寛容の存在が指摘されており、肝非実質細胞においては免疫細胞の役割は大きい。しかしそれ以外の肝非実質細胞によるHBV持続感染への影響は十分解明されておらず、肝非実質細胞として内皮細胞に着目し、この細胞がもたらすHBV感染肝細胞への影響を評価する。

3. 研究の方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)及びヒト肝類洞内皮細胞(LSEC)を用い、これら内皮細胞とHBV感染肝細胞との直接接触を伴う共培養、またトランズウェルを介した共培養を行い評価した。HBV感染肝細胞は細胞株であるHepAD38、HepG2.2.15.7、またヒト肝細胞キメラマウスから分離された新鮮肝細胞を用いた。一定期間の培養後、pregenomic RNA(pgRNA)を測定することによりHBV複製の評価、またHBVcccDNAを定量リアルタイムPCRやサザンブロッティングにより変化を観察した。シグナル伝達経路に関して、非共培養下のHBV感染肝細胞との比較を定量リアルタイムPCRやウエスタンブロッティングにて比較検討を行った。本研究では、細胞内シグナル伝達経路に関して、HBV複製との関連が指摘される経路の一つであるPI3K/Akt/mTOR経路に着目した。さらに、これまで細胞間の液性因子として、肝細胞増殖因子(HGF)はHBVの感染例において亢進傾向であり、共培養の条件下で役割を果たしているかを確認する実験に関してHGFを負荷したり、HGF抗体を投与したりすることによりその阻害作用を確認する実験を行った。

4. 研究成果

(1)令和3年度の成果

HUVECやLSECと共培養させたHBV感染肝細胞では、非共培養下のHBV感染肝細胞と比較すると、直接またはトランズウェルを介した非接触型の系それぞれで行い、肝細胞におけるHBVpgRNAやHBVcccDNAを定量リアルタイムPCR法で測定したところ、いずれも共培養系で有意に上昇した(図1)。以上からは、HBV感染肝細胞が内皮細胞と同じ環境下に存在することにより、HBVが活性化することが判明し、肝組織環境はHBVにとって何らかの液性因子を介してHBV複製の亢進が認められ、かつHBVcccDNAの増加も有意に認められ、この仕組みを詳細

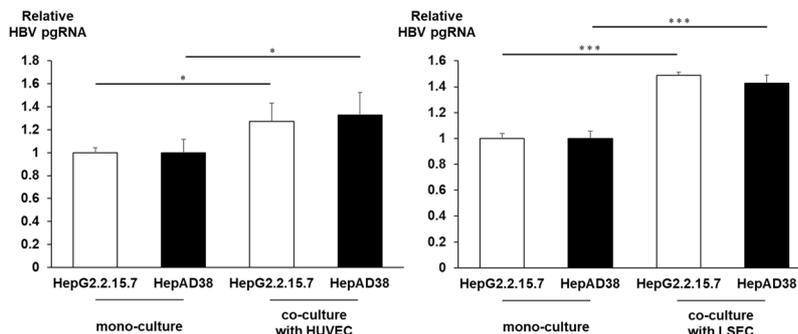


図1. 共培養系におけるHBV複製亢進

* : p < 0.05
*** : p < 0.001

HBV複製の亢進が認められ、かつHBVcccDNAの増加も有意に認められ、この仕組みを詳細

に検討することが重要と考えた。

(2)令和4年度の成果

内皮細胞とHBV感染肝細胞の間を介し、HBV複製亢進に寄与する液性因子の候補として、これまでの報告では、HGFがHBV感染慢性肝障害で増加傾向という報告があり、内皮細胞から分泌する液性因子として重要とされた。そこで、HGF負荷下のHBV感染肝細胞で評価すると、一定の濃度でHBV複製の亢進が認められた。また、内皮細胞との共培養によりHBV複製が得られた系において、抗HGF抗体を投与することにより、HBV複製は抑制されることが示された(図2)。以上より、液性因子の中でもHGFは内皮細胞から分泌されるが、これはHBV肝細胞内におけるHBV複製亢進に寄与することが本研究で判明した。

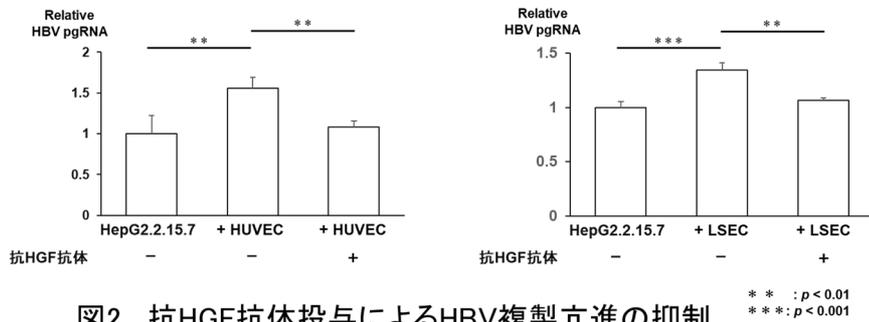


図2. 抗HGF抗体投与によるHBV複製亢進の抑制

(3)令和5年度の成果

これまでの報告よりHBVの複製にはPI3k/Akt/mTOR経路の活性化が関与しており、内皮細胞とHBV感染肝細胞との共培養の系、また、HGFをHBV感染肝細胞に負荷した系において評価を行った。HUVEC及びLSEC両者の内皮細胞との共培養によりHBV感染肝細胞のHBV複製やHBVcccDNAの増加のみならずPI3K/Akt/mTOR経路の亢進が認められた(図3)。抗HGF抗体を共培養系のこの系に負荷するとHUVEC及びLSECともにウイルス複製とPI3K/Akt/mTOR経路両者の亢進が減弱した。HGFはHBV感染肝細胞のウイルス複製に影響する責任因子の1つと考えられ、中でもPI3K/Akt/mTOR経路が肝細胞内のシグナルとして寄与することが判明した。さらに、HGFを負荷した系においてHBV複製のみならず、PI3K/Akt/mTOR経路も同様に亢進するが、それは負荷するHGFの濃度により変化することが判明した。すなわち、低濃度のHGF負荷では有意にHBV複製やPI3K/Akt/mTOR経路は亢進するが、一定濃度以上となるとその亢進が不十分となることが判明した(図4)。一般的に内皮細胞から分泌されるHGFの濃度は低濃度であることを考えると、HGFそのものはHBV感染肝細胞のHBV複製やPI3K/Akt/mTOR経路を亢進させるが、一定濃度以上になると、何らかのフィードバック機構がかかり、一律なHBV複製亢進は認められなくなることが示された。

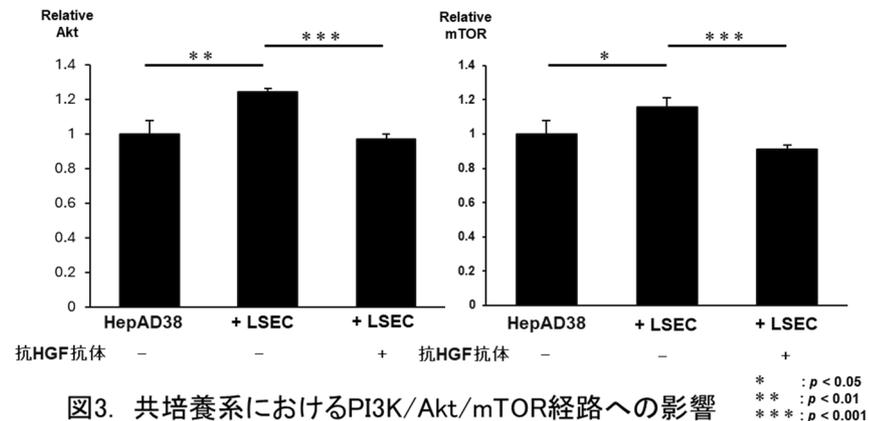


図3. 共培養系におけるPI3K/Akt/mTOR経路への影響

以上よりHBV感染肝微小環境で内皮細胞は、HGFを介して肝細胞内のHBV複製に影響を及ぼすことが本研究で示唆された。

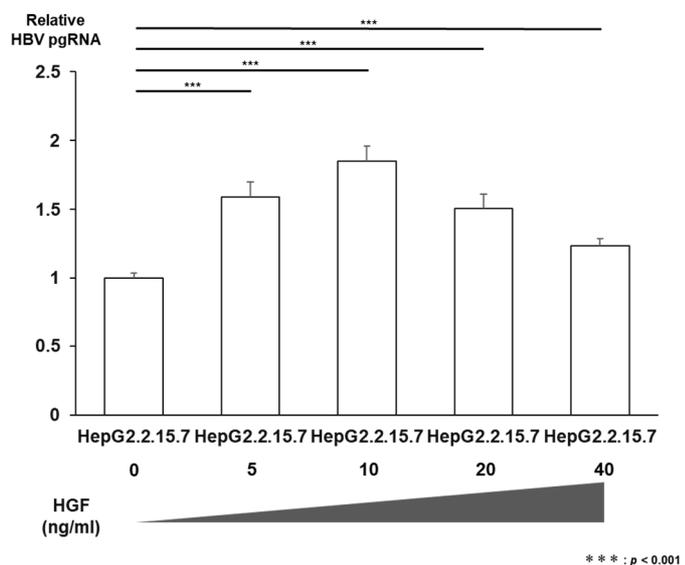


図4. HGF負荷濃度別HBV複製効率の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shimizu Ryogo, Murai Kazuhisa, Tanaka Kensuke, Sato Yuga, Takeda Naho, Nakasyo Saki, Shirasaki Takayoshi, Kawaguchi Kazunori, Shimakami Tetsuro, Nio Kouki, Nakaya Yuki, Kagiwada Harumi, Horimoto Katsuhisa, Mizokami Masashi, Kaneko Shuichi, Murata Kazumoto, Yamashita Taro, Honda Masao	4. 巻 8
2. 論文標題 Nucleos(t)ide analogs for hepatitis B virus infection differentially regulate the growth factor signaling in hepatocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 e0351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HC9.0000000000000351	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 Shirasaki Takayoshi, Murai Kazuhisa, Ishida Atsuya, Kuroki Kazuyuki, Kawaguchi Kazunori, Yamashita Taro, Kaneko Shuichi, Honda Masao	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional involvement of endothelial lipase in hepatitis B virus infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 e0206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HC9.0000000000000206	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 Orita Noriaki, Kawaguchi Kazunori, Honda Masao, Shimode Tetsuhiro, Hayakawa Nozomu, Terashima Takeshi, Komura Takuya, Nishikawa Masashi, Horii Rika, Nio Kouki, Shimakami Tetsuro, Takatori Hajime, Arai Kuniaki, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi, Kagaya Takashi, Yamashita Taro	4. 巻 674
2. 論文標題 Aldo-keto reductase family 1 member B10 is regulated by nucleos(t)ide analogues for chronic hepatitis B	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 133 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.06.093	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 Lyu Junyan, Okada Hikari, Sunagozaka Hajime, Kawaguchi Kazunori, Shimakami Tetsuro, Nio Kouki, Murai Kazuhisa, Shirasaki Takayoshi, Yoshida Mika, Arai Kuniaki, Yamashita Tatsuya, Tanaka Takuji, Harada Kenichi, Takamura Toshinari, Kaneko Shuichi, Yamashita Taro, Honda Masao	4. 巻 8
2. 論文標題 Potential utility of l-carnitine for preventing liver tumors derived from metabolic dysfunction-associated steatohepatitis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 e0425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HC9.0000000000000425	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 Shirasaki Takayoshi, Yamagoe Satoshi, Shimakami Tetsuro, Murai Kazuhisa, Kawaguchi Kazunori, Kaneko Shuichi, Matsumoto Kunio, Takamura Toshinari, Honda Masao	4. 巻 13
2. 論文標題 Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is an antiviral regulator acting through the proto-oncogene MET	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30879-3	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 Sumiyadorj Ariunaa, Murai Kazuhisa, Shimakami Tetsuro, Kuroki Kazuyuki, Nishikawa Tomoki, Kakuya Masaki, Yamada Atsumu, Wang Ying, Ishida Atsuya, Shirasaki Takayoshi, Kawase Shotaro, Li Ying Yi, Okada Hikari, Nio Kouki, Kawaguchi Kazunori, Honda Masao, Kaneko Shuichi	4. 巻 6
2. 論文標題 A single hepatitis B virus genome with a reporter allows the entire viral life cycle to be monitored in primary human hepatocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 2441 ~ 2454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.2018	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 Li Ying-Yi, Kuroki Kazuyuki, Shimakami Tetsuro, Murai Kazuhisa, Kawaguchi Kazunori, Yamashita Taro, Kaneko Shuichi, Honda Masao	4. 巻 15
2. 論文標題 Hepatitis B Virus Utilizes a Retrograde Trafficking Route via the Trans-Golgi Network to Avoid Lysosomal Degradation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 533 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.10.008	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 Hashimoto Shinichi, Shirasaki Takayoshi, Yamashita Taro, Iwabuchi Sadahiro, Suzuki Yutaka, Takamura Yuzuru, Ukita Yoshiaki, Deshimaru Shungo, Okayama Toshitugu, Ikeo Kazuho, Kuroki Kazuyuki, Kawaguchi Kazunori, Mizukoshi Eishiro, Matsushima Kouji, Honda Masao, Kaneko Shuichi	4. 巻 16
2. 論文標題 DOCK11 and DENND2A play pivotal roles in the maintenance of hepatitis B virus in host cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246313	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 Ishida Kosuke, Seki Akihiro, Kawaguchi Kazunori, Nasti Alessandro, Yamato Masatoshi, Inui Hiroyuki, Komura Takuya, Yamashita Taro, Arai Kuniaki, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Honda Masao, Wada Takashi, Harada Kenichi, Kaneko Shuichi, Sakai Yoshio	4. 巻 54
2. 論文標題 Restorative effect of adipose tissue-derived stem cells on impaired hepatocytes through Notch signaling in non-alcoholic steatohepatitis mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102425 ~ 102425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102425	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 下出哲弘, 川口和紀, 山下太郎
2. 発表標題 肝組織内の内皮細胞がもたらす肝細胞内のB型肝炎ウイルス複製の影響
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下出哲弘, 川口和紀, 本多政夫, 岡田光, 関晃裕, 丹尾幸樹, 島上哲朗, 酒井佳夫, 水腰英四郎, 金子周一, 山下太郎
2. 発表標題 HGFを介した内皮細胞によるHBV感染肝細胞のウイルス複製への影響
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下出 哲弘、川口 和紀、本多 政夫、岡田 光、村居 和寿、李 影奕、丹尾 幸樹、島上 哲朗、荒井 邦明、酒井 佳夫、山下 竜也、水腰 英四郎、金子 周一、黒木 和之、山下 太郎
2. 発表標題 肝類洞内皮細胞によるHBV感染肝細胞のAkt-mTOR経路を介したウイルス複製への影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuhiro Shimode, Kazunori Kawaguchi, Noriaki Orita, Kouki Nio, Hikari Okada, Kazuhisa Murai, Kouki Nio, Kuniaki Arai, Taro Yamashita, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Masao Honda
2. 発表標題 Liver sinusoidal endothelial cells affect hepatitis B virus replication in virus-infected hepatocytes via Akt-mTOR pathway
3. 学会等名 The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口和紀、下出哲弘、金子周一
2. 発表標題 肝非実質細胞がもたらすB型肝炎ウイルス感染肝細胞におけるシグナル伝達因子の変化
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuhiro Shimode, Kazunori Kawaguchi, Masao Honda, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Endothelial cells affect HBV replication in hepatocytes in a non-contact manner
3. 学会等名 The Liver Meeting 2021 (国際学会)
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
研究協力者	下出 哲弘 (Shimode Tetsuhiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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	本多 政夫 (Honda Masao)		

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