

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16042

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス・C型肝炎ウイルス共感染時における線維化進展加速機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of acceleration of fibrosis progression in coinfection with hepatitis B and C viruses

研究代表者

村井 一裕 (Murai, Kazuhiro)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：50867314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：初代培養ヒト肝細胞(PHH)でHBV RNA陽性・陰性細胞で発現が異なる遺伝子を5遺伝子を抽出した。C型肝炎ウイルス(HCV)感染ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織でHCV感染肝細胞とHCV非肝細胞で発現が変化する遺伝子や肝組織手術検体でHBV患者に認めるクラスターで発現が変化する遺伝子にはこの5遺伝子は含まれていなかった。核酸アナログ製剤内服下のB型慢性肝炎患者の患者血清からエクソソームを抽出し、プロテオーム解析を施行した。肝発癌症例と非肝発癌症例で発現が変化したタンパク質を抽出し、HBV感染PHHでHBV RNA陽性・陰性細胞で発現が変動した5遺伝子と重複する1遺伝子(CLU)を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルス(HBV)は核酸アナログ製剤により血中のHBV DNAは抑制され、肝発癌・線維化進展が抑制されるが一部の症例では肝発癌・線維化進展を認める。B型慢性肝炎症例における肝発癌・線維化進展の機序解明や新規予測マーカーの開発が重要である。本研究ではC型肝炎ウイルス共感染症例に着目して病態進展の機序解明や予測マーカーの発見を目指したが、B型肝炎モデル・C型肝炎モデルで共通した予測マーカーの同定はできなかった。しかしHBV感染初代培養ヒト肝細胞のRNA sequenceとB型慢性肝炎患者血清のプロテオーム解析で共通した候補遺伝子1つを同定し、今後の新規肝癌予測マーカー開発の一助となった。

研究成果の概要(英文)：Five genes differentially expressed in primary cultured human hepatocytes (PHH) between HBV RNA positive and negative cells were extracted. The five genes were not consistent with genes differentially expressed between HCV-infected and uninfected hepatocytes in liver tissue from hepatitis C virus (HCV)-infected humanized liver chimeric mice, or with genes whose expression was elevated in clusters observed in hepatectomy samples from HBV patients. Exosomes were extracted from sera of chronic hepatitis B patients treated with nucleos(t)ide analogs and proteomic analysis was performed. Proteins with altered expression in hepatocellular carcinoma and nonhepatocellular carcinoma cases were extracted, and one gene (CLU) was identified that overlaps with five genes with altered expression in HBV RNA positive and negative cells of HBV infected PHH.

研究分野：B型肝炎

キーワード：B型肝炎 single RNA sequence 核酸アナログ製剤 肝細胞癌 プロテオーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎患者の大半がC型肝炎ウイルス(HCV)単独感染であるが、B型肝炎ウイルス(HBV)高浸淫地域ではHBV・HCV共感染患者が一定の割合で存在し、全世界で320-1280万人存在すると推定されている(Liu CJ, et al. World J Gastroenterol. 2014)。HBV・HCV共感染患者では、HBV単独感染患者、HCV単独感染患者と比して、肝硬変や肝発癌に至る割合が高く、予後が悪いと報告されている(Liu CJ, et al. J Formos Med Assoc. 2005)が、その機序は未だ明らかでない。HBV・HCV共感染時において肝線維化進展が加速する機序を明らかにすることはHBV・HCVの線維化進展の機序解明につながる。HBV・HCV共感染患者ではHBV複製の抑制を認める。ヒト肝細胞キメラマウスから単離した初代培養ヒト肝細胞(PHH)やヒト肝細胞キメラマウスを用いたHCV感染モデルではRIG-I様ヘリカーゼ(RLH)経路が活性化しており、direct acting antivirals (DAA)治療によるHCV排除時のRLH経路活性化の減弱が、HBV/HCV共感染患者におけるHBV再活性化に寄与していることや初代培養ヒト肝細胞ではHBV、HCVが同一肝細胞に共感染することが報告されている(Murai K, et al. Sci Rep. 2020)。これらのことから同一肝細胞に共感染したHBV・HCVが相互作用することにより線維化進展が加速している可能性が想定されるが原因は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HBV・HCV共感染時において肝線維化進展が加速する機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1)HBV感染初代培養ヒト肝細胞での検討

ヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスより単離した初代培養ヒト肝細胞(PHH)2 LotにHBVを感染させた。HBV感染10日後に1 Lotにつきsingle cell 10000 cellsを回収し、single cell RNA sequenceを施行した。HBV RNA陽性細胞とHBV RNA陰性細胞で発現を比較し、有意に発現が異なる遺伝子を抽出し、さらに2 Lotで共通する遺伝子を抽出した。

(2)HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスでの検討

C型肝炎ウイルス(HCV)感染ヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスの肝組織を用いてsingle cell RNA sequenceを施行した。HCV感染11週後のマウス1匹を用いて解析を施行した。肝組織から擬似灌流法を用いてsingle cellを回収し、single cell RNA sequenceを施行した。回収した細胞をhAlb、HLA-A、TK(チミジンキナーゼ)の発現量からヒト肝細胞分画を同定した。さらにヒト肝細胞分画に対して擬似時系列解析を行いHCV感染肝細胞とHCV非感染細胞を区別し、2つの分画の遺伝子発現を比較した。

(3)HBV感染肝組織での検討

B型肝炎由来肝癌非癌部2例、アルコール性由来肝癌非癌部1例、非アルコール性肝炎由来肝癌非癌部2例の手術検体を用いてsingle cell fixed RNA sequenceを施行した。肝細胞のみを抽出し、クラスタリングを行い、疾患別に各クラスターへの細胞分布を検討した。

(4)HBV 感染患者血液検体での検討

B 型慢性肝炎患者 242 名の核酸アナログ製剤開始 1 年の HBV DNA が抑制された時点の患者血清からエクソソームを抽出し、プロテオーム解析を施行した。肝発癌症例と非肝発癌症例で有意に発現が変化したタンパク質を抽出した。

4 . 研究成果

ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスより単離した初代培養ヒト肝細胞(PHH)2Lot に対して B 型肝炎ウイルス(HBV)を感染させた。HBV 感染 10 日後に 1Lot につき 10000 cells を回収し、single cell RNA sequence を施行した。HBV RNA 陽性細胞比率はそれぞれ 63.4%、67.0%であった。HBV RNA 陽性細胞と HBV RNA 陰性細胞で有意に発現が異なる遺伝子をそれぞれ 342 遺伝子、30 遺伝子抽出し、2 Lot で共通する遺伝子として 5 遺伝子を抽出した。次に C 型肝炎ウイルス(HCV)感染ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスの肝組織を用いて single cell RNA sequence を施行した。HCV 感染 11 週後のマウス 1 匹を用いて解析を施行した。肝組織から擬似灌流法を用いて 11380 cells を回収し、single cell RNA sequence を施行した。回収した細胞は 3 つのクラスターに区別されたが hAIb、HLA-A、TK(チミジンキナーゼ)の発現量からヒト肝細胞分画を同定することが可能であった。さらにヒト肝細胞を用いて擬似時系列解析を行うと HCV 感染肝細胞と HCV 非肝細胞を区別することができ、2 つの分画の遺伝子発現を比較すると MX1、IIFIT1、ISG15 といった細胞内自然免疫の発現に有意な差を認めたが HBV 感染 PHH で抽出した 5 遺伝子は含まれていなかった。次に B 型肝炎由来肝癌非癌部 2 例、アルコール性由来肝癌非癌部 1 例、非アルコール性肝炎由来肝癌非癌部 2 例の手術検体を用いて single cell fixed RNA sequence を施行した。肝細胞のみを抽出し、クラスタリングを施行したところ、B 型肝炎由来肝癌非癌部に限定して細胞比率が高い 2 つのクラスターを同定した。しかし 2 つのクラスターで有意に発現が変化した遺伝子に HBV 感染 PHH で抽出した 5 遺伝子は含まれていなかった。最後に核酸アナログ製剤内服下の B 型慢性肝炎患者 242 名の患者血清からエクソソームを抽出し、プロテオーム解析を施行した。肝発癌症例と非肝発癌症例で有意に発現が変化したタンパク質 202 個を抽出した。HBV 感染初代培養ヒト肝細胞を用いた single cell RNA sequence で HBV RNA 陽性細胞と HBV RNA 陰性細胞で発現が有意に変動した 5 遺伝子と重複する 1 遺伝子(CLU)を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhiro Murai, Hayato Hikita, Kumiko Shirai, Hiroshi Suemizu, Kunimaro Furuta, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Single cell RNA sequence using the liver tissue derived from humanized liver chimeric mice infected hepatitis C virus
3. 学会等名 The 6th International Workshop on Humanized Mice (IWHM6) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------