

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09410

研究課題名（和文）新規高感度システムを用いたHBs抗原とその免疫応答の解析

研究課題名（英文）Analysis of HBsAg and its immune response with novel high sensitivity method

研究代表者

田尻 和人（Tajiri, Kazuto）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：30512165

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：Small-HBsAgの細胞外領域を認識するモノクローナル抗体、middle-HBsAgの糖鎖修飾部を特異的に認識するモノクローナル抗体、large-HBsAgを認識するモノクローナル抗体を用いて、様々な病態、HBsAg発現量のHBV感染患者において検討を行ったところlarge-HBsAgに認識されるHBsAgがHBV-DNA、HBsAgの発現量が低下しても存在していることが示された。これはlarge-HBsAgがHBVの感染において重要な役割を果たしていることとも関連が示唆されHBsAgの質的解析がHBV感染症の病態を検討する上で重要な意味を果たしていることを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBV感染症においてはHBV-DNAの制御が可能となったが、HBVにより引き起こされる病態は持続するため、真のHBV感染症のコントロールにはHBsAgの低下が重要とされてきた。しかし、HBsAgの現在の測定系はポリクローナル抗体を用いたおおまかな量の測定しかできていない。我々のモノクローナル抗体を用いたHBsAgの測定はHBsAgの質的解析を行うことができ、HBV感染症の病態をより反映したHBsAg測定系となりうる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated serum of patients with HBV infection by monoclonal antibodies for small-HBsAg, glycosylated middle-HBsAg and large-HBsAg, those were obtained our novel system that can effectively detect antigen-specific cells. As the results, large-HBsAg was found independent of titer of HBV-DNA or HBsAg which is recognized with polyclonal antibody and is commercially available. Our results indicate that large HBsAg has a specific role in HBsAg biology. Our novel HBsAg detection system might provide a new insight in the study of HBV infection.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HBV感染症 HBs抗原

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)感染保有者は、我が国では約140万人(世界では約4億人のHBV保有者)があり、その約1割において病変が進行して肝硬変・肝細胞癌に至る。現在、その感染予防に際してはHBVのエンベロープ蛋白であるHBs抗原を用いたHBワクチンが用いられ、一定の効果が得られている。しかし、HBワクチンには、約10%の患者にHBワクチン不応例が存在し、HBワクチン接種後も変異ウイルスによるワクチンエスケープも知られている。WHOは新生児全員にワクチンを接種するユニバーサルワクチン(UV)を推奨しており、世界に先駆けてUVを導入したHBV感染国である台湾は、新規感染率の減少や肝細胞癌(HCC)の減少など大きな成果を報告してきた。しかし最新の報告ではUV後に水平感染がみられることが報告されるようになっており、HBワクチンの限定的な効果が問題となってきた。その理由としてはHBVワクチン接種後の時間経過による免疫応答の減弱、HBVエスケープ変異に加え、HBV糖鎖修飾の影響が考えられており、それらへの対応が喫緊の課題である。

またHBs抗原はHBV感染時に感染細胞から血中に放出され、HBV感染の指標となる。核酸アナログ治療が広く行われる現状では、血中HBV-DNAは減少するが、HBs抗原が高値となる患者も多くみられ、血中HBV-DNAのみならず血中HBs抗原を消失させることがHBV感染症治療の目標とされている。しかし、現在のHBs抗原測定は既存のHBs抗体を用いたサンドイッチEILSAが行われており、アミノ酸変異、糖鎖修飾されたHBs抗原を十分に認識できていない可能性があり、その意義については更なる検討が必要である。

我々はこれまでに高感度のモノクローナル抗体が取得可能な細胞マイクロアレイシステムを開発し、その有用性を報告してきた。そのシステムを用いてHBVワクチン(ビームゲン)を接種した健常人ボランティア末梢血リンパ球から、高い親和性・中和能を有する抗HBVモノクローナル抗体を取得している。また、厚生労働省科学研究費補助金・B型肝炎創薬実用化等研究事業研究班にH25より分担参加し、糖鎖修飾されたHBs抗原に対するモノクローナル抗体なども取得している。

今回の検討ではHBV患者血清を高感度モノクローナル抗体を用いて解析し、HBV感染症の種々の病態における、HBs抗原の意義を明らかにし、HBV感染症の進行制御の基盤を構築する。

2. 研究の目的

本研究ではB型肝炎ウイルス(HBV)の表面抗原であるHBs抗原のHBV感染症における意義を明らかにすることを目的とする。HBs抗原はHBV粒子の最外層の膜蛋白であるが、HBVの複製とともに宿主細胞より放出されるため、HBV感染・複製の指標として広く臨床応用されている。しかし、アミノ酸変異、糖鎖修飾などによる現行のHBs抗原検出系の影響は検討されておらず、現在測定されているHBs抗原の真の意義は不明確である。アミノ酸変異、糖鎖修飾などの影響を受けない新規HBs抗原測定法を確立し、同方法および我々の開発した高感度の抗原特異的免疫細胞解析システムを用いてHBVキャリア、慢性B型肝炎、B型肝炎硬変、肝細胞癌患者検体におけるHBs抗原とその状態、HBs抗原に対する免疫応答を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではB型肝炎ウイルス(HBV)の表面抗原であるHBs抗原のHBV感染症における意義を明らかにすることを目的とする。HBs抗原はHBV粒子の最外層の膜蛋白であるが、HBVの複製とともに宿主細胞より放出されるため、HBV感染・複製の指標として広く臨床応用されている。しかし、アミノ酸変異、糖鎖修飾などによる現行のHBs抗原検出系の影響は検討されておらず、現在測定されているHBs抗原の真の意義は不明確である。アミノ酸変異、糖鎖修飾などの影響を受けない新規HBs抗原測定法を確立し、同方法および我々の開発した高感度の抗原特異的免疫細胞解析システムを用いてHBVキャリア、慢性B型肝炎、B型肝炎硬変、肝細胞癌患者検体におけるHBs抗原とその状態、HBs抗原に対する免疫応答を明らかにする。

病態の変化を反映するモノクローナル抗体、およびその組み合わせを検討し、その結果を用いて多数の患者検体での検討をすすめる。多数の症例での検討を行うことでHBs抗原の量的質的变化がHBV感染症をどう反映しているのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) small-HBs 抗原中の異なるエピトープ、Middle-HBs 抗原の preS2 領域、Large-HBs 抗原の preS1 領域、preS2 の糖鎖修飾蛋白を認識するモノクローナル抗体遺伝子 を、我々がこれまでに開発した抗原特異的細胞検出システムを用いて取得し、それぞれのモノクローナル抗体を大量調整した。

(2) 当大学倫理委員会承認の上、HBV-DNA 高値の未治療患者、核酸アナログ治療を行った患者、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌など病期の異なる患者の血清の収集を行った。核酸アナログ治療前後の患者血清の収集も開始することとした。

(3) HBs 抗原と進行肝細胞癌治療との関連につき論文発表した。

(4) 定量的な新規 HB s 抗原測定法の開発に向け、 により調整したモノクロ抗体を用いた ELISA 法およびウェスタンブロット法の開発をすすめた。血清からの検出測定においては存在する HB s 抗原量とバックグラウンドノイズにより、その感度が問題となったため、条件検討を進めた。

(5) その結果、HBV 感染患者においては血清中の HB s Ag 量、HBV-DNA 量とは一部独立して、上記のモノクローナル抗体で認識される HB s Ag が存在していた。HBsAg 上の蛋白量としてはこれまでの知見では Small-HB s Ag が大部分を占め、Middle-,Large-は一部しか存在していないとされていた。しかし我々の検討では Large-HB s Ag に認識される HB s Ag が HBV-DNA,HB s Ag の発現量が低下しても存在がしていることが示され、Large-HBsAg が HBV 感染において重要な役割を果たしていることを示唆された。これは Large-HB s Ag が HBV の感染においても重要な役割を果たしていることとも関連が示された。

これらの結果は、臨床現場でも広く使用されており HBV 感染症の治療目標ともなっている従来の HB s Ag 測定に代わり、より病態を反映した HB s A g 測定が可能となることも考えられ、HBV 感染症の病態解明の重要な手がかりとなる研究成果であると考えられた。現在追加データ収集と論文作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Tajiri K, Futsukaichi Y, Kobayashi S, Nagata K, Yasumura S, Takahara T, Minemura M, Yasuda I.	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficacy of On-Demand Intrahepatic Arterial Therapy in Combination With Sorafenib for Advanced Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Onco Targets Ther	6. 最初と最後の頁 2205-2214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/OTT.S191741. eCollection 2019.	査読の有無 有
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 田尻和人	4. 巻 34
2. 論文標題 B型肝炎ワクチンの現状と今後の課題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 69-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 田尻和人、二日市有花、安田一朗	4. 巻 56
2. 論文標題 肝機能障害-B型慢性肝炎	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 90-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 田尻和人	4. 巻 44
2. 論文標題 B型肝炎ワクチンの現状と今後の課題	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 350-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 田尻和人
2．発表標題 進行肝細胞癌患者の予後改善を目指したTKI治療の最適化のためのソラフェニブ併用治療の検討
3．学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4．発表年 2019年

1．発表者名 田尻和人
2．発表標題 臨床試験適応からみた進行肝細胞癌に対する一次全身化学療法の治療成績の検討
3．学会等名 JDDW2019
4．発表年 2019年

1．発表者名 田尻和人、小林才人、河合健吾、峯村正実、安村敏 高原照美、杉山敏郎
2．発表標題 進行肝細胞癌に対するソラフェニブ併用療法の意義
3．学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4．発表年 2017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
---------	---------