

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08479

研究課題名（和文）B型肝炎再活性化や発癌の原因となるエンベロープ蛋白質追加糖鎖修飾の分布と機能解析

研究課題名（英文）Analysis of additional glycosylation sites in the envelope protein of Hepatitis B Virus associated with HBV reactivation and hepatocellular carcinogenesis

研究代表者

伊藤 清顕 (Kiyooki, Ito)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：50551420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HBVエンベロープ蛋白質上の "additional glycosylation"（ここでは追加糖鎖修飾とする）がHBV再活性化や肝発癌症例において高頻度に認められることが報告された。我々はHBV再活性化症例におけるエンベロープ蛋白質の追加糖鎖修飾変異の発現頻度を次世代シーケンサー（NGS）を使用して調査した。その結果、約17%程度の再活性化症例において追加糖鎖修飾変異を認めた。HBVの追加糖鎖修飾の原因となる遺伝子変異をin vitro感染モデルに導入し、この変異がHBVの増殖やウイルス蛋白質発現および免疫原性に与える影響を解析し、本遺伝子変異とHBV再活性化および発癌との関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVの再活性化はHBVキャリアや国民のおよそ20-25%にもなるHBV既往感染者において免疫抑制や化学療法により発生する可能性があり、一度再活性化が発症すると重症化することが多くその対策は極めて重要である。また、HBVによる発癌はC型肝炎ウイルスによるものと比較して未だ制御には至っていない。本研究において、エンベロープ蛋白質追加糖鎖修飾変異のHBV再活性化症例における発現頻度を明らかにした。また、HBV in vitro感染モデルにおいてHBV再活性化や肝発癌に関連するメカニズムを明らかにした。本研究結果はHBV再活性化や発癌対策を講じるうえで極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：There have been reported that "additional glycosylation" on the HBV envelope protein is frequently observed in cases of HBV reactivation and hepatocellular carcinogenesis. In this research project, we have investigated the frequency of occurrence of genomic mutations which create additional glycosylation site in envelope proteins in HBV reactivation cases using the next-generation sequencer (NGS) in Japan, and found that approximately 17% of HBV reactivation cases. We have introduced artificial genomic mutations that create additional glycosylation site into HBV in vitro infectious model, and analyzed the effects of the artificial genomic mutations on HBV proliferation, viral protein expression, and immunogenicity to clarify the relationship with HBV reactivation and hepatocellular carcinogenesis.

研究分野：肝臓

キーワード：糖鎖修飾変異

### 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制や化学療法によるB型肝炎ウイルス (HBV) の再活性化は、HBVキャリアおよび既往感染者に発症する。HBV再活性化はいったん発症すると重症化しやすく、重篤な基礎疾患を有することが多いことから死亡率が高い。日本人におけるHBVキャリアの数は人口のおよそ1% (100~130万人) 存在し、既往感染者は人口のおよそ20-25% (2,500-3,000万人) にものぼると推定され、多くの人々がHBV再活性化のリスクを有しその対策は極めて重要である。また、肝臓癌による死亡者数は年間およそ3万人にのぼり、その10~20%はHBVが原因であるとされており、この割合はここ30年程度変化していない。これはC型肝炎ウイルス (HCV) による肝臓癌の割合が治療や感染対策の改善により低下傾向にあるのと対照的であり、その治療や感染対策が十分ではないことを反映しているものと考えられる。

このようなHBVによる再活性化と肝発癌という極めて重要な二つの病態に対して、最近HBVのエンベロープ蛋白質内 major hydrophilic loop (MHL) 上の "additional glycosylation" (ここでは「追加糖鎖修飾」とする) が関与しているとの報告が相次いでいる (Yu et al. J Hepatol 2014, Salpini et al. Hepatology 2015, Chen et al. PLoS One 2016, Qiao et al. Oncotarget 2017)。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでにHBVのin vitro感染モデルを用いた基礎研究により、エンベロープ蛋白質MHL上146番目のN結合型糖鎖がHBVウイルス粒子の分泌に必須であることを明らかにした。また、エンベロープ蛋白質MHL上の免疫エスケープ変異により低下したHBVの分泌は、"additional glycosylation" (追加糖鎖修飾) により回復することを報告してきた (Ito K et al. J Virol. 2010)。最近になりHBs抗原およびHBs抗体同時発現例 (J Hepatol 2014)、HBV再活性化症例 (Hepatology 2015) や発癌症例 (Oncotarget 2017) において血液中のHBVを解析したところ、追加糖鎖修飾が高頻度に認められるとの報告が相次いでいる。そこで、私たちはこれまでの自分達の基礎研究をさらに進めることにより、追加糖鎖修飾がウイルス学的にどのような現象を引き起こすか、また細胞内にどのような変化をもたらすかを明らかにし、この糖鎖の変化がHBVの再活性化や発癌にどのように関与しているかを解明しその対策の基礎とした。

### 3. 研究の方法

私たちはこれまでにB型肝炎ウイルスの遺伝子変異解析 (糖鎖修飾を含む) 研究に関して同意を取得した保存血清を多数収集してきた。また、申請者が代表研究者であった科学研究費助成「B型肝炎における遺伝子型分布の変遷および分子生物学的検討 (基盤研究C)」において、倫理委員会で承認されたウイルス側の遺伝子変異解析 (糖鎖修飾を含む) の同意を取得した多施設でのB型肝炎症例の保存血清を多数収集してきた。その上でHBV陽性の保存血清の中で再活性化症例や発癌症例を中心にHBVのエンベロープ蛋白質MHL上の追加糖鎖修飾変異の発現頻度を解析した。凍結保存血清を融解しDNA抽出キットを用いてDNAを採取し、direct sequencingを行った。一部の症例に関しては次世代シーケンサー (NGS) を用いてマイナークローンに対応した解析を行った。

基礎研究として免疫エスケープ変異と追加糖鎖修飾変異をエンベロープ蛋白質MHL内に挿入し、HBV in vitro 感染モデルを使用することによりHBs抗原やHBV DNAの分泌量および肝細胞内へのウイルス蛋白質の蓄積等の解析を行った。対象とする変異を私たちの所有する genotype C 由来の1.24倍長のHBV construct に遺伝子操作により挿入し (遺伝子組み換え実験大臣承認済み)、肝臓由来のHuh7細胞やHepG2細胞を用いたin vitro感染モデルを用いて分泌されるHBV DNAやHBs抗原を測定し、HBV再活性化のウイルス側の発生機序を解明した。HBV construct に関しては、HBVはエンベロープ領域とポリメラーゼ領域がoverlapしているため、ポリメラーゼ領域への変異の影響を避けるために1.24倍長のHBV construct にstopコドン挿入したエンベロープ蛋白質欠損 replication construct と0.7倍長のエンベロープ蛋白質発現 construct を共感染させる complimentary assay を用い、変異を0.7倍長 construct のみに導入することによりエンベロープ蛋白質への影響のみを観察した。HBVによる肝発癌機構としてこれまで報告されているHBs抗原の肝細胞内への異常蓄積や小胞体ストレスを解析した。

#### 4. 研究成果

我々はこれまでの研究により HBV エンベロープ蛋白質 MHL 内 146 番目の N 結合型糖鎖が HBV ウイルス粒子の分泌に必須であることを明らかにした。また、本研究によりエンベロープ蛋白質 MHL 内の追加糖鎖修飾変異は、免疫エスケープ変異により低下した HBV の分泌を回復することを確認した。これまでの海外の論文や Hepatitis Virus Database を用いた検索では、エンベロープ蛋白質上の追加糖鎖修飾変異はこれまでに報告してきた M133T 変異のみではなく、T115N 変異や T123N 変異そして”NTS”の 3 アミノ酸が挿入されるケース等様々な variation が存在することが判明した。NGS を使用した解析により、HBV 再活性化症例において追加糖鎖修飾変異をおよそ 17% 程度に認めることが判明した。

本研究において、エンベロープ蛋白質の免疫エスケープ変異(T126I、G145R 変異など)により HBs 抗原の免疫原性が変化し、HBs 抗原陰性となることを明らかにした。このような免疫エスケープ変異単独では、通常 HBV の分泌量が低下するため臨床上問題となることは少ない。しかし、これらの免疫エスケープ変異に追加糖鎖修飾変異(T115N、T123N、M133T 変異等)が加わることによりウイルスの分泌量が回復し、HBs 抗原陰性+HBV DNA のいわゆる潜伏感染が成立し、再活性化の準備状況になるということを明らかにした。また、我々はデータベースを使用して検索した結果、この追加糖鎖修飾変異が高率に肝癌症例にも認められることを突き止めた。これまでも HBV の潜伏感染が肝癌発生に関連するという報告もあり、この追加糖鎖修飾変異を研究することは潜伏感染が肝発癌に与える影響の分子メカニズムを解明し得る可能性があると考えられた。さらに、肝発癌機構としてこれまでに報告されている HBs 抗原の肝細胞内への異常蓄積や小胞体ストレスを解析したが、本追加糖鎖修飾変異において両者への影響は認められなかった。このため、血管新生や細胞増殖による腫瘍の微小環境への変化が発癌を惹起する可能性が示唆され、現在研究を継続しているところである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 Ito Kiyooki, Okumura Akinori, Takeuchi Junko S., Watashi Koichi, Inoue Rieko, Yamauchi Taeko, Sakamoto Kazumasa, Yamashita Yukiko, Iguchi Yusuke, Une Mizuho, Wakita Takaji, Umezawa Kazuo, Yoneda Masashi	4. 巻 74
2. 論文標題 Dual Agonist of Farnesoid X Receptor and Takeda G Protein Coupled Receptor 5 Inhibits Hepatitis B Virus Infection <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31712	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 Ito Kiyooki	4. 巻 51
2. 論文標題 Mutations in the envelope protein associated with hepatitis B virus reactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HepatoI Research	6. 最初と最後の頁 151-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13619	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 Ito Kiyooki, Angata Kiyohiko, Kuno Atsushi, Okumura Akinori, Sakamoto Kazumasa, Inoue Rieko, Morita Naoko, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Tanaka Yasuhito, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Yoneda Masashi, Narimatsu Hisashi	4. 巻 50
2. 論文標題 Screening siRNAs against host glycosylation pathways to develop novel antiviral agents against hepatitis B virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1128 ~ 1140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13552	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 Matsumoto A, Nishiguchi S, Enomoto H, Tanaka Y, Shinkai N, Okuse C, Kang JH, Matsui T, Miyase S, Yatsunami H, Nagaoka S, Kanda T, Enomoto M, Yamada R, Hiramatsu N, Saito S, Takaguchi K, Ito K, Masaki T, Morihara D, Tsuge M, Chayama K, Ikeda F, Kagawa T, Kondo Y, Murata K, Tanaka E	4. 巻 55
2. 論文標題 Pilot study of tenofovir disoproxil fumarate and pegylated interferon-alpha 2a add-on therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 977 ~ 989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01707-6	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 Sakamoto Kazumasa, Umemura Takeji, Ito Kiyooki, Okumura Akinori, Joshita Satoru, Ota Masao, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Yoneda Masashi, Tanaka Eiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Virological Factors Associated with the Occurrence of HBV Reactivation in Patients with Resolved HBV Infection Analyzed through Ultradeep Sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 400-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiz478	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 伊藤清顕、梅村武司、坂本和賢、奥村彰規、田中榮司、米田政志	4. 巻 61
2. 論文標題 B型肝炎再活性化発症に関連するウイルス側因子	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 肝臓	6. 最初と最後の頁 237-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2957/kanzo.61.237	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 伊藤清顕	4. 巻 58
2. 論文標題 ステロイドや免疫抑制薬使用中のde novo B型肝炎予防と発症後の対処	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 medicina	6. 最初と最後の頁 410-414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1402227463.	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 Ito Kiyoaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Difference between genotypes B and C in the decline and disappearance of hepatitis B surface antigen: Toward an era of direct acting antiviral agents for hepatitis B virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1253 ~ 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13456	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥村彰規, 伊藤清顕, 米田政志
2. 発表標題 胆汁酸誘導体ライブラリを使ったB型肝炎ウイルスに対する創薬研究
3. 学会等名 第6回Gastro-PLUS
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村彰規, 伊藤清顕, 米田政志
2. 発表標題 胆汁酸誘導体ライブラリによる新規抗HBV剤の開発
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村彰規, 伊藤清顕, 山下ユキコ, 井口裕介, 武井一, 入野博, 宇根瑞穂, 米田政志
2. 発表標題 胆汁酸誘導体によるB型肝炎ウイルスに対する新規治療薬開発
3. 学会等名 第42回胆汁酸研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村彰規, 伊藤清顕, 米田政志
2. 発表標題 HBVに作用して侵入阻害効果を持つ胆汁酸誘導体によるHBV侵入阻害剤の開発
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyooki Ito, Akinori Okumura, Sayaka Nishimura, Miho Jin, Masashi Iwamoto, Koichi Watashi, Takaji Wakita, Masashi Yoneda
2. 発表標題 Inhibition of hepatitis B virus infection by bile acid derivatives
3. 学会等名 The Liver Meeting 2021 (AASLD)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyooki Ito, Akinori Okumura, Koichi Watashi, Masashi Yoneda
2. 発表標題 Bile acid derivatives inhibit hepatitis B virus infection in vitro and in vivo
3. 学会等名 The Digital International Liver Congress 2020:EASL
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村彰規, 伊藤清顕, 米田政志
2. 発表標題 HBV侵入阻害を標的とした胆汁酸誘導体による新規抗HBV剤の開発
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤清顕, 角田圭雄, 米田政志
2. 発表標題 M2BPGi 値とFIB-4 index のコンビネーションによる効率的なNASH拾い上げ
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito K, Okumura A, Takeuchi J, Watashi K, Sakamoto K, Wakita T, Yoneda M
2. 発表標題 Bile acid derivatives inhibit hepatitis B virus infection in vitro and in vivo
3. 学会等名 The Digital International Liver Congress
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤清顕、奥村彰規、米田政志
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス感染症の創薬研究から臨床応用へ
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 伊藤清顕
2. 発表標題 B型肝炎における遺伝子型分布の変遷および分子生物学的検討
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Ito K, Okumura A, Takeuchi J, Watashi K, Sakamoto K, Wakita T, Yoneda M
2. 発表標題 Dual Agonist of Farnesoid X Receptor and G Protein-coupled Receptor TGR5 Inhibits Hepatitis B Virus Infection
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito K, Okumura A, Takeuchi J, Watashi K, Sakamoto K, Wakita T, Yoneda M
2. 発表標題 FXR/TGR5 dual agonist inhibits hepatitis B virus infection in vitro and in vivo
3. 学会等名 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤清顕、梅村武司、田中榮司
2. 発表標題 胆汁酸誘導体を用いたB型肝炎ウイルス制御
3. 学会等名 第27回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤清顕、奥村彰規、米田政志
2. 発表標題 胆汁酸誘導体を用いた新規抗HBV剤の開発
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤清顕、梅村武司、米田政志
2. 発表標題 In vitro感染モデルを用いたde novo B型肝炎発症に関連するウイルス側因子の検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 B型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス効果を有する胆汁酸誘導体	発明者 学校法人愛知医科大学、 学校法人常翔学園	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-072888	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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