

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08369

研究課題名(和文) C型肝炎のDAA治療によるSVR達成後の肝病態形成に関わる基礎的研究

研究課題名(英文) Research on hepatic pathogenesis after achieving SVR by DAA treatment for hepatitis C

研究代表者

脇田 隆字 (Wakita, Takaji)

国立感染症研究所・所長・所長

研究者番号：40280789

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)：HCVは持続感染し慢性肝障害を引き起こす。線維化が進行すると、肝小葉が再構築され、血液循環動態の変化も関与する。SVR達成された後も、肝障害が持続することがある。本研究では感染細胞の小器官構造や遺伝子発現変化に着目した。培養細胞ベースでのHCV未感染細胞、感染細胞、感染後排除細胞を構築し、HCV感染からHCV排除が観察できた。これらの細胞においては可逆的、不可逆的に変化する遺伝子があった。これらの細胞での解析をさらに進め、ヒト肝臓キメラマウスや患者検体での解析を行い共通して可逆的、不可逆的に変化する遺伝子を明らかにし、肝障害に関連する宿主マーカーを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCVは抗ウイルス療法により95%以上のウイルス排除率が達成されている。しかし、DAAによるSVR達成後に一部の症例ではウイルス排除後の肝障害の持続や、肝発癌が問題となっている。本研究ではウイルス感染およびウイルス排除に伴う肝細胞および肝組織変化に着目し、ウイルス感染による肝臓の可逆的および不可逆的变化を解析する。ウイルス排除後も回復しない不可逆的变化とその原因となる宿主因子について解明できれば、SVR達成後の肝障害および肝発がん予防に資する検査法および治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：HCV persistently infects hepatocytes and causes chronic liver damage. As fibrosis progresses, liver lobules are remodeled, and the hemodynamics of the liver also change. Therefore, liver damage caused by persistent HCV infection involves not only viral infection and host immune response, but also changes due to tissue remodeling of the liver. Therefore, even after achieving SVR, liver injury may continue and lead to hepatocarcinogenesis. In this study, we focused on the organelle structure and gene expression changes of infected cells. We constructed HCV-uninfected cells, infected cells, and post-infection-excluded cells on a culture cell basis, and observed HCV elimination from HCV infection. There were genes that changed reversibly and irreversibly in these cells. We will further analyze these cells, analyze human liver chimeric mice and patient specimens, clarify genes that are reversibly and irreversibly changed in common, and clarify host markers related to liver damage.

研究分野：肝炎ウイルス

キーワード：C型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

HCV は 1989 年に米国カイロン社の研究グループにより発見された。HCV 感染の治療は、インターフェロンを中心とした治療が長らく主体であり、その治療効果も限定的であった。しかし、1999 年にドイツのグループよりレプリコンが報告され、2005 年には申請者のグループよりウイルス培養系が発表され、DAA の開発に至った。現在では内服薬のみの抗ウイルス療法により 95%以上のウイルス排除率が達成されている。DAA 治療によるウイルス排除の目的は HCV 持続感染による慢性肝疾患と全身状態の改善と、肝発がん予防である。しかし、DAA による SVR 達成後には肝発がんは明らかに減少するが、一部の症例ではウイルス排除後の肝障害の持続や、肝発がんが問題となっている。ウイルス持続感染による肝細胞の遺伝子発現変化や肝組織障害のなかにウイルス排除後も不可逆的に持続するものがあれば、DAA 治療によるウイルス排除のみでは完全に回復しない可能性がある。DAA 治療前から検出困難な微小肝がんが存在し、DAA 治療による SVR 達成後に肝がんと診断される場合は SVR 後早期に発症すると考えられるが、実際には SVR 達成後長期間にわたり肝発がんする症例が存在する。また、SVR 達成後に肝障害が持続する症例も報告されている。従って、ウイルス排除した肝細胞に不可逆的な遺伝子変化が存在する、あるいはウイルス排除後も発がんに関与する肝臓内の環境変化が持続している可能性がある。そこで本研究ではウイルス感染およびウイルス排除に伴う肝細胞および肝組織変化に着目し、ウイルス感染による肝臓の可逆的および不可逆的变化を解析する。ウイルス排除後も回復しない不可逆的变化とその原因となる宿主因子について解明できれば、SVR 達成後の肝障害および肝発がん予防に資する検査法および治療法開発につながることを期待される。

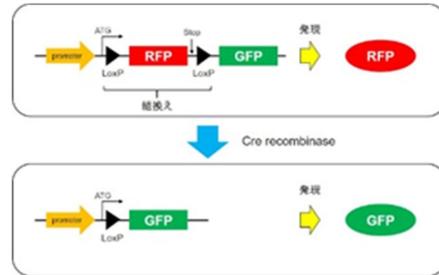
2. 研究の目的

HCV 感染は肝臓に持続感染して慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌といった慢性肝障害を引き起こす。慢性肝障害は肝細胞のアポトーシス、リンパ球浸潤、脂肪肝などを伴う。さらに線維化が進行すると肝小葉が再構築され、肝臓の血液循環動態も変化する。従って、HCV 持続感染による肝障害はウイルス感染そのもの、および宿主の免疫反応だけによるものではなく、肝臓の組織再構築による変化も関与することが考えられる。従って、DAA 治療によりウイルス排除が達成された後も、引き続き肝障害が持続し、肝発がんに至ることもあり得る。

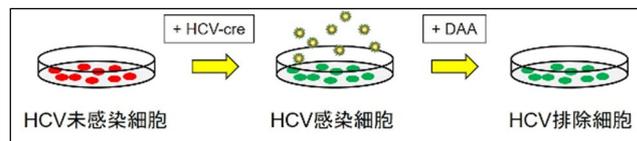
本研究ではウイルス培養モデル、ヒト肝細胞キメラマウス、HCV キャリアおよび SVR 患者の肝生検サンプルにおけるウイルス感染による細胞小器官構造変化、遺伝子発現変化に着目して解析する。SVR 後の肝発がんや持続する肝障害の発生機構および関連する宿主因子を解明することが目的である。

3. 研究の方法

ウイルス細胞培養モデル：Cre-loxP によるスイッチング発現系を利用して、未感染細胞、感染細胞、DAA によるウイルス排除細胞を完全に分離することが可能な実験系を構築した。この実験系により、ウイルス感染による細胞小器官構造変化、遺伝子発現変化を解析可能となる。また、細胞培養時に酸素分圧濃度を変化させることにより、正常肝臓の門脈優位な低酸素状態から慢性肝障害における動脈優位な高酸素状態における細胞変化を解析する。



・ファクスにより未感染細胞、ウイルス感染細胞、ウイルス排除後細胞の解析とソーティングをおこない、完全に分離する

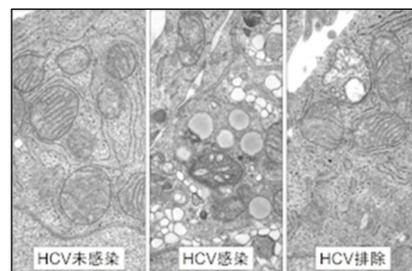


- ・未感染細胞、ウイルス感染細胞、ウイルス排除後細胞から RNA、ゲノム DNA、タンパク、脂質を抽出して網羅的に解析する
- ・未感染細胞、ウイルス感染細胞、ウイルス排除後細胞を電子顕微鏡で観察して細胞内小器官の構造変化を解析する
- ・高酸素分圧下、低酸素分圧下で培養したウイルス感染細胞、ウイルス排除後細胞の遺伝子変化や細胞内小器官の構造を解析する

4 . 研究成果

Cre/loxP 組換えにより RFP 遺伝子発現から GFP 遺伝子発現に変化するレポーターカセット遺伝子を Huh751 細胞に遺伝子導入した。選択培養とソーティングを行い、レポーター細胞である Huh751-RG を樹立した。さらに Cre を発現する組み換え HCV(HCV-Cre)を構築した。HCV-Cre を Huh751-RG 細胞に感染することにより遺伝子組み換えがおり、GFP 発現細胞を確認できた。その後、Huh751-RG 細胞のクローン化を行い、RFP を高発現する細胞を 11 クローン単離した。この RG クローンに HCV-Cre を感染させると、様々な割合で GFP 発現細胞が観察された。感染後すべての細胞において RFP から GFP への組換えが起こるわけではなかった。HCV 感染後に継代培養すると、2 週間程度をピークに GFP 陽性細胞の割合は減少した。各 RG クローンの感染細胞について HCV 産生のピークが過ぎた 30 日以降の GFP 陽性細胞をソーティングで分離して培養を継続することにより、HCV が持続感染する HCV 感染細胞を得た。さらに、HCV 感染細胞を抗ウイルス薬で 3 週間処理して HCV を排除した。各 RG クローンの HCV 排除細胞からは薬物処理停止後 2 週間以上経過しても培養上清や細胞内で HCV は検出されなかった。以上の実験により、HCV 未感染細胞、HCV 感染細胞、HCV 感染後排除細胞を樹立できた。

クローン化した RG 細胞のうち感染後の HCV 産生が安定している 3 クローンの RG 細胞に注目し、それらの HCV 未感染細胞、HCV 感染細胞、HCV 感染後排除細胞について、細胞内の微細構造を観察した。HCV 感染細胞では HCV 感染患者検体でも観察される二重膜構造や脂肪滴構造の出現、ミトコンドリア構造の異常が観察された。HCV 排除細胞においてはこれらの構造変化は感染前の状態に回復していた。



これらの細胞内の構造変化は HCV 感染による宿主の遺伝子発現変化によるものと考えて、HCV 感染後、HCV 感染から排除後の遺伝子発現の変化を RNA-seq で網羅的に解析した。HCV 感染により約 580 遺伝子、その後の HCV 排除により約 360 遺伝子に発現変化があった。これら遺伝子の中には HCV 排除により感染前の状態に回復する可逆的な遺伝子、回復しない不可逆的な遺伝子があった。これらの

HCV感染、HCV排除後の遺伝子変化			
p<0.05の遺伝子数			
HCV感染	未感染細胞 vs	感染細胞	581遺伝子
HCV排除	感染細胞 vs	排除細胞	368遺伝子
	未感染細胞 vs	排除細胞	120遺伝子

遺伝子のうち感染により遺伝子発現が増加する 20 遺伝子（排除後に回復しないものが 12 遺伝子）、減少する 12 遺伝子（排除後に回復しないものが 4 遺伝子）に注目して解析を進めている。中でもウイルス排除後に回復しない遺伝子に関しては、不可逆的な肝組織変化に関与すると考えられ、解析を進めることで肝組織異常の改善につながる情報になり得る。また、メタボローム解析を行い、それぞれの細胞内での代謝物変化についても網羅的に比較解析を行った。その結果、HCV 感染細胞と HCV 排除細胞において解糖系の代謝産物の低下が観察された。この結果は HCV 感染患者において糖代謝異常が多いことと一致する。

以上のことから、培養細胞ベースでの HCV 未感染細胞、HCV 感染細胞、HCV 感染後排除細胞の構築することで、同一細胞を用いた HCV 感染（感染については同じ程度の HCV 感染を受けた状態）から HCV 排除が観察できた。これらの細胞においては確かに HCV 感染、HCV 排除の過程において可逆的、不可逆的に変化する遺伝子があった。これらの細胞での解析をさらに進めるとともに、ヒト肝臓キメラマウスや患者検体での解析を行い 3 モデルで共通して可逆的、不可逆的に変化する遺伝子を明らかにすることで DAA 治療後の肝発癌、肝障害に関連する宿主マーカーが明らかになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Deng Lin, Liang Yujiao, Ariffianto Adi, Matsui Chieko, Abe Takayuki, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Maki Masatoshi, Shibata Hideki, Shoji Ikuo	4. 巻 96
2. 論文標題 Hepatitis C Virus-Induced ROS/JNK Signaling Pathway Activates the E3 Ubiquitin Ligase Itch to Promote the Release of HCV Particles via Polyubiquitylation of VPS4A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0181121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01811-21	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 Kikuchi Minami, Sawabe Motoji, Aoyagi Haruyo, Wakae Kosho, Watashi Koichi, Hattori Satoru, Kawabe Naoto, Yoshioka Kentaro, Tanaka Junko, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Aizaki Hideki	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of an intervention system for linkage-to-care and follow-up for hepatitis B and C virus carriers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 68～80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-021-10269-5	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 Zheng Xin, Guo Rui, Liu Qingbo, Wakae Kousho, Watanabe Noriyuki, Fukano Kento, Que Lusheng, Li Yingfang, Aly Hussein H., Watashi Koichi, Suzuki Ryosuke, Murayama Asako, Kato Takanobu, Aizaki Hideki, Wakita Takaji, Huang Xiaoxiao, Yan Yi, Song Shao-Jiang, Muramatsu Masamichi	4. 巻 567
2. 論文標題 Identification of natural compounds extracted from crude drugs as novel inhibitors of hepatitis C virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1～8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.022	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 該当する
1. 著者名 Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Iguchi Eriko, Mishima Masako, Arasawa Soichi, Kumagai Ken, Eso Yuji, Shimizu Takahiro, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Taura Kojiro, Hatano Etsuro, Iijima Hiroko, Aoyagi Haruyo, Aizaki Hideki, Marusawa Hiroyuki, Wakita Takaji, Seno Hiroshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Oncogenic transcriptomic profile is sustained in the liver after the eradication of the hepatitis C virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 672～684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgab014	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 Kakizoe Yusuke, Koizumi Yoshiki, Ikoma Yukino, Ohashi Hirofumi, Wakita Takaji, Iwami Shingo, Watashi Koichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Required concentration index quantifies effective drug combinations against hepatitis C virus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theoretical Biology and Medical Modelling	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12976-020-00135-6	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 Kakizoe Yusuke, Koizumi Yoshiki, Ikoma Yukino, Ohashi Hirofumi, Wakita Takaji, Iwami Shingo, Watashi Koichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Required concentration index quantifies effective drug combinations against hepatitis C virus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theoretical Biology and Medical Modelling	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12976-020-00135-6	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 Shimizu Yoshimi, Shinoda Takehiro, Shirasago Yoshitaka, Kondoh Masuo, Shinya Naoko, Hanada Kentaro, Yagi Kiyohito, Suzuki Tetsuro, Wakita Takaji, Kimura Someya Tomomi, Shirouzu Mikako, Fukasawa Masayoshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Occludin binding single chain variable fragment and antigen binding fragment antibodies prevent hepatitis C virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 220 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13975	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 Gewaid Hossam, Aoyagi Haruyo, Arita Minetaro, Watashi Koichi, Suzuki Ryosuke, Sakai Shota, Kumagai Keigo, Yamaji Toshiyuki, Fukasawa Masayoshi, Kato Fumihito, Hishiki Takayuki, Mimata Ayako, Sakamaki Yuriko, Ichinose Shizuko, Hanada Kentaro, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Aizaki Hideki	4. 巻 94
2. 論文標題 Sphingomyelin Is Essential for the Structure and Function of the Double-Membrane Vesicles in Hepatitis C Virus RNA Replication Factories	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01080-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01080-20	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 Yoneyama H, Morishita A, Iwama H, Fujita K, Masaki T, Tani J, Tadokoro T, Nomura T, Sakamoto T, Oura K, Takuma K, Nakahara M, Mimura S, Deguchi A, Oryu M, Tsutsui K, Himoto T, Shimotohno K, Wakita T, Kobara H, Masaki T	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of microRNA associated with the elimination of hepatitis C virus genotype 1b by direct acting antiviral therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15224	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 Iwanami Shoya, Kitagawa Kosaku, Ohashi Hirofumi, Asai Yusuke, Shionoya Kaho, Saso Wakana, Nishioka Kazane, Inaba Hisashi, Nakaoka Shinji, Wakita Takaji, Diekmann Odo, Iwami Shingo, Watashi Koichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Should a viral genome stay in the host cell or leave? A quantitative dynamics study of how hepatitis C virus deals with this dilemma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000562	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 Date Tomoko, Sugiyama Masaya, Lkhagvasuren Damdindorj, Wakita Takaji, Oyunsuren Tsendsuren, Mizokami Masashi	4. 巻 282
2. 論文標題 Prevalence of equine hepacivirus infection in Mongolia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 197940 ~ 197940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2020.197940	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5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takaji Wakita
2. 発表標題 30 years of HCV Virology
3. 学会等名 27th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaji Wakita, Haruyo Aoyagi, Tomoko Date, Noriyuki Watanabe, Hideki Aizaki, Masamichi Muramatsu
2. 発表標題 HCV virology and HCC after SVR
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases (ISVHLD) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaji Wakita, Haruyo Aoyagi, Tomoko Date, Noriyuki Watanabe, Hideki Aizaki, Masamichi Muramatsu
2. 発表標題 Hepatocellular carcinoma in SVR achieved CHC patients after DAA treatment
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇田隆字
2. 発表標題 今年のノーベル医学生理学賞は「The discovery of Hepatitis C Virus (C型肝炎ウイルスの発見)」が受賞したことを祝して
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇田隆字
2. 発表標題 今年のノーベル医学生理学賞は「The discovery of Hepatitis C Virus (C型肝炎ウイルスの発見)」が受賞したことを祝して
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会 (招待講演)
4. 発表年 2020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	渡邊 則幸 (Watanabe Noriyuki)		
研究協力者	杉山 真也 (Sugiyama Masaya)		

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
---------	---------