

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890255

研究課題名（和文）HBV感染による肝線維化進展機序の解析

研究課題名（英文）Analyses on the progression of liver fibrosis induced by hepatitis B virus infection

研究代表者

杉山 真也（SUGIYAMA MASAYA）

国立国際医療研究センター研究所，肝炎・免疫研究センター，肝疾患研究部

研究者番号：20612427

研究成果の概要（和文）：B型肝炎ウイルスに感染したヒト肝細胞置換キメラマウスに自然免疫担当分子である Toll-like receptor 4（TLR4）に対する新規の抗体を投与したところ，肝線維化進展を予防する一定の効果を認めた．また，抗体を投与したキメラマウスでの目立った副作用は認められず，これらの点から新規抗体の有用性が明らかとなった．今後はこの新規抗 TLR4 抗体を共同開発した製薬メーカーと共に，医薬品としての開発を進めていく．

研究成果の概要（英文）：Chimeric mice with human hepatocyte was infected with hepatitis B virus to mimic liver fibrosis triggered by virus infection. To prevent liver fibrosis, a newly developed antibody specific for Toll-like receptor 4 was administrated with the chimeric mice. The antibody successfully prevented the progression of liver fibrosis. The severe side effect induced by the antibody was not observed in the mice. Along with these results, the antibody could be a potential as a new drug. Further study is needed to reveal the molecular basis of this effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス，肝線維化，自然免疫，活性酸素種，細胞周期

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎はB型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus: HBV）に感染することにより発症する．本邦では約150万人，世界中では約4億2千万人のHBV持続感染者が存在すると推定されている．B型肝炎を起因とする肝硬変や肝細胞癌での死亡者数は，本邦では年間約6千

人，世界中で年間100万人程度である．一般的な病態としては，B型慢性肝炎から肝線維化を経て，肝硬変や肝癌へと進展していくことが知られている．ウイルス感染症の場合，ウイルス因子と宿主因子が病態の進展に関連すると考えられ，B型肝炎の場合，ウイルス因子の研究は多数なされている．HBV

はヒト免疫不全ウイルス (HIV) と類似の生活環を有し、HIV と同様に宿主ゲノムへウイルスゲノムをインテグレーションさせるため、一旦感染が成立した場合、ウイルスの完全な排除は困難である。そのため、B 型慢性肝炎の治療法としては、ウイルス複製の抑制を目標として、インターフェロン (Interferon: IFN) と核酸アナログ (Nucleotide analogue: NA) 製剤が利用され、一定の効果を上げている。

他方で、病態進行の機序については、十分な解析がなされていない。C 型慢性肝炎では、肝線維化から肝硬変、肝癌へと至る経過は時間軸と相関しているため、その予後の推測が可能であるが、B 型慢性肝炎では必ずしも感染期間と病態が一致せず、線維化や肝硬変へと急速に進むことがある。そのため、慎重な経過観察が必要で、特に生体肝移植後や HIV 感染といった免疫抑制下での肝炎では急速に肝線維化が進展することが知られており、その詳細な機序の解明と対策が必要とされている。

申請者らは、この点を解決するためにヒト肝臓を保有するヒューマノイドマウスであるヒト肝細胞置換キメラマウス (キメラマウス) を感染モデルとして利用することで、HBV 感染下での病態進展に関する研究を世界に先駆けて進めてきた。これまでの研究で、キメラマウスに HBV を長期感染させた群で肝線維化が認められた (Sugiyama M. et al. *Gastroenterology* 2009)。また、線維化の進展しているキメラマウス群では、感染初期から活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の発現が顕著であることが明らかとなり、これに関連して、細胞核の酸化傷害が認められた。この病態と関連する遺伝子を網羅的に探索したところ、Toll-like receptor (TLR) 4 の発現が特にヒトとマウス共に誘導され、その下流の IL-6 も高値であるという予備データを得た。

2. 研究の目的

B 型慢性肝炎の進行により肝臓の線維化が進むが、その発症と進展の機序は不明のままであった。申請者らは、ヒト肝細胞置換キメラマウスを利用することで B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染を起因とする線維化モデルを確立した。この中で、ROS の持続的産生と TLR4 経路の活性化が観察された。本研究では、ROS と TLR4 を中心に、その上流と下流経路を解析することで、線維化の発症と進展の機序を目指した。TLR4 経路の阻害を *in vitro* や *in vivo* で行ない、TLR4 の直接的な影響を解析することを軸として、線維化関連遺伝子の変動を検討した。線維化形成の経路を同定することで、持続感染下でも病態進展を予防可能とする最適な因子の発見と将来

的な臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、TLR4 と ROS に注目して肝線維化の発症と進展の機序を検討した。予備データから得られている TLR4 経路の活性化が線維化形成に与える影響を確認するために、中和抗体による阻害を行なうことで直接的な影響を評価した。これに関連して、ROS の誘導が TLR4 経路によるものか、もしくは TLR4 の上流に位置しているのか検討した。

ROS の持続的な産生による核傷害と多核化が観察されているが、多核化形成に関与するとされる Chk1 と中心体の関連について解析をすすめた。Chk1 の発現とリン酸化の有無を検討し、さらに Chk1 のヒストン H3T11 キナーゼ機能により制御されている細胞周期関連遺伝子について解析した。また、中心体と Chk1 の相互作用についても蛍光染色やイムノプロットにより解析を進め、持続的な炎症が細胞分裂機構に与える影響をエピジェネティックな変化を含めて検討した。

4. 研究成果

(1) 肝線維化進展における TLR4 経路の解析

マクロファージ、NK 細胞に対して、新規に取得した抗 TLR4 抗体を作用させ、その阻害効果を *in vitro* で確認した。その効果を *in vivo* で検討するためにヒト肝細胞置換キメラマウスへ抗 TLR4 抗体を投与した。抗体としては、ヒト TLR4 特異的な抗 TLR4 抗体、マウス TLR4 特異的な抗 TLR4 抗体を準備した。HBV 感染させたキメラマウスに抗 TLR4 抗体を毎週適量投与し、6 ヶ月飼育した時点で剖検した。その結果、マウス抗 TLR4 抗体を投与した群において肝線維化の抑制が観察された。一方で、ヒト抗 TLR4 抗体ではその効果が認められなかった。これらのことから、ヒト肝細胞が発現する TLR4 の関与は否定された。マウス肝臓内の TLR4 高発現細胞としては、クッパー細胞と肝星細胞が挙げられる。今後は、いずれの細胞が TLR4 経路を介した線維化に大きな影響を与えているか検討する。

(2) 核分裂異常と細胞周期異常に関連する因子の解析

これまでの解析から、Chk1 のリン酸化状態や機能異常が中心体の機能異常へとつながることが明らかとなっている。HBV 感染におけるこの現象の確認と新たな経路の有無について HBV を恒常的に発現する培養細胞株 (HepG2. 2. 15) と HBV 感染キメラマウス肝臓について中心体の配置を蛍光顕微鏡により観察し、Chk1 との相互作用を解析したが、Chk1 のリン酸化異常などは認められなかった。

(3) TLR4 に対するリガンドの探索

TLR4 とその下流の活性化を示す予備データは得られているが、この経路が活性化された原因は不明のままである。HBV 発現している培養細胞と HBV 感染キメラマウス由来の肝臓を用いて、質量分析装置による探索研究の準備を進めた。来年度以降の新規研究でそのリガンド候補分子の探索を行なっていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M (2011) Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS ONE* 6(10):e26620.
2. Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 2011 Oct;41(10):936-45.
3. Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Genetic variation in IL-28B is associated with response to the therapy for chronic hepatitis C. *J Pharmacol Sci.* 2011;115(3):263-9.
4. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):439-48.
5. Yuen MF, Wong DK, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection. *Clin Infect Dis.* 2011 Mar;52(5):624-32.
6. Tatematsu K, Tanaka Y, Sugiyama M, Sudoh M, Mizokami M. Host sphingolipid biosynthesis is a promising therapeutic target for the inhibition of hepatitis B virus replication. *J Med Virol.* 2011 Apr;83(4):587-93.
7. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 1;20(17):3507-16.
8. Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, Tanaka Y, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Nov 1;21(21):6328-31.
9. Nakano T, Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int.* 2011 Dec 5.
10. Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Jan 15;23(2):503-6.
11. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.* 2012

- Nov 7.
12. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e44743.
 13. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175.
 14. □ Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 Jun 19;13:47.
 15. Sugiyama M, Kimura T, Naito S, Mukaide M, Shinauchi T, Ueno M, Ito K, Murata K, Mizokami M. Development of specific and quantitative real-time detection PCR and immunoassays for λ 3-interferon. *Hepatol Res*. 2012 Nov;42(11):1089-99.
 16. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*. 2012 Oct;42(10):958-965.
 17. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. Lect-hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012 Oct;56(4):1448-56.
- [学会発表] (計 16 件)
1. 「キメラマウスでのB型肝炎の病態進展に関わる分子機構の検討」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 シンポジウム SY-1-11 第47回日本肝臓学会総会、東京 2011年6月2日
 2. 「ホストのスフィンゴ脂質合成系を標的とした抗HBV薬のキメラマウスにおける検討」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 パネルディスカッション PD4-3 第19回日本消化器関連学会週間、福岡 2011年10月20日
 3. 「IL-28B 遺伝子周囲に存在するSNPsの機能解析と臨床的意義」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 シンポジウム S2-13 第19回日本消化器関連学会週間、福岡 2011年10月20日
 4. 「スフィンゴ脂質合成経路の阻害によるHBV複製の抑制」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 肝炎ウイルス研究シンポジウム S4 東京 2012年3月24日
 5. 「活性酸素種を中心としたB型肝炎ウイルスの病態進展に関わる分子機序の解析」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 シンポジウム S4 Liver forum in Kyoto 第14回学術集会 京都 2012年3月31日
 6. 「Influence of genetic variation in IL-28B promoter on the gene expression levels」Masaya Sugiyama, Yasuhito

- Tanaka, Makoto Nakanishi, and Masashi Mizokami Poster VI-P018-6 International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo September 13, 2011
7. 「The impact of core promoter mutations specific for hepatitis B virus genotype D1 on viral replication」 Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, and Masashi Mizokami Poster 848 Asian Pacific Digestive Week 2011, Singapore, 2nd October 2011
 8. 「Host sphingolipid biosynthesis as a therapeutic target for HBV replication」 Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, Masayuki Sudoh, and Masashi Mizokami Poster P-1462, American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, Nov 7th, 2011
 9. 「Polymorphism of IL-28B promoter region could improve the prediction value of response to CHC treatment following rs8099917 genotyping.」 Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami Poster P-407, American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, Nov 5th, 2011
 10. 「No infectivity of HBV DNA and HBsAb double-positive sera in uPA/SCID chimeric mouse」 Masaya Sugiyama, Miki Yoshida, Yuji Hoshi, Yasumi Furui, Shigeharu Uchida, Masashi Mizokami Poster PP10-010, Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Taipei, Taiwan, Feb 17th, 2012
 11. 「Core promoter mutations specific for hepatitis B virus genotype D1 regulating viral replication」 Masaya Sugiyama, Sachiko Sato, Yasuhito Tanaka, Kiyooki Ito, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, and Masashi Mizokami Poster PP10-017, Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Taipei, Taiwan, Feb 17th, 2012
 12. 「宿主・ウイルスゲノム解析によるC型肝炎の病態解明にむけて“Host and viral genome analyses on hepatitis C”」 杉山真也 ワークショップ B1 国立遺伝学研究所研究会 NIG Workshop 国立遺伝学研究所 三島 2012年3月12日
 13. 「IL28B 特異的測定系の開発と臨床的意義の検討」 杉山真也, 村田一素, 溝上雅史 シンポジウム S1-1 第77階日本イ

ンターフェロン・サイトカイン学会学術集会 神戸商工会議所 神戸 2012年6月21日

14. 「C型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用」 杉山真也、平峯智、西田奈央、伊藤清顕、村田一素、正木尚彦、井戸章雄、坪内博仁、溝上雅史 ワークショップ WS25-3 第48回日本肝臓学会総会 ポルテ金沢 金沢 2012年6月7日
15. 「The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication.」 Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi and Masashi Mizokami Poster P-109 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses Oxford, England Sep 25, 2012,
16. 「Genetic variation in IL-28B promoter region consisting of TA dinucleotide repeat could improve the prediction of chronic hepatitis C and spontaneous clearance with rs8099917 genotyping.」 Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, and Masashi Mizokami Poster P-1765, Oct 13th 2012 Boston, American Association for the Study of Liver Diseases,

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

名称: C型肝炎患者の経過予測方法
発明者: 溝上雅史、杉山真也
権利者: 国立国際医療研究センター
種類: 特許
番号: 特願 2011-211647
出願年月日: 平成 23 年 9 月 27 日
国内外の別: 国内

名称: B型肝炎ウイルス群を検出し、遺伝子多様性を評価するためのオリゴヌクレオチドのセット、並びにそれを用いた方法
発明者: 溝上雅史、杉山真也、新井 理、田村卓郎
権利者: 国立国際医療研究センター, ビッツ株式会社
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/79353
出願年月日: 平成 23 年 12 月 19 日
国内外の別: 国際

名称: IL-28B の分析方法

発明者：溝上雅史、杉山真也、木村達治
権利者：国立国際医療研究センター、特殊免疫研究所
種類：特許
番号：特願 2011-287603
出願年月日：平成 23 年 12 月 28 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 真也（スギヤマ マサヤ）
国立国際医療研究センター研究所，肝炎・免疫研究センター，肝疾患研究部
研究者番号：20612427

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし