

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09002

研究課題名(和文) B型慢性肝疾患におけるインターフェロン抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms for suppressing interferon responsiveness by chronic hepatitis B virus infection

研究代表者

柘植 雅貴 (TSUGE, MASATAKA)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教

研究者番号：50448263

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)：B型肝炎ウイルス(HBV)感染では感染したHBVの遺伝子型により、細胞内の遺伝子発現への影響が異なり、その相違がインターフェロン(IFN)反応性や病態に関与していると推察されることから、本研究では、HBV感染細胞における遺伝子発現解析を行い、HBV遺伝子型による遺伝子発現変化の違いや発現変化した遺伝子とHBV関連蛋白との関連性を解析した。その結果、感染したHBVの遺伝子型によって発現変化の程度が異なる遺伝子が存在することが明らかとなった。さらに、HBVによって発現が誘導される遺伝子を解析した結果、HBxやHBs蛋白により転写制御され、IFN抵抗性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is considered that many gene expressions are regulated by hepatitis B virus (HBV) infection and this regulation of gene expressions are different among infected HBV genotypes. However, it has not been clarified the differences of regulation in gene expressions among HBV genotypes. In the present study, I analyzed gene expression profiles using human hepatocytes with or without HBV infection and then I also analyzed the association between HBV related proteins and the regulated genes via HBV infection. By gene expression analysis, it was identified that regulation levels in several gene expressions were different between HBV genotype A and C infection. And further analyses were indicated that transcription of one gene was regulated by HBx and HBs protein and the upregulation of this gene suppressed interferon responsiveness in human hepatocytes.

研究分野：消化器内科

キーワード：B型肝炎ウイルス 遺伝子発現 インターフェロン

### 1. 研究開始当初の背景

1986年よりB型肝炎ウイルス(HBV)感染に対し母子感染防止事業が施行されて以降、母子感染に伴うB型慢性肝炎例は著しく減少した。しかしながら、性行為感染を背景としたHBV感染は一定の割合で生じている現状から、B型急性肝炎の実態把握やユニバーサルワクチネーションの必要が議論されている。2009年に広島県内の肝疾患診療を行っている主要施設に対して行った調査では、年間30例程度のB型急性肝炎に伴う入院患者が発生し、発生数の減少傾向は認められなかった。さらに、感染したHBVのgenotypeを調べると、HBV genotype A感染が増加しており、2006年以降、B型急性肝炎の約1/3を占めるようになっていた(第40回日本肝臓学会西部会にて報告)。通常、成人がHBVに感染した場合、特殊な場合を除き、一過性感染にとどまるが、HBV genotype Aでは、成人感染例においても約10%でキャリア化するとされ、HBV genotype A持続感染例の増加が懸念されている。

現在、B型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法の中心は核酸アナログ療法であり、HBV増殖を強力に阻害できるものの、感染肝細胞からHBVを完全に排除することはできない。そのため、長期投与が必須となり、長期治療に伴う薬剤耐性ウイルス出現をしばしば経験する。特にHBV genotype A感染例では、耐性株の出現頻度が高いという報告(Kobayashi M, et al. J Med Virol 78(10):1276-83, 2006.)もあることから、genotype A感染の拡大に伴う薬剤耐性株の増加も懸念され、抗ウイルス療法の向上は不可欠と言える。一方、もう一つの抗ウイルス療法であるインターフェロン(IFN)療法は、近年、有用性が見直されてきているものの、その治療成績は決して満足できるものではない。特に、HBV genotype C感染例に対しては、genotype Aやgenotype B感染例に比べ、治療反応性が低く、当研究室での基礎研究成果からは、HBV感染によりヒト肝細胞内の遺伝子発現が制御されIFN抵抗性を示している可能性が示唆された(Tsuge M, et al. J Infect Dis 204:224-8, 2011.)。しかし、HBV感染により細胞内でIFN抵抗性が生じる詳細なメカニズムは依然として不明であり、B型慢性肝疾患におけるHBs抗原消失率の増加を達成するためには、IFN抵抗性獲得メカニズムを解明し、IFN治療効果を向上することが重要と考える。

### 2. 研究の目的

研究の背景で示したように、HBV genotype A感染における慢性化やHBV感染肝細胞におけるIFN抵抗性獲得機構には、HBV感染に伴う細胞内の遺伝子発現制御が強く関与していることが予想されることから、これまでに当研究室で構築してきた*in vitro*および*in vivo*のHBV感染・複製モデルを用いて、HBV感染により発現制御をうける肝細胞内遺伝

子からIFN抵抗性関連遺伝子を同定し、さらに同定されたIFN抵抗性関連遺伝子とHBV関連蛋白との相互作用を解析し、より詳細なメカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト肝細胞を用いた細胞内遺伝子発現変化の検討

ヒト肝細胞キメラマウスより採取し、培養されたPXB細胞に対し、HBVを感染させ、PXB細胞内の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。

HBV genotype AおよびC感染による遺伝子発現変化の検討

ヒト肝がん細胞株およびヒト肝細胞に対し、HBVを感染もしくは発現させ、細胞内の遺伝子発現変化をHBV genotypeで比較。

IFN抵抗性関連候補遺伝子とHBV関連蛋白の相互作用の検討

上記検討により、HBV genotype間で発現変化に差が認められた遺伝子に関して、HBV関連蛋白との相互作用を*in vitro*にて検討した。

### 4. 研究成果

約27,000遺伝子に関する遺伝子発現プロファイルより、HBV genotype C感染肝細胞において、非感染細胞に比して有意に発現変化した遺伝子(P<0.01)を検討した結果、927遺伝子が抽出されたが、そのうち1.5倍以上発現亢進した遺伝子は152遺伝子、0.7倍以下に発現低下した遺伝子は54遺伝子であった。そこで、発現亢進した152遺伝子を用いてPANTHER classification systemによるパスウェイ解析を行ったところ、Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)、Angiogenesis (P00005)、CCKR signaling map (P06959)、PDGF signaling pathway (P00047)に關与する遺伝子が発現亢進していた(表1)。一方、発現低下した遺伝子は、p53 pathway (P00059)、Parkinson disease (P00049)に關与している可能性が示唆された。

表1. HBV感染に伴い発現亢進を認めた遺伝子を用いたPathway解析

Pathway	遺伝子数
Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)	7
Angiogenesis (P00005)	5
PDGF signaling pathway (P00047)	5
CCKR signaling map (P06959)	5
Apoptosis signaling pathway (P00006)	3
Huntington disease (P00029)	3
Wnt signaling pathway (P00057)	3
Toll receptor signaling pathway (P00054)	3
Ras Pathway (P04393)	3
Oxidative stress response (P00046)	3

そこで、HBV genotype A感染時と遺伝子発現を比較したが、多くの遺伝子はHBV genotype C感染時と同様の傾向を示していたが、一部の遺伝子で発現変化の割合が異なるものを認めた。

背景の項で示したように、臨床的にHBV感染では、感染しているHBVのgenotypeによりインターフェロン(IFN)の感受性が異なることが知られている。そのため、上記の遺伝子発現量の違いがHBV genotype間のIFN

反応性の違いに寄与している可能性が考えられたため、発現量の異なる遺伝子に関して解析を進めることとした。本研究の再現性を検討するため、HBV genotype A および HBV genotype C を恒常的に発現する細胞株を作製した。その後、遺伝子発現解析により抽出された遺伝子が HBV 発現により誘導され、さらに HBV genotype により発現の変化量が異なるかについて検討したところ、ほぼ同様の傾向を認めた(図1)。

これらの遺伝子のうち、まず、HBV genotype A 感染時よりも

HBV genotype C 感染時により強く発現が誘導された遺伝子 C について、HBV 感染との関連性および IFN 反応性に及ぼす影響について in vitro にて解析を進めたところ、遺伝子 C は HBV 関連蛋白である HBx や HBs 蛋白により転写レベルで発現が制御されていることが明らかとなった。さらに、同遺伝子は、強制発現することにより、細胞内の IFN 誘導遺伝子 (ISGs) 誘導を抑制することが明らかとなり、IFN 抵抗性に関与している可能性が示唆された。

一方、HBV genotype C 感染時に比べ、HBV genotype A 感染時により強く発現が誘導された遺伝子 D についても解析を進めている。同遺伝子は、HBc 蛋白との interaction が示唆され、さらに、遺伝子 D を強制発現することで、HBV 増殖が 2~3 倍程度亢進する可能性が考えられた(図2)。現在、さらに詳細なメカニズムを検討中である。

図1. HBV持続発現細胞株における遺伝子発現の変化

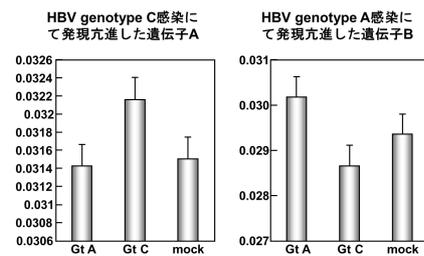
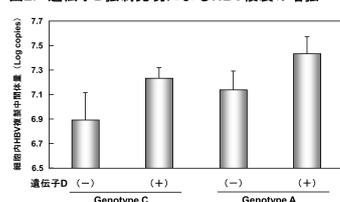


図2. 遺伝子D強制発現によるHBV複製の増強



## 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 11 件)

1. Matsumoto A, Nishiguchi S, Enomoto H, Kang JH, Tanaka Y, Shinkai N, Kurosaki M, Enomoto M, Kanda T, Yokosuka O, Yatsunami H, Nagaoka S, Okuse C, Kagawa T, Mine T, Takaguchi K, Saito S,

Hino K, Ikeda F, Sakisaka S, Morihara D, Miyase S, Tsuge M, Chayama K, Hiramatsu N, Suzuki Y, Murata K and Tanaka E. Combinational use of hepatitis B viral antigens predicts responses to nucleos(t)ide analogue/peg-interferon sequential therapy. J Gastroenterol 2018; 53(2):247-257. 査読有

2. Uchida T, Imamura M, Kan H, Hiraga N, Hayes CN, Tsuge M, Abe-Chayama H, Aikata H, Makokha GN, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C and Chayama K. Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. J Gen Virol 2017; 98:1040-1047. 査読有
3. Uchida T, Imamura M, Hayes CN, Hiraga N, Kan H, Tsuge M, Abe-Chayama H, Zhang Y, Makokha GN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C and Chayama K. Persistent Loss of HBV Markers in Serum without Cellular Immunity by Combination of PEG-IFN Plus ETV Therapy in Humanized Mice. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(9): e00725-17. 査読有
4. Tsuge M, Uchida T, Hiraga N, Kan H, Makokha GN, Abe-Chayama H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Shimozone R, Iwamura T, Narumi H, Suzuki T, Kainoh M, Taniguchi T and Chayama K. Development of a Novel Site-Specific Pegylated Interferon Beta for Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(6): e00183-17. 査読有
5. Taida T, Arai M., Kanda T., Hige S., Ueno Y., Imazeki F., Izumi N., Tanaka E., Shinkai N., Yoshioka K., Nakamoto Y.,

- Nishiguchi S., Tsuge M., Abe M., Sata M., Yatsushashi H., Ido A., Kita K., Azemoto R., Kitsukawa Y., Goto N. and Yokosuka O. The prognosis of hepatitis B inactive carriers in Japan: a multicenter prospective study. *Journal of Gastroenterology*. 2017, 52(1): 113-22. 査読有
- 6 . Tsuge M., Hiraga N., Uchida T., Kan H., Miyaki E., Masaki K., Ono A., Nakahara T., Abe-Chayama H., Zhang Y., Naswa M.G., Kawaoka T., Miki D., Imamura M., Kawakami Y., Aikata H., Ochi H., Hayes C.N. and Chayama K. Antiviral effects of anti-HBs immunoglobulin and vaccine on HBs antigen seroclearance for chronic hepatitis B infection. *Journal of Gastroenterology*. 2016, 51(11): 1073-80. 査読有
- 7 . Urabe A., Imamura M., Tsuge M., Kan H., Fujino H., Fukuhara T., Masaki K., Kobayashi T., Ono A., Nakahara T., Kawaoka T., Hiramatsu A., Kawakami Y., Aikata H., Hayes C.N., Maki N., Ohdan H. and Chayama K. The relationship between HBcrAg and HBV reinfection in HBV related post-liver transplantation patients. *Journal of Gastroenterology*. 2016, 51(11): 1073-1080. 査読有
- 8 . Murakami E., Tsuge M., Hiraga N., Kan H., Uchida T., Masaki K., Nakahara T., Ono A., Miki D., Kawaoka T., Abe H., Imamura M., Aikata H., Ochi H., Hayes C.N., Akita T., Tanaka J. and Chayama K. Effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones. *Journal of Infection*. 2016, 72(1): 91-102. 査読有
- 9 . Huang YW, Takahashi S, Tsuge M., Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K, Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*, 2015, 20(4): 369-75. 査読有
- 10 . Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M., Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Murakami K, Chayama K. Human Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Acute Liver Failure and Rescue by Immunoglobulin in Human Hepatocyte Transplant TK-NOG Mice. *J Virol*, 2015. 89(19): 10087-96. 査読有
- 11 . Matsumoto A, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M., Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E. Factors associated with the effect of interferon- $\alpha$  sequential therapy in order to discontinue nucleoside/nucleotide analog treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Research*. 2015, 45(2): 1195-202. 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

1. B型肝炎ウイルス (HBV) 感染に伴う肝細胞内 IL8 発現亢進と細胞内インターフェロン反応性の検討、口頭、柘植 雅貴、内田宅郎、茶山一彰、第 53 回日本肝臓学会総会、2017/6/8、国内
2. B 型慢性肝疾患に対するエンテカビル治療と血清サイトカインの変化、口頭、柘植 雅貴、栗原美緒、茶山一彰、第 53 回日本肝臓学会総会、2017/6/9、国内
3. 核酸アナログ治療併用の有無によるインターフェロン治療効果の検討、口頭、柘植雅貴、川上由育、茶山一彰、第 21 回日本肝臓学大

- 会、2017/10/12、国内
4. Hepatitis B virus up-regulates IL8 expression via endoplasmic reticulum stress and leads to suppress interferon responsiveness.、ポスター、Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Murakami E, Abe-Chayama H, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Chayama K, AASLD(米国肝臓学会) 2017、2017/10/22、国外
  5. 核酸アナログ治療例に対するペグインターフェロン治療と HBs 低下に関する検討、口頭、柘植雅貴、川上由育、内川慎介、児玉健一郎、西田祐乃、稲垣有希、盛生 慶、中原隆志、村上英介、河岡友和、平松 憲、今村道雄、相方 浩、川上広育、茶山一彰、第 42 回日本肝臓学会西部会、2017/11/30、国内
  6. B 型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子の発現変化の解析、口頭、柘植雅貴、平賀伸彦、内田宅郎、菅宏美、茶山弘美、今村道雄、茶山一彰、第 3 回みなとまちフォーラム、2016/8/6、国内
  7. HBV 産生細胞株を用いたテノホビルの抗ウイルス効果の評価、口頭、柘植雅貴、内田宅郎、菅宏美、阿部弘美、三木大樹、河岡友和、平賀伸彦、今村道雄、相方浩、越智秀典、茶山一彰、肝炎ウイルス細胞培養系研究会、2016/9/16、国内
  8. Evaluation of antiviral effects of a novel site-specific pegylated interferon beta using humanized mouse model. ポスター、Tsuge M, Uchida T, Kan H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Shimozone R, Iwamura T, Narumi H, Suzuki T, Kainoh M, Taniguchi T, Chayama K. AASLD2016, 2016/11/14, 国外
  9. 核酸アナログ先行投与によるインターフェロン反応性の改善. ポスター、柘植雅貴、森奈美、長沖祐子、河岡友和、平松憲、今村道雄、川上由育、相方浩、辻恵二、川上広育、茶山一彰、JDDW2016, 2016/11/3, 国内
  10. B 型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子の発現変化の解析、口頭、柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰、第 52 回日本肝臓学会総会、2016/5/19、国内
  11. 核酸アナログ投与と B 型慢性肝炎症例に対する HBIG 投与の有効性、口頭、柘植雅貴、川上由育、茶山一彰、第 52 回日本肝臓学会総会、2016/5/20、国内
  12. HBV genotype に伴う核酸アナログ感受性に関する検討、口頭、柘植雅貴、村上英介、茶山一彰、第 102 回日本消化器病学会総会、2016/4/22、国内
  13. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた B 型肝炎ウイルス遺伝子型による感染肝細胞内遺伝子発現変化の検討、ポスター、柘植雅貴、平賀伸彦、内田宅郎、菅宏美、阿部弘美、三木大樹、河岡友和、今村道雄、相方浩、越智秀典、茶山一彰、日本臨床分子医学会学術集会、2016/4/15、国内
  14. HBV RNA 量を用いた核酸アナログ中止後再燃予測、口頭(パネルディスカッション)、柘植雅貴、

- 川上広育、茶山一彰，第 41 回日本肝臓学会西部会，2015/12/4，国内
15. Difference of intracellular responses by HBV genotype A and C infection in humanized mouse model. ポスター，Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Hiromi Abe, Daiki Miki, Michio Imamura, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama , AASLD2015, 2015/11/16, 国外
16. HBV genotype C 感染例における HBs 抗原消失に関する検討 ,口頭，柘植雅貴、村上英介、茶山一彰，JDDW 2015，2015/10/8，国内
17. HBV genotype と核酸アナログの抗ウイルス効果，口頭，柘植 雅貴、村上英介、平賀 伸彦、阿部弘美、今村 道雄、秋田智之、田中純子、茶山 一彰，第 11 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム，2015/7/4，国内
18. HBV 感染に伴う microRNA 発現変化と miRNA による HBV 複製制御，口頭，柘植雅貴、平賀伸彦、村上英介、阿部弘美、三木大樹、河岡友和、平松 憲、今村道雄、川上由育、相方 浩、越智秀典、茶山一彰，第 51 回日本肝臓学会総会，2015/5/22，国内
19. 核酸アナログ中止例における HBV コア蛋白のアミノ酸変異に関する解析，口頭，村上英介、柘植雅貴、内田宅郎、菅 宏美、柘木慶一、本田洋士、中原隆志、大野敦司、平賀伸彦、河岡友和、平松 憲、今村道雄、相方 浩、茶山一彰、川上広育，第 51 回日本肝臓学会総会，2015/5/22，国内
20. 核酸アナログ先行投与によるイン

ターフェロン反応性の変化，口頭，柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰，第 101 回日本消化病学会総会，2015/4/23，国内

21. 当院における HBV キャリアの HBs 抗原陰性化と肝発癌に関する検討，口頭，村上英介、柘植雅貴、茶山一彰，第 101 回日本消化病学会総会，2015/4/24，国内

〔図書〕(計 0 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
該当なし

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
柘植 雅貴 (TSUGE, MASATAKA)  
広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教  
研究者番号：50448263

(2)研究分担者 ( )  
研究者番号：

(3)連携研究者 ( )  
研究者番号：

(4)研究協力者 ( )