

平成30年6月6日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09016

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスの自然免疫回避メカニズムの解明と創薬応用

研究課題名(英文) Analysis and therapeutic targeting of molecular mechanisms by which hepatitis B virus evade the host innate immune response

研究代表者

堤 進(浜田進)(Hamada-Tsutsumi, Susumu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30367693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝細胞内核酸センサーによるtype I およびtype IIIインターフェロン(IFN)の誘導にHBV感染が及ぼす影響を検証した。HBV感染感受性を持つ細胞株Hep G2-NTCPにHBVを持続感染し、2本鎖RNAを導入し核酸センサーを活性化した。その結果、HBV感染細胞ではtype I/III IFNの誘導が阻害された。一方、type I/III IFNが誘導されないにも関わらず細胞内HBV mRNA量および細胞外ウイルス抗原量は顕著に低下していた。以上から、核酸センサーの活性化がtype I/III IFNと独立の経路で細胞内抗ウイルス作用を誘導することが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the impact of HBV infection on the induction of type I and type III interferon (IFN) by stimulation of intracellular nucleic acid sensors in the hepatocytes. A HBV-permissive cell line, Hep G2-NTCP, was infected with HBV and transfected with double-strand RNA to activate nucleic acid sensors. Interestingly the induction of type I/III IFNs was significantly suppressed in the HBV-infected cells. On the other hand, the amounts of intracellular HBV mRNAs and extracellular viral antigen were greatly reduced in the double-strand RNA-treated group in the absence of IFNs. Thus, the activation of nucleic acid sensors induces uncharacterized antiviral pathways independent of conventional type I/III interferon signaling.

研究分野：ウイルス学、免疫学

キーワード：B型肝炎ウイルス(HBV) 自然免疫 核酸センサー インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) の感染に起因する肝炎のうち、出生時の母子感染や幼児の水平感染は高率に慢性 B 型肝炎に移行する。また、成人の急性 B 型肝炎においても一部の患者ではウイルス排除が達成されず慢性 B 型肝炎に移行する。肝細胞からの HBV の排除には HBV 特異的細胞傷害性 T 細胞を代表とする獲得免疫応答が必須である。一方、獲得免疫応答の誘導に不可欠な自然免疫応答と HBV 感染との関連は不明な点が多い。

一般的に、ウイルス感染初期には感染細胞や近傍の免疫系細胞において自然免疫応答が速やかに誘導され、炎症性サイトカインや抗ウイルス作用を持つインターフェロン (IFN) が分泌される。しかし、驚くべきことに、HBV 感染初期や肝内 HBV 増殖期には炎症性サイトカイン、IFN を含む自然免疫応答関連遺伝子群の誘導が観察されないことが、HBV 感染チンパンジーを用いた肝内遺伝子マイクロアレイ解析により示された。

自然免疫応答の開始には種々の核酸センサー分子 (TLR: Toll-like receptor, RLR: RIG-I-like receptor) がウイルスゲノム (1 本鎖または 2 本鎖からなる RNA および DNA) を認識し活性化することが必須であるが、HBV は核酸センサーによる認識を回避しているとされてきた。しかし、HBV 自身が積極的に自然免疫誘導経路を阻害、抑制している可能性も否定できなかった。

申請者らは HBV と宿主自然免疫応答の相互関係を明らかにするために、初代ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系を用いて自然免疫関連遺伝子の発現を解析した。その結果、興味深いことに HBV 感染に伴って type III IFN に属する IFN- γ / 1/2/3 が弱く誘導されたのに対し、type I IFN に属する IFN- α / β は誘導されなかった。一方、HBV に対する type III IFN の抗ウイルス効果は type I よりも低いことが HBV 感染ヒト肝臓置換キメラマウスを用いた *in vivo* 感染実験から明らかとなった。したがって、HBV は自身の感染に伴う自然免疫応答のうち、抗ウイルス作用の強い type I IFN の誘導を選択的に阻害することにより持続感染状態を成立させる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、HBV による自然免疫応答回避メカニズム、すなわち核酸センサー-RLR 刺激による type I IFN 誘導に対する HBV 複製の影響を解明すること、さらに自然免疫応答回避メカニズムの解除が HBV 排除を促進する可能性を探ることを目標とした。

目的 1 HBV が核酸センサー刺激による type I IFN の誘導を阻害するメカニズムの解明

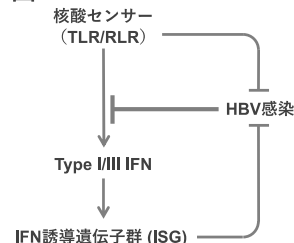
目的 2 HBV 由来分子の抑制による自然免疫応答の回復

3. 研究の方法

目的 1 HBV が核酸センサー刺激による type I IFN の誘導を阻害するメカニズムの解明

ポリイノシン酸-シチジン (polyIC) は 2 本鎖 RNA ウイルスのゲノムに類似した分子であり、リポフェクションにより肝細胞内に導入すると RLR 型核酸センサー (RIG-I、MDA5 など) を強く活性化し type I および type III IFN の産生を誘導する。Type I/III IFN により誘導された IFN 誘導遺伝子群 (ISG) は抗ウイルス作用を持ち HBV 複製を阻害する (図 1)。polyIC による type I/III IFN の誘導に対する HBV 感染の影響を検証するため、*in vitro* HBV 感染モデルとして広く利用されている Hep G2-NTCP 細胞に HBV を感染後、12 日目に polyIC を投与し、経時的に IFN および IFN 誘導遺伝子発現を解析し、非感染細胞と比較した。また polyIC のウイルス複製への影響を検証するため、上清 HBV DNA および細胞内 HBV mRNA を定量 PCR で、上清 HBs 抗原 (HBV 表面抗原) を ELISA で測定した。

図1



目的 2 HBV 由来分子の抑制による自然免疫応答の回復

HBV がコードする遺伝子が染色体に組み込まれた安定導入細胞株 Hep G2.2.15.7 では全ての細胞で HBV 由来遺伝子が発現し、常に培養上清中に HBV 感染性粒子および HBs 抗原を分泌する。Hep G2.2.15.7 に同様に polyIC を導入し、経時的に自然免疫応答関連遺伝子の発現をモニターした。HBV による type I/III IFN 誘導阻害を解除するため、polyIC 導入 24 時間前に HBV mRNA 特異的 small interference RNA (siRNA) をリポフェクションにより導入し、HBV 遺伝子発現を阻害した。

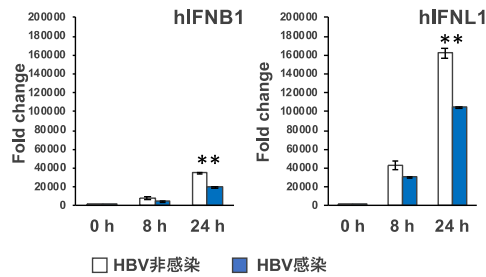
4. 研究成果

目的 1 HBV が核酸センサー刺激による type I IFN の誘導を阻害するメカニズムの解明

HBV 非感染 Hep G2-NTCP 細胞に polyIC を導入すると type I IFN 遺伝子 (hIFN β 1) が中程度、type III IFN 遺伝子 (hIFNL1) が強く誘導された (図 2, white bars)。一方、予想に反して HBV 感染細胞では type I IFN のみならず type III IFN の誘導も有意に阻害された (blue bars, **:P<0.01)。したがって、HBV 感染による RLR シグナルの阻害は type I/III IFN 双方に影響することが示唆された。

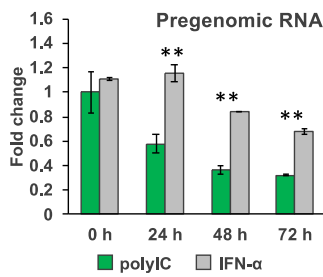
一方、type I/III IFN により誘導される ISG の発現レベルは HBV 感染の有無に関わらず差異は認められなかった (データ示さず)。

図2



HBV複製に対するpolyIC導入の影響を検証したところ、興味深いことにpolyIC導入群ではHBVゲノムの鋳型となるウイルス由来pregenomic RNA量が顕著に減少し、その効果はtype I IFNに属するIFN- β の抗ウイルス作用に比較し、有意に高かった(図3)。したがって、polyICはtype I/III IFNを介さない経路で抗ウイルス作用を発揮し、HBV複製を直接阻害できることが示唆された(図1)。

図3



目的 2 HBV由来分子の抑制による自然免疫応答の回復

HBVを強力に産生するHep G2.2.15.7細胞にpolyICを導入するとtype I IFNは全く誘導されなかったが、type III IFNは弱く誘導された(図4, white bars)。興味深いことに、HBV由来mRNAの発現を阻害するsiHBVをあらかじめ導入した群ではtype I/III IFN誘導が顕著に回復した(blue bars)。Control siRNAおよび逆転写酵素阻害剤エンテカビル処理群ではtype I/III誘導の回復は観察されなかった(gray bars, orange bars)。エンテカビルなどの逆転写酵素阻害剤は子孫ウイルスゲノム(不完全2本鎖DNA)の形成のみを阻害するが、siHBVはHBVの全ての転写産物を阻害する。したがって、HBV転写産物またはそれらにコードされるタンパクが核酸センサーによるIFN誘導を阻害していると考えられる。

図4

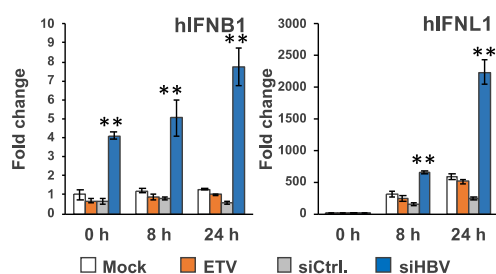
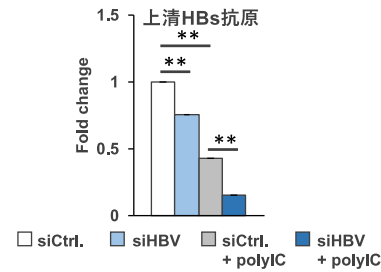


図5



一方、siHBVまたはpolyICを導入したHep G2.2.15.7細胞では培養上清中のHBs抗原がそれぞれ有意に低下したが、siHBVとpolyICを共に導入した群ではHBs抗原量がさらに顕著に低下した(図5)。

HBV持続感染による慢性B型肝炎においては免疫系が疲弊しており、ウイルスの排除が困難となっている。HBV転写産物を標的とするsiRNAなどの薬剤は感染細胞における核酸センサーによるIFN誘導能を回復しうることから、siHBVと核酸センサーアゴニスト(活性化剤)との相乗効果が期待される。

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4件)

- Enomoto Y, Takagi R, Naito Y, Kiniwa T, Tanaka Y, Hamada-Tsutsumi S, Kawano M, Matsushita S, Ochiya T, Miyajima A. Identification of the novel 3' UTR sequences of human IL-21 mRNA as potential targets of miRNAs. *Scientific Reports* 7, 1-9 (2017).
- Kato M, Hamada-Tsutsumi S, Okuse C, Sakai A, Matsumoto N, Sato M, Sato T, Arito M, Omoteyama K, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Itoh F, Sumazaki R, Tanaka Y, Yotsuyanagi H, Kato T, Kurokawa MS. Effects of vaccine-acquired polyclonal anti-HBs antibodies on the prevention of HBV infection of non-vaccine genotypes. *J. Gastroenterol.* 384, 2053-13 (2017).
- Tsuzuki Y, Watanabe T, Iio E, Fujisaki S, Ibe S, Kani S, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W, Okuse C, Okumura A, Sato Y, Tanaka Y. Virological characteristics of hepatitis B genotype G/A2 recombination virus in Japan. *Hepatol. Res.* 46, 775-83 (2015).
- 堤進、新海登、田中靖人. B型肝炎

創薬研究の最前線, 肝臓, 58, 217-227 (2017).

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Hamada-Tsutsumi, S., Naito, Y., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Watashi, K., Ochiya, T., Tanaka, Y. Screening for microRNAs to suppress hepatitis B virus replication. Poster Sessions, The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2017/10/21, Washington DC (U.S.A).
2. Hamada-Tsutsumi, S., Naito, Y., Ochiya, T., Tanaka, Y. Identification of human microRNAs as suppressors of hepatitis B virus replication. Poster Sessions, 2017 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2017/9/5, Washington DC (U.S.A).
3. 堤 進, 内藤 寛, 佐藤 精一, 高岡 晃教, 落谷 孝広, 田中 靖人. HBV 複製を抑制するヒト microRNA の同定. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会, 2017/5/18, 熊本
4. 堤 進, 飯尾 悦子, 渡邊 綱正, 村上 周子, 五十川 正記, 飯島 沙幸, 井上 貴子, 松波 加代子, 田尻 和人, 小澤 龍彦, 田中 靖人. 遺伝子型の異なる B 型肝炎ウイルス株に対するワクチン免疫後中和抗体の感染防御能の検討, 第 26 回抗ウイルス療法学会学術集会, 2016/5/15, 名古屋.
5. Hamada-Tsutsumi, S., Watanabe, T., Kawashima, K., Murakami, S., Isogawa, M., Tanaka, Y. Comparison of cytopathic and non-cytopathic antiviral effects of Interferon alpha and lambda against hepatitis B virus infection, Poster Sessions, 2015 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2015/10/4, Dolce Bad Nauheim (Germany).
6. 堤 進, 渡邊 綱正, 松波 加代子, 飯尾 悦子, 村上 周子, 飯島 沙幸, 新海 登, 松浦 健太郎, 五十川 正記, 田中 靖人. B 型肝炎に対するインターフェロン と の治療効果を規定する因子. 第 51 日本肝臓学会総会, 2015/5/21 熊本

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/labo/viro.dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 進 (Susumu Hamada-Tsutsumi)

名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 30367693

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

田中 靖人 (Yasuhiro Tanaka)

名古屋市立大学大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90336694

(4) 研究協力者

なし