

令和元年6月4日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09366

研究課題名(和文) HBV感染により誘導される肝線維化メカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism of liver fibrosis induced by HBV infection

研究代表者

飯島 沙幸 (Iijima, Sayuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00416273

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)：HBV感染による肝線維化要因の一つとして、HBVによる細胞内ストレスの上昇を仮定し *in vitro* 実験系でHBV存在下での細胞内ストレスの変動を検証した。代表的な細胞ストレスである小胞体ストレスあるいは抗酸化作用は、ウイルス量の増減と関連せず殆ど変動を示さなかった。*in vitro* ではHBVと細胞ストレスの関連性の検証は困難と思われたため、次のステップとして *in vivo* 実験系利用を試みた。肝障害コントロール群と肝障害群を非侵襲的に区別可能なマーカーを検索するため、それぞれの肝臓組織と血清サンプルを用いて糖鎖解析を行ったところ、血清サンプルデータにおいていくつかマーカー候補が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBV感染による肝線維化は細胞ストレスと密接に関与していると推測されているが、その詳細は長年の研究にもかかわらず未だに明らかになっていない。本研究は、従来までのタンパク強制発現系の結果をさらに発展させ、生理的に近い状態でのHBV感染により細胞ストレスかどうかを検証する非常に重要、かつ独創的な研究である。本研究から、肝線維化に重要な役割を果たす細胞、ウイルス因子、シグナル伝達経路が明らかになると予想される。肝線維化は肝硬変・肝癌の前段階と考えられているため、その進展の機序解明による社会的貢献は非常に多である。

研究成果の概要(英文)：As a factor of liver fibrosis caused by HBV infection, I hypothesized that intracellular stress increased by viral infection. When the fluctuation of intracellular stress in the presence of HBV was examined in an *in vitro* experimental system, the endoplasmic reticulum stress which is a typical cell stress or the antioxidant action showed little fluctuation regardless of the increase or decrease of the viral load. Since it was difficult to verify the relationship between HBV and cell stress *in vitro*, we tried to use an experimental system that could cause liver damage in an *in vivo* system as the next step. In order to search for markers that can distinguish non-invasively from control group and liver injury group, sugar chain analysis was performed using each liver tissue and serum sample. Several marker candidates were confirmed.

研究分野：ウイルス学

キーワード：線維化 HBV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性 B 型肝炎を原因とする肝癌発症患者数は HBV 感染治療法の発達した現在でも横ばい傾向で著しい改善は見られない。肝線維化は肝硬変・肝癌発症の前段階であり慢性炎症を伴う様々な疾患 (C 型肝炎、非アルコール性脂肪肝炎等) で確認され、慢性炎症に伴う肝線維化の発生・進行機序としては、(1)マクロファージ(クッパー細胞)などから産生された TGF- β などの炎症性サイトカインにより星細胞が活性化され筋繊維芽細胞へ形質転換する、(2)活性化星細胞は細胞外マトリックスであるコラーゲンの産生を誘導する、(3)(2)と同時に線維分解を担うマトリックスメタロプロテナーゼの阻害が星細胞内で起こり線維化が促進される、と考えられている。ウイルス型肝炎の治療方法の進歩により、肝線維化が可逆的な病態であることが明らかとなり、HBV 感染に関しては核酸アナログ製剤ラミブジン使用により抗線維化効果が確認されている^{1,2}。しかし核酸アナログの長期使用には高頻度な耐性変異出現(ラミブジン 1 年投与で約 20%)の問題が存在し、線維化抑制を目的として使用することは難しく、HBV 感染による肝線維化誘導の詳細解明が求められている。

HBV は感染許容細胞に限られるため実験モデルが少ないが、我々はヒト肝キメラマウス(肝実質細胞をヒト細胞と置換され、自然免疫系はマウス由来で獲得免疫系を持たない)に対し HBV をチャレンジし、感染成立とそれにより肝線維化を生じること成功している^{3,4}。肝線維化レベルは HBV 遺伝子型によって異なり、感染後 6 か月の時点でウイルス複製能の高い遺伝子型 C、B1 型プレコア変異体感染個体によって強い線維化亢進が認められ、臨床像と一致する結果となった。また線維化した肝組織では持続的(感染後 3~6 か月)かつ顕著な活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)産生が確認され、線維化亢進と ROS 産生の相関が認められた。同時に肝内遺伝子発現を qPCR 法で測定したところ、線維化亢進群の肝内 TLR4、IL-6 高発現が確認された。肝線維化に対する TLR4 シグナル経路の関与をさらに解析するため、キメラマウスに HBV をチャレンジする際に持続的に抗 TLR4 抗体を添加したところ、マウス抗 TLR4 抗体により線維化進行が抑制された。キメラマウス肝臓は肝実質細胞のみがヒト由来であるため、このことはマウス由来の非実質細胞上の TLR4 が肝線維化に重要な役割を果たしていることを示唆している。

以上の結果から、HBV 感染による肝線維化は HBV のウイルス複製そのものと、感染によって誘導される自然免疫系の関与によって誘導可能であると考えられた。さらに肝線維化が誘導される過程で ROS 産生や TLR4 シグナル経路が関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

・目的(1)細胞内での HBV のウイルス因子増加による細胞ストレス(ROS 産生・小胞体ストレス等)の誘導を検証する。

獲得免疫系の HBV の 4 遺伝子・7 つのウイルス蛋白のうち、過去に X 蛋白による ROS 産生が報告されており⁵、さらに X 遺伝子を導入した Tg マウスでは肝癌の発生が認められている⁶。しかし上記はいずれも X 蛋白を過剰発現させたものであり、生理的感染下で認められる量の X 蛋白が、同様に ROS 産生を誘導するかどうかは明らかでない。また Large S 蛋白のみの過剰発現が認められるトランスジェニックマウスでも肝癌の発生がみとめられており、これは Large S 蛋白の蓄積による小胞体ストレスが原因と考えられているが、発癌機序の詳細は明らかになっておらず、その生理的重要性も十分には検証されていない⁷。小胞体ストレス上昇は培養細胞内でウイルス産生を行った場合にも関連シャペロン Grp78 の発現上昇で確認されている⁸。本研究では、最近開発された HBV 感染培養モデルを用いて、実際に ROS 産生・小胞体ストレスが HBV 感染と、それによって生じる個々の HBV ウイルス因子[HBV DNA、HBV mRNA、ウイルス蛋白]によって誘導されるかを検討する。HBV 感染によって肝細胞内にストレスが誘導されなかった場合、HBV に感染させたこれらの肝細胞と自然免疫系細胞と共培養し、これら非実質細胞によって ROS 産生もしくは小胞体ストレスが誘導されるかを検討する。

・目的(2) HBV 感染・複製により細胞間相互作用で TLR4 シグナル経路が活性化するメカニズムを明らかにする。組織線維化と TLR4 シグナル経路に関しては、急性呼吸促進症候群による急性肺障害の際の TLR4 の関与⁹や TLR4 が肝線維化を誘導する TGF- β シグナルを増強する¹⁰等の報告があり、HBV 感染による肝線維化にも関連が強いと予想される。また TLR4 シグナル経路活性化のリガンドとしてはグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分 LPS の他、細胞内ストレスによって誘導された細胞死の結果放出される HMGB 1 等のいくつか報告されている¹¹。実験系としては HBV 感染肝細胞と自然免疫系細胞の共培養系を利用し、非実質細胞における TLR4 シグナル経路の活性化を検討する。また実際に非実質細胞の TLR4 シグナル経路を活性化させている因子(HBV 由来因子あるいは宿主側液性因子)を同定するため、薬剤添加による HBV 複製の抑制、HMGB 1 等に代表されるダメージ関連分子パターン(DAMPs)と呼ばれる分子の関与も検討する。

3. 研究の方法

(1)HBV ウイルス因子依存的な ROS 産生の検証と原因因子の特定: HBV 感染系あるいは HBV ウイルス蛋白発現系において複製量・蛋白発現量依存的な ROS 産生を確認し、さらに核酸アナログによるウイルス複製抑制、遺伝子欠損株等を用いて原因因子の絞り込みを行う。

(2) HBV 感染時の TLR4 シグナル経路活性化因子の絞り込み: HBV 感染細胞と自然免疫系細胞の

共培養下で TLR4 シグナル経路活性化細胞の同定を行う。また同じ条件下で siRNA、核酸アナログ等を添加し活性化に関与する HBV 因子を絞り込む。さらに同条件下で HBV 因子以外の活性化因子を検証するため DAMPs に注目し、培養上清中での DAMP 量経時変化・阻害剤の添加による活性化への影響等を解析する。

4. 研究成果

平成 28-29 年度：in vitro における HBV と細胞ストレスの関連性検討

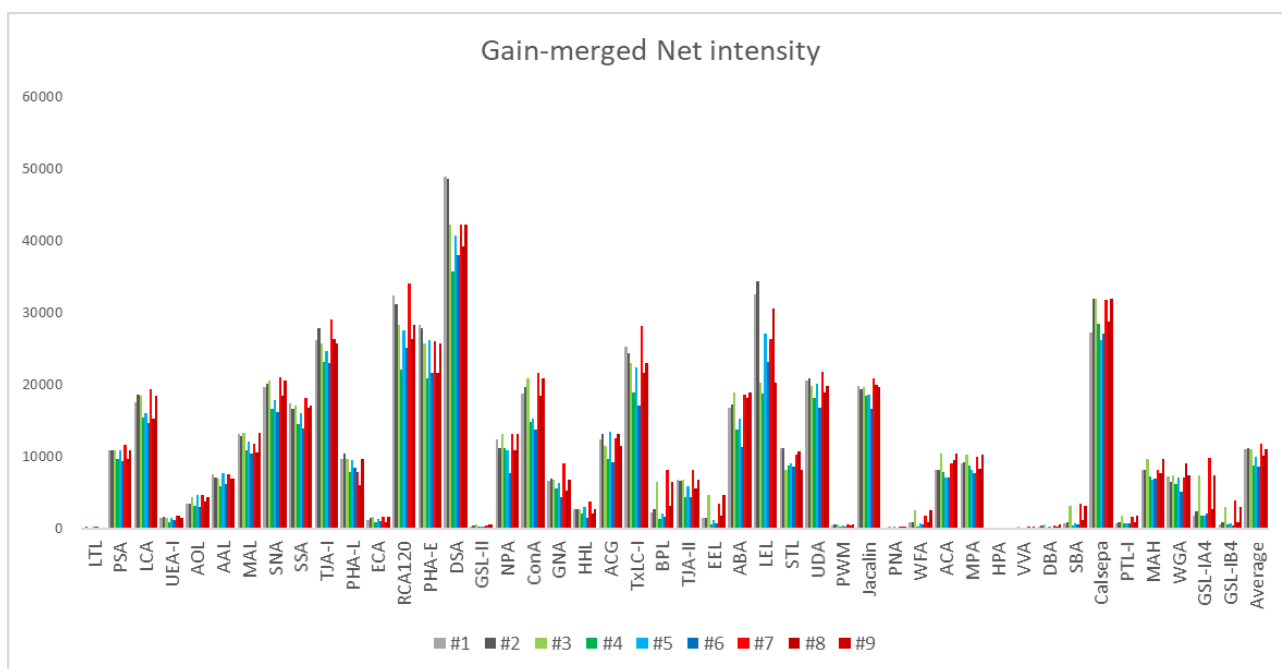
細胞培地中のテトラサイクリンの有無で HBV 産生誘導できる細胞株 HepAD38.7 を利用し、HBV 産生によって細胞内ストレスシグナルがどのように変動するか検討した。HBV 産生誘導開始からウイルス抗原量、ウイルス DNA 量を測定し HBV 産生をモニターするのと並行して、細胞ストレスの一つである小胞体ストレス関連遺伝子（PERK, ARF6, IRE1a, GRP78, eIF2a, ATF4, XBP1 等）抗活性酸産生関連遺伝子（SOD, Keap1 等）の発現量をリアルタイム PCR で測定した。ウイルス増殖は Day10 でピークに達したのに対し、Day14 までのストレス関連遺伝子の発現は殆ど変動を示さなかった。

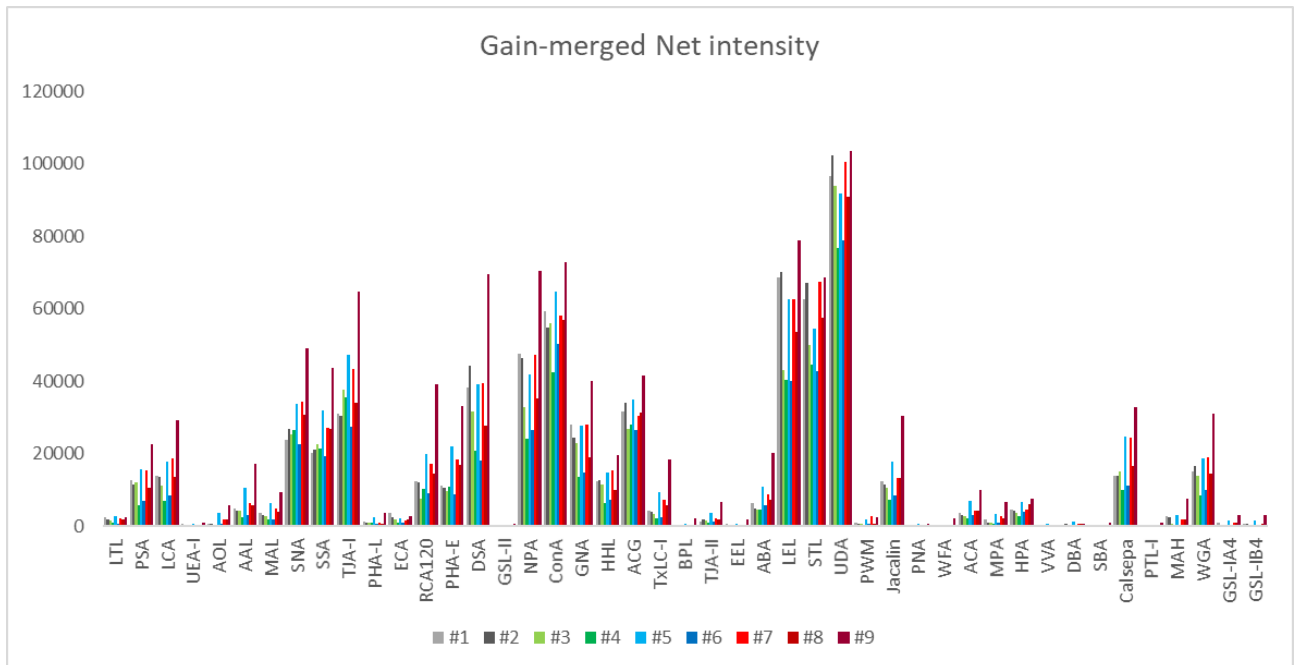
HBV産生誘導系では細胞ストレスが確認できなかったため、次にHBV持続感染系を用いて細胞ストレスが生じるか検証を行った。ヒト肝臓細胞を肝臓障害SCIDマウスに移植したヒト肝キメラマウス由来のprimary human hepatocytes:PHHに対しHBVを感染させ、長期感染状態を維持しつつ細胞ストレス関連遺伝子の変動をリアルタイムPCRで解析した。PHHにおいてDay40までウイルス抗原量、ウイルスDNA量を確認しながら感染を維持し、小胞体ストレス関連遺伝子、抗ROS産生関連遺伝子等の発現を検出したところ、殆どの遺伝子において発現の変動は見られなかった。

平成 30 年度：In vivo における肝障害誘導系の利用

ここまでの解析ではHBVと細胞内ストレスの関連性は確認できなかったため、in vitroではHBVと細胞ストレスの関連性を解析するのは困難と思われた。細胞内にHBVは存在するがその結果として細胞障害性は確認できなかったため、次のステップとしてin vivoの系において肝障害が生じうる実験系利用を試みた。マウスを用いた肝障害誘導系を利用し、さらにHBV感染を重複させて肝障害マウスを得た。まず第一に、コントロール群と肝障害群を非侵襲的に区別可能なマーカーを検索するため、肝臓組織と血清サンプルを用いてレクチンを利用した糖鎖解析(レクチンマイクロアレイ)を行った。タンパク質を抽出し、レクチンを利用した糖鎖解析方法であるレクチンマイクロアレイを行った。コントロール個体と肝臓障害が進んだ個体では、ガラクトース末端認識、ポリラクタミン認識レクチンなどに多少の差が見られたが大きな傾向の差はなかった。一方で血清サンプルの糖鎖解析データでは、肝障害群においてアセチルラクタミンやガラクトース/ギャルナック認識レクチンの差が確認され、肝障害のマーカーとして利用できる可能性が示された。今後はこの系を用いて細胞内ストレスの解析を進める予定である。

レクチンマイクロアレイ解析結果 上：血清、下：肝組織





1. Kweon et al., Journal of hepatology, 2001
2. Liaw et al., New England Journal of Medicine, 2004
3. Sugiyama et al., Gastroenterology, 2009
4. Okamoto et al., Gastroenterology, 2014
5. Seung-youn et al., Cancer letters, 2013
6. Kim et al., Nature Medicine, 1991
7. Chisari et al., Cell, 1989
8. Sugiyama et al., Hepatology, 2006
9. Imai et al., Cell, 2008
10. Seki et al., Nature Medicine, 2007
11. Wang et al., PLoS ONE, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Baudi I, Iijima S, Chin'ombe N, Mtapuri-Zinyowera S, Murakami S, Isogawa M, Hachiya A, Iwatani Y, Tanaka Y. Molecular epidemiology of co-infection with hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV) among adult patients in Harare, Zimbabwe. J. Med. Virol. (査読有) 89, 2017, 257-266. doi: 10.1002/jmv.24641.
2. Murakawa M, Asahina Y, Kawai-Kitahata F, Nakagawa M, Nitta S, Otani S, Nagata H, Kaneko S, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Iijima S, Tsuchiya K, Izumi N, Tohda S, Watanabe M. Hepatic IFNL4 expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. J. Med. Virol. (査読有) 89, 2017, 1241-1247. doi: 10.1002/jmv.24763.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 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、田中康人. 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総会 2016
2. Hayashi S, Khan AA, Ogawa K, Kawashima K, Shimons-Petrusa B, Homan CE, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Hepatocellular carcinoma-associated core N51H mutation with BCP PC mutations in HBV genotype F1b enhances infectivity and up-regulates C-myc and GAB2. AASLD2016.

〔図書〕(計 1 件)

田中靖人、飯島沙幸. 南山堂「知っておきたい C 型肝炎と C 型肝炎ウイルス (HCV)」2016. 220 ページ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。