

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19324

研究課題名(和文)HBV感染における自然免疫系センサー分子の探索

研究課題名(英文)Research for innate immune system sensor molecules in HBV infection

研究代表者

中井 正人(NAKAI, MASATO)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40756003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HBV急性感染時のHBV-DNAに対する核酸認識や自然免疫機構は不明な点が多く、慢性感染では免疫寛容状態が成立し、HBV完全閉鎖2本鎖DNAが核内に残存し完全排除は困難である。本研究では細胞内DNAセンサー分子のHBV感染、HBV-DNA複製に対する影響と免疫応答に関して検討した。DNAセンサー分子のうち、特にDDX41に着目し、各種肝細胞株における発現を解析した。DDX41を恒常的ノックダウンしたNTCP-C4-HepG2細胞を作成し、HBVウイルス感染を行った場合、HBV-DNA, RNAがコントロールと比較して早期に増加した。DDX41がHBVの増殖を肝細胞内にて抑制する結果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVの完全な排除はまだ臨床的に達成されていないこと、その自然免疫応答はまだまだ理解されていない点が多い。本研究ではDDX41分子がHBV感染に関与していることが示唆されるデータを得られている。DDX41のHBV感染に関する報告は多くないため、本研究をさらに進めることで、HBV感染へのDDX41の関与を明らかにし、自然免疫応答やウイルス排除へのさらなる知見の蓄積が可能となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In acute HBV infection phase, it takes time for the virus to grow and liver damage to appear, but the nucleic acid recognition for HBV-DNA and mechanism of innate immunity during that period are not well understood. In chronic HBV infection, immunologically tolerated state is established, and complete elimination of the virus is difficult because HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) remains in the nucleus for life. Based on the above, the purpose of this study was to investigate the role of intracellular DNA sensor molecules in HBV infection, the effect on HBV-DNA replication, and the immune response. Focusing on various DNA sensor molecules, especially DDX41, we analyzed the expression in various hepatocyte cell lines, In NTCP-C4-HepG2 cells in which DDX41 was constitutively knocked down, HBV-DNA and RNA increased in an early stage compared with the control. This results suggested that DDX41 suppresses HBV proliferation in hepatocytes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：B型肝炎ウイルス DNAセンサー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中で約2億人にのぼる感染者が存在するが臨床的に排除が可能になった。一方、HBVは世界中で約4億人が、我が国においては100万人以上が持続感染しているとされる。成人HBV感染では急性感染を来した数%程度が持続感染へと移行する。これらウイルス肝炎は慢性肝炎から肝硬変へと病態が進展し、肝硬変では年率7-8%の割合で肝細胞癌を発症する重大な健康問題である。

HBV持続感染においては免疫寛容状態の成立がみられるとともに、cccDNAが核内に生涯残存するためウイルス排除を得ることが困難とされる。これに関連して、近年免疫抑制剤や抗癌剤によるHBV再活性化が大きな問題となっている。ヒトおよび動物モデルにおいてHBV初期感染後、血中にHBV-DNAやHBs抗原などのウイルス蛋白が検出されるようになるまでに数週間のタイムラグがあることが知られている(文献1)。実際に培養細胞系を用いたHBV感染実験を行った場合も、肝細胞株のみを用いた*in vitro*の系であるにもかかわらず、HBVの複製増殖までに約12-15日程度を要する(文献2)。以上の事実より、HBVが感染した後、十分に肝細胞内で増殖するのに時間を要するというを示唆しており、HBV増殖を肝細胞内の自然免疫系が感知し、抑制している可能性が考えられる。一般に自然免疫応答は、外来生物の核酸や蛋白などを、パターン認識レセプターが認識することで始動される。各種核酸に対するこれまでに知られているDNA/RNAセンサーを表1に示す。これらのうち、どの分子がHBV感染の初期段階において働くかは十分に解明されていない。文献的にLuらはMDA5がHBV-RNAを認識し、HBV複製の制御にかかわっていると報告している(文献3)。また、SatoらはRIG-IがHBVのRNAを認識しIFN- λ 産生のトリガーとなると報告をしている(文献4)。これらは、HBVの複製課程におけるmRNAを、RNAセンサーが認識するという報告である。一方、HBVはDNAウイルスであり、細胞内への感染後、細胞質内のDNAセンサーが免疫応答に関与することが予想される。しかし文献1ではIFI16やcGUSの2種類のDNAセンサーによるHBV-DNA認識については否定的と報告されている。その他DNAセンサーに関しての報告はこれまで無く、HBVに対する初期自然免疫応答を理解する上で、これらDNAセンサーの関与を検討することは重要な課題であると考えられる。また、これまでHCVに対する核酸認識・自然免疫の研究において、HCV自体のNS3-4Aプロテアーゼが宿主のMAVSやRipletなどの蛋白を切断することによりI型IFN産生が抑制されることが明らかになっている(文献5,6)。チンパンジーを用いた感染実験では、HCVが感染初期に様々なIFN関連遺伝子(ISGs)の発現を肝細胞において誘導するのに対し、HBV感染初期においてはこのようなISGsの発現応答が認められないことが報告されている(文献7)。これらの報告より、HBV初期感染においてはHBVに対する自然免疫応答は抑制されており、HCVと同様にHBVが自然免疫応答誘導回避のための何らかの対抗手段を用いていることが示唆される。

DDX41はATP依存性RNAヘリカーゼの1つでありDEAD-box-polypeptideである。DDX41はマウスのmDCにおいて細胞質DNAセンサーとして働くことが報告され(文献8)、肝細胞にも豊富に発現しているとされる。DDX41がDNAセンサーとして機能するとSTINGを介してI型IFN産生を誘導することが報告されており、RNAヘリカーゼとしての機能に加え(文献9)、細胞質内においてHBVのDNAおよびRNA認識に働くことが予想される。このDDX41を中心に各種DNAセンサーのHBV感染およびHBVに対する自然免疫機構を本研究で解明が求められる。

2. 研究の目的

HBV感染初期および持続感染時に作動するDNAセンサーとして、DDX41(DEAD-box polypeptide41)に特に着目し、DDX41のHBV-DNA認識およびHBV複製にかかわる機能について解析し、HBV感染に及ぼす影響と、HBVに対する自然免疫機能を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1)各種肝細胞株におけるDDX41発現の評価：各種肝細胞株におけるDDX41の発現を調べ、実験に用いるべき肝細胞株を決定する。

(2)安定的なHBV感染ウイルスの作成と、コントロール細胞(HepG2-C4：HepG2細胞)への感染実験によるHBV感染実験系の確立を行う。HBV複製は上清中のHBs抗原の測定(CLIA法)、細胞内のHBV-DNA/RNAの測定(RT-PCR法)、anti-HBc抗体を用いた免疫染色にて評価する。

(3)HBVのウイルス粒子感染実験を施行するための細胞作製

HBVは肝細胞株(NTCP-HepG2-C4：HepG2細胞にHBV受容体であるNTCP強制発現細胞)に感染させた場合、HBs抗原増加などの感染を検出できるまでに12-15日程度を要する。そのため感染実験においては、各種分子の強制発現やknock downはトランスフェクション等を用いた一時的なものではなく、恒常的な発現やknock downとする必要があるため、以下の細胞を作成する。

肝細胞に発現しDDX4恒常発現細胞株をレンチウイルスを用いて、恒常的ノックダウン細胞をshRNAを用いて作成する。

HBV のエントリーレセプターとして報告されている NTCP を恒常発現する肝細胞株である NTCP-HepG2-C4 細胞に対して、上記で作成したレンチウイルスを感染し、各種 DNA センサーの恒常的強制発現細胞、Knock down 細胞を作成する。

HBV 持続産生細胞である HepAD38.7 に各種 DNA センサーに対する shRNA を含むレンチウイルスを、また各種 DNA センサーを、持続的強制発現細胞を作成するために、293T 細胞を用いてレンチウイルスを作成する。これらのレンチウイルスを上記の HepAD38.7 細胞に感染させることで、恒常的な DNA センサー強制発現細胞、knock down 細胞を作成する。

(4) NTCP-HepG2-C4 細胞における HBV 感染時の DDX41 の HBV ウイルス粒子感染への影響解析

NTCP-HepG2-C4 細胞を用いて、各種 DNA センサーを恒常的発現させた場合と knock down した状態で、HepG2.2.15.7 もしくは HepAD38.7 由来の HBV 感染を行い、感染実験を行う。上記細胞に HBV を感染させた後、3,6,9,12,15 日後における細胞内の HBV-DNA、HBV-RNA、HBc 抗原、上清中の HBs 抗原を RT-qPCR 法、Western blot 法、免疫染色、ELISA を用いて経時的に測定し、各種 DNA センサーの HBV 感染系における影響を検討する。

(5) HBV 持続産生細胞における DDX41 の HBV 産生への影響解析

HepAD38.7 細胞を用いて作成した細胞株を用いて、各種 DNA センサーを恒常的発現させた場合と knock down した場合における HBV 複製・HBV 粒子放出・HBs 抗原産生等に関して、RT-qPCR 法、ELISA 法、免疫染色法を用いて評価する。HepAD38.7 細胞は Tet-off にて HBV 複製が指導する細胞であり、この特徴を利用して HBV 複製開始からの HBV 遺伝子増幅や蛋白発現を評価する

(6) HBV 感染細胞 (NTCP-HepG2-C4 および HepAD38.7) での Type I IFN および Type III IFN 産生やサイトカイン産生について RT-qPCR 法、Western blot 法、ELISA 法、CBA アッセイで評価する。

4. 研究成果

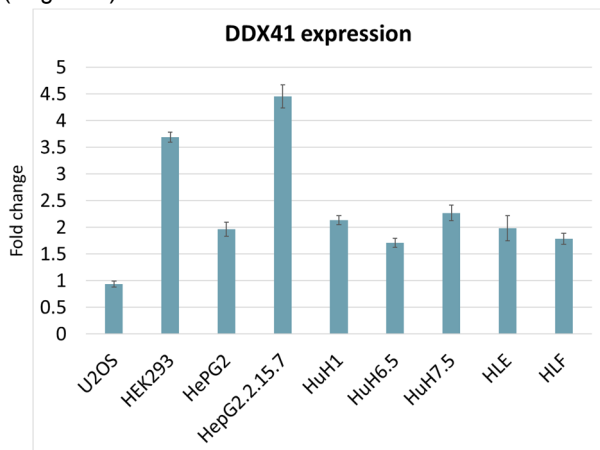
(1) 各肝細胞株における DDX41 の発現の多寡の評価

種々の肝細胞株各種肝細胞株 (HepG2, HepG2.2.15.7, HuH1, HuH6.5, HuH7.5, HLE, HLF) および HEK293 から cDNA 合成を行い、定量 PCR 法にて各種 DNA センサー分子 (DDX41, MAVS, STING, cGUS, DAI など) の発現を評価した。(特に、DNA センサー分子として DDX41 分子に着目し、この発現の多寡を定量 PCR 法にて確認した。) コントロールと比較して、各肝細胞 (HepG2, HepG2.2.15.7, HuH1, HuH6.5, HuH7.5, HLE, HLF) において DDX41 の発現は有意に高く、特に HepG2.2.15.7 細胞では多い結果であった。(Figure1)

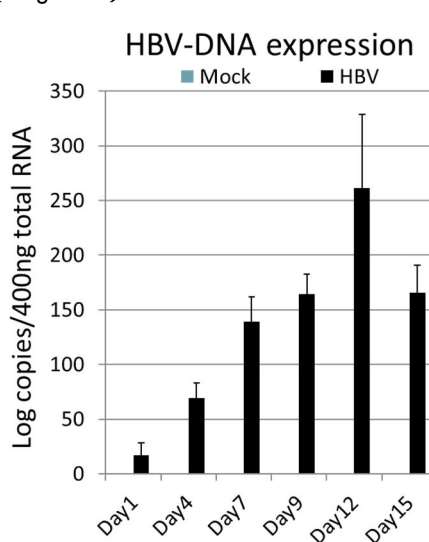
(2) HBV 感染実験系の確立

HepG2.2.15.7 細胞、HepAD38.7 細胞の上清から作成した感染実験用の HBV ウイルス濃縮液を用いて、HBV 感染許容細胞株である NTCP-HepG2-C4 細胞株へ感染実験を行い、HBV-DNA および HBV-RNA を定量 PCR で測定し感染性を確認した(Figure2)。

(Figure1)



(Figure2)



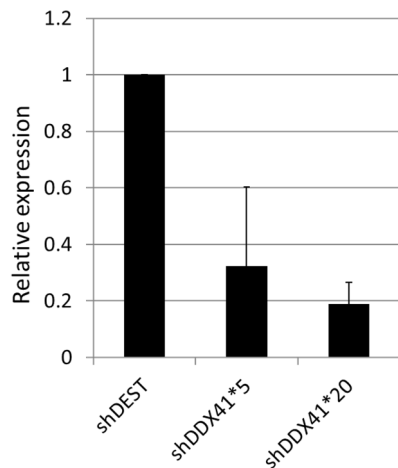
(3) 恒常的 DDX41 Knockdown 細胞の樹立

また、恒常的な DNA センサー分子をノックダウンした細胞株として、DDX41 に対する shRNA を含むレンチウイルスを作成し、HepG2 細胞株および NTCP-HepG2-C4 細胞株に対して感染させ、恒常的な DDX41 ノックダウン細胞株を作成した(Figure3)

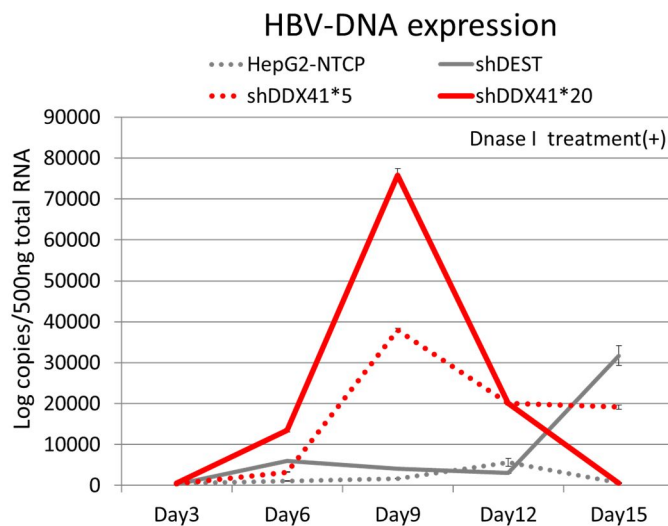
(4) 恒常的 DDX41 Knockdown 細胞における HBV 感染実験

上記 HBV ウイルスを用いて感染実験を行うと、DDX41 の恒常的ノックアウト NTCP-C4-HepG2 細胞においては、非ノックアウト NTCP-C4-HepG2 細胞と比較し、HBV-RNA・DNA が、HBV 感染暴露後により早く、かつ 2 倍程度高値に増加していた (Figure4)

(Figure3)



(Figure4)



本研究では上記結果を得ることができた。

現在、方法(5)(6)の実験を遂行中である。今後、DDX41 の HBV 産生に与える影響、HBV 感染細胞における免疫応答に関してさらに解析を行う予定である。

HBV の完全な排除はまだ臨床的に達成されていないこと、その自然免疫応答はいまだ理解されていない点が多い。本研究では DDX41 分子が HBV 感染に関与していることが示唆されるデータを得られている。DDX41 の HBV 感染についての報告は多くないため、本研究をさらに進めることで、HBV 感染への DDX41 の関与を明らかにし、自然免疫応答やウイルス排除へのさらなる知見の蓄積が可能となる可能性がある。

<参考文献>

1. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*. 1999; 284 (5415) :825-829
2. Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, et al. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(3):808-13.
3. Hsin-Lin Lu , Fang Liao. Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Senses Hepatitis B Virus and Activates Innate Immune Signaling To Suppress Virus Replication. *J Immunol*. 2013; 191 3264-3276.
4. Sato S, Li K, Kameyama T, et al. Article The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity*. 2015;42(1):123-132.
5. Li XD, Sun L, Seth RB, et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102 (49):17717-17722.
6. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, et al. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host Microbe*. 2010; 8(6) :396-509.
7. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(24):15669-15674.
8. Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1155-61.
9. Lee K-G, Kim SS-Y, Kui L, et al. Bruton's Tyrosine Kinase Phosphorylates DDX41 and Activates Its Binding of dsDNA and STING to Initiate Type 1 Interferon Response. *Cell Rep*. 2015:1055-1065.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawagishi N., Suda G., Onozawa M., Kimura M., Maehara O., Ohara M., Izumi T., Uemura M., Ito J., Nakai M., Sho T., Natsuizaka M., Morikawa K., Ogawa K., Sakamoto N.	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 1098 ~ 1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.12737	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 Suzuki Kazuharu, Suda Goki, Yamamoto Yoshiya, Furuya Ken, Baba Masaru, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Shimazaki Tomoe, Yamamoto Koji, Shigesawa Taku, Nakamura Akihisa, Ohara Masatsugu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuizaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya, for the NORTE Study Group	4. 巻 49
2. 論文標題 Entecavir treatment of hepatitis B virus infected patients with severe renal impairment and those on hemodialysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13399	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 Nakai Masato, Ogawa Koji, Takeda Rei, Ohara Masatsugu, Kawagishi Naoki, Izumi Takaaki, Uemura Machiko, Ito Jun, Sho Takuya, Suda Goki, Morikawa Kenichi, Sakamoto Naoya	4. 巻 48
2. 論文標題 Increased serum C-reactive protein and decreased urinary aquaporin 2 levels are predictive of the efficacy of tolvaptan in patients with liver cirrhosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 E311 ~ E319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.12988	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 Kawagishi N., Suda G., Onozawa M., Kimura M., Maehara O., Ohara M., Izumi T., Uemura M., Ito J., Nakai M., Sho T., Natsuizaka M., Morikawa K., Ogawa K., Sakamoto N.	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatology	6. 最初と最後の頁 1098 ~ 1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.12737	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----