

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19360

研究課題名(和文)核酸アナログ投与によるB型肝炎鎮静化及びHBs抗原排除の機序解明

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of ameliorated liver disease and HBs antigen elimination by nucleos(t)ide analogs in chronic hepatitis B patients

研究代表者

林 佐奈衣 (HAYASHI, Sanae)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10597587

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)：in vitro試験によりNK細胞の特徴づけを行った結果、CD56bright+TRAIL+NK細胞は量依存的に肝細胞障害を誘発すること、HBV感染肝細胞とCD56bright+TRAIL+NK細胞の共培養は、CD56bright+TRAIL+NK細胞の走化を促進することを見出した。さらに性・年齢をマッチさせたB型慢性肝炎患者において、核酸アナログ(ETVもしくはTDF)投薬前後の血清中に含まれるIP10の変動を解析した。その結果、TDF投薬患者では血清IP10量は投与前と比較して投薬後12、24週で低下したが、ETV投薬患者では有意な減少を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In vitro study revealed that CD56bright+TRAIL+ NK cells induce hepatocyte damage in a dose dependent manner, and that HBV infected hepatocytes cocultured with CD56bright+TRAIL+ NK cells promote the chemotaxis of the CD56bright+TRAIL+ NK cells. In an age and gender-matched case study, we analyzed the dynamic changes of an inflammatory cytokine, IP10, in the sera of chronic HBV patients before and after NAs treatment (ETV or TDF). After 12 and 24 weeks of NAs treatment, serum IP10 level was decreased in chronic HBV patients treated with TDF. No significant change was observed in patients treated with ETV.

研究分野：医歯薬学

キーワード：B型肝炎ウイルス 核酸アナログ NK細胞 肝障害 免疫 炎症

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は、垂直感染・水平感染を介してキャリア化する世界規模の感染症である。HBV 持続感染者の自然経過は、HBV の DNA 量・抗原量と宿主免疫応答により分類され (B型肝炎治療ガイドライン、日本肝臓学会、2015)、感染初期の免疫寛容期では HBV 感染者は無症候キャリアとして存在するが、免疫応答期以降で肝細胞傷害や炎症を伴う。B 型急性肝炎患者におけるウイルス排除と肝炎惹起は、主に **活性 CD8T 細胞により誘導されるが** (Chisari FV, Ferrari C. et al. Ann.Rev.Immunol. 1995)、B 型慢性肝炎患者においては、肝臓内の HBV 特異的 CD8+T 細胞数と肝障害の程度は必ずしも一致しない (Maini M, Bertoletti A. et al. J.Exp.Med. 2000)。一方で、NK 細胞の活性化が慢性肝炎患者における肝障害の程度と相関するということが、NK 細胞が TRAIL を介してアポトーシスを誘発することが報告された (Dunn C, Maini M. et al. J.Exp.Med. 2007)。最近では、核酸アナログ (NAs) 治療による ALT 値の改善に伴い、NK 細胞が活性化型から非活性化型へと移行することが報告されたが (Boni C, Ferrari C. et al. Hepatology. 2015)、これらの詳細な機序は明らかとなっておらず、NK 細胞が実際に肝障害を誘導している証拠はない。

B 型肝炎に対する治療は HBs 抗原の消失を最終目標とするが (Takamatsu Y, Tanaka Y, Hayashi S. et al. Hepatology. 2015)、NAs・エンテカビル (ETV) による HBs 抗原の陰性化は年率 1%と極めて低率である。近年、HBe 抗原陽性・陰性例に対して NAs・テノホビル (TDF) 治療を行った結果、HBe 抗原陽性例でのみ HBs 抗原を消失させることが示されている (Heathcote E, Rousseau F. et al. Gastroenterology. 2011)。このような現象は、現在主に使用されている ETV では認められておらず、TDF で特異的である。**HBs 抗原の消失には免疫応答の賦活化が必須**とされており、以上の結果は TDF と HBe 抗原が何らかの機序で免疫応答を活性化することを示唆している。このメカニズムを明らかにすることは、HBV 治療の短期化、NAs 耐性変異の獲得症例の低減、さらには変異を獲得した治療不応例にも有効な治療法の開発の糸口となる (Hayashi S, Isogawa M, Tanaka Y. et al. J. Hepatol. 2015)。

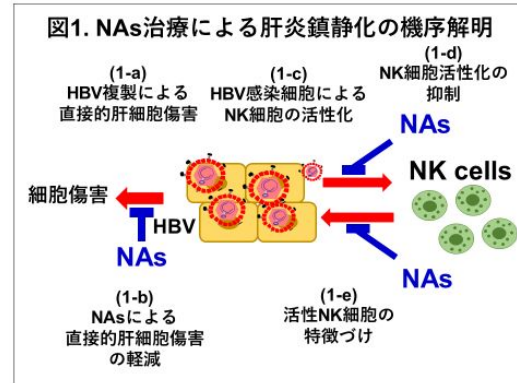
2. 研究の目的

HBV は急性・慢性肝炎の原因となり、慢性肝炎患者の多くは未治療の場合に高率に肝硬変や肝癌へと進展する。NAs は HBV の DNA 複製を阻害し、肝障害を軽減させ予後を改善することで知られるが、NAs 投与による肝障害軽減の機序は明らかになっていない。一方で 2014 年に認可された TDF は、HBe 抗原陽性例に対して HBs 抗原をも消失させる副次的効果を示すことが報告されているが、詳細な機序

は不明である。そこで本研究では、1) NAs 投与による肝細胞傷害抑制機序を同定し、さらに 2) HBs 抗原の消失に關与する免疫学的機序を解明する。本研究より、**宿主因子を活用した新たな HBV 治療戦略の方向性を決定するための情報が得られることが期待される。**

3. 研究の方法

目的 1: NAs 治療による肝炎鎮静化の機序解明 (図 1)



(1-a) HBV 感染自体が、感染肝細胞に対して直接的な細胞傷害を誘導するかを明らかにし、(1-b) その細胞傷害が NAs 投与により軽減するかを検討した: HBV の感染自体が肝細胞傷害を誘導するかを検討するため、HBV を HepG2-NTCP 細胞させ培養上清中の lactate dehydrogenase (LDH) 値を測定した。細胞外 HBV DNA レベルを RT-PCR 法、各 HBV 抗原分泌レベルを化学発光法により解析した。また、HBV 感染細胞へ NAs を添加し、肝細胞傷害が軽減するかを検討した。(1-c) HBV 感染細胞が NK 細胞を活性化させるかを解析し、(1-d) NAs 投与によりその活性が抑制されるかを検討した: 健常末梢血から、密度勾配遠心分離法により単核細胞を分離し、NK 細胞を磁気細胞分離法により単離した。HBV を感染させた HepG2-NTCP 細胞と NK 細胞を共培養し、活性化マーカー CD56 および細胞傷害能を司る TRAIL の発現をフローサイトメトリーで評価した。(1-e) B 型慢性肝炎患者で認められる活性型 NK 細胞を樹立し、特徴づけを行った: 健常人より単離した NK 細胞を IL-2 により活性化させ活性型 CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK 細胞を誘導した。HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞と活性型 CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK 細胞と共培養し (1:1-10)、肝細胞傷害の程度を検討した。走化能を評価する Trans-well を用いて、活性型 CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK 細胞と HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞の共培養が、活性型 CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK 細胞の集積に寄与するかを検討した。

目的 2: TDF 治療による HBs 抗原消失の機序解明

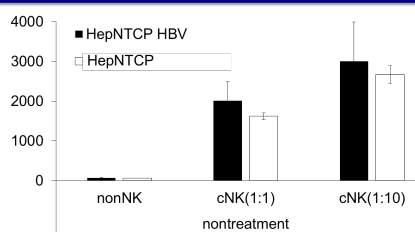
2014年にB型慢性肝炎治療への保険適応が認可されたTDF投与例で認められるHBs抗原の陰性化がHBe抗原陽性例でのみ起こるということに着目し、NAs治療に介入した臨床検体を用いて炎症性サイトカインの変動を検討した。NAs (ETVもしくはTDF)投薬前後のB型慢性肝炎患者に含まれる血清中サイトカインをBio-Plex200により評価した。対象はALT量>90 U/L、HBVDNA量>6 log copies/mL、HBe抗原陽性のNAs治療対象患者 (n=14) (18.5±11.4才)、男/女=9/5)とし、性年齢をマッチさせたETV単独治療者(以下、ETV群) (n=9) (43.0±13.0才、男/女=6/3)もしくはTDF単独治療者(以下、TDF群)(n=5) (42.0±8.1才、男/女=3/2)に対する、NAs投与前、投与12週、48週後の血清サイトカインの変動を検討した。

4. 研究成果

目的1: NAs治療による肝炎鎮静化の機序解明

1-a, bの結果、HBV感染自体が感染肝細胞に対して直接的な細胞傷害を誘導しないこと、またNAsにより差がないことが確認された。1-c, dの結果、HBV感染自体が慢性肝炎患者で認められるCD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞を直接誘導しないことが確認された。慢性肝炎患者においてCD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞は肝障害 (ALT値)の程度と相関し、NAs治療後に肝臓中のCD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞数が減少する。以上の臨床背景に基づき、CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞に着目して*in vitro*評価による特徴づけを行った。1-eの結果、CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞は量依存的、HBV非特異的に肝障害を誘発することが明らかとなった(図2)。

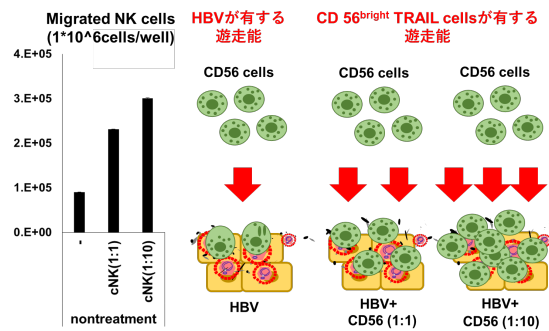
図2 CD56^{bright}+TRAIL⁺細胞は量依存的に肝障害を誘発



次に、CD56^{bright}+NK細胞はB型慢性肝炎患者の肝臓で特異的に集積するという報告より、CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞の走化能を評価した。CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞とHBV感染肝細胞を共培養した培養上清をTrans-wellのlower wellへ、CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞をupper wellへ添加した結果、CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞はHBV単独培養上清と比較して、CD56^{bright}+TRAIL⁺細胞を含む培養上清において走化を亢進した(図3)。この結果は、慢性肝炎においてCD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞が肝障害に寄与する可

能性を示唆するものであるが、一方で、NAsがCD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞による肝障害を直接的に抑制する可能性を見出すことができなかった。引き続き、CD56^{bright}+TRAIL⁺ NK細胞の活性を誘発する宿主因子の同定を目指し、追加解析を行う。

図3 CD56^{bright}+TRAIL⁺細胞はHBV+CD56^{bright}+TRAIL⁺細胞に対して走化亢進



目的2: TDF治療によるHBs抗原消失の機序解明

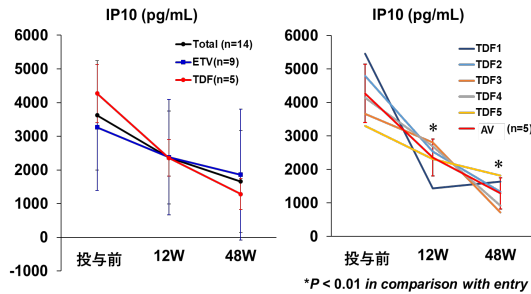
NAs治療と炎症性サイトカインの関係性を明らかにするために、ALT値>90 U/L、HBVDNA値>6 log copies/mL、HBe抗原陽性のNAs治療対象患者のNAs治療対象患者 (n=14)のうち、性年齢をマッチさせたETV群 (n=9)もしくはTDF群 (n=5)に対して、NAs投与前、投与12週、48週後の血清サイトカインの変動を検討した。治療前のHBVDNA量はETV群:8.5±0.8 log copies/mL、TDF群:8.3±0.7 log copies/mL (p=0.347)、ALT値はETV群:134.0±205.5 U/L、TDF群:177.0±49.4 U/L (p=0.576)で差は認められなかった(図4)。

図4 B型慢性肝炎患者のNAs前基礎データ

Characteristics	Total, n=14	ETV, n=9	TDF, n=5	p
Ages	38.5±11.4 (26-66)	43.0±13.0 (26-66)	42.0±8.1 (30-50)	0.513
Male, n (%)	9 (64.3%)	6 (66.7%)	3 (60%)	1
HBeAg positive, n (%)	14 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	1
HBVDNA (log copies/mL)	8.5±0.8 (6.7-9.6)	8.7±0.9 (6.7-9.6)	8.3±0.7 (7.3-9.1)	0.347
ALT	155.5±168.7 (90-674)	134.0±205.5 (90-674)	177.0±49.4 (91-208)	0.576

NAs投与前、12週、24週の血清サイトカインの変動を解析した結果、TDF投薬患者では血清IP10量は投与前と比較して投薬後12、24週で低下したが (p>0.001)、ETV投薬患者では有意な減少を認めなかった(図5)。2014年に認可されたNAs・テノホビル (TDF)は血清HBVDNAを低下させるだけでなく、HBe抗原陽性例に対してはHBs抗原をも消失させる副次的効果を示すことが報告されているが、詳細な機序は不明である。今後は症例を増やし、肝障害の改善および治療応答に与える影響を検討する。

図5 TDF投薬により血清IP10値は有意に低下



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)

[学会発表](計 7 件)

鎌田伸好, 林佐奈衣, 熊本浩樹, 服部真一郎, 橋本麻衣, 林宏典, 松田幸樹, 青木学, 前田賢次, 小田切優樹, 田中靖人, 満屋裕明. 新規抗HBV薬候補化合物CFCPの*in vitro*ウイルス学・細胞生物学的特性. 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. 2017.

林佐奈衣, 鎌田伸好, 熊本浩樹, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正記, 前田賢次, 満屋裕明, 田中靖人. Entecavirよりも持続的かつ強力に抗HBV活性を有する新規核酸アナログCFCPの同定. 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. 2017.

苫谷晃太, 大野裕太郎, 杉原匠, 山田浩平, 鎌田伸好, 林佐奈衣, 村上周子, 前田賢次, 田中靖人, 満屋裕明. 新規4'-置換-7-デアザプリンヌクレオシド類の合成と抗HBV活性評価. 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. 2017.

Higashi-kuwata N, Hayashi S, Kumamoto H, Kohgo S, Das D, Bulut H, Sarafianos S, Tanaka Y, Mitsuya H. Novel Nucleosides, CMCP and CFCP, Potently Block the Infectivity and Replication of Wild-type and Drug-resistant HBVs in Culture and in Human-liver-chimeric Mice and Show Potential QW or Q2W. HEP DART. 2017.

Sanae Hayashi, Yuki Takamatsu, Kenji Maeda, Shuko Murakami, Katsumi Omagari, Takeshi Matsui, Masanori Isogawa, Tsunamasa Watanabe, Yoshiyasu Karino, Satoru Kohgo, Hiroaki Mitsuya, Yasuhito Tanaka. Novel 4'-modified nucleoside analogs exert antiviral replication against hepatitis B virus with drug resistance mutations. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2016.

林佐奈衣, 前田賢次, 高松悠樹, 向後悟, 鎌田伸好, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正記, 満屋裕明, 田中靖人. 新規核酸アナログSK15-146は薬剤耐性HBV変異株に対して有効である. 第26回抗ウイルス療法学会総会. 2016.

Sanae Hayashi, Yuki Takamatsu, Kenji Maeda, Shuko Murakami, Katsumi Omagari, Takeshi Matsui, Masanori Isogawa, Tsunamasa Watanabe, Yoshiyasu Karino, Satoru Kohgo, Hiroaki Mitsuya, Yasuhito Tanaka. Novel 4'-modified nucleoside analogs, CAdA and CdG, strongly suppress the replication of wild-type hepatitis B virus and drug-resistant mutants. 2016 International HBV Meeting-Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 佐奈衣 (HAYASHI, Sanae)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 10597587

(2) 研究協力者

五十川 正記 (ISOGAWA, Masanori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

田中 靖人 (TANAKA, Yasuhito)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授