

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15709

研究課題名(和文) エキソソームを介したB型肝炎ウイルスの新規感染経路の解析

研究課題名(英文) Characterization of HBV infection mediated by extracellular vesicles

研究代表者

真田 崇弘 (SANADA, Takahiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：60721272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HBV感染個体におけるエキソソームの解析を行った。HBV感染ヒト肝臓置換キメラマウスの血清中に含まれるエキソソーム(HBV-Exo)よりウイルスの遺伝子が検出された。さらにHBV-Exoは肝細胞に接着することが明らかとなった。またHBV-ExoはHBVに対する中和抗体に対して抵抗性を有することが明らかとなった。続いてエキソソームを介したHBV感染を防止すべく、細胞性免疫を誘導する新規予防ワクチンの開発を試みた。HBs-LとHBcをカルボキシポリマー基剤と鼻粘膜に投与することで強い細胞性免疫応答・液性免疫応答を誘導することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エキソソームがHBVの産生機構および感染機構に関与していることが示唆された。本研究をさらに進めていくことで、現在問題となっているワクチン接種者でのHBV感染のメカニズムの解明につながっていくものと考えられる。また細胞性免疫を効率的に誘導できる免疫法に関して、基礎的なデータを得ることができた。本研究によって得られたデータは、エキソソームを介した感染を防御できる予防法の構築につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the extracellular vesicle (EV)-mediated transmission of hepatitis B virus (HBV) infection. Purified EVs from sera of HBV-infected chimeric mice with human liver contain viral DNA and to be capable of transmitting HBV DNA to naive hepatocytes. These HBV-DNA transmitting EVs were resistant to antibody neutralization. To establish a protective vaccine which can block HBV infection via EVs, we evaluated the effects of intranasal vaccination with HBs and HBc. Intranasal immunization with HBs-L and HBc formulated with CVP strongly induced cellular and humoral immune responses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV エキソソーム

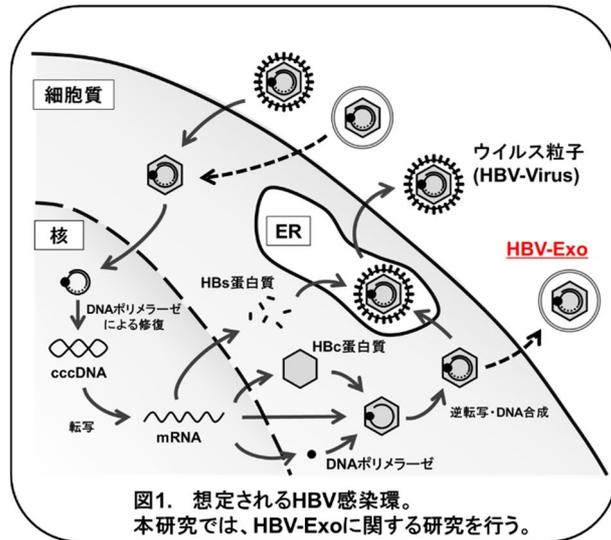
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は、ヒトに持続感染することで、慢性的な肝炎を引き起こし、やがては肝硬変・肝細胞癌を引き起こす。全世界において約3億5千万人も慢性HBV感染者がいると考えられており、公衆衛生学上重要な問題となっている。HBV感染に対する予防ワクチンは既に存在しているものの、ワクチン接種者がHBVに感染する事例が報告されていることから、ワクチンを回避するメカニズムの存在が示唆されており、本機構の解明および対策は急務となっている。

先の研究において、HBVを感染させたヒト初代培養肝細胞の培養上清より分離したエキソソーム(HBV-Exo)には、HBV-DNAが存在していることが示された。またエキソソームのマーカー蛋白質であるCD81およびHBVの各種ウイルス蛋白質に対する抗体で免疫染色を行い、超高解像度顕微鏡であるSTED顕微鏡により観察を行ったところ、HBc(ウイルスのコア粒子)蛋白質とCD81の共局在が観察された。

以上の結果から、エキソソームにはHBV-DNAを伴うコア粒子が内包されていると考えられた。さらに、HBV-Exoをヒト初代培養肝細胞に接種したところ、細胞へのウイルスの感染および複製が確認され、HBV-Exoが感染性を有していることが示された。またHBVワクチンの免疫原となっているHBsに対する抗体を用いてHBV-Exoの中和試験を行ったところ、ウイルスは中和されるのに対して、HBV-Exoは有意に抵抗性を示した。



これらの結果から、これまで考えられていたHBVの産生・感染経路とは別に、エキソソームを介したHBV産生・感染経路が見出された(図1)。本研究では、細胞系およびモデル動物を用いて、エキソソームを介したHBV感染に関する全体像の解明を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、HBVの新たな産生経路、侵入経路としてエキソソームに着目し、HBV-Exoの性状を明らかにする。さらに、HBV感染モデル動物を用いて、HBV-Exo感染に対する抗HBV抗体の有効性を検証すると共に、HBV-Exo感染に有効な免疫法の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 感染動物からのHBV-Exoの検出および性状解析

重度免疫複合不全(SCID)マウスの肝臓をヒトの肝臓に置換したキメラマウスにHBVを感染させ、感染後10週目の個体より血清を採取した。その後、血清よりエキソソーム画分(HBV-Exo)を抽出した。血清よりエキソソーム画分を除去したものをHBV-Virusとした。これらウイルス感染動物由来のHBV-ExoおよびHBV-Virusにウイルスが存在するかを検証するために、遺伝子を抽出し、HBV-DNAの定量を行った。続いて、これらの画分に存在する遺伝子が、感染性を示すのかを検証すべく、HBV感染のレセプターであるNTCPを発現させたHepG2細胞に感染させ、ウイルス遺伝子量を解析した。さらにはHBV-ExoがHBVに対する中和抗体に対して抵抗性を持つのかを解析すべく、中和試験を実施した。

(2) HBV-Exo 感染に対するワクチンの予防効果の検討

HBV-Exo 感染に対する予防法を構築するために、HBV 感染モデル動物であるツパイを用いて免疫実験を行った。免疫原には、 現行の HBV 予防ワクチンにも使用されている HBs-small (HBs-S)、 HBs-S、 preS1、 preS2 からなる HBs-large (HBs-L)、 細胞性免疫の誘導が期待される HBc の 3 種類のウイルス蛋白質を用いた。これらの免疫原をツパイに皮下接種もしくは鼻粘膜接種し、その後誘導される免疫応答を経時的に解析した。

4 . 研究成果

(1) 感染動物からの HBV-Exo の検出および性状解析

HBV 感染キメラマウスの血清よりエキソソームを抽出し、解析を行ったところ、感染個体のエキソソームよりウイルスの遺伝子が検出された。さらにこのエキソソーム (HBV-Exo) を肝細胞へ接種すると、肝細胞に接着することが明らかとなった。また HBV に対する中和抗体を用いた中和試験を行ったところ、エキソソーム画分ではないウイルス (HBV-Virus) の肝細胞への接着は中和抗体によって阻害されたのに対して、HBV-Exo

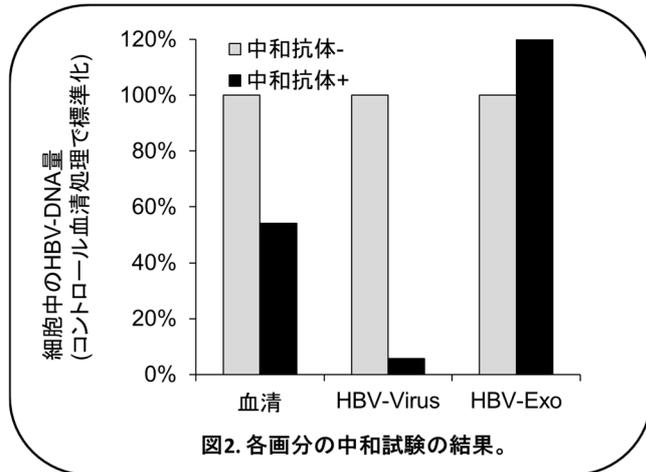


図2. 各画分の中和試験の結果。

の接着は、中和抗体では阻害されなかった (図 2)。以上の結果から、培養細胞だけでなく、ウイルス感染動物においてもエキソソームに内包された HBV の存在が示された。

(2) HBV-Exo 感染に対するワクチンの予防効果の検討

HBs は HBV の外殻を構成する蛋白質で細胞への感染に重要な役割を担っている。そのため、現行の HBV 予防ワクチンでは HBs が使われている。しかし、本研究により、HBV-Exo を介した HBV の感染の防御には HBs に対する中和抗体では不十分であると考えられる。そこで、液性免疫だけでなく、細胞性免疫を誘導することで、HBV-Exo を介した感染を阻害できる新規予防ワクチンの構築を試みた。

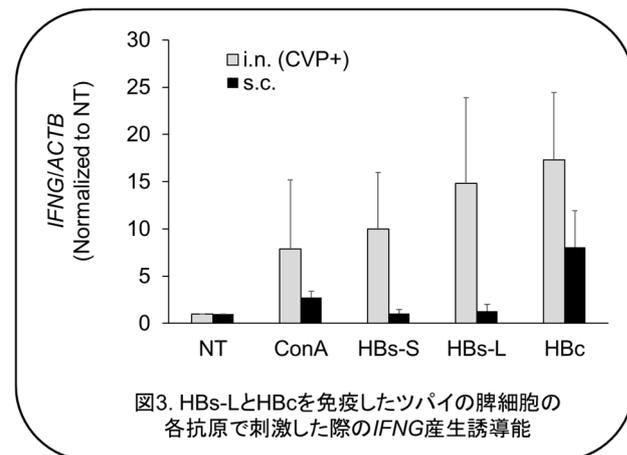


図3. HBs-LとHBcを免疫したツパイの脾細胞の各抗原で刺激した際のIFNγ産生誘導能

HBs-L と HBc を混合した免疫原を用いることで、HBs-S と HBc を混合した免疫原よりも強い免疫応答を誘導することが示された。さらにはカルボキシポリマーを基剤として加え、鼻粘膜に噴霧する方法が、IgG 抗体、IgA 抗体、中和抗体および脾細胞のウイルス抗原に対する IFNγ 応答を最も強く誘導できることが見出された (図 3)。

HBs-L と HBc の粘膜免疫によって、強い細胞性免疫および液性免疫の誘導がみられ、本免疫用により HBV-Exo の感染を阻害できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sanada Takahiro, Yamamoto Naoki, Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Tsukiyama-Kohara Kyoko, Hasegawa Hideki, Miyazaki Takashi, Takano Jun-ichiro, Shiogama Yumiko, Yasutomi Yasuhiro, Goh Yasumasa, Yoshida Osamu, Hiasa Yoichi, Kohara Michinori	4. 巻 520
2. 論文標題 Intranasal vaccination with HBs and HBe protein combined with carboxyl vinyl polymer induces strong neutralizing antibody, anti-HBs IgA, and IFNG response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 86～92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.09.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sanada Takahiro, Tsukiyama-Kohara Kyoko, Shin-I Tadasu, Yamamoto Naoki, Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Yamane Daisuke, Takano Jun-ichiro, Shiogama Yumiko, Yasutomi Yasuhiro, Ikeo Kazuho, Gojobori Takashi, Mizokami Masashi, Kohara Michinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Construction of complete Tupaia belangeri transcriptome database by whole-genome and comprehensive RNA sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48867-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sanada Takahiro, Yasui Fumihiko, Honda Tomoko, Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Takano Jun-ichiro, Shiogama Yumiko, Yasutomi Yasuhiro, Tsukiyama-Kohara Kyoko, Kohara Michinori	4. 巻 529
2. 論文標題 Avian H5N1 influenza virus infection causes severe pneumonia in the Northern tree shrew (Tupaia belangeri)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 101～110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2019.01.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Ezzikouri Sayeh, Sanada Takahiro, Chi Haiying, Hayashi Yukiko, Rebbani Khadija, Kitab Bouchra, Matsu Aya, Miyoshi Noriaki, Hishima Tsunekazu, Kohara Michinori, Tsukiyama-Kohara Kyoko	4. 巻 7
2. 論文標題 Oxidative Stress and Immune Responses During Hepatitis C Virus Infection in Tupaia belangeri	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-10329-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kayesh MEH, Ezzikouri S, Chi H, Sanada T, Yamamoto N, Kitab B, Haraguchi T, Matsuyama R, Nkogue CN, Hatai H, Miyoshi N, Murakami S, Tanaka Y, Takano JI, Shiogama Y, Yasutomi Y, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K	4. 巻 237
2. 論文標題 Interferon- response is impaired by hepatitis B virus infection in Tupaia belangeri	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 47 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2017.05.013	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 該当する

1. 著者名 Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Kitab Bouchra, Sanada Takahiro, Hayasaka Daisuke, Morita Kouichi, Kohara Michinori, Tsukiyama-Kohara Kyoko	4. 巻 51
2. 論文標題 Susceptibility and initial immune response of Tupaia belangeri cells to dengue virus infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 203 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2017.04.003	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Sanada T, Kayesh MEH, Tsukiyama-Kohara K, Hasegawa H, Goh Y, Miyazaki T, Kohara M.
2. 発表標題 HBs-large hybrid protein vaccination via intranasal route with carboxyl vinyl polymer rapidly induced strong neutralizing antibody and anti-HBs IgA.
3. 学会等名 2019 AASLD THE LIVER MEETING. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sanada T, Tsukiyama-Kohara K, Shin-I T, Yamamoto N, Kayesh MEH, Kohara M.
2. 発表標題 Construction of genomic and transcriptomic database of the tree shrew (Tupaia belangeri), which is a small animal model of HBV infection.
3. 学会等名 2019 International HBV Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sanada T, Tsukiyama-Kohara K, Shin-I T, Yamamoto N, Kayesh MEH, Kohara M.
2. 発表標題 Construction of genomic and transcriptomic database of the tree shrew (<i>Tupaia belangeri</i>), which is a small animal model of HBV infection.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sanada T, Kayesh MEH, Chi H, Yamamoto N, Tsukiyama-Kohara K, Yoshida O, Hiasa Y, Hasegawa H, Sugiyama M, Mizokami M, Oda Y, Goh Y, Miyazaki T, Kamishita T, Kohara M.
2. 発表標題 HBs-large protein vaccination via intranasal route with carboxyl vinyl polymer induces strong neutralizing antibody and anti-HBs IgA
3. 学会等名 2018 International HBV Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sanada T, Kayesh MEH, Chi H, Yamamoto N, Tsukiyama-Kohara K, Yoshida O, Hiasa Y, Hasegawa H, Sugiyama M, Mizokami M, Oda Y, Goh Y, Miyazaki T, Kamishita T, Kohara M.
2. 発表標題 HBs-large protein vaccination via intranasal route with carboxyl vinyl polymer induces strong neutralizing antibody and anti-HBs IgA
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sanada T, Hirata Y, Naito Y, Yamamoto N, Kikkawa Y, Ishida Y, Yamasaki C, Tateno C, Ochiya T, Kohara M.
2. 発表標題 Transmission of HBV mediated by extracellular vesicles
3. 学会等名 2017 International HBV Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sanada T, Hirata Y, Naito Y, Yamamoto N, Kikkawa Y, Ishida Y, Yamasaki C, Tateno C, Ochiya T, Kohara M.
2. 発表標題 Transmission of HBV genomic DNA mediated by extracellular vesicles
3. 学会等名 XVII International Congress of Virology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 B型肝炎ウイルスの複製阻害組成物	発明者 棟方翼、小原道法、 真田崇弘	権利者 公益財団法人 東 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-215898	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 B型肝炎ワクチン	発明者 日浅陽一、小原恭 子、小原道法、真田 崇弘、郷保正、織田	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-138047	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 経鼻B型肝炎ワクチン組成物およびその製造方法	発明者 上下泰造、宮崎隆、 小原道法、真田崇 弘、日浅陽一、吉田	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-195262	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/infectious/index.html

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
---------------------------	-----------------------	----