

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15941

研究課題名(和文) 臨床検体を用いたB型肝炎ウイルス(HBV)感染の病態解析

研究課題名(英文) Investigation of pathophysiology in HBV infection using clinical samples

研究代表者

中堀 輔(Nakabori, Tasuku)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60795160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：3例のB型肝炎患者肝組織のHBsAg陽性細胞領域および陰性細胞領域を分離採取した。それぞれの遺伝子発現を次世代シーケンサーを用い、網羅的に解析し、発現に差異を認める遺伝子を選定した。選定した遺伝子の中でBCAT2 (branched-chain amino acid transaminase 2) は初代培養ヒト肝細胞にHBVを接種すると発現は上昇し、HBV感染初代培養ヒト肝細胞に対して、発現を抑制すると、細胞内のpgRNAや培養上清中のHBsAgおよびHBeAgは低下した。BCAT2発現上昇はB型肝炎ウイルス複製に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎は既存の治療薬ではウイルスを排除できず、新たな治療が必要である。しかし、B型肝炎ウイルス感染の病態生理は不明な点が多く、新規薬剤の開発は滞っている。本研究では分岐鎖アミノ酸(BCAA: branched-chain amino acid)代謝に関与するBCAA transaminase 2 (BCAT2)の発現上昇はB型肝炎ウイルス複製に寄与している可能性を示唆している。分岐鎖アミノ酸代謝は既存の抗ウイルス治療の標的にはなっていないため、新規治療標的になり得る可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：RNA and DNA were extracted from the HBsAg-positive or -negative hepatocytes of 3 samples separately using laser capture microdissection and analyzed by real time PCR.

Comprehensive analysis of gene expression levels using RNA-sequencing and paired-analysis were performed. Seven genes elevated more than twice in the HBsAg-positive hepatocytes ($p < 0.01$). One of the seven was branched-chain amino acid transaminase 2 (BCAT2). In the PHHs, BCAT2 expression level elevated after HBV inoculation. Knockdown of BCAT2 significantly decreased pgRNA level in the HBV-infected PHHs. HBsAg and HBV DNA levels in the culture medium were significantly lower in the BCAT2 knockdown group. These results suggested that BCAT2 upregulation might contribute HBV replication.

研究分野：B型肝炎

キーワード：B型肝炎 BCAT2

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

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎は国内最大の感染症の一つである。しかし、マウスなどの小動物や通常の肝癌由来の培養細胞株にはB型肝炎ウイルスは感染せず、解析モデルに伴う制限が研究の障壁となり、病態については十分に解明されていない。既存の治療薬ではウイルスを排除することはできないため、新規治療が必要とされており、治療標的を探索するために、HBV感染の病態について詳細に解明する必要がある。

近年、解析技術が進歩し、微量検体から次世代シーケンサーを用いることによりオミックス解析が可能となった。そこで本申請課題では、B型慢性肝炎患者臨床試料からRNAおよびDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用い宿主の遺伝子発現を網羅的に解析し、B型肝炎ウイルス複製に対する宿主制御機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

B型肝炎ウイルス複製に対する宿主制御機構はこれまで宿主の転写因子やインターフェロン、マイクロRNAなどの関与が報告されているが、詳細は十分に解明されている訳ではない。本研究では、B型肝炎ウイルス複製に対する宿主制御機構の解明を目的とし、抗ウイルス治療標的について検討した。

3. 研究の方法

(1) B型慢性肝炎患者肝組織を用いてHBs抗原に対する抗体を用い、免疫染色を施行した。

(2) Laser Microdissection(LCM)法によりHBs抗原陽性肝細胞および陰性肝細胞を分離採取した(図1)。それぞれからRNAおよびDNAを抽出し、RT-PCR法によりpregenomic RNA(pgRNA)、cccDNAの発現レベルを解析した。また、3症例はライブラリー調整を行い、次世代シーケンサーを用い、HBs抗原陽性肝細胞および陰性肝細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した。解析結果よりHBs抗原陽性細胞および陰性細胞において発現に差異を認められた遺伝子を選定した。

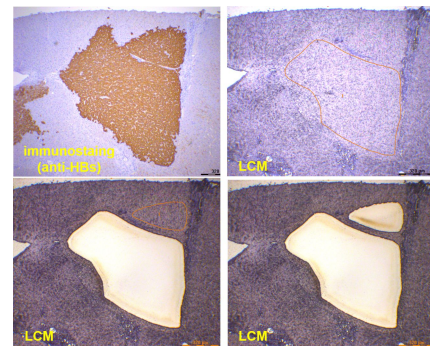


図1. Laser Microdissection

(3) 上記にて選定した遺伝子について、HBV複製における意義を、ヒト肝細胞キメラマウスより単離した初代培養ヒト肝細胞(PHHs: Primary human hepatocytes)にHepAD 38.7培養上清由来のHBV inoculumを接種したin vitro感染モデルを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色の結果、92%の症例でHBs抗原陽性肝細胞と陰性肝細胞が混在した。未治療のB型肝炎患者肝組織では、HBs抗原陽性細胞比率は血清HBV DNA値および血清HBs抗原値と有意な正の相関を認めた。HBs抗原陽性細胞ではHBs抗原陰性細胞と比し、pgRNAおよびcccDNAは有意に高値であった。

(2) RNAシーケンスでは、HBs抗原陽性肝細胞において陰性肝細胞と比し発現が2倍以上かつ統計学的に有意に高値を呈した7遺伝子を同定した($p < 0.01$)。

(3) (2)にて選定した7遺伝子の中には分岐鎖アミノ酸(BCAA: branched-chain amino acid)代謝に関連する遺伝子(BCAT2およびSLC16A4)が含まれており、HBV感染によるBCAA代謝リモデリングに注目した。BCAAはBCATを触媒として代謝され、 α -ケト酸やグルタミンを産生する。 α -ケト酸はSLC16A4を介し、細胞外に輸送される。BCAT2およびSLC16A4の発現はRT-PCR法にてHBsAg陽性細胞領域では陰性細胞領域と比較し、有意に高値を呈した。

ヒト肝細胞キメラマウスより単離したPHHsにHBVを接種し、5日毎に培養上清を交換し、HBsAg、HBeAg、HBV DNAを解析すると、継時的にtiterは上昇し、HBV接種20日後にはプラトーに達した。そのため、本申請課題ではHBV接種20日後に解析を行った。PHHsはHBV感染により、BCAT2およびSLC16A4の発現上昇を認め、細胞内のBCAAは増加した。HBV感染PHHsにおいて、BCAT2

の発現を抑制したところ、細胞内 pgRNA および SLC16A4 の発現は低下し、培養上清中の HBV DNA 量および HBs 抗原量は減少した。一方で、HBV 感染 PHHs において、SLC16A4 の発現を抑制したところ、細胞内 pgRNA および BCAT2 発現、培養上清中の HBV DNA 量および HBs 抗原量は変化しなかった。以上の結果から BCAT2 は HBV 感染に対する新たな治療標的になり得る可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

第 54 回日本肝臓学会総会, 2018

「臨床検体を用いた HBV 感染に対する宿主制御因子の解析」

中堀 輔, 足田 隼人, 福富 啓祐, 村井 一裕, 山井 琢陽, 小玉 尚宏, 阪森 亮太郎, 巽 智秀, 竹原 徹郎

第 26 回日本消化器関連学会週間 (JDDW), 2018

「HBs 抗原低下による肝発がん抑制を目指した新規治療標的の探索」

中堀 輔, 小玉 尚宏, 竹原 徹郎

International HBV meeting, 2018

「Inhibition of branched-chain amino acid transaminase 2 suppresses hepatitis B virus replication.」

Tasuku Nakabori, Hayato Hikita, Keisuke Fukutomi, Yoshinobu Saito, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

The Liver Meeting (AASLD), 2018

「Branched-chain amino acid transaminase 2 contributes to hepatitis B virus replication through de novo nucleotide synthesis.」

Tasuku Nakabori, Hayato Hikita, Keisuke Fukutomi, Kazuhiro Murai, Takuo Yamai, Yuki Makino, Yasutoshi Nozaki, Yoshinobu Saito, Hiroshi Suemizu, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。