

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18397

研究課題名（和文）B型肝炎モデルにおける肝臓内マクロファージが、肝線維化に与える影響とその機能解析

研究課題名（英文）Research on effect of macrophage on liver fibrosis in a mouse model of hepatitis B

研究代表者

杉山 真也 (Sugiyama, Masaya)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・副プロジェクト長

研究者番号：20612427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肝がんの手術で切除された患者の肝切除片から単一細胞化し、RNA-seq解析を実施した。患者検体としては、B型肝炎由来、C型肝炎由来、非B非C型肝炎由来の肝がん組織を用いた。その結果、B型肝炎由来の肝がんにて特徴的な遺伝子（特許申請中）を発現している単核球集団（新規サブセット）を同定した。その頻度を解析したところ、肝線維化の程度に沿って、その新規サブセットが増加することを確認した。また、肝がんになるとその頻度も有意に増えることを確認した。単一細胞解析では、組織中の位置情報が失われるため、新規サブセットの位置を組織染色で確認したところ、線維化部分の周囲、肝がん周囲に局在していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎によって生じた肝障害を治療する薬剤は未だ開発されていない。高齢層に患者が多い肝炎では、その病態が進むこともあり、特に肝線維化や肝硬変を治療する薬剤の必要性は高まっている。本研究では、その肝線維化の発生機序を解析することで、病態進行に関連するキー遺伝子を複数同定するに至った。これらに対する阻害剤や治療薬が開発されることで、肝線維化等に対する治療薬の開発が進展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Single cell RNA-seq analysis was determined using human liver specimens from hepatocellular carcinomas. we enrolled patients with hepatitis B, C, and non-B non-C. Then, we determined new macrophages subset expressing specific genes in hepatitis B patients. The proportion of the new subset was upregulated in fibrosis-grade dependent manner. hepatocellular carcinomas also contained high proportion of the new subset. To confirm the localization of the new subset, the subset was accumulated around fibrosis area.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：B型肝炎 肝線維化 マクロファージ マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎はB型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus: HBV)に感染することにより発症し、HBV持続感染者は、本邦では約150万人、世界中では約3億5千万人が存在すると推定されている。一般的な病態としては、B型慢性肝炎から肝線維化、肝硬変、肝癌が発症することが知られている。B型肝炎では完全なウイルス排除が困難なため、その治療法としては、ウイルス複製の抑制を目的として、慢性肝炎患者に対してインターフェロン(Interferon: IFN) 核酸アナログ(Nucleotide analogue: NA)製剤が利用され、ある程度の効果を上げている。

一方、肝線維化進展や肝癌発症といった病態進行の機序については、十分な解明がなされていない。肝炎の中でも特にB型肝炎は、感染期間と肝線維化の進展が一致しないことが多く、特に生体肝移植後やHIV感染といった免疫抑制下での肝炎では急速に肝線維化が進展する(Puoti et al. J Hepatol. 2006)。現在も肝線維化に対する治療薬は有用なものがなく、病態が進行した患者に十分な治療ができない。

これまで病態研究が進まなかった原因として、HBV感染を起因とする有用な病態モデル動物がなかったことが挙げられる。申請者らは、この点を解決するためにヒト肝臓を保有するヒト肝細胞置換キメラマウス(キメラマウス)を感染モデルとして利用することで、化学物質誘導型でなく、HBV感染を起因とする病態モデルを樹立し、in vivoで病態進展に関する研究を世界に先駆けて進めてきた。

申請者らは、これまでにこの肝線維化の進展機構に関する解析を進め、このキメラマウスの特性を利用することで、肝線維化進展群では、TLR4とその活性化マーカーであるIL-6の発現誘導を確認した。また、マウスTLR4へ作用する抗TLR4抗体処理で肝線維化の進展が妨げられたことから、マクロファージ(マウス由来)のTLR4経路が線維化進展の原因の一つであることを明らかとした。

しかしながら、このTLR4経路の活性化が誘導される機構は明らかではない。これまでに、インフルエンザウイルス等での線維化形成には、過酸化脂質や外来物がTLR4リガンドとして作用することが報告されていたが(Imai et al. Cell 2008)、我々の検討ではそれは否定的であり、肝線維化においては異なる分子メカニズムが作用していると推定された。

また、これまで有用なモデルマウスがなかったこともあり、in vivoのHBV感染下モデルで、肝病態形成時における免疫細胞の応答や相互作用はほとんど解析がされておらず、その挙動は明らかではない。

最近、申請者らは、ヒトPBMCを用いた検討で、HBV感染時にナチュラルキラー(NK)細胞と樹状細胞(DC)が相互作用して抗ウイルス応答を示すことを示した。他方、NASHモデルであるが、NK細胞がマクロファージを制御し、肝線維化の形成に関連していることが報告されており(Tosello-Trampont et al. Hepatology 2016)、これらことから、HBV感染下での病態形成においても、マクロファージやNK細胞を中心とした細胞の相互作用が重要な役割を果たしていることと示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、HBV感染により形成される肝線維化の誘導機構を明らかとすることで、新規治療標的を同定し、線維化治療薬の開発へとつなげる。

具体的には、肝線維化進展機序を明らかとするために、TLR4リガンドの探索を中心

とする線維化形成の「前期過程」と、TLR4 感作後のマクロファージと周辺細胞の相互作用を解析する「後期過程」に分けて解析を進める。「前期過程」の線維化形成時に誘導される TLR4 リガンド分子の探索では、近年、LPS 等の外来分子に加えて、内因性の分子も多数報告されている。そこで、HBV 感染マウスもしくは患者血清を用いて、肝線維化の進展に関連して、血中に遊離する分子をスクリーニングし、基礎検討を加えることでリガンド分子の同定を行う。また、肝臓の組織染色やイメージングから、そのリガンド分子を産生する細胞種の同定を行う。

線維化誘導の「後期過程」の解析としては、TLR4 経路活性化を受けたマクロファージの肝臓内での動態に加えて、周辺細胞との相互作用を *in vivo* で明らかとする。刺激を受けたマクロファージが他の免疫細胞（NK、樹状細胞等）と相互作用する様子をライブイメージング等で観察する。特に、相互作用する細胞を 1 細胞レベルでの遺伝子発現解析（1 細胞 RNA-seq）を行い、マクロファージの性質変化を中心に解析し、維化形成時のマクロファージの機能解析を進める。

申請者らは、超解像顕微鏡や二光子顕微鏡によるライブイメージングで肝臓内の細胞動態を観察する系を確立している（共同研究先：株式会社ニコン）。また、1 細胞 RNA-seq では、様々な HBV 感染時の肝細胞側のデータを既に得ており、抱負な運用実績を有している。

3. 研究の方法

HBV 感染と肝線維化形成の観点から、持続感染により誘導される TLR4 のリガンド分子の探索を行う。そのために、キメラマウスやヒトの血液サンプルを用いて網羅的な探索的スクリーニングを実施し、特に肝臓に含まれる液性のリガンド候補をリスト化する。得られた分子候補については、*in vitro* で TLR4 経路の活性化能をマクロファージを用いて評価する。

初年度では、肝臓内でのマクロファージと他の細胞等の相互作用については、C57BL/6 (B6) マウスで既に設定済みの二光子顕微鏡の観察条件をキメラマウスに適応させ、HBV 感染モデルによる観察で、肝臓内マクロファージの全体的な動態を捉える。肝組織から細胞を分離し、1 細胞 RNA-seq 解析を実施し、TLR4 感作後のマクロファージが起こした質的な変化の全容を捉える。

二年目以降では、線維化誘導の「前期過程」の解析では、初年度で得たデータと実験条件を元に、リガンド分子を *in vivo* へ投与した解析をすすめる。「後期過程」解析では、TLR4 経路が活性化したマクロファージと相互作用する細胞種の同定と、その細胞種がマクロファージへ与える影響を *in vitro*、*in vivo* で明らかとしていく。その中で、有力な個別の相互作用を取り出し、そのマクロファージの変化を 1 細胞 RNA-seq、サイトカインアレイで解析することで、マクロファージの変化を明らかとする。*In vivo* で相互作用を阻害することで、肝線維化に関連するか評価する。

(1) TLR4 リガンドの探索（線維化誘導の前期過程）

一般的に TLR4 は LPS 等の細菌毒の認識をするとされているが、我々のこれまでの検討では、既報の過酸化脂質や外来物の関与は否定的であった。近年では内因性リガンドが多数報告されており（遊離脂肪酸、HMGB1、S100A8 等 González-Guerrero et al. Arch Toxicol 2016）、感染や細胞破壊によって誘導される血中の内因性の分子に注目し

た解析を進める。

既に確立した初代培養肝細胞の HBV 感染系、患者血清、キメラマウス血清を用いて、共通して上昇する内因性の因子を、マルチプレックスアレイ、NGS 解析等を用いた網羅的な探索を実施する。候補リガンド分子を *in vitro* でマクロファージに対して作用させ、IL-6 産生を指標に TLR4 活性化能を検証する。強い活性が確認出来たものについては、順次、B6 マウスへ投与することで、線維化の形成に関連するかを、線維化関連遺伝子の発現で評価する。リガンド分子の阻害実験を行い、線維化関連遺伝子の変動や線維化形成を病理学的に評価する。

(2) 肝線維化形成過程の解析 (線維化誘導の後期過程)

HBV 持続感染下での線維化形成過程において、肝臓内マクロファージがどのような周辺細胞と相互作用するか明らかとすることで、線維化に特徴的な細胞動態の全体像を初年度で確認する。細胞間相互作用で産生が変化するサイトカインを捉える。最終的には、細胞間相互作用がマクロファージへ与える変化を明らかとし、肝線維化誘導に対する機能変化を解析する。

細胞間相互作用が推定された細胞とマクロファージを *in vitro* で培養し、サイトカイン産生能の変化をマルチプレックスアレイで捉える。細胞間相互作用で産生されるサイトカインについて、線維化に重要な役割を果たすものを同定するため、抗体での中和阻害を行う。星細胞株、マウスモデルに作用させ、線維化関連遺伝子の定量により、肝線維化進展が阻害できるかを検討する。

(3) 肝内マクロファージの 1 細胞遺伝子発現解析 (線維化誘導の後期過程)

HBV 感染キメラマウスやヒト検体を用いて、線維化形成過程で個々のマクロファージが持つ RNA プロファイルの全容データを得ることを目的とする。肝線維化進展時の肝組織からマクロファージ分画を得る。それらを 1 細胞に分けて遺伝子発現解析をする (1 細胞 RNA-seq)。個々の遺伝子発現パターンの違いを元に、肝臓内に存在するマクロファージの分類を行う。これにより、新規フェノタイプの発見ができる可能性もある。肝線維化過程に特有なマクロファージ集団の存在を検討する。存在が推定される場合、遺伝子発現データに基いた細胞分離と機能解析を行う。細胞の別マウスへの移植を行い、線維化への関与を明らかとする。

4. 研究成果

これまでに、ヒト肝細胞置換キメラマウスへ HBV 感染させることで肝線維化が形成されることを報告してきた。その中で、HBV の持続感染により、TLR4 の遺伝子発現が肝臓内の単球で誘導され、TLR4 経路の活性化が起きていることを明らかとしてきた。(1) TLR4 リガンドの探索として、キメラマウスへ抗生物質を投与することで、腸内細菌を除菌し、その肝線維化に与える影響を評価した。その結果、除菌することで肝線維化の進展は、有意に抑制された。線維関連遺伝子の発現も抑制されており、星細胞の活性化も抑制されていた。肝臓内への単球の浸潤量も減少し、単球表面の TLR4 分子の発現が誘導されるレベルは低値であった。一方で、血中の HBV 量が除菌群で有意に増加していたことから、腸内環境が免疫機能の活性化に関連していることが示唆された。続いて、マウスもしくはマウスから得た単球に対して前年度までに候補として得た菌体を投与

して、TLR4 経路の活性化状態を評価した。その結果、最終的に 3 菌種について TLR4 経路の活性化を確認し、それらが有力と考えられた。

(2) 肝臓内マクロファージの肝線維化への関連について解析するために、二光子顕微鏡による観察を実施した。これまでの成果で、BALB/c 等で観察条件を決めているため、それをキメラマウスに適応させた。HBV 感染キメラマウス肝臓を感染初期から観察することで、単球の遊走と感染の場へリクルートされる様子を可視化した。また、肝線維化に対する肝臓内マクロファージの直接的な影響を評価するために、キメラマウスにクロドロン酸を投与することで、単球の除去を行った状態での肝線維化進展を検討した。その結果、HBV 感染下で 3 ヶ月と 6 ヶ月間維持し、肝線維化状態を評価したところ、クロドロン酸投与群において肝線維化の進展が抑制された。また、肝臓中の肝線維化関連の遺伝子発現を確認したところ、ACTA2 などの遺伝子が抑制されており、本モデルにおけるマクロファージの関与を裏付けることができた。

(3) 肝線維化の病態形成に関わる細胞種を特定するために、患者由来肝臓を用いた 1 細胞遺伝子発現解析を実施した。外科での切除片から線維化部分の 1 細胞 RNA-seq を実施し、病態形成部位の細胞種を RNA プロファイルから特定した。肝内マクロファージの 1 細胞 RNA-seq から、肝病態の進展部分には、補体関連遺伝子を高発現するサブセットが存在することが明らかとなった。

また、肝がんの手術で切除された肝切除片から単一細胞化し、RNA-seq 解析を実施した。患者検体としては、B 型肝炎由来、C 型肝炎由来、非 B 非 C 型肝炎由来の肝がん組織を用いた。その結果、B 型肝炎由来の線維化や肝がんの特徴的な補体関連遺伝子（特許申請中）を発現しているマクロファージ集団のサブセットを同定した。その頻度を解析したところ、肝線維化の程度に沿って、その新規サブセットが増加することを確認した。また、肝がんになるとその頻度も有意に増えることを確認した。単一細胞解析では、組織中の位置情報が失われるため、新規サブセットの位置を組織染色で確認したところ、線維化部分の周囲に局在していることを確認した。

続いて、ヒト組織とキメラマウス肝臓から新規サブセットをそれぞれ分取し、遺伝子発現の比較を実施した。その結果、多少のプロファイルの違いはあるものの解析対象とする遺伝子群の発現は同様であることが確認できた。B 型肝炎ウイルスを感染させたヒト肝臓置換キメラマウスに対して、その新規サブセットに対する中和抗体を投与し、その機能阻害によって病態進展を予防する試験を開始した。この試験の結果は来年度に明らかとなる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Yoshio Sachiyo, Mano Yohei, Doi Hiroyoshi, Shoji Hirotaka, Shimagaki Tomonari, Sakamoto Yuzuru, Kawai Hironari, Matsuda Michitaka, Mori Taizo, Osawa Yosuke, Korenaga Masaaki, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Mita Eiji, Katayama Keiko, Tanaka Junko, Kanto Tatsuya	4. 巻 3
2. 論文標題 Cytokine and chemokine signatures associated with hepatitis B surface antigen loss in hepatitis B patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.122268	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 Nishi M, Miyakawa K, Matsunaga S, Khatun H, Yamaoka Y, Watashi K, Sugiyama M, Kimura H, Wakita T, Ryo A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Regulates the Stability of Hepatitis B Virus Core Protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nishikawa K, Kimura K, Kanda Y, Sugiyama M, Kakihana K, Doki N, Ohashi K, Bae SK, Takahashi K, Ishihara Y, Mizuno I, Onishi Y, Onozawa M, Onizuka M, Yamamoto M, Ishikawa T, Inoue K, Kusumoto S, Hashino S, Saito H, Kanto T, Sakamaki H, Mizokami M.	4. 巻 .
2. 論文標題 A prospective trial of vaccine to prevent hepatitis B virus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplant.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yamada N, Murayama A, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Muramatsu M, Murata K, Kato T.	4. 巻 .
2. 論文標題 Anti-Viral Effects of Interferon- 3 on Hepatitis B Virus Infection in Cell Culture.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Komatsu H, Inui A, Suzuki Y, Sugiyama M, Fujisawa T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Deep sequencing of hepatitis B surface antigen gene in the preserved umbilical cords in immunoprophylaxis failure against mother-to-child HBV transmission.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sakamoto K, Umemura T, Ito K, Okumura A, Joshita S, Ota M, Sugiyama M, Mizokami M, Yoneda M, Tanaka E.	4. 巻 .
2. 論文標題 Virological Factors Associated with the Occurrence of HBV Reactivation in Patients with Resolved HBV Infection Analyzed through Ultradeep Sequencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Murata K, Tsukuda S, Suizu F, Kimura A, Sugiyama M, Watashi K, Noguchi M, Mizokami M.	4. 巻 .
2. 論文標題 Immunomodulatory mechanism of acyclic nucleoside phosphates in treatment of hepatitis B virus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nishida N, Sugiyama M, Sawai H, Nishina S, Sakai A, Ohashi J, Khor SS, Kakisaka K, Tsuchiura T, Hino K, Sumazaki R, Takikawa Y, Murata K, Kanda T, Yokosuka O, Tokunaga K, Mizokami M.	4. 巻 .
2. 論文標題 Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the BTNL2 gene for response to a hepatitis B vaccine.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology.	6. 最初と最後の頁 848-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Murata K, Asano M, Matsumoto A, Sugiyama M, Nishida N, Tanaka E, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N, Shirasaki T, Honda M, Kaneko S, Gatanaga H, Oka S, Kawamura YI, Dohi T, Shuno Y, Yano H, Mizokami M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Induction of IFN- 3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 362-371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 杉山真也、考藤達哉、溝上雅史
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス感染キメラマウスモデルでの肝線維化進展における腸内細菌叢の影響とその解析
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, Masashi Mizokami
2. 発表標題 Liver Fibrosis Induced By Gut Microbes in Chimeric Mice Model with Human Hepatocytes Persistently infected with hepatitis B Virus.
3. 学会等名 The Liver Meeting 2018 (AASLD) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami
2. 発表標題 Gut microbes mediate liver fibrosis in chimeric mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus
3. 学会等名 THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山真也、考藤達哉、溝上雅史
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス感染キメラマウスモデルでの肝線維化進展における腸内細菌叢の影響とその解析
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaya Sugiyama, Nishida Nao, Katsushi Tokunaga, Mizokami Masashi
2. 発表標題 Integrated analyses of both human and HBV genome to predict HCC development
3. 学会等名 2019 EASL Liver Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------