

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2019

課題番号：17KK0194

研究課題名（和文）HBV感染に伴うインターフェロン抵抗性獲得と肝細胞内遺伝子発現変化の関連解析

研究課題名（英文）Association analysis between the suppression of interferon responsiveness by HBV infection and changes of gene expression in human hepatocytes

研究代表者

柘植 雅貴（Tsuge, Masataka）

広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教

研究者番号：50448263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,000,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウス（PXBマウス）にB型肝炎ウイルス（HBV）を感染させ、マウス肝組織の遺伝子発現解析およびHBV感染後のウイルス動態を解析した。その結果、感染初期のウイルス動態はmultiphasicに変化し、HDV（D型肝炎ウイルス）が共感染した場合でも感染初期の動態には影響しないこと、HBV感染後の肝組織では免疫応答に關与するようなpathwayや細胞の増殖やアポトーシスに關与するようなpathwayが活性化されていること、HBV感染後の細胞内応答は、HBV遺伝子型により異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年間50万人以上がB型肝炎ウイルス感染により死亡するとされ、特にアジア地域ではその感染者数が多い。そのため、B型慢性肝炎に対する治療薬の開発は急務であり、現在、治療薬開発に向けた研究が進められ、新規治療薬の登場が期待されている。このような背景から、治療薬開発において、抗ウイルス効果が評価可能な動物モデルの作製は非常に重要であり、また本研究のようなウイルス動態の視点から評価も必須と言える。本研究を進めていくことで、B型肝炎治療に向けた治療標的が同定され、本研究で得られた遺伝子発現プロファイルが新規治療薬開発の基盤として活用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Human hepatocyte chimeric mice were infected with hepatitis B virus and their liver tissues were collected after sacrifice. Total RNA was extracted from the mouse livers and transcribed into cDNA. Then gene expression analyses were performed using these cDNA and gene expression profiles were compared between HBV-infected and non-infected mice. Resulting these analyses, we identified that similar viral kinetic pattern could be observed regardless to HBV clones and that pathways associated with immune responses, cell growth or apoptosis were significantly activated in human hepatocytes after HBV infection. Furthermore, we also identified that intracellular responses by HBV infection were different among HBV genotypes.

研究分野：消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス ウイルス動態 ヒト肝細胞キメラマウス 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は、ヒトやチンパンジーなど特定の動物にしか感染が成立せず、また、肝癌細胞株などへの感染もほとんど認められないことから、*in vitro*、*in vivo*のHBV感染実験系は限られる。重度の免疫不全・肝不全マウス(uPA/SCIDマウス)にヒト肝細胞を移植することにより作製されたヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス)は、マウス肝臓の95%以上がヒト肝細胞に置換され、マウス肝臓がヒトの肝臓と類似した状態となる。このPXBマウスは、HBV感染が可能であり、高度の免疫不全状態にあることから、肝炎は生じず、HBV持続感染が成立する。このHBV持続感染PXBマウスより採取したヒト肝細胞を用いて、cDNAマイクロアレイや次世代シーケンスによる遺伝子発現解析を行うことで、HBV感染が直接細胞内遺伝子発現に及ぼす影響を解析することが可能と考え、基課題を含めたいくつかの基礎研究を行ってきた。しかしながら、網羅的な遺伝子発現解析を行うと、HBV感染に伴い有意な発現変化を示す遺伝子(標的遺伝子)が多数抽出され、絞り込みが困難であり、新たな遺伝子発現解析の手法を取り入れる必要があると考え、本国際共同研究を計画した。

2. 研究の目的

本共同研究では、マウスの血中ウイルス量やウイルス蛋白量の変化とヒト肝細胞内の遺伝子発現プロファイルを用いて、ウイルスの動態と遺伝子発現変化との相関を解析し、次世代シーケンス解析により得られた膨大な遺伝子発現プロファイルとウイルス動態とを関連付け、B型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞内の反応を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

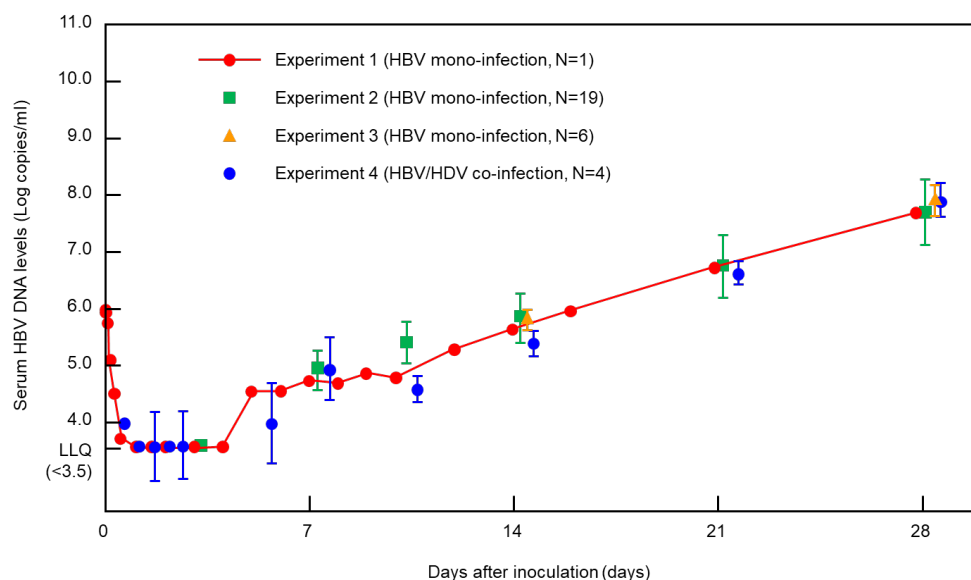
PXBマウスにHBVを感染させ、感染後のマウス血中HBV DNA量を経時的に測定し、マウス血中HBV DNA量の変化を観察した。HBVを感染させたマウスは、感染3日後、10日後、5週後、8週後、34週後にsacrificeし、マウス肝組織よりヒト肝細胞部分を採取。肝細胞よりtotal RNAを抽出、逆転写反応を行ったのち、次世代シーケンス解析にて遺伝子発現プロファイルを取得した。また、HBV genotypeによる遺伝子発現プロファイルへの影響を解析するため、HBV genotype A感染マウスも準備し、遺伝子発現プロファイルを取得した。さらにHBV非感染マウスと感染マウスの遺伝子発現プロファイルを比較し、HBV感染により有意に発現変化が生じる遺伝子の抽出を行った。

4. 研究成果

1) HBV感染後のマウスにおけるウイルス動態の解析

感染するHBVクローンやマウスに移植したヒト肝細胞の違いによるウイルス動態への影響を把握するため、30頭のHBV感染PXBマウスのデータを用いて、HBVクローンによるマウス血中HBV DNAの動態変化を解析した。その結果、感染初期のウイルス動態はmultiphasicに変化し、HDV(D型肝炎ウイルス)が共感染した場合でも感染初期の動態には影響しないことが明らかとなった(図1)。本研究成果は、VirusesにBrief communicationとして報告した。

図1. PXBマウスにおけるHBV感染後のウイルス動態の比較



2) HBV感染後のヒト肝細胞内遺伝子発現の経時的な変化の解析

30頭のマウスのうち、共通のHBVクローンを接種した19頭のマウスとHBVを感染させていない4頭のPXBマウスからヒト肝細胞を採取し、ヒト肝細胞内の遺伝子発現を次世代シーケンサーにて解析した。HBV感染3日後、10日後のヒト肝細胞では有意な遺伝子発現変

化は観察できなかったが、感染 5 週後、8 週後、34 週後のマウスでは多くの遺伝子発現が変化しており、特に、免疫応答に関与するような pathway や細胞の増殖やアポトーシスに関与するような pathway が活性化されていることが明らかとなった(表 1)。本研究成果は、Melbourne で行われた International HBV meeting 2019 にて発表した。

表 1. HBV 感染に伴い有意な発現変化を示した Pathway の感染期間別比較

No.	35 days (5w)	56 days (8w)	238 days (34w)
1	T cell activation (P00053)	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)
2	Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	CCKR signaling map (P06959)	Wnt signaling pathway (P00057)
3	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	Integrin signalling pathway (P00034)
4	Wnt signaling pathway (P00057)	p53 pathway (P00059)	Angiogenesis (P00005)
5	Parkinson disease (P00049)	Endothelin signaling pathway (P00019)	PDGF signaling pathway (P00047)
6	PDGF signaling pathway (P00047)	Apoptosis signaling pathway (P00006)	Huntington disease (P00029)
7	Integrin signalling pathway (P00034)	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)	CCKR signaling map (P06959)
8	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)	Wnt signaling pathway (P00057)	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)
9	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)
10	Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)	Angiogenesis (P00005)	EGF receptor signaling pathway (P00018)

### 3) PXB 細胞を用いた HBV 感染とウイルス動態・遺伝子発現解析

PXB マウスの解析で得られた細胞内遺伝子発現変化が、HBV の直接的な作用であることを確認するため、PXB マウスの肝組織を用いて作製された初代培養ヒト肝細胞 (PXB 細胞) に前解析で用いた HBV とは別の HBV クローンを感染させ、解析を進めた。HBV 遺伝子発現を行う前に PXB 細胞への HBV 感染率およびウイルス動態を解析したところ、培養上清中の HBV DNA は multiphasic な動態を示し、PXB マウスの解析で認められたウイルス動態に類似していた。本動態に関しては、現在も Dr. Dahari、Dr. Uprichard、Dr. Dubey とともに数学的なモデリングによる解析を実施中である。また、遺伝子解析については、感染 12 日までの細胞への感染効率が 2.5% と低かったことから、十分な遺伝子発現変化が観察できないと考え、現在、single cell sorting 等を用いた解析への移行を検討中である。

### 4) HBV genotype による遺伝子発現変化の比較

HBV 遺伝子型 A および C 感染により、それぞれ 780、208 遺伝子が発現制御を受け、発現制御レベルは HBV 遺伝子型により異なることが明らかとなった。特に、遺伝子型 C 感染マウスでは、Wnt signal pathway や Oxidative stress pathway が遺伝子型 A 感染時よりも強く誘導を受けることが明らかとなり(表 2)。HBV 感染後の細胞内応答は、HBV 遺伝子型により異なり、この細胞内応答の相違が臨床経過や治療反応性に関与している可能性が示された。尚、本研究成果は、Journal of Gastroenterology に Original Article として報告した。

表 2. HBV genotype A および C 感染により制御される pathway の比較

HBV Gt A infection	HBV Gt C infection
Parkinson disease (P00049)	1 Oxidative stress response (P00046)
Huntington disease (P00029)	2 CCKR signaling map (P06959)
p53 pathway (P00059)	3 Wnt signaling pathway (P00057)
Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	4 p53 pathway feedback loops 2 (P04398)
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway (P00003)	5 Interleukin signaling pathway (P00036)
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	6 PDGF signaling pathway (P00047)

Analyzed by Panther pathway analysis

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuge M, Uchida T, Walsh K, Ishida Y, Tateno C, Kumar US, Glenn J, Koh C, Heller T, Uprichard SL, Dahari H, Chayama K	4. 巻 11
2. 論文標題 Early Multiphasic HBV Infection Initiation Kinetics Is Not Clone-Specific and Is Not Affected by Hepatitis D Virus (HDV) Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 263 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11030263	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 Tsushima K, Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Murakami E, Makokha GN, Kurihara M, Nomura M, Hiyama Y, Fujino H, Ono A, Nakahara T, Yamauchi M, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Aikata H, Hayes CN, Chayama K.	4. 巻 54
2. 論文標題 Comparison of intracellular responses between HBV genotype A and C infection in human hepatocyte chimeric mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 650 ~ 659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01558-w	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 Makokha Grace Naswa, Abe-Chayama Hiromi, Chowdhury Sajeda, Hayes C. Nelson, Tsuge Masataka, Yoshima Tadahiko, Ishida Yuji, Zhang Yizhou, Uchida Takuro, Tateno Chise, Akiyama Rie, Chayama Kazuaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of the Hepatitis B virus replication and gene expression by the multi-functional protein TARDBP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44934-5	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 柘植雅貴、茶山一彰	4. 巻 6
2. 論文標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたB型肝炎研究の最前線	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 消化器・肝臓内科	6. 最初と最後の頁 271-278
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 無
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 Nomura M, Tsuge M, Uchida T, Hiraga N, Kurihara M, Tsushima K, Fujino H, Nakahara T, Murakami E, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Zhang Y, Makokha GN, Hayes CN, Tanaka S and Chayama K.	4. 巻 25
2. 論文標題 CTL-associated and NK cell-associated immune responses induce different HBV DNA reduction patterns in chronic hepatitis B patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.12970	査読の有無 無
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 Tsuge M, Hiraga N, Zhang Y, Yamashita M, Sato O, Oka N, Shiraishi K, Izaki Y, Makokha GN, Uchida T, Kurihara M, Nomura M, Tsushima K, Nakahara T, Murakami E, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Fujita T, Chayama K	4. 巻 525
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum-mediated induction of interleukin-8 occurs by hepatitis B virus infection and contributes to suppression of interferon responsiveness in human hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 48 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.08.020	査読の有無 無
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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Masataka Tsuge, Motonobu Nomura, Takuro Uchida, Hiromi Abe-Chayama, Daiki Miki, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Grace Naswa Makokha, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 CTL-associated and NK cell-associated immune responses induce different HBV DNA reduction patterns in chronic HBV infection.
3. 学会等名 7th Japan-Taiwan-Korea HBV Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柘植雅貴、辰川裕美子、茶山一彰
2. 発表標題 核酸アナログ・ペグインターフェロン併用療法におけるHBs低下に寄与する因子の検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柘植雅貴
2. 発表標題 症例から学ぶ B型肝炎の診断・治療の最前線
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Tsuge, Ken Tsushima, Nobuhiko Hiraga, Takuro Uchida, Michio Imamura, C. Hayes Nelson, Harel Dahari, Susan L. Uprichard, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Analysis of the association between HBV infection and long-term trends in intrahepatic gene expression.
3. 学会等名 International HBV meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatsue Fujino, Miko Namba, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Eisuke Murakami, Masami Yamauchi, Tomokazu Kawaoka, Daiki Miki, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, C. Hayes Nelson, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Investigation of infectivity of serum-derived HBV from patients and human hepatocyte chimeric mouse to HepG2/NTCP cells.
3. 学会等名 International HBV meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatsue Fujino, Kei Morio, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Eisuke Murakami, Masami Yamauchi, Tomokazu Kawaoka, Daiki Miki, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, C. Hayes Nelson, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Serum atototaxin levels is useful to evaluate fibrosis during entecavir therapy and to predict the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B.
3. 学会等名 International HBV meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野初江、柘植雅貴、寺岡雄史、盛生慶、大野敦司、中原隆志、村上英介、河岡友和、三木大樹、平松憲、今村道雄、相方浩、茶山一彰
2. 発表標題 核酸アナログ・ペグインターフェロン併用療法におけるHBs低下に寄与する因子の検討
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柘植雅貴、内田宅郎、栗原美緒、津島 健、野村元宣、寺岡雄史、大沢光毅、茶山弘美、大野敦司、中原隆志、村上英介、三木大樹、河岡友和、平松 憲、今村道雄、相方 浩、茶山一彰
2. 発表標題 HBV感染に伴う肝細胞内IL8発現亢進とインターフェロン反応性への影響
3. 学会等名 第28回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柘植 雅貴、内田宅郎、茶山一彰
2. 発表標題 新規ペグ化インターフェロン によるB型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス効果の検討
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 柘植雅貴、辰川裕美子、茶山一彰
2. 発表標題 核酸アナログ治療後のペグインターフェロン治療におけるHBs低下に寄与する因子の検討
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ダハリ ハレル  (Dahari Harel)	Loyola University Chicago Medical Center・The Program for Experimental & Theoretical Modeling (PETM), Division of Hepatology・Associate professor	
その他の研究協力者	茶山 一彰  (Chayama Kazuaki)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授	
その他の研究協力者	アブリチャード スーザン  (Uprichard Susan)	Loyola University Chicago Medical Center・Department of Microbiology and Immunology・Professor	
その他の研究協力者	デュベイ プレティ  (Dubey Preeti)	Loyola University Chicago Medical Center・The Program for Experimental & Theoretical Modeling (PETM), Division of Hepatology・Postdoctoral Fellow	