

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15131

研究課題名(和文)腸内細菌叢の構成変化に対するHBV感染肝細胞由来細胞外小胞の役割の検討

研究課題名(英文) Investigation of the role of extracellular vesicles from HBV infected cells in composition of intestinal microbiota

研究代表者

柿崎 正敏 (KAKIZAKI, Masatoshi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00816697

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マウス感染モデルを用いてHBV感染細胞由来の細胞外小胞(EVs)が、HBV関連病態への影響、腸管免疫に対する役割の解明を試みた。その結果、HBV感染細胞由来EVsは免疫応答を強く抑制し、HBVマウス感染モデルではHBV複製細胞の排除を抑制し、肝臓所属リンパ節における樹状細胞でPD-L1の発現が上昇することが重要である可能性が示唆された。また、骨髄細胞に感染細胞由来EVsを添加すると、腸内の免疫調節性DC集団であるCD11c+ CD11b+ CD103+ 細胞の割合が増加した。この結果から、HBV感染細胞由来EVsを取り込んだ骨髄細胞が腸管免疫に影響を与え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

これまで、HBV感染細胞から放出される細胞外小胞(EVs)の機能を解析した研究はなされてきたが、全てIn vitroでの研究であった。本研究は、HBV感染マウスモデルを使って初めてIn vivoでHBV感染細胞由来EVsの機能を明らかにしたものである。この機能は、HBV感染細胞由来EVsは免疫応答を強く抑制し、HBV複製細胞の排除を抑制するものである。さらに、HBV感染細胞由来EVsは腸管免疫にも影響を与えている可能性を示唆する結果も得られた。これらの結果は、B型肝炎関連病態の理解を深めるとともに、新規治療の開発への足がかりとなることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a mouse model of HBV infection to elucidate the effects of extracellular vesicles (EVs) derived from HBV-infected cells on HBV-related pathologies and their role in intestinal immunity. The results showed that EVs secreted from cells with HBV infection strongly suppressed the immune response, which inhibited the eradication of HBV-replicating cells in the HBV mouse model of infection. It was suggested that up-regulation of PD-L1 expression in dendritic cells in liver-draining lymph nodes may be important for the suppression of this eradication. Furthermore, the addition of infected cell-derived EVs to the culture supernatant of bone marrow cells increased the proportion of CD11c+ CD11b+ CD103+ cells, an immunomodulatory DC population in the gut. These results suggest that bone marrow cells that take up EVs derived from HBV-infected cells may affect intestinal immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス 細胞外小胞 ハイドロダイナミックインジェクション PD-L1 腸管免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

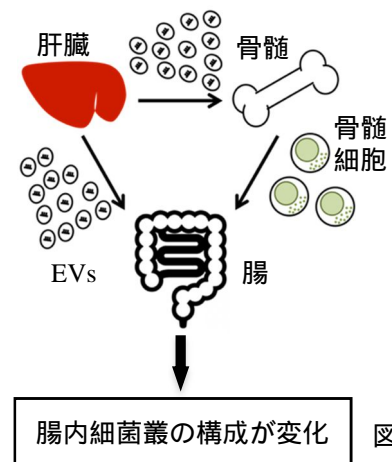
1. 研究開始当初の背景

人の腸管内には 500~1000 種類ほど、数にして 100 兆個以上の腸内細菌が存在すると言われており、これらの腸内細菌は宿主が代謝できない物質を代謝し、また、腸管免疫を適切に制御することで我々の健康が維持されている。バランスのとれた腸内細菌叢が健康には重要であるが、ひとたび腸内細菌叢のバランスが乱れると、全身の免疫系を過剰に活性化して自己免疫疾患などの炎症が悪化することや (Kawamoto S, et al. Science 2012.)、慢性肝炎や肝硬変を促進することが報告されている (Qin N, et al. Nature. 2014.)。さらに、近年、腸内細菌が産生する代謝物は、ヒトの病態に様々な影響を及ぼしていることが明らかになってきている。特に肝臓は、腸肝循環を介して長期にわたって腸内細菌の影響を受ける臓器であると考えられている。

B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) は全世界的な感染症であり、HBV 持続感染者は全世界でも 4 億人存在すると推定され、その大部分はアジア、アフリカ地域に集中しており、本邦でも HBV キャリアは約 100 万人と推定される。本邦では、母子感染予防策により新規感染は減り、核酸アナログによってウイルス複製は制御可能になりつつあるが、いまだ完全駆除はされがたく、増殖を制御しても肝臓の発症は必ずしも抑止できていない。近年、慢性肝炎または肝臓癌を発症した HBV キャリアでは、健康者や HBV 不顕性キャリアと比べ腸内細菌叢の構成が大きく異なることが報告されている (Y Kang, et al. J Hosp Infect 2017.)。さらに、Hydrodynamic injection (HI) 法を用いたマウス HBV 感染モデルでも同様の現象が報告されており (Han-Hsuan Chou, et al. PNAS 2015.)、B 型肝炎の慢性化や肝臓癌発症に腸内細菌叢の構成の変化が関与していることが示唆されている。しかしながら、腸内細菌叢の構成が変化するメカニズムは明らかになっておらず、メカニズムが解明されれば B 型肝炎の慢性化、肝臓癌発症の予防法開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

申請者は、これまで B 型肝炎関連病態に対する HBV 感染肝細胞由来の細胞外小胞 (extracellular vesicles: EVs) の関与を検討してきた。EVs は多くの細胞から分泌されており、分泌細胞由来の RNA やタンパクが内包され、細胞間コミュニケーションツールとして働く。近年、EVs は免疫細胞間での抗原情報の交換や、免疫細胞の活性化・不活性化など様々な免疫応答を制御する可能性が示されている。申請者はマウスを用いた研究で、HBV 感染肝細胞由来 EVs は全身性に取り込まれること、さらに HBV 感染肝細胞由来 EVs を取り込んだ (EVs+) 骨髄細胞は腸管向性を獲得することを見出した (未発表)。以上の結果に着目し、申請者は、「HBV 感染肝細胞由来 EVs が直接腸管内の細胞に取り込まれること、または、EVs+ 骨髄細胞が腸管に浸潤することが原因で腸管免疫系に異常が生じ、腸内細菌のバランスが乱れる」という仮説を立てた (図 1)。この仮説を検証することを本研究の目的とする。



3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 点を通じて、HBV 感染肝細胞由来 EVs の HBV 関連病態への影響、腸管免疫・腸内細菌叢に対する役割の解明を試みる。

(1) HBV 非感染または感染細胞由来 EVs の phenotype の検討

本研究では、HBV 感染肝細胞としてテトラサイクリン誘導プロモーターの制御下で HBV を産生する HepAD38 を用いる。また、HBV 非感染細胞として HepG2 を用いた。HepAD38 と HepG2 の培養上清から、超遠心でそれぞれ EVs を回収する。回収した EVs に対して下記の検討を行った。

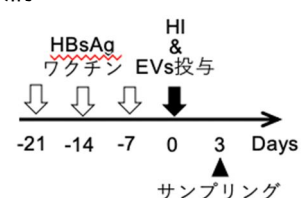
電子顕微鏡を用いて形態観察を行った。

EVs の粒子径を qNano を用いて測定した。

EVs 含まれるタンパク質を LC-MS 解析を用いて網羅的に解析した。

(2) HBV 感染マウスモデルを用いた HBV 感染細胞由来 EVs の機能の検討

マウス生体内で肝炎実験系を得るために、HBsAg (蛋白) 抗原ワクチンを一週間に一度の頻度で 3 回投与し、マウスを免疫する。その後 HBV レプリコンプラスミドを、HI 法を用いてマウス肝臓にトランスフェクションする。この操作後、HBV 肝炎実験系が得られる。この炎症が発症する途中で HBV 感染肝細胞由来 EVs を、尾静脈から投与する (図 2)。このモデルを用いて、HBV 感染細胞由来 EVs が実際に B 型肝炎に対してどのように働くのかを検証するため下記を検討した。



肝臓切片の HE 染色を用いて組織学的所見

肝臓での HBc 抗原発現の検索

肝臓所属リンパ節における免疫細胞のポピュレーション変化の検索

(3) EVs を取り込む前後の骨髄細胞の phenotype の検討

マウスから骨髓細胞を回収し培養する。この培養上清に EVs を投与し、24 時間後に骨髓細胞を回収し下記を検討した。

代表的な腸管ホーミング受容体として C-C chemokine receptor type 9 (CCR9) と $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの発現を FACS を用いて検索した。

腸管免疫の調節で重要な役割を果たしているのは、CD103+ の樹状細胞(DC)であることが報告されている。そこで、CD103+ DC のポピュレーションの変化を FACS を用いて検索した。

4. 研究成果

(1) HBV 非感染または感染細胞由来 EVs の phenotype の検討

電子顕微鏡観察の結果、HBV 感染・非感染細胞由来 EVs はともにエクソソーム様の形態をとることが示された(図 3A)。

qNano を用いて EVs の粒子径を測定した結果、感染と非感染に差は見られなかった(図 3B)。LC-MS 解析の結果、HBV 感染細胞由来 EVs からは 221 種のタンパク質が検出され、HBV 非感染細胞由来 EVs からは 198 種のタンパク質が検出された。また、感染・非感染ともに検出されたタンパク質は 126 種であった(図 3C)。このことから、HBV の感染に EVs に含まれるタンパク質のポピュレーションに影響を与えることが示唆された。

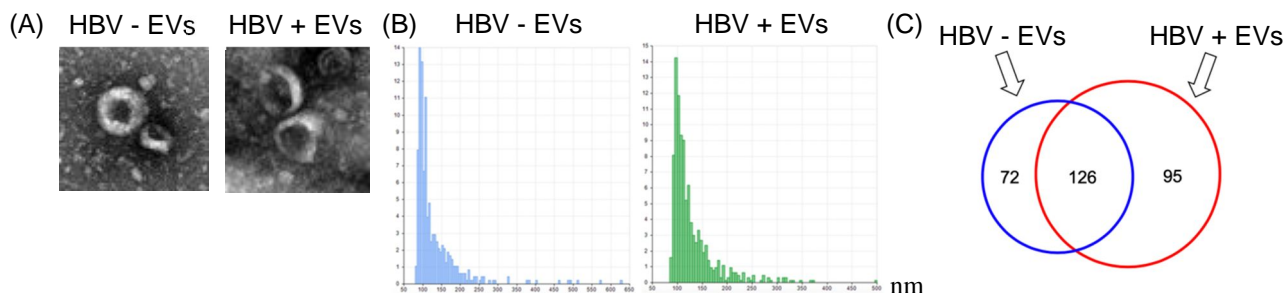
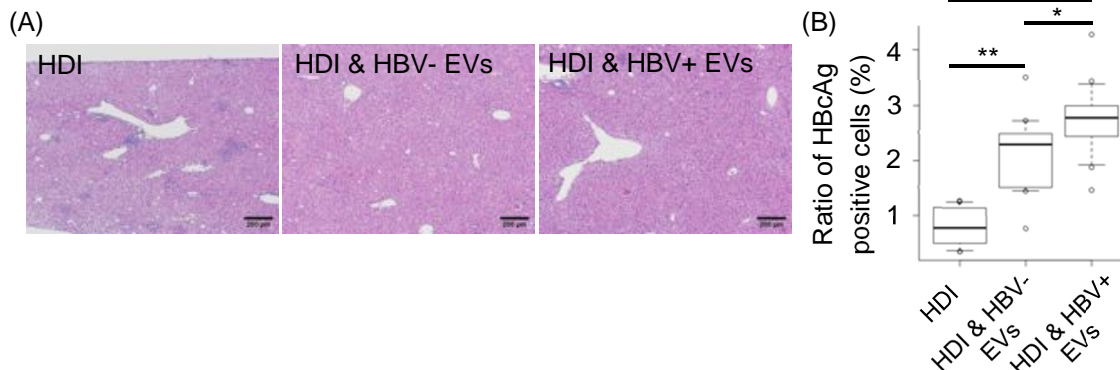


図 3 HBV 非感染または感染細胞由来 EVs の phenotype

(2) HBV 感染マウスモデルを用いた HBV 感染細胞由来 EVs の機能の検討

EVs を投与しなかったマウスの肝臓では、多数の細胞浸潤が認められたが、HBV 感染・非感染細胞由来 EVs を投与したマウスの肝臓では、細胞浸潤があまり認められなかった(図 4A)。

EVs を投与しなかったマウスの肝臓では、ほとんど HBc 抗原が確認できなかったが、HBV 感染・非感染細胞由来 EVs を投与したマウスの肝臓では、HBc 抗原が多数認められた(図 4B)。このことから、EVs は免疫抑制作用を持つことが示唆された。しかし、先行研究で、腫瘍由来 EVs には免疫抑制効果があることが報告されているが、HBV 非感染由来 EVs でも HBc 抗原が排除されず残存したことは、HepG2 が腫瘍由来の細胞株であることが原因と考えられる。そこで、HBV 感染そのものが EVs が免疫抑制作用を持つために必要であることを確認するため、健常者と HBV 患者の血清から EVs を採取し同様の実験を行った。その結果、健常者由来 EVs を投与したマウスではほとんど HBc 抗原が確認できなかったが、HBV 患者由来 EVs を投与したマウスの肝臓では、HBc 抗原が多数認められた(図 3C)。これより、HBV 感染そのものが EVs が免疫抑制作用を持つために必要であることが示唆された。HI 法を用いた HBV マウス感染モデルでは、肝臓所属リンパ節において HBV 排除に關与する HBV 特異的な免疫応答を誘導することが報告されている。そこで、次に肝臓所属リンパ節における免疫細胞のポピュレーション変化を検索した。T 細胞、B 細胞、マクロファージ、DC のポピュレーションに変化は見られなかった。しかし、HBV 患者由来 EVs を投与したマウスにおいて、DC の PD-L1 の発現が上昇していることが明らかになった(図 4D)。このことから、DC における PD-L1 の発現上昇が免疫抑制に關与している可能性が示唆された。



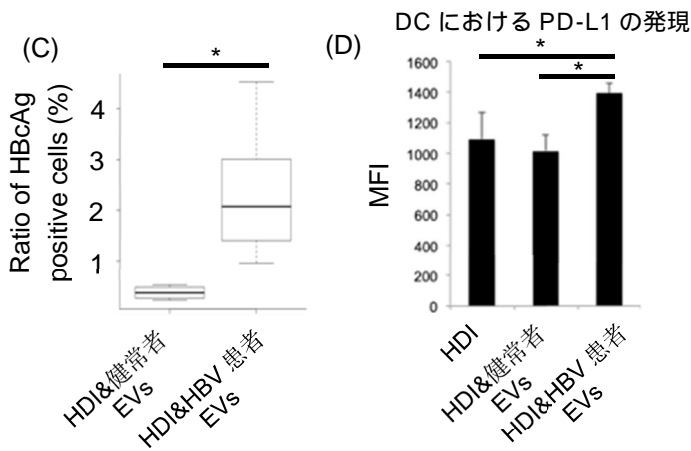


図4 HBV感染マウスモデルを用いたHBV感染細胞由来EVsの機能

(3) EVsを取り込む前後の骨髄細胞の phenotype の検討

代表的な腸管ホーミング受容体である CCR9 と $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの発現に差は見られなかった。このことから、EVs+ 骨髄細胞の腸管向性獲得には、CCR9 と $\alpha 4\beta 7$ とは別の受容体に関係している可能性が示唆された。

腸内の免疫調節性 DC 集団である CD11c+ CD11b+ CD103+ 細胞の割合は、BM 細胞培養に HBV 感染細胞由来の EVs を添加した後に増加した (図 5)。この結果から、HBV 感染細胞由来 EVs を取り込んだ骨髄細胞が腸管免疫に影響を与える可能性が示唆された。

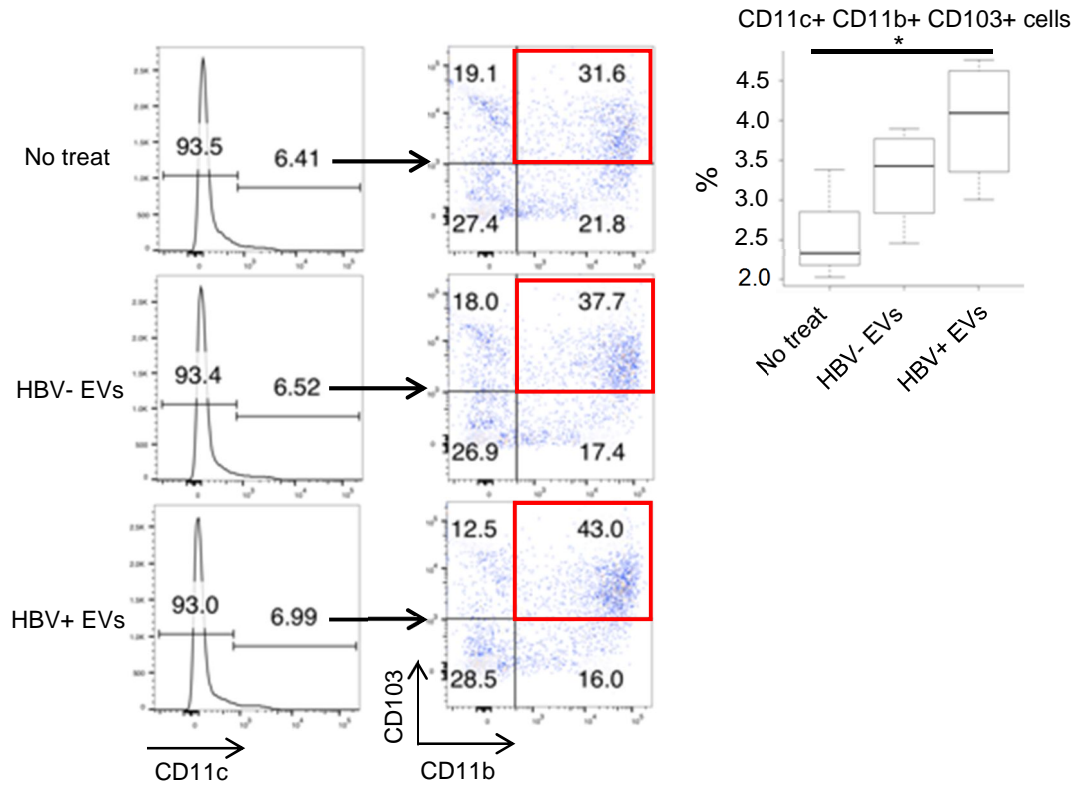


図5 EVsを取り込む前後の骨髄細胞の phenotype

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kakizaki Masatoshi, Yamamoto Yuichiro, Yabuta Suemi, Kurosaki Natsumi, Kagawa Tatehiro, Kotani Ai	4. 巻 13
2. 論文標題 The immunological function of extracellular vesicles in hepatitis B virus-infected hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0205886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1371/journal.pone.0205886	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 Yamamoto Yuichiro, Kakizaki Masatoshi, Shimizu Takayuki, Carreras Joaquim, Chiba Tetsuhiro, Chamoto Kenji, Kagawa Tatehiro, Aoki Taku, Nakamura Naoya, Ando Kiyoshi, Kotani Ai	4. 巻 -
2. 論文標題 PD-L1 is induced on the hepatocyte surface via CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6 up-regulation by the anti-HBV drug Entecavir	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	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） doi: 10.1093/intimm/dxaa018	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 Kawashima Masaharu, Carreras Joaquim, Higuchi Hiroshi, Kotaki Ryutaro, Hoshina Takahiro, Okuyama Kazuki, Suzuki Naoto, Kakizaki Masatoshi, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	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） doi: 10.1038/s41375-020-0737-9	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ai Kotani, Masatoshi Kakizaki, Yuichiro Yamamoto, Motoyuki Otsuka, and Tatehiro Kagawa
2. 発表標題 Composition change of extracellular vesicles secreted from hepatitis b virus (HBV) infected hepatocytes after treatment with nucleic acid analogs
3. 学会等名 international society for extracellular vesicles
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani, Masatoshi Kakizaki, Yuichiro Yamamoto, Motoyuki Otsuka, and Tatehiro Kagawa
2. 発表標題 Multi organ association mediated by extracellular vesicles secreted from HBV positive hepatocyte
3. 学会等名 international society for extracellular vesicles
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Kakizaki, Yuichiro Yamamoto, Ai Kotani
2. 発表標題 Extracellular vesicles secreted from HBV-infected cells inhibit the eradication of HBV-infected cells in the HBV-infection mouse model
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
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