

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791023

研究課題名(和文)HBVゲノタイプA感染に伴う病態解明に向けた基礎研究

研究課題名(英文)Basic research for clarifying the pathologic characteristics with HBV genotype A infection

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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルスゲノタイプによる違いを明らかにするため、培養細胞およびヒト肝細胞キメラマウスを用いた基礎研究を行った。B型慢性肝疾患治療薬である核酸アナログ製剤を用いた検討において、新規核酸アナログ製剤であるテノホビルは、既存の核酸アナログ製剤に耐性を示すようなウイルスに対し、抗ウイルス効果を発揮するが、アデホビル耐性ウイルスに対しては、十分な効果が得られない可能性が示唆された。また、B型肝炎ウイルスゲノタイプCとゲノタイプAについてテノホビルの抗ウイルス効果を比較した結果、ゲノタイプAのテノホビル感受性はゲノタイプCに比して弱い可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, basic research was performed using cell culture system and human hepatocyte chimeric mice for clarifying the differences between hepatitis B virus (HBV) genotype A and C. Lamivudine-resistant clones and lamivudine plus entecavir-resistant clones had similar tenofovir (TDF) susceptibilities to wild type clones. However, lamivudine plus adefovir-resistant clones acquired tolerance to TDF. Comparing between HBV genotype A and genotype C, the susceptibility to TDF in HBV genotype A was lower than that in HBV genotype C.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 感染症内科学

キーワード：B型肝炎 治療 核酸アナログ

1. 研究開始当初の背景

1981年以降、HBs抗原陽性の母親から出生した子供に対し、免疫グロブリン製剤、B型肝炎ワクチン製剤の投与が行われるようになり、母子感染に伴うB型肝炎症例は著しく減少している一方で、性行為感染症としてのB型肝炎が問題となり、B型肝炎急性肝炎発生数の把握やユニバーサルワクチネーションの必要性について議論されている。

当院を含めた広島県内の主要施設に対して行った過去5年間のB型肝炎急性肝炎調査でも、年間30例程度のB型肝炎急性肝炎が発生していた。なかでも、近年のB型肝炎急性肝炎例では、HBV genotype Aの感染例が増加しており、2000年～2003年に当院を受診したB型肝炎急性肝炎例では、5.3%に過ぎなかった genotype A感染は、2004年～2009年では、40%を占めていた(第47回日本肝臓学会にて報告)。広島県内の主要施設に行った調査においても genotype Aは38.3%を占めており、genotype Aの感染が拡大していることが推定されている。

通常、成人になってからHBVに感染した場合、感染は一過性にとどまり、持続感染となることは免疫抑制状態などの特殊な場合を除き、極めて稀であるが、HBV genotype Aの成人感染では、約10%の症例でキャリア化するとされている。つまり、B型肝炎急性肝炎の一部がキャリア化し、B型肝炎慢性肝炎へと移行する可能性が危惧される。今後、HBV genotype A感染がさらに拡大する可能性が高いと推測されるが、現在のところ、HBV genotype Aで慢性化するメカニズムは不明であり、慢性化を確実に予防する方法は確立されていない。

一方、現在のB型肝炎慢性肝炎に対する治療は、核酸アナログ製剤が大きな役割を担っている。しかしながら、その作用は、B型肝炎ウイルス(HBV)の肝細胞内での複製段階にある逆転写反応およびDNA合成を阻害することであり、HBVの感染肝細胞からの排除を行うものではない。そのため、長期投与が必須となり、長期間の核酸アナログ投与に伴い、核酸アナログに対して耐性を獲得したウイルス(薬剤耐性株)が出現することも少なくない。特に、genotype Aにおいて耐性株の出現率が高いという報告もあり、genotype A感染の拡大が予想されるなかで、多様な genotype における薬剤耐性株の予防法とそれらへの対応策の確立が急務であると考えられる。

2. 研究の目的

当研究室では、HBV複製培養肝癌細胞株を用いた *in vitro* モデルおよびHBV持続感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* マウスモデルを作製し、これらのモデルがHBVに対する抗ウイルス薬の薬効評価系として有用であることを報告してきた。

本研究では、HBV genotype C と genotype A

を比較することにより、臨床病態の解明を目指す。genotype Aの慢性化に関しては、*in vivo* のHBV持続感染マウスからHBV感染ヒト肝細胞を採取し、次世代シーケンサー解析を施行。遺伝子発現プロファイルを解析し、HBV持続感染メカニズムの解明を試みる。

一方、耐性変異の出現頻度の違いに関しては、*in vitro*、*in vivo*の薬効評価系を用いる。HBVに対する抗ウイルス効果が確認されている Lamivudine、Adefovir、Entecavir、Tenofovir を投与し、各 genotype の薬剤耐性変異株に対する抗ウイルス効果を検証する。また、HBV genotype Aは、genotype Cに比して薬剤耐性が生じやすいとの報告もあることから、*in vivo* マウスモデルを用いて、核酸アナログ長期投与に伴うマウス血清中の核酸アナログ耐性変異の出現頻度に genotype 間で差が生じるかについて検討を行う。

3. 研究の方法

1. B型肝炎ウイルスゲノムの作製

核酸アナログ使用歴のないB型肝炎慢性肝炎患者の保存血清より、DNAを抽出し、HBVゲノムを増幅し、1.4倍長のHBVゲノムを組み込んだHBV発現プラスミドを作製する。また、それぞれの核酸アナログに対する薬剤耐性変異が報告されていることから、作製したHBV発現プラスミドに遺伝子変異を加え、各種薬剤耐性株を発現するプラスミドを構築した。

2. *In vitro* における各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討

本検討の概要を図1に示す。作製したHBV発現プラスミド(genotype Aおよびgenotype C)を培養肝癌細胞株HepG2細胞にトランスフェクションし、培養上清中に様々な濃度の核酸アナログを添加。薬剤添加72時間後に、細胞内HBV複製中間体量をreal time PCRにて測定し、各種核酸アナログの抗ウイルス効果を解析した。この際、耐性変異に伴う抗ウイルス効果の変化だけでなく、genotype 間での核酸アナログ感受性の違いについても検討を行った。

3. *In vivo* における各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討

HBV発現プラスミドをトランスフェクションした培養細胞より産生されたHBV粒子をヒト肝細胞キメラマウスに接種。HBV持続感染マウスを作製後、マウスに核酸アナログを経口投与し、マウス血清中のHBVDNAの変化をreal time PCRにて検討した。

4. ヒト肝細胞を用いた細胞内遺伝子発現変化の検討

ヒト肝細胞キメラマウスは、T細胞・B細胞系の機能が欠如した高度な免疫不全マウスであるため、HBVが感染した肝細胞では、免疫応答の影響を受けず、HBVの直接的な作用により、細胞内遺伝子発現に変化が生じる。genotype Aにおいてキャリア化が高率である原因を検索するため、HBV持続感染ヒト肝細胞

胞キメラマウスを作製後、マウス肝臓からヒト肝細胞を採取し、次世代シーケンサーにて遺伝子発現変化を解析した。

4. 研究成果

1. 各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討

図1、図2に示すように、in vitro、in vivoの検討において、各種HBVの核酸アナログ製剤感受性は、臨床データを良好に反映することが示された。

図1. 各種核酸アナログの抗ウイルス効果の検討 (in vitro)

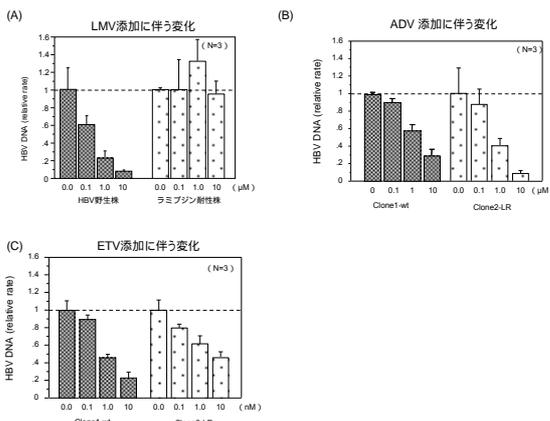
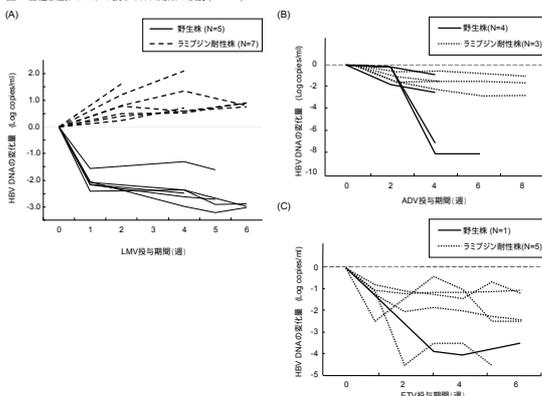


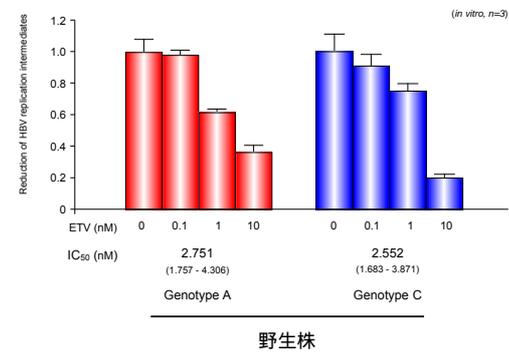
図2. 各種核酸アナログの抗ウイルス効果の検討 (in vivo)



そこで、ラミブジン・アデホビル耐性HBVであるrtA181T/N236T変異株は新規核酸アナログ製剤であるテノホビルに対する感受性も低下していることが示された。そこで、追加研究として、181番、236番いずれのアミノ酸変異が薬剤耐性に関与しているかについて検討したところ、236番のアミノ酸変異が加わることで、テノホビルの感受性は約1/4~1/5に低下することが確認された。一方、HBV genotype Aはgenotype Cに比して、テノホビルの感受性が低下していることが示された(図3)。

さらに、genotype間の相違が生じる責任部位を検討した結果、HBVポリメラーゼ遺伝子RT領域にある2つのアミノ酸がgenotype間のテノホビル感受性変化に関与していることが示された。

図3. 野生株に対するETVの抗ウイルス効果



2. ヒト肝細胞を用いた細胞内遺伝子発現変化の検討

HBVが感染した肝細胞では、免疫応答の影響を受けず、HBVの直接的な作用により、細胞内遺伝子発現に変化が生じる。そこで、本年度は、HBV持続感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、ヒト肝細胞内遺伝子発現の変化について、次世代シーケンサーを用いて検討した。その結果、HBV感染に伴い、免疫応答に関連する複数のパスウェイの遺伝子が有意な発現変化を生じており、HBV感染に伴い、ヒト肝細胞内で免疫応答が惹起されていることが示唆された。また、一部の遺伝子は、HBV感染成立後に核酸アナログを投与することにより、遺伝子発現が低下しており、これらの遺伝子は、HBV感染が直接的に遺伝子発現を誘導しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9件)

1. Kosaka K., Hiraga N., Imamura M., Yoshimi S., Murakami E., Nakahara T., Honda Y., Ono A., Kawaoka T., Tsuge M., Abe H., Hayes C.N., Miki D., Aikata H., Ochi H., Ishida Y., Tateno C., Yoshizato K., Sasaki T. and Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun* 441(1), 230-5, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.040. (査読有)
2. Arataki K., Hayes C.N., Akamatsu S., Akiyama R., Abe H., Tsuge M., Miki D., Ochi H., Hiraga N., Imamura M., Takahashi S., Aikata H., Kawaoka T., Kawakami H., Ohishi W. and Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 85(5), 789-98, 2013. doi: 10.1002/jmv.23540. (査読有)
3. Tsuge M. and Chayama K. Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J*

- Gastroenterol 48(6), 779-80, 2013. doi: 10.1007/s00535-013-0801-6. (査読有)
4. Tsuge M., Murakami E., Imamura M., Abe H., Miki D., Hiraga N., Takahashi S., Ochi H., Nelson Hayes C., Ginba H., Matsuyama K., Kawakami H. and Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol* 48(10), 1188-204, 2013. doi: 10.1007/s00535-012-0737-2. (査読有)
 5. Ohishi W., Cologne J.B., Fujiwara S., Suzuki G., Hayashi T., Niwa Y., Akahoshi M., Ueda K., Tsuge M. and Chayama K. Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: A nested case-control study. *Int J Cancer* 134(1), 154-63, 2013. doi: 10.1002/ijc.28337. (査読有)
 6. Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M., Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One*. 7(10): e47490, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0047490. (査読有)
 7. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M., Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tatenno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology* 56(2): 555-66, 2012. doi: 10.1002/hep.25651. (査読有)
 8. 柘植雅貴, 今村道雄, 茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗HBV薬剤感受性評価と臨床への応用」*肝胆膵* 65(4): 591-600, 2012 (査読有)
 9. 柘植雅貴, 平賀伸彦, 茶山一彰「HBV RT領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討」*消化器内科* 54(5): 575-581, 2012 (査読有)
- [学会発表](計 16件)
1. 占部綾子, 柘植雅貴, 茶山一彰「当院におけるB型急性肝炎の解析」第40回日本肝臓学会西部会 ワークショップ、岐阜、2013.12.7
 2. Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroyuki Ginba, Kazuhiro Matsuyama, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター、ワシントン DC、USA、2013.11.3
 3. Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ohno, Takashi Nakahara, Daiki Miki, Hiromi Abe, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Chise Tatenno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama. Antiviral effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones and different susceptibility between HBV genotype A and C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター、ワシントン DC、USA、2013.11.3
 4. Nami Mori, Masataka Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Th1/2 ratio was associated with anti-viral effects of sequential therapy with lamivudine and interferon- α in HBe antigen-positive chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター、ワシントン DC、USA、2013.11.3
 5. 柘植雅貴, 村上英介, 茶山一彰「薬剤耐性HBVに対するテノホビルの抗ウイルス効果と genotype による相違」第17回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション、東京、2013.10.9
 6. 村上英介, 柘植雅貴, 菅 宏美, 藤野初江, 小林知樹, 福原崇之, 榎木慶一, 大野敦司, 苗代典昭, 中原隆志, 本田洋土, 宮木大輔, 占部綾子, 横山聡榮, 河岡友和, 三木大樹, 平賀伸彦, 平松 憲, 今村道雄, 兵庫秀幸, 川上由育, 相方 浩, 高橋祥一, 茶山一彰「当院における核酸アナログ製剤の治療効果の解析」第17回日本肝臓学会大会 ポスター、東京、2013.10.9
 7. 柘植雅貴, 村上英介, 平賀伸彦, 阿部弘美, 今村道雄, 茶山一彰「薬剤耐性HBVに対する核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討と genotype による相違」第9回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、2013.6.29
 8. 柘植雅貴, 高橋祥一, 茶山一彰「HBV感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化」第49回日本肝臓学会総会 シンポジウム、東京、2013.6.7
 9. 村上英介, 柘植雅貴, 平賀伸彦, 阿部弘美, 大野敦司, 本田洋土, 河岡友和, 三木大樹, 今村道雄, 相方 浩, 高橋祥一, 越智秀典, 茶山一彰「薬剤耐性B型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果の検討」第49回日本肝臓学会総会一般演題、東京、2013.6.7

10. 柘植雅貴、平賀伸彦、今村道雄、越智秀典、高橋祥一、茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV・HCV 感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子発現変化の解析」第 50 回日本臨床分子医学会 ポスター、東京、2013.4.12
11. 柘植雅貴「B 型肝炎治療における HBV 関連マーカーの臨床的意義」アポット肝疾患セミナー広島、広島、2013.11.14
12. 柘植雅貴「B 型肝炎ウイルス感染と抗ウイルス療法」Digestive Disease Renaissance、大阪、2013.10.19
13. 小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋土、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における B 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果の検討」第 54 回日本消化器病学会大会 ポスター、神戸、2012.10.10
14. 柘植雅貴「薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログの抗ウイルス効果」Hepatology Meeting in Japan 2012 一般演題、東京、2012.10.27
15. 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰「HBV 薬剤耐性変異株に対するテノホビル抗ウイルス効果」第 48 回日本肝臓学会総会ワークショップ 5、金沢、2012.6.6
16. 村上英介、柘植雅貴、今村道雄、小林知樹、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋土、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平賀伸彦、平松 憲、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「HBV 既往感染者に対する血液悪性疾患化学療法時の核酸アナログ製剤による HBV 再活性化予防についての検討」第 48 回日本肝臓学会総会 一般演題、金沢、2012.6.7

〔図書〕(計 2 件)

1. 柘植雅貴、茶山一彰「HBV の感染実験系」Hepatology Practice 第 1 巻 B 型肝炎の診療を極める、文光堂、185-192、2013
2. 柘植雅貴、茶山一彰「B 型肝炎、D 型肝炎」カラー版 消化器病学、西村書店、1150-1155、2013

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)
該当なし

○取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 雅貴 (Masataka Tsuge)

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