

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860491

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス感染による肝線維化進展、発癌機序の解析

研究課題名(英文) The effect of sirtuin on the pathogenesis of hepatitis B virus-related liver disease

研究代表者

中本 晋吾 (Nakamoto, Shingo)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90586596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)は肝臓に持続感染して慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと進展する。本研究では主に細胞老化との関連に着目しウイルス持続感染による肝病態発症の分子機序を解明することを目標とした。老化関連疾患への関与が知られるサーチュイン遺伝子の発現抑制は肝星細胞の活性化や線維化関連遺伝子の発現レベルと関連していた。HBVは肝星細胞の活性化と関連していた。細胞老化アッセイからX蛋白と細胞老化との関連性が示唆された。CRISPR/Casシステムを用いたサーチュイン遺伝子ノックアウト細胞では、サーチュインの欠損はHBV複製に影響した。サーチュインはHBV関連肝疾患の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) can cause chronic infection in the liver. It can lead to chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Cellular aging may be associated with HBV-related liver diseases. Knockdown of sirtuins, genes associated with age-related diseases, was associated with the activity of hepatic stellate cell. HBV replication altered the activity of hepatic stellate cell. Cellular aging assay suggested that X protein expression may have a potential to alter cellular aging. Lack of sirtuin using CRISPR/Cas system affected HBV replication. The results suggested that sirtuin may have a role in HBV-related liver disease.

研究分野：ウイルス性肝疾患

キーワード：B型肝炎ウイルス 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は肝臓に持続感染し、炎症やストレス、加齢、遺伝要因などが複雑に絡みながら慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと進展する。肝線維化は肝臓の慢性的な炎症と再生の繰り返しの中で、組織の正常な再生ができずに細胞外基質が蓄積するなかで進行する。肝疾患の進行によりコラーゲンやその他の基質が沈着する。肝細胞と血液との物質交換の場である類洞血管周囲腔での細胞外基質の沈着は物質交換の阻害を起こす。門脈域における線維化には門脈域に存在する線維芽細胞が関与する一方、肝実質での線維化には類洞周囲腔に存在する肝星細胞が重要な役割を果たすとされる。

2. 研究の目的

本研究では主に細胞老化との関連に着目し、ウイルスの持続感染による肝病態発症の分子メカニズムを解明することを目指した。そのためにウイルス感染細胞や肝癌細胞株を用いて老化関連疾患との関係が示唆されているサーチュイン遺伝子の機能解析、サーチュイン遺伝子が肝線維化に関与する肝星細胞の活性化や線維化に与える影響についての解析、ウイルス感染細胞を用いた老化関連遺伝子の発現解析等を目的とした。

3. 研究の方法

細胞

ヒト正常肝より単離された不死化培養肝星細胞を用いた。肝星細胞はアルファ平滑筋アクチンを産生し活性化星細胞の形質を示す。その他正常肝細胞の形質を示す健常ヒト肝由来の単層細胞培養系や、ヒト肝癌患者由来の肝癌細胞株等を用いた。

サーチュインノックアウト細胞

CRISPR/Cas システムのうちダブルニック法を用いたゲノム編集法により標的遺伝子のノックアウト細胞の作製を行った。各プラスミドを脂質トランスフェクションにより細胞に導入、抗生物質耐性クローンを選択した。

プラスミド、ウイルス

HBV 粒子、HBV 全長遺伝子あるいは X 遺伝子発現プラスミドを用いた。自己複製機構を有し宿主ゲノムへ組み込まれることなく複製維持されるエピソード型ベクターを用いて X 遺伝子を発現するプラスミドを作成した。

RNA シークエンス

細胞より全 RNA を回収、polyA RNA を対象として RNA シークエンスを行った。ヒトリファレンス配列を用いてマッピング、遺伝子発現量は単位配列長・リード数当たりのリード数で評価した。ノックアウト細胞と野生型細胞で発現変動遺伝子を評価した。

アッセイ

老化関連ベータガラクトシダーゼ染色は細胞ベータガラクトシダーゼ活性の有無をインドール系基質を用いて染色評価した。その他定量 PCR、イムノプロット法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 肝星細胞での検討

HBV のサーチュイン発現への影響

肝星細胞において B 型肝炎ウイルスとサーチュインとの関連について検討するため、肝星細胞にウイルス全長発現プラスミドを一過性に形質導入した際のサーチュイン遺伝子発現に与える影響について検討した結果、mRNA 発現レベルに明確な変化は見られなかった。1 型アイソフォームの検討ではイムノプロットでタンパク発現レベルに差は見られなかった。次に X タンパクを過剰発現させた際の影響について検討した。全体としてサーチュイン発現に与える影響はみられないが、軽微であった。これらより検討した条件下において、ウイルス複製は肝星細胞におけるサーチュイン発現に影響を与えていないと考えられた。

HBV のサイトカイン産生への影響

次に B 型肝炎ウイルスが肝星細胞のサイトカイン産生に与える影響について検討した。ウイルス全長発現プラスミドの一過性導入に対して炎症性サイトカインである CXCL8 の発現上昇が見られたことから、ウイルスは肝星細胞の炎症応答を誘導すると考えられた。一方星細胞活性化の指標であるアルファ平滑筋アクチンの遺伝子発現レベルを検討したところ、ウイルス導入により低下しており、コラーゲン遺伝子の発現の低下傾向を認められた。次に B 型肝炎ウイルス産生肝癌細胞あるいは非産生肝癌細胞を肝星細胞と共培養し、肝星細胞のサイトカイン産生や線維化形成に与える影響について検討した。一定の条件下においてウイルス産生細胞では非産生細胞と比較して肝星細胞からの炎症性サイトカイン産生が亢進するという結果となり、肝星細胞へのウイルス直接導入の場合とも一致する結果と考えられた。

サーチュインの肝星細胞活性化への影響

次にサーチュインと肝星細胞におけるサイトカイン産生や線維化形成との関連について検討した。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 TNF は肝星細胞において CXCL8 などのサイトカインを強力に誘導するが、サーチュイン活性誘導剤は肝星細胞におけるサイトカイン誘導に明らかな影響を与えなかった。肝星細胞と肝癌細胞との共培養時におけるサーチュイン活性誘導剤の検討を行ったが、サイトカイン産生等に明確な影響は見られなかった。次に低分子干渉 RNA によるサーチュインノックダウンに対する影響を検討した。サーチュインノックダウンにより肝星

細胞における CXCL8 発現が亢進した一方で、TNF 処理では変化が見られなかった。平滑筋アクチンの発現やコラーゲンの発現が低下した。以上のことからサーチュインタンパク発現が肝星細胞の活性化に關与している可能性が考えられたが、酵素活性への依存に關しては異なる活性化剤を用いた際には肝星細胞の活性化に影響するという結果も得られており、詳細は今後の検討課題と考えられた。

(2) 肝細胞での検討

サーチュインの B 型肝炎ウイルス複製への影響

肝癌細胞ないし肝細胞を用いてサーチュインと B 型肝炎ウイルス複製との關連について検討した。ウイルス遺伝子を一過性に導入した複数の肝癌細胞を用いた検討ではサーチュインノックダウンによりウイルス複製の変動がみられたが、その効果は細胞株に依存していた。ウイルス産生あるいはウイルスタンパク産生肝癌細胞株を用いた検討では全体としてサーチュイン阻害剤ないし誘導剤処理に対してウイルス発現レベルは明確な影響を受けなかった。ウイルス感染肝細胞を用いた検討ではサーチュイン阻害剤によりウイルス複製は明確な影響を受けなかった。一方後述するサーチュインノックアウト細胞と野生型細胞に対してウイルス遺伝子を一過性に導入してウイルス増殖能を比較した結果、サーチュイン欠失がウイルス遺伝子の転写能に影響するという結果を得た。以上のことからサーチュイン活性調節薬剤に対してウイルス複製は影響をうけない一方で、サーチュイン量的変化に依存しているという可能性が考えられた。ウイルス標的タンパクの同定やサーチュインとの相互作用について今後の検討課題と考えられた。

細胞老化

非癌肝細胞株を用いてウイルス複製ないしタンパク産生が細胞老化に与える影響について検討した。X タンパクを一過性に導入後 48 時間で老化關連ベータ GAL 染色アッセイを行い評価した。老化細胞の出現は X 蛋白の発現有無により明確な差は見られなかった。次にウイルス全長遺伝子を一過性に発現させて同様に検討したところ、全体として老化細胞の頻度に大きな差を認めなかった。次にサーチュインの一過性ノックダウンやサーチュイン機能調節剤の影響について検討したところ、老化細胞の頻度に有意な差を認めなかった。以上のことから本実験条件のもとで一過性の暴露に対しては細胞老化への影響は低いと考えられたが、異なるジェノタイプや変異の影響等についてさらなる検討が必要と考えられた。より長期暴露の影響を検討するためエピソード発現ベクターの実用性について検討した。エピソードベクターによる X タンパクの発現は細胞株依存性であ

った。X タンパク発現可能な細胞株について発現維持が可能な期間を検討し 2 週間の発現持続を確認した。本ベクターを用いて細胞老化に対する影響を検討した。予備的な検討では X タンパクにより老化細胞の頻度に変化がみられたが、細胞増殖に与える影響についての評価やこれを補正した場合の結果について慎重に判断する必要があると考えられ、今後の検討課題と考えられた。

サーチュインノックアウト細胞の作製

肝癌細胞株、肝星細胞株を用いて CRISPR/Cas ダブルノック法によるノックアウトを行った。抗生物質選択後複数クローンを回収しイムノプロットでサーチュインの発現を確認した。肝癌細胞株においてノックアウトクローンの選択は可能であり、DNA シークエンスにより酵素活性領域中の補酵素結合領域上に存在する標的領域の遺伝子欠失が確認された。一方で導入効率が低いことが確認され、肝星細胞においては本研究中ノックアウト細胞の作製が実現できず今後の課題と考えられた。ノックアウト細胞の形質を野生型細胞と比較して細胞増殖アッセイにより細胞増殖特性を評価した。ノックアウトによる細胞アセチル化反応への影響についてイムノプロットアッセイにより評価した。サーチュインノックアウトにより一部のタンパクアセチル化に影響が見られた。

ノックアウト細胞の遺伝子発現プロファイル

RNA シークエンスによりノックアウト細胞と野生型細胞の遺伝子発現を比較し、ノックアウト細胞の特性を評価した。変動遺伝子群の解析によりサーチュインノックアウトが特定の細胞機能に關連する一連の遺伝子群に影響を及ぼしていた。今後異なる細胞に対する機能的影響を評価する上での基礎的データとして、今後肝線維化との關連性についてさらなる検討を行う必要があると考えられた。

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 7 件)

- (1) Discrepancy between Hepatitis C Virus Genotypes and NS4-Based Serotypes: Association with Their Subgenomic Sequences. Win NN, Nakamoto S, Kanda T, Takahashi H, Takahashi-Nakaguchi A, Yasui S, Nakamura M, Wu S, Imazeki F, Mikami S, Yokosuka O, Gono T, Shirasawa H. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 17;18(1). pii: E172. doi: 10.3390/ijms18010172. (査読有)

(2) Effect of Hepatitis C Virus Genotype 1b Core and NS5A Mutations on Response to Peginterferon Plus Ribavirin Combination Therapy. Nakamoto S, Imazeki F, Arai M, Yasui S, Nakamura M, Haga Y, Sasaki R, Kanda T, Shirasawa H, Yokosuka O. Int J Mol Sci. 2015 Sep 7;16(9):21177-90. doi: 10.3390/ijms160921177. (査読有)

(3) Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment. Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Int J Mol Sci. 2014 Nov 21;15(11):21455-67. doi: 10.3390/ijms151121455. (査読有)

〔学会発表〕(計 6件)

(1) Association between Sirtuins Expression and Hepatocellular Carcinoma Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Sasaki R, Haga Y, Nakamura M, Win NN, Yokosuka O, Shirasawa H. 25th Asian Pacific Association for the Study of the Liver Feb 22 2016 International Convention Center Pamir (Tokyo, Minato-ku)

(2) Inhibition of epigenetic regulators affects hepatitis B virus (HBV) replication and Hepatitis B surface (HBs) antigen production. Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Shirasawa H, Yokosuka O. The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases Nov 16 2015 San Francisco (USA)

(3) Screening of epigenetic compound library using primary hepatocyte persistantly infecting hepatitis B virus Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Jiang X, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Shirasawa H, Yokosuka O. 24th Conference of the Asian Pacific Associaton for the Study of the Liver Mar 13 2015 Istanbul (Turkey)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
中本 晋吾 (Nakamoto Shingo)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号： 90586596

(2)研究分担者 ()
研究者番号：

(3)連携研究者 ()
研究者番号：

(4)研究協力者 ()