

201321019A

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

エクソソームを介したHBV感染及び発がんメカニズム解析と治療戦略

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成26（2014）年5月

# 目次

I. 総括研究報告	
エクソソームを介した HBV 感染及び発がんメカニズム解明と治療戦略の総括	3
落谷 孝広	
II. 分担研究報告	
1. エクソソームに含まれる宿主因子の同定と肝がん発症能の解明	6
仁科 博史	
2. エクソソーム由来宿主因子の細胞増殖分化能の解明	7
宮島 篤	
3. エクソソーム内 HBV-DNA・RNA および HB 抗原の定量解析	9
梅村 武司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	13

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)  
総括研究報告書

エクソソームを介した HBV 感染及び発がんメカニズム解明と治療戦略の総括  
研究代表者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野・分野長

研究要旨

最近、細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームに関心が集まり、複数のウイルス種の感染機構やウイルス依存的疾患発症メカニズムにエクソソームが仲介することが報告されている。しかしながら、HBV とエクソソームとの関わりは未解明のままである。本研究では、HBV 感染細胞から放出されるエクソソームが、それらの免疫系細胞に作用して感染を制御している可能性に注目し、HBV の感染、伝播、薬剤耐性、ならびに発がんメカニズムに、エクソソームがどのように関係しているかを解明する。初年度は本研究の準備期間とし、1) HBV-X タンパク質を発現するヒト肝細胞の分泌するエクソソームを分離・精製する事に成功した。2) (1) で準備したエクソソームを、ヒト不死化星細胞の培養系に導入する系を樹立した。3) (1) のエクソソームのプロテオーム解析に着手した。4) (1) のエクソソームを分担研究者に供与するための大量培養系構築を開始した。5) 肝臓が内包する免疫非依存的異常肝細胞排除機構の存在を見出した (論文準備中)。6) HBV 感染エクソソームに含まれる宿主因子を同定に向けて、網羅的質量分析法の構築を開始した。7) HBV 感染エクソソームに含まれる因子の機能解析に向けて、肝臓中の免疫細胞のセルソータによる分離法を確立した。8) NK 細胞は HBV 感染への関与が示唆されている。マウス NK 細胞の新たなサブセットを見いだした (論文投稿中)。9) HBV 感染エクソソームに含まれる宿主因子の肝線維化に及ぼす影響を評価するために、肝星細胞の分離培養系とその他の非実質細胞との共培養系の構築を開始した。10) 血清中の HBV RNA の定量系を確立して臨床検体で測定した。11) HBV 感染エクソソーム内の HBV-DNA、HBV-RNA、HBs 抗原の定量を行えるようにするために検討を開始した。

A. 研究背景、目的  
(背景)

B型肝炎ウイルス (HBV) に対する治療としては、核酸アナログ製剤が主流であるが、薬剤耐性株の出現と長期間服用の副作用が問題となっていて、新規治療法が臨まれている。しかしHBVによる感染伝播や発がんメカニズムは必ずしも明らかにされておらず、新しい創薬研究が望まれている。

最近、細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームに関心が集まり、複数のウイルス種の感染機構やウイルス依存的疾患発症メカニズムにエクソソームが仲介することが報告されている。しかしながら、HBV とエクソソームとの関わりは未解明のままである。HBV感染時に、NK細胞、NKT細胞、DC等の自然免疫系が抑制され、感染拡大につながり、また逆に、HBV慢性肝炎では、免疫系の過剰な活性化が誘導され、肝障害の増悪化やがん化につながることもある。従って、HBV感染細胞から放出されるエクソソームが、それらの免疫系細胞に作用して感染を制御している可能性が大きい。

HBV根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBVの感染、伝播、薬剤耐性、ならびに発がんメカニズムに、エクソソームがどのように関係しているかを解明することは緊急の研究課題である。

B. 研究方法



- (1) 細胞外分泌顆粒であるエクソソームによる HBV 感染、免疫細胞制御、星細胞の活性化、および薬剤耐性メカニズム解明
- (2) エクソソームによる発がんメカニズム解明
- (3) HBV 感染培養系を用いたエクソソームによる感染機構の解明とエクソソーム阻害による感染防御の検討
- (4) HBV 感染肝細胞の分泌するエクソソーム内の HBV 関連タンパク質および宿主因子の同定、を実施することで、エクソソームを起点とした HBV 感染とそれに由来する肝臓疾患の防御の創薬研究
- (5) 上記を目標に、最終的にエクソソームを阻害す

る新規 HBV 治療薬を開発する。

### (倫理面への配慮)

本研究で使用する細胞は、いずれもインフォームドコンセントのもとに倫理審査を得て採取され、市販されて HBV 感染エクソソームに含まれる因子の機能解析しているヒト肝細胞や株化された星細胞であるため、倫理的な問題点はない。

## C. 研究結果

・研究代表者(落谷 孝広)

(1) HBV-X タンパク質を発現するヒト肝細胞の分泌するエクソソームを分離・精製する事に成功した。

(2) (1) で準備したエクソソームを、ヒト不死化星細胞の培養系に導入する系を樹立した。

(3) (1) のエクソソームのプロテオーム解析に着手した。

(4) (1) のエクソソームを分担研究者に供与するための大量培養系構築を開始した。

・研究分担者(仁科 博史)

(1) 肝臓が内包する免疫非依存的な異常肝細胞排除機構の存在を見出した(論文準備中)

(2) HBV 感染エクソソームに含まれる宿主因子を同定に向けて、網羅的質量分析法の構築を開始した。

・研究分担者(宮島 篤)

(1) HBV 感染エクソソームに含まれる因子の機能解析に向けて、肝臓中の免疫細胞のセルソータによる分離法を確立した。

(2) NK 細胞は HBV 感染への関与が示唆されている。マウス NK 細胞の新たなサブセットを見いだした(論文投稿中)。

(3) HBV 感染エクソソームに含まれる宿主因子の肝線維化に及ぼす影響を評価するために、肝星細胞の分離培養系とその他の非実質細胞との共培養系の構築を開始した。

・研究分担者(梅村 武司)

(1) 血清中の HBV RNA の定量系を確立して臨床検体で測定した。

(2) HBV 感染エクソソーム内の HBV-DNA、HBV-RNA、HBs 抗原の定量を行えるようにするために検討を開始した。

## D. 考察

初年度の短い期間は、主に本研究事業に必要な細胞の準備や解析系の最適条件の設定に費やされた。今後の方針を以下に明記する。

(1) 初年度に解析をした HBV 感染による疾患エクソソームが、実際の HBV 感染患者の血清中に存在することを梅村らが 10 症例程度の臨床検体を用いて検証する。

(2) 落谷、仁科、宮島らは、疾患エクソソームに特徴的な分子群の予備的な解析を行ない、数個の標的候補分子の選択に従事する。ここで用いられる系は、全て *in vitro* の培養系であり、すでに落谷らによ

って確立されているエクソソームの分泌抑制の系等を駆使することで、感染性や細胞のトランスフォーム(初期のがん化)に関する知見を収集する。

(3) マウス肝臓構成細胞の初代培養系を用いて HBV 感染エクソソームに含まれる因子の機能解析

(4) HBV 感染エクソソーム内の HBs 抗原の定量をするために高感度 HBs 抗原測定法の改良を行い、定量を行う。(梅村)

## E. 結論

HBV 感染ヒト肝細胞から分泌される細胞外小胞顆粒であるエクソソームの回収や精製方法が、他のがん細胞等の場合とほぼ同様に施行可能である条件を設定できた。今後は、このエクソソームの機能を細胞レベルで検証し、感染エクソソーム中の分子レベルの解析に進むための素地が出来上がった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, and Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. Springer. ISBN 978-3-319-03724-0.
2. Thirion M and Ochiya T. Roles of microRNAs in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases. *Viruses* 2013; 5(11), 2690-703; doi:10.3390/v5112690.
3. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawarahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology*. 2013; 58(3), 1153-65.
4. Thirion M and Ochiya T. Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In *MicroRNAs in cancer* (pp. 308-332). 2013; Enfield, New Hampshire, Science Publishers.
5. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer. *Front Biosci*, 18:199-223, 2013
6. Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma. *Histol histopathol*, 28:437-451, 2013
7. Gailhouste L, Ochiya T. MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression. *Cancer Diagnostics*, pp 12-14, 2013

### 2. 学会発表

1. 「The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.」、落谷孝広、第

20 回 肝細胞研究会 イブニングセミナー  
(2013.9.26 大阪)

2. Ochiya T. 「Hepatocyte from other sources of stem cell」. APASL Liver Week 2013, Suntec.Singapore. June 6-10

**G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)**

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)  
分担研究報告書

エクソソームに含まれる宿主因子の同定と肝がん発症能の解明  
研究分担者 仁科 博史 東京医科歯科大学

**研究要旨**

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染細胞が放出するエクソソームが、星細胞を活性化することを研究代表者の落谷は見出しており、その活性化機構の解明のためには、エクソソームに含まれる宿主因子の同定が求められている。我々の研究グループでは、今年度所属機関に整備された網羅的質量解析技術を駆使して、主にタンパク質の同定を行う。本年度は、MALDI-TOF/TOF/MS や nanoLC-OrbiTrap/MS, nanoLC-QqQ/MS, nanoLC-QTOF/MS の整備が整い、網羅的タンパク質の同定およびそれらの翻訳後修飾の解析の準備が整った。

**A. 研究背景、目的  
(背景)**

HBV感染細胞から放出されるエクソソームがどのように線維化や肝がん発症の病態に関与するかは不明であった。研究代表の落谷による星細胞活性化誘導能の発見はこの課題の糸口になることが期待されている。そこで我々は、最新の質量分析装置を用いた、エクソソーム内の網羅的宿主因子の解析を目的に実験を行うことになった。

**B. 研究方法**

HBV 感染細胞から回収されるエクソソームからタンパク質を抽出し、1) 2次元電気泳動で展開し、非感染細胞から回収されるエクソソームと比較検討し、HBV 感染細胞に特異的に存在するタンパク質スポットを同定する。また、両エクソソームから回収された全タンパク質をトリプシンで消化し、網羅的にペプチド配列を決定し、HBV 感染細胞特異的なペプチドを同定する。

**(倫理面への配慮)**

本研究においては組換えDNA実験を含むが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、およびこれに基づく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得ている。また、動物実験の承認も得ている。

**C. 研究結果**

本年度は、MALDI-TOF/TOF/MS や nanoLC-OrbiTrap/MS, nanoLC-QqQ/MS, nanoLC-QTOF/MS の整備が整い、2次元電気泳動で展開したスポットを確実に決定する条件を得ることに成功した。網羅的ペプチド同定にはまだ条件検討が必要である。

**D. 考察**

エクソソームから回収できるタンパク質量は一般的に十分とは言えず、その解析は困難な場合が多い。一方、我々のシステムは感度の向上に努力したため、同定可能であると期待できる。

**E. 結論**

整備された質量分析システムを用いて HBV 感染細胞特異的な宿主因子の同定の準備が整った。

**F. 研究発表**

1. 論文発表  
特になし

2. 学会発表  
特になし

**G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)**

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

エクソソーム由来宿主因子の細胞増殖分化能の解明  
研究分担者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所

### 研究要旨

細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームが複数のウイルス種の感染機構やウイルス依存的疾患発症メカニズムに関与することが報告されている。しかし、HBV とエクソソームとの関わりは未解明のままである。HBV 感染時には、NK 細胞、NKT 細胞、DC 等の自然免疫系が抑制されることが感染拡大につながり得る。逆に、HBV 慢性肝炎では、免疫系の過剰な活性化が誘導され、肝障害の増悪化やがん化につながる可能性もある。HBV 感染細胞から放出されるエクソソームが、それらの免疫系細胞に作用して感染を制御している可能性が高いと考えられる。そこで、本研究では肝臓における免疫系細胞や肝線維化に関与する細胞種等の性状解析を行うとともに、HBV 感染細胞由来エクソソームの作用を解析するための実験系の確立を目指す。

### A. 研究背景、目的 (背景)

B 型肝炎ウイルス (HBV) に対する治療としては、核酸アナログ製剤が主流であるが、薬剤耐性株の出現と長期間服用の副作用が問題となっていて、新規治療法が望まれている。しかし HBV による感染伝播や発がんメカニズムは必ずしも明らかにされておらず、新しい創薬研究が望まれている。

最近、細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームが複数のウイルス種の感染機構やウイルス依存的疾患発症メカニズムに関与することが報告されている。しかしながら、HBV とエクソソームとの関わりは未解明のままである。HBV 感染時に、NK 細胞、NKT 細胞、DC 等の自然免疫系が抑制され、感染拡大につながり、また逆に、HBV 慢性肝炎では、免疫系の過剰な活性化が誘導され、肝障害の増悪化やがん化につながることもある。従って、HBV 感染細胞から放出されるエクソソームが、それらの免疫系細胞に作用して感染を制御している可能性が大きい。

HBV 根絶を目指した B 型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBV の感染、伝播、薬剤耐性、ならびに発がんメカニズムに、エクソソームがどのように関係しているかを解明することは緊急の研究課題である。本研究では、とりわけ肝臓の自然免疫系細胞である NK 細胞やマクロファージなどに対する HBV 感染細胞由来エクソソームの作用を明らかにすることを目的として、それら細胞の性状解析を行う。また、HBV 感染細胞由来エクソソームの肝線維化に対する作用を解析するための培養系の樹立を目指す。

### B. 研究方法

当研究室では種々の肝臓構成細胞に発現する細胞膜タンパク質を多数同定し、モノクローナル抗体とセルソーターによる細胞分離法を確立してきた。そこで本研究では、こうした細胞分離法を用いて、免疫細胞や肝星細胞など肝非実質細胞をセルソーターで分離して培養することで、細胞の性状を解析するとともに、HBV 感染細胞由来エクソソームに含まれる因子の作用を解析するシステムの開発を行う。

#### (倫理面への配慮)

本研究はマウスから分離した細胞の初代培養系による解析であり、生命倫理問題は派生しない。

### C. 研究結果

NK 細胞は IFN-g を産生して抗腫瘍作用を増強するとともに、腫瘍細胞やウイルス感染細胞を傷害する主要な免疫細胞である。NK 細胞は他の血球同様に骨髄由来であるが、末梢においてはいくつかのサブセットが存在する。我々は、Ly6C を高発現する NK 細胞は細胞傷害活性の低い休眠状態の NK 細胞であり、Ly6C 低発現 NK 細胞に由来すること、この Ly6C 高発現 NK 細胞は IL-15 により Ly6C 低発現の活性化 NK 細胞に変化することを見いだした。このように、末梢の NK 細胞は可逆的に休眠状態に入ることが示された。

マクロファージは肝線維化の進行および線維の溶解の両方のステップに関与する細胞であるが、マクロファージには少なくとも M1/M2 というサブセットがあり、そのバランスが種々の病態の進行に影響する。Trb1 は C/EBP を制御する因子であり、Trb1 欠損マウスの肝臓では M2 マクロ

ファージが著減し、CC14による線維化も抑制されていた。

オンコスタチンM(OSM)は、肝再生を促進するサイトカインであるが、肝線維化に対する作用は不明であった。本研究では、線維化の主体と考えられる肝星細胞と、その他の肝非実質細胞との細胞間相互作用に焦点を絞り、OSMの肝線維化における作用を解析した。Hydrodynamic Tail Vein injection法によりOSMを肝臓で過剰発現させたマウスでは、肝線維化関連遺伝子(Collagen type1, Collagen type3, TIMP1,  $\alpha$ -SMA)の発現上昇が起こり、肝線維化が誘導された。一方、肝星細胞を分離して培養を行うと、OSMにより活性化指標の一つである筋線維芽細胞様の形態変化と、TIMP1の発現上昇を認めたが、Collagenの発現上昇は認めなかった。しかし、類洞内皮細胞や血球を含む共培養では、OSM刺激によりTIMP1のみならずCollagenの発現上昇を認めた。したがって、本培養系では、肝星細胞の活性化に対する非実質細胞の作用をin vitroで解析することが可能となる。

#### D. 考察

末梢に存在するLy6C高発現NK細胞は休眠状態であるが、IL-15により速やかに再活性化されることから、ウイルス感染などに速やかに対応する細胞である可能性が考えられる。

肝臓に存在するマクロファージのM1/M2サブセットの存在比は肝線維化に大きな影響を与えることが示された。すなわち、この比を変化させる因子は線維化を制御する重要な因子であるといえる。

肝星細胞と肝非実質細胞との共培養により、星細胞の活性化が変化することから、肝星細胞の活性化を解析する培養系として利用できる可能性が示された。

#### E. 結論

セルソーターにより分離した肝臓の構成細胞の培養により、免疫系細胞や肝線維化に関与する細胞の性状解析を行い、肝線維化における作用を解析する実験系が確立された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Komori T, Tanaka M, Semba M, Miyajima A, and Morikawa Y. Deficiency of OSMR $\beta$  exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J. Biol. Chem.* 289, 13821-13837, 2014.
2. Yagai T, Miyajima A and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the

sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *American J. Pathology* in press

##### 2. 学会発表

Yagai T, Miyajima A, and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during mouse liver regeneration. Keystone Symposium, Fibrosis: From Bench to Bedside. Colorado, Mar 23-28, 2014.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得  
該当なし。
- 2.実用新案登録  
該当なし。
- 3.その他  
特になし。



厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)  
分担研究報告書

エクソソーム内 HBV-DNA・RNA および HB 抗原  
の定量解析  
研究分担者 梅村武司 信州大学医学部消化器内科

**研究要旨**

【目的】エクソソーム内の HBV の動態を明らかにするために HBV RNA 測定系の確立を行った。

【方法】HBV 感染患者血清から核酸を抽出し、DNase 処理後に RT を行い real-time PCR 法で HBV RNA を、同時に DNase 処理せずそのまま real-time PCR 法で HBV DNA の測定を行った。ラミブジン投与された患者血清を使用して HBV DNA, HBV RNA を経時的に投与後 1 週、6 週、10 週、20 週の 4 ポイントについてシヨ糖密度勾配遠心法を用いて検討を行った。

【成績】血清中の HBV RNA は  $10^2 \sim 10^9$  copies/mL の範囲で測定可能であった。同様に、HBV DNA の検出範囲も  $10^2 \sim 10^9$  copies/mL であった。シヨ糖密度勾配遠心法の検討ではラミブジン投与 1 週後では HBV RNA の分画はわずかにしか確認されなかったが 6 週後には HBV RNA 分画を検出しその存在を証明した。

【考案】高感度 HBV RNA 測定系を確立した。今後、エクソソーム内の HBV ウイルスマーカーの測定系として使用可能でありその意義を検討していく予定である。

**A. 研究背景、目的  
(背景)**

B型肝炎ウイルス(HBV)感染では核酸アナログ製剤によりウイルス量の減少から肝硬変、肝がんへの進展を抑制する事が可能となっているが、cccDNAを排除することは困難であるため新規治療法の開発が待たれている。

本研究班では細胞外分泌顆粒であるエクソソームがHBVの感染、薬剤耐性、発がんメカニズムにどのように関係しているかを解明し、肝炎・肝がんの創薬開発を行うことを目的としている。これまでに感染細胞のエクソソーム内HBVに関するウイルスマーカーの動態は明らかとされていない。本年度はウイルスマーカーの一つである高感度HBV RNA測定系の確立を行った。

**B. 研究方法**

当院にて B 型慢性肝炎と診断された患者血清 200 $\mu$ l から核酸の抽出を行った。DNase で処理を行い、RT では 5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'を用いて cDNA を作成した後、forward primer 5'-ACAACAT CAGGATTCCTAGGAC-3'、reverse primer 5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'、TaqMan probe 5'-CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC-3'を用いて real-time PCR を行い、HBV RNA 量を定量した。同じ系で DNase と RT の過程を除いて HBV DNA 量を同じ検体で測定することも行った。さらに、ラミブジン投与された患者血清の HBV DNA, HBV RNA を経時的に投与後 1 週、6 週、10 週、20 週の 4 ポイントについてシヨ糖密度勾配遠心法を用いて検討を行った。

**(倫理面への配慮)**

本研究は信州大学医学部臨床倫理委員会で承認され、患者から同意を得て血清保存を行い、測定した。

**C. 研究結果**

血清中 HBV RNA は検出可能であり、希釈サンプルを用いて検出感度を決定したところ  $10^2 \sim 10^9$  copies/mL の範囲で測定可能であった。同じ系で測定可能である HBV DNA も同様に  $10^2 \sim 10^9$  copies/mL であった(図 1)。

HBV DNA と HBV RNA の混合試験を行うと DNase 処理後の RT-PCR では HBV RNA のみが測定可能であった。

シヨ糖密度勾配遠心法による検出結果を図 2 に示す。投与 1 週後では HBV DNA が検出されているが HBV RNA はほとんど検出されていない。投与 6 週後の時点では HBV DNA はラミブジンの治療効果により検出感度以下になっているが HBV RNA が優位に検出された。投与 10 週後には HBV RNA がわずかに検出されるが DNA は検出されず、20 週後の時点では HBV DNA、HBV RNA ともに検出されなかった。

**D. 考察**

血清中の HBV RNA と HBV DNA を定量する系を確立した。測定範囲はそれぞれ  $10^2 \sim 10^9$  copies/mL であった。シヨ糖密度勾配遠心法を用いて HBV RNA の存在を証明した。感度、測定範囲とも十分であり、今後エクソソーム内の HBV ウイルスマーカーの測定系の一つとして使用可能と考えられる。

**E. 結論**

HBV RNA 測定系を確立した。来年度以降はエクソソーム内のHBV RNA DNAの測定を行い、病態における意義について検討を行う予定である。

**F. 研究発表**

**1. 論文発表**

1. Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res 2013 in press
2. Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E. Serum levels of interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B. Hepatol Res 2013 in press
3. 梅村武司、田中榮司 de novo B型肝炎の臨床的特徴 de novo B型肝炎 HBV再活性化予防のための基礎知識(持田智編)、医薬ジャーナル社、大阪 pp78-85, 2013

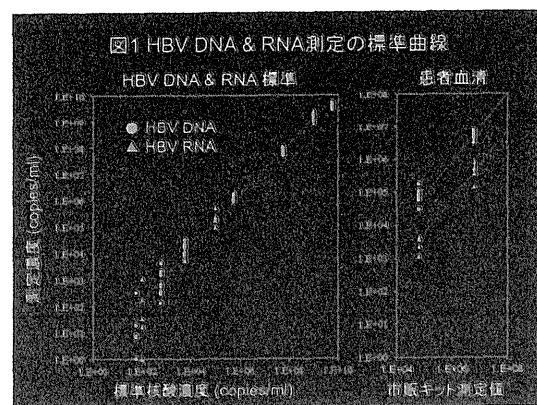
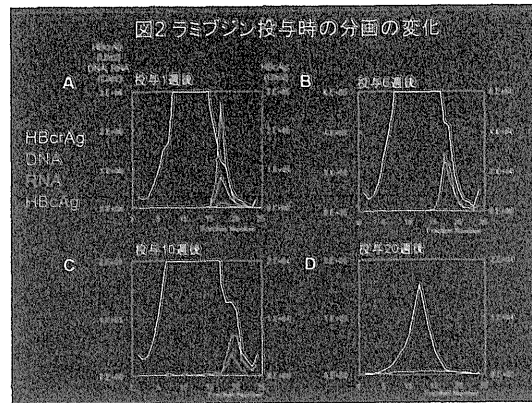
**2. 学会発表**

1. 梅村武司、城下智、松本晶博 De novo B型肝炎発症 HBVの全塩基配列決定とその特徴」第99回日本消化器病学会総会、鹿児島、2013
2. 梅村武司、城下智、田中榮司 de novo B型肝炎発症 HBVの全塩基配列の検討、第17回日本肝臓学会大会、東京、2013

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

- 1.特許取得  
特になし。
- 2.実用新案登録  
特になし。
- 3.その他  
特になし。



## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
梅村武司、 田中榮司	<i>de novo</i> B型肝炎 の臨床的特徴	持田智	<i>de novo</i> B型 肝炎	医薬ジャーナル社	大阪	2013	78-85

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Thirion M, Kanda T, Murakami Y, <u>Ochiya</u> T, and Iizasa H.	MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis.	Springer.		ISBN 978-3-319-0 3724-0.	
Thirion M and <u>Ochiya</u> T.	Roles of micromnas in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases.	Viruses	5(11)	2690-703 doi:10.3390/ v5112690.	2013
Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and <u>Ochiya T.</u>	MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells.	Hepatology	58(3)	1153-65	2013
Thirion M and <u>Ochiya</u> T.	Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In MicroRNAs in cancer	Enfield, New Hampshire, Science Publishers.		308-332	2013
Gailhouste L, Gomez-Santos L, <u>Ochiya T.</u>	Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer.	Front Biosci	18	199-223	2013
Gailhouste L, <u>Ochiya</u> T.	Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma.	Histol histopathol	28	437-451	2013
Gailhouste L, <u>Ochiya</u> T.	MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression.	Cancer Diagnostics		12-14	2013

Komori T, Tanaka M, Semba M, <u>Miyajima A</u> , and Morikawa Y.	Deficiency of OSMRb exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice.	J. Biol. Chem.	289	13821-13837	2014
Yagai T, <u>Miyajima A</u> and Tanaka M.	Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration.	American J. Pathology		In press	2014
Morita S, Matsumoto A, <u>Umemura T</u> , Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E.	Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res		in press	2013
Okuhara S, <u>Umemura T</u> , Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E.	Serum levels of interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B.	Hepatol Res		in press	2013

## II. *de novo* B型肝炎を知る・診る・防ぐ

### 1. *de novo* B型肝炎の臨床的特徴

【梅村 武司・田中 榮司】

#### はじめに

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)キャリアおよびその既往感染者では、移植(肝臓・造血幹細胞)、悪性腫瘍、リウマチ・膠原病などの治療に抗腫瘍薬、免疫抑制薬を使用すると、その使用中または使用後にHBVが再活性化して肝機能異常を起こし得る。この再活性化は臨床家であれば知らなければならない病態であり、臨床的には次の2点が問題となる。一つはHBVの再活性化に伴いB型肝炎が増悪し、重症化・劇症化して死亡する症例が存在することである。もう一つは重症肝炎に至らなくても肝機能異常が持続することにより、原疾患治療の中断もしくは中止が余儀なくされ、原疾患のコントロールが不十分となり予後が悪くなることである。

HBV再活性化のなかで、特にHBV既往感染者で起こるものを*de novo* B型肝炎と称している。この*de novo* 肝炎の存在は以前から報告がされていたが、症例数が少なかったため臨床的にあまり重要視されていなかった。しかし、CD 20陽性悪性リンパ腫に対する治療薬としてリツキシマブが使用されるようになると、その報告が急激に増加した。さらに、使用される生物学的製剤の種類、使用頻度が多くなったため、様々な疾患で*de novo* B型肝炎の発症に注意が喚起されるようになってきた。ここでは、わが国や海外のデータをもとに*de novo* B型肝炎の臨床的特徴を紹介する。

## ① *de novo* B型肝炎について

HBs 抗原陰性かつ HBc 抗体陽性の既往感染者は、これまでは臨床的に治癒と判断されていた人々であり、わが国では約 20 % に存在すると予測されている。通常 HBV に感染した後は非特異的な自然免疫に引き続き、ウイルス特異的な免疫反応が起こる。この時は細胞傷害性 T 細胞による細胞性免疫が重要な役割を果たしている。細胞性免疫は急性肝炎罹患後、年単位で継続するため肝臓内では感染性のあるウイルスの産生が持続するが、細胞傷害性 T 細胞の働きのため血液中へのウイルスの放出は極めて少量に抑えられている。これが既往感染と呼ばれる状態である。よって HBV に特異的な細胞傷害性 T 細胞が HBV の増殖をコントロールできないような状態に陥ると、HBV DNA が急速に増殖することになり肝炎が再燃する。これが *de novo* B型肝炎の病態である。

抗腫瘍薬治療後に発生した *de novo* B型肝炎をまとめた報告は、1975 年の Wands らによるものが最初である。その後、通常の抗腫瘍薬だけでなく血液疾患の移植後でも同様の検討がなされている。2001 年には、Dervite らが非ホジキンリンパ腫の治療で使用した抗 CD 20 抗体 (リツキシマブ [リツキサン<sup>®</sup>]) による *de novo* 肝炎を初めて報告した<sup>1)</sup>。その後、リツキサン<sup>®</sup>による *de novo* 肝炎発症例の報告が多くなされるようになった。

多数例での *de novo* 肝炎の検討は、HBV 既往感染者の多いアジアから報告されている。2006 年に香港の Hui らが、悪性リンパ腫の治療を行った HBs 抗原陰性者 244 名の前向きコホート患者群で、*de novo* B型肝炎、急性肝不全の発症率、危険因子などについて詳細な検討を発表した<sup>2)</sup>。244 例中 8 例 (3.3 %) で *de novo* 肝炎を発症しており、そのうち 3 例で急性肝不全を発症し、1 例が死亡した。*de novo* 肝炎の発症の危険因子はリツキサン<sup>®</sup>と副腎皮質ステロイドの併用療法であった。

さらに、*de novo* 肝炎は急性肝不全発症の危険因子であった。Hui らは *de novo* 肝炎の患者を詳細に検討した。臨床経過をまとめると図 1 のようになる。化学療法終了後、まず HBV DNA の増殖が起こり、それから中央値で 10 週後に

II. *de novo* B型肝炎を知る・診る・防ぐ

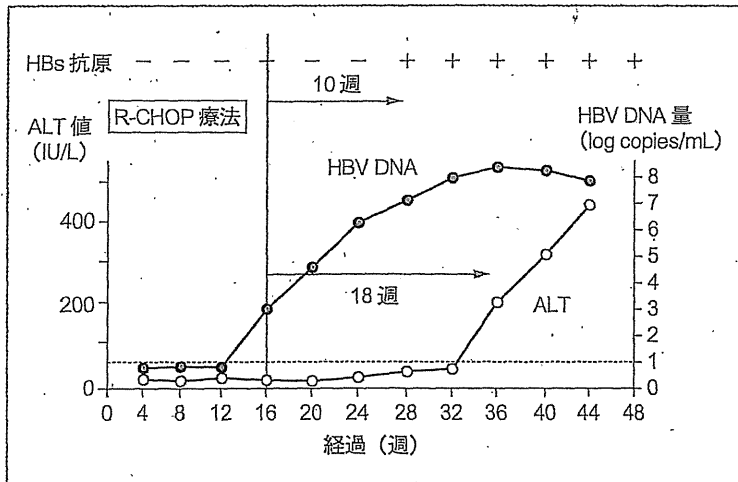


図1 *de novo* B型肝炎の発症パターン

*de novo* 肝炎でのウイルス・肝機能検査の推移。まず、HBV DNAが陽性になり、陽性後10週経過してHBs抗原が陽性となり、18週後にALTが上昇する。  
(文献2より改変)

HBs抗原が陽転化する。HBV DNA陽性化してから中央値18週後になると初めてALT値が上昇して肝炎を発症する。よって*de novo*肝炎の予防には、HBV DNA量の増加を認めてから核酸アナログの内服を開始することを提案している。エビデンスレベルの高い報告であるが、治療前からごく少量のHBV DNAが陽性の症例が含まれていること、治療前と再活性化時点でのHBV DNAの核酸配列の相同性が低めの症例もあり、輸血等による感染などの可能性を完全には否定することはできない。

2009年には香港のYeoらがHBs抗原陰性のびまん性大細胞性リンパ腫患者にCHOP療法(シクロホスファミド〔エンドキサン®〕、アドリアマイシン〔ドキソルビシン; アドリアシン®〕、ビンクリスチン〔オンコビン®〕、プレドニゾロン〔副腎皮質ステロイド〕)とR-CHOP(リツキシマブ+CHOP)療法を行った場合の*de novo*肝炎の発症頻度の違いを報告した<sup>3)</sup>。前向きに経過観察された80症例のうちHBe抗体陽性者は46例であり、この群についてCHOP療法施行者25

1. *de novo* B型肝炎の臨床的特徴

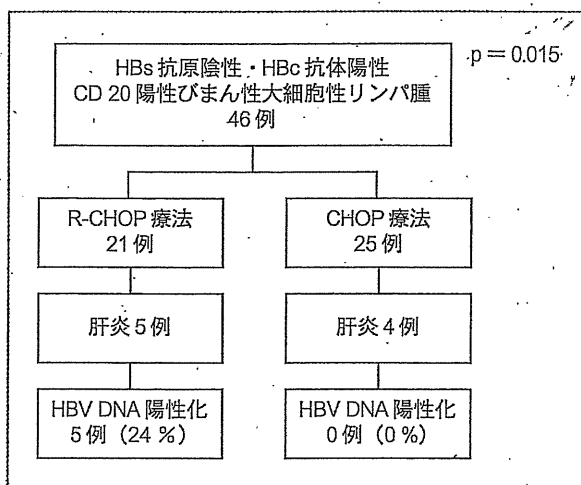


図2 びまん性大細胞性リンパ腫患者からのHBV再活性化の検討

CD 20陽性びまん性大細胞性リンパ腫では、リツキサン®の含まれているR-CHOP療法を施行した患者のみからHBV DNAが再活性化している。

(文献3より改変)

例とR-CHOP療法施行者21例について比較検討した。CHOP療法施行群ではHBV DNAの上昇は1例も認めなかったが、R-CHOP療法施行群では24% (21例中5例)において*de novo*肝炎の発症を認めた(図2)。リツキサン®を含む化学療法では、*de novo*肝炎発症のリスクが高いことが明らかである。

## 2 わが国における*de novo* B型肝炎の背景

わが国では、厚生労働省の研究班で*de novo* B型肝炎発症の全国調査を行った<sup>4)</sup>。平成12～16年(2000～2004年)の5年間に、新たにHBs抗原陽性になった患者についてアンケート調査を行い、最終的には552例について検討を行った<sup>5)</sup>。552例中529例(96%)がB型急性肝炎で、23例(4%)が*de novo*肝炎



## II. *de novo* B型肝炎を知る・診る・防ぐ

であった。劇症肝炎の発症率は、*de novo* 肝炎では 23 例中 5 例 (22%) であり、急性肝炎の 529 例中 45 例 (9%) と比較して有意に高率であることが判明した。特に劇症肝炎を発症した *de novo* 肝炎の死亡率は 100% (5/5) と、急性肝炎の 42% と比較して有意に高率であった。しかも、*de novo* 肝炎を発症した症例は核酸アナログ (当時はラミブジン [ゼフィックス<sup>®</sup>]) がほぼ全例で投与されていたが、劇症化した症例は残念ながら全例死亡していた。つまり、*de novo* 肝炎が発症してから核酸アナログを投与しても重症例では救命することができないことがわかった。☞ サイドメモ 7

その後、平成 19～22 年 (2007～2010 年) の 4 年間について、厚生労働省研究班 (熊田博光 班長) で継続して *de novo* 肝炎の疫学調査を継続して行った。班員の施設において新規に経験した *de novo* 肝炎 16 例の登録があり、最初の調査の 23 例と合わせると計 39 例になる。後ろ向きではあるが、これらの症例についての臨床的背景などについて紹介する。

患者背景を表 1 に示す。発症年齢は中央値 64 歳で、男性にやや多い。背景疾患は従来の非ホジキンリンパ腫が 24 例 (62%) と最も多い。次いで、末梢血幹細胞移植後の多発性骨髄腫の症例が 8 例 (21%) で認められる。劇症肝炎を発症した症例は 11 例 (28%) であった。最初の調査の時と同様で、発症後に核酸アナログが全例投与されているにもかかわらず死亡していた。筆者らの施設でも、他院から紹介された肝不全に陥って死亡した *de novo* 肝炎症例を経験した。核酸アナログを内服開始すると HBV DNA は減少していくが、最終的には肝再

### サイドメモ 7

#### 劇症肝炎を発症した *de novo* B 型肝炎は全例死亡している

わが国のデータでは劇症肝炎を発症した *de novo* B 型肝炎の症例は、肝炎の発症後に核酸アナログ (ゼフィックス<sup>®</sup>、バラクルード<sup>®</sup> など) を全例投与されているが、残念ながら全例死亡している。よって、厚生労働省の研究班から発表されているガイドラインを遵守することが必要である。

1. *de novo* B型肝炎の臨床的特徴

表1 患者背景の検討

	中央値 (N = 39)	平成12～16年 (N = 23)	平成19～22年 (N = 16)	p
年齢	64	63	66	0.091
男性	59 %	61 %	56 %	> 0.2
非ホジキンリンパ腫	62 %	57 %	69 %	> 0.2
多発性骨髄腫	21 %	22 %	19 %	> 0.2
劇症化した症例	28 %	22 %	38 %	> 0.2
肝不全による死亡	44 %	35 %	56 %	0.16

わが国における *de novo* B型肝炎の患者背景の検討であり、劇症化した症例、肝不全で死亡した症例はそれぞれ28%、44%と高率である。平成12～16年度、19～22年度における背景に差はない。

(厚生労働省研究班〔熊田博光 班長〕データより)

生が起らず、多臓器不全となって死亡に至った。やはり劇症化した場合の救命は困難であることを実感した。

今回の解析で、背景疾患として多発性骨髄腫の割合が20%を占めることが判明したため、非ホジキンリンパ腫の患者と背景因子、予後などを比較した(表2)。両群で年齢と性別に差はなかったが、多発性骨髄腫の症例では1例も劇症化した症例はなく、肝不全による死亡例も1例も認めなかった。多発性骨髄腫患者に発症した *de novo* 肝炎の予後は、非ホジキンリンパ腫患者と比較すると予後が良いと考えられた。しかし急性肝不全の登録患者では、多発性骨髄腫からの劇症肝炎の発症例の報告もあるようであり、今後のデータの蓄積が必要である。

感染したウイルス側の要因についての検討も行っている。*de novo* 肝炎では、急性肝炎と比較して遺伝子型(genotype) Bの比率が比較的高い傾向があったが、最近の39例の解析では有意差はなかった。さらに、劇症肝炎と関連性の強いプレコア変異(G1896A)、コアプロモーター変異(A1762T, G1764A)についても検討を行ったが、*de novo* 肝炎の発症・劇症化症例でこれらの変異が多いと

## II. *de novo* B型肝炎を知る・診る・防ぐ

表2 悪性リンパ腫と多発性骨髄腫による比較検討

	悪性リンパ腫 (N = 24)	多発性骨髄腫 (N = 8)	p
年齢	64	63	> 0.2
男性	54 %	63 %	> 0.2
劇症化した症例	42 %	0 %	0.03
慢性化した症例	25 %	13 %	> 0.2
死亡例	50 %	50 %	> 0.2
肝不全による死亡の割合	83 %	0 %	0.003

悪性リンパ腫の患者では高率に劇症化しており、肝不全による死亡率が高い。一方、多発性骨髄腫では劇症化例はなく肝不全による死亡もなかった。

(厚生労働省研究班〔熊田博光 班長〕データより)

いう傾向は認められていない。現在これらの症例について全塩基配列の決定を行い、解析中である。

### おわりに

ようやく *de novo* B型肝炎の危険性が一般に周知されてきた状況であるが、未だに劇症肝炎からの死亡例の報告が絶えない。この肝炎は核酸アナログの予防投与やHBV DNAの定期検査で予防可能であるが、その費用対効果が問題となっている。今後の課題は、HBc抗体陽性者が人口の約20%を占めるわが国での *de novo* 肝炎について、基礎疾患や治療薬の違いによる発症率の違いを明らかにし、個々に対応した予防の基準を決定していくことである。

▶ **ここがポイント!**

- ・HBV 既往感染とは HBs 抗原陰性, HBe 抗体もしくは HBs 抗体陽性の状態である。しかし, 肝細胞の核内には cccDNA (covalently closed circular DNA: 二本鎖閉鎖環状 DNA) の形でウイルス遺伝子は残存している。
- ・*de novo* B型肝炎とは, HBV の既往感染例において免疫抑制薬や抗悪性腫瘍薬を投与することで血清 HBV DNA が検出され発症した肝炎のことである。

文 献

- 1) Dervite I, Hobel D, Molel P : Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 344 (1) : 68-69, 2001.
- 2) Hui CK, Cheung WW, Zhang HY, *et al* : Kinetics and risk of *de novo* hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology* 131 (1) : 59-68, 2006.
- 3) Yeo W, Chan TC, Leung NW, *et al* : Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J Clin Oncol* 27 (4) : 605-611, 2009.
- 4) Umemura T, Kiyosawa K : Fatal HBV reactivation in a subject with anti-HBs and anti-HBe. *Intern Med* 45 (12) : 747-748, 2006.
- 5) Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K, *et al* : Mortality secondary to fulminant hepatic failure in patients with prior resolution of hepatitis B virus infection in Japan. *Clin Infect Dis* 47 (5) : e52-56, 2008.