

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

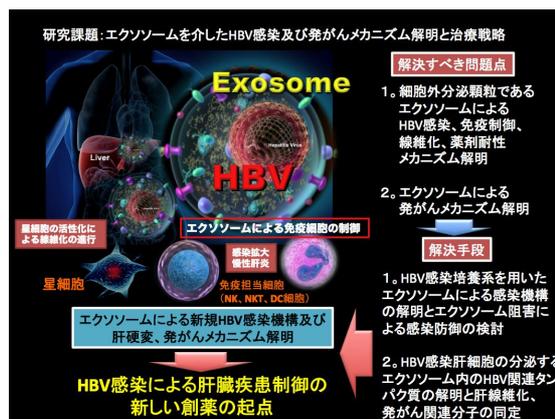
研究要旨

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な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逐することで、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。