

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, α -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 β 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ョ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。ショ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 μ 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'-CAGAGTCTAGACTCGTGTTGGACTTC-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ョ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。

ショ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。ショ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。



