

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・教授
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・講師
中本 晋吾 千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学・助教

分担研究課題：肝発癌における自然免疫関与の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)は、感染複製効率の良い培養系も少ないことからその感染排除に関しては依然不明な点が多い。ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞にHBVを感染させ、肝細胞における自然免疫関連分子MHC class I polypeptide-related chain A (MICA)およびreceptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2)等の発現状態を比較検討した。ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞では少なくとも90日間のHBV感染状態の観察が可能であった。HBV関連肝細胞癌との関連が報告されたMICAはHBV感染とともに発現が増強し、HBsAgの排除前から発現の減弱がみられ、HBV感染およびHBsAg排除との関連から非常に興味深く思われた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は、感染複製効率の良い培養系も少ないことからその感染排除に関しては依然不明な点が多い。ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞にHBVを感染させ、肝細胞における自然免疫関連分子MICAおよびRIPK2等の発現状態を比較検討した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスから分離されたPXB細胞 4×10^5 cells/well にHBV genotype C 1×10^6 copies/well または 1×10^5 copies/well を感染させ(Day 0)、4-5日に1度Cell culture mediumを交換した。HBV DNAおよびHBsAgはそれぞれTaqMan PCRおよびCLIAにて測定した。Day 7, Day 27, Day 62, Day 90にて細胞蛋白をSDS lysis bufferにて回収し、Western blotにてMICAおよびRIPK2の発現状態をHBV非感染肝細胞と比較検討した。

(倫理面への配慮)

血清の解析に関しては千葉大学医学部倫

理委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。また、一般論として弱者、女性、少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮している。

C. 研究結果

1) Condition medium 中HBV DNAはDay 2で3.9, 4.7 log copies/mL, Day 7で3.8, 4.5 log copies/mL, Day 27で5.5, 5.1 log copies/mL, Day 62で4.5, 5.5 log copies/mL, およびDay 90で3.3, 3.3 log copies/mLと検出可能であった。

2) Condition medium 中HBsAgはDay 2で<0.05, 0.06 IU/mL, Day 7で<0.05, 0.24 IU/mL, Day 27で2.38, 0.76 IU/mL, Day 62で1.41, 1.57 IU/mLであったが以後急速に検出感度以下となった。

3) 肝細胞MICAは、Day 27で感染HBV量依存的に非感染肝細胞と比較し発現が増加していた。Day 62では非感染肝細胞と比較し発現が減少し、Day 90ではHBV感染肝細胞では発現のさらなる減弱がみられた。

4) 肝細胞 RIPK2 は HBV 感染により発現の減弱がみられた.

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された PXB 細胞中のヒト肝細胞の割合は約 70%以上と報告されている (Joyce ら, PLoS Pathogen 2009). そこで今回我々は MICA および RIPK2 の解析を Western blot を用いて蛋白レベルで行った. HBV 粒子の半減期は HBe 抗原陰性者および陽性者ではそれぞれ中央値 2.5 min および 46 min であり, Dandri ら (Hepatology 2008) は免疫不全 uPA mice では HBV 粒子の半減期は 44 min から 4 時間と延長していることを報告している. 今回研究に用いた HBV は HBe 抗原産生株であるが約 90 日間 Condition medium 中で HBV DNA が検出可能であった.

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞では少なくとも 90 日間の HBV 感染状態の観察が可能であった. HBV 関連肝細胞癌との関連が報告された MICA は HBV 感染とともに発現が増強し, HBsAg の排除前から発現の減弱がみられ, HBV 感染および HBsAg 排除との関連から非常に興味深く思われた.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment. **Int J Mol Sci** 2014; 15: 21455-21467
- 2) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of microRNA by hepatitis B virus

infection and their possible association with control of innate immunity. **World J Gastroenterol** 2014; 20: 7197-7206

- 3) Kanda T, Jiang X, Yokosuka O. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers. **World J Gastroenterol** 2014; 20: 9229-9236
- 4) Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Wu S, Mikata R, Yokosuka O. Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress. **Oncol Rep** 2014; 32: 2343-2348
- 5) Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Involvement of androgen receptor and glucose-regulated protein 78 kDa in human hepatocarcinogenesis. **Exp Cell Res** 2014; 323: 326-336
- 6) Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. **J Viral Hepat** 2015; 22: 94-102
- 7) Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, Yokosuka O. Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance. **Hepatology** 2015 (Epub ahead of print)

2. 学会発表

- 1) 神田達郎、中村昌人、呉霜、中本晋吾、姜霞、宮村達雄、白澤浩、横須賀収. ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞を用いた HBV 感染と MICA 発現状態の解析. 第 18 回日本肝臓学会大会. 2014 年 10 月 23 日

2) Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Nakamura M, Yokosuka O. HBV up-regulates IGFBP1 and MCA expressions in hepatocytes from humanized SCID Alb-uPA mouse model. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B – Recent Progress in Basic and Clinical Research -. Hiroshima, Japan. 20 November, 2014

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし