

検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

テトラサイクリンを除去することで分泌される HBV 粒子を回収し、ポリエチレングリコールを用いて濃縮した。そのウイルスを HepG2/NTCP および初代肝細胞に感染させ、マイクロアレイを用いて、HBV 感染に伴い発現が変動する免疫関連因子を探索した。1 型および 2 型インターフェロンにより誘導される遺伝子の明らかな変化は認められなかったが、CCL や CXCL といったケモカインの発現が誘導されていた。また、ウイルスのセンサーに関わる宿主因子として、IPS1、IRF3、STAT1 および cGas のノックダウン細胞を樹立し、HBV の感染性および ISG 等の自然免疫応答遺伝子を検討したが、感染性や ISG の誘導に明らかな差は認められなかった。次に、in vivo モデルとして NTCP トランスジェニックマウスを用いるために、まず先に in vitro に播種した肝細胞に対する HBV の感染性を検討したが、HBV の感染が検出できなかったため、マウス肝細胞への HBV 感染には他の因子が関わっていることが予想された。そこで、HBV ゲノムをハイドロダイナミック法で 8 週令のマウスに導入し、1 週間後に ALT および血清中のウイルス量を検討した。ALT はコントロールと比較して有意な上昇は認められなかったが、血清中に HBV ゲノムが検出できた。また、肝臓中では、in vitro と同様にケモカインの誘導が認められた。

D. 考察

HBV 感染に伴い誘導される応答として、1 型および 2 型のインターフェロンシグナルでは

なく、ケモカインが誘導されていた。誘導されているケモカインの中に、NK や DC を介して自然免疫応答に重要な役割を演じるケモカインが存在する可能性がある。今後は、それぞれのケモカインの意義を in vitro および in vivo の系で明らかにする予定である。

E. 結論

HBV 感染に伴い、インターフェロンシグナルではなく、ケモカインが誘導される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534
2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594

2. 学会発表

1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology,

- Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
 4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
 5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014
 6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に寄与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014
- H. 知的所有権の出願・登録状況**
特になし。

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

分担研究報告書（平成 26 年度）

in vitro、*in vivo* HBV 感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答に関する研究

分担研究者：氏名 柘植 雅貴

所属 広島大学自然科学研究支援開発センター・助教

研究要旨：

本研究では、HBV がヒトの生体内で免疫寛容を誘導し、持続感染を成立させるメカニズムを解明するため、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV の直接的な作用によるヒト肝細胞内遺伝子発現の変化を解析する。HBV 感染 8 週後の HBV 感染キメラマウス肝より採取したヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を次世代シーケンサー（Illumina HiSeq™ 2000）にて解析した結果、137 遺伝子の発現亢進と 18 遺伝子の発現抑制を認めた。これらの遺伝子群のうち、HBV 感染により最も発現が誘導された遺伝子（*Gene 1*）について、解析を行った。ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織内における *Gene 1* 発現は、HBV 非感染、感染 10 日目のマウスに比して、有意に高かった。培養細胞を用いた検討では、HBV 持続発現細胞において、発現の亢進を認め、核酸アナログ製剤を添加し、HBV 増殖を抑制することで、発現は減弱した。さらに、*Gene 1* は HBV 感染により、転写レベルで調節され、特に、HBx 蛋白や large HBs 蛋白発現により、転写が活性化することが示された。今後、発現調節メカニズムを詳細に解析することにより、HBV 感染に伴うヒト肝細胞内の免疫応答メカニズム解明への手掛かりとなる可能性があり、治療法開発への応用も期待できる。

A. 研究目的

ヒト肝細胞キメラマウスは、マウスの肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されており、B 型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染を成立させることが可能であり、*in vitro* HBV 複製系とともに、HBV の感染・増殖メカニズムを解明するための有用な *in vivo* モデルと言える。さらに、このヒト肝細胞キメラマウスは、90% 以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換され、かつ免疫不全マウス由来であることから、HBV 感染後に肝炎を発症することはなく、HBV 感染が及ぼす直接的なヒト肝細胞への

影響を解析することが可能である。

本研究では、HBV が感染した後に起こる肝細胞内の遺伝子変化を、次世代シーケンサーにて解析し、HBV が免疫寛容を獲得し、持続感染を生じるメカニズムを解析するとともに、HBV 感染に伴いヒト肝細胞内で生じる細胞内免疫応答メカニズムの解明につなげる。

B. 研究方法

検討 1：次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析

昨年度報告したように、HBV 感染 8 週

後のヒト肝細胞キメラマウスと非感染ヒト肝細胞キメラマウスのマウス肝組織を採取し、ヒト肝細胞中の遺伝子発現を、次世代シーケンサー

(HiSeq2000)を用いて網羅的に解析した。さらに、次世代シーケンサーのデータに関して再現性を確認するため、同一のサンプルを用いて、リアルタイムPCRを行い、遺伝子発現量の変化を確認した。

検討2：次世代シーケンサーにて抽出された遺伝子 *Gene 1* の解析

検討1の結果、HBV感染に伴い、最も発現が亢進した遺伝子として *Gene 1* が抽出された。そこで、*Gene 1* の遺伝子発現調節機構ならびに機能を明らかにするため、HBV発現細胞株を用いて、レポーターアッセイ等の機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清の使用に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている。また、十分なインフォームドコンセントの後に患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。また、遺伝子組換え実験に関しては、当大学での機関承認実験(26-20、26-259)および文部科学省での大臣確認実験(26受文科振第463号)として第二種使用等拡散防止措置確認を受け、研究を行っている。

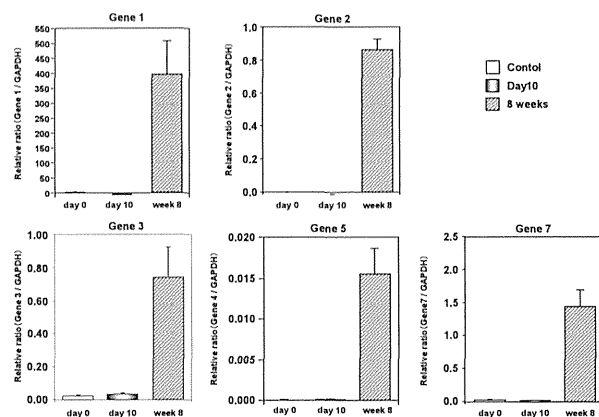
C. 研究結果

検討1：次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析

次世代シーケンサーにて網羅的な遺伝子発現プロファイルの作成を行い、非感染マウスとHBV感染8週後のマウスとの間で、発現が変化した遺伝子を抽出したところ、HBV感染により有意に発現亢進した遺伝子として、137遺伝子が抽出された(昨年度報告)。

それらの遺伝子のうち、発現変化の大きかった上位遺伝子について、ヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を確認するため、リアルタイムPCRを施行。その結果、非感染、HBV感染10日目のヒト肝細胞では、ほとんど発現が認められなかったのに対し、HBV8週目のマウス肝組織内のヒト肝細胞では、著明な発現亢進を認め、これらの遺伝子が、HBV感染に伴い、発現誘導されることが示唆された(図1)。

図1. リアルタイムPCRによるヒト肝細胞内の遺伝子発現確認

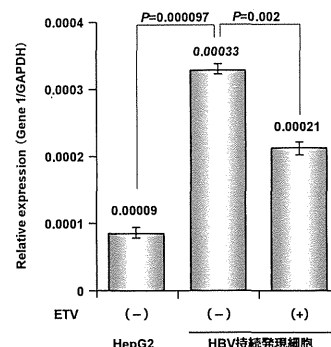


検討2：次世代シーケンサーにて抽出された遺伝子 *Gene 1* の解析

検討1の結果、HBV感染に伴い、最も発現が亢進した遺伝子として *Gene 1* が抽出された。

まず、*Gene 1* の遺伝子発現制御が *in vitro* でも再現されるかを確認するため、HepG2由来のHBV持続発現細胞株を用いて、*Gene 1* mRNA発現量を検討した。図2に示すように、親株であるHepG2細胞に比して、HBV持続発現細胞では、*Gene 1* mRNA発現は亢進しており、さらに、核酸アナログ製剤を用いて、HBV増殖を抑制したところ、*Gene 1* 発

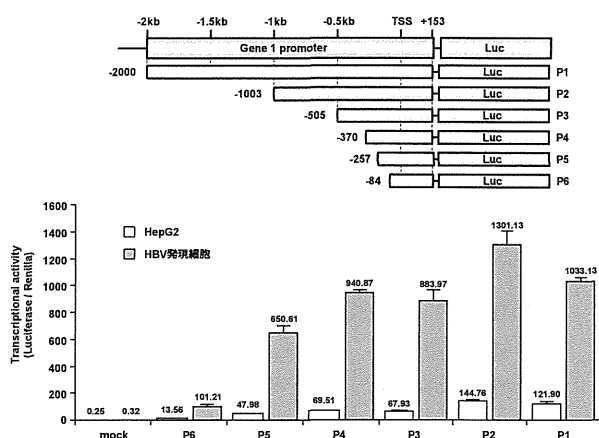
図2. HBV発現細胞における*Gene 1*発現



現は低下した (図 2)。つまり、この結果から、*Gene 1* 発現が HBV 増殖により制御されている可能性が示唆された。

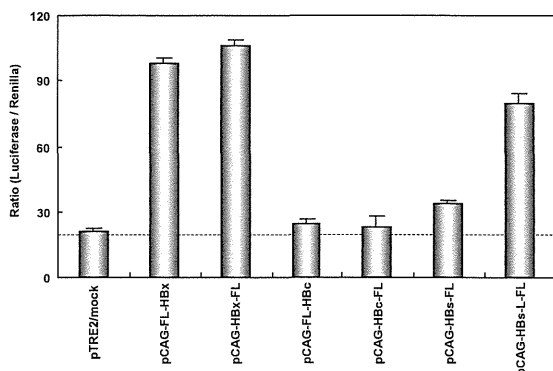
次に、*Gene 1* の発現変化が転写レベルで制御されていることを確認するため、*Gene 1* のプロモーター領域 (転写開始点から 2kb 上流) をクローニングし、レポーターアッセイを行った。その結果、HBV 持続発現細胞では *Gene 1* の転写が活性化しており、特に、転写開始点の上流 84~370 の領域で強く制御されていることが確認された (図 3)。

図3. *Gene 1* の転写活性変化



さらに、*Gene 1* の転写活性と HBV 関連蛋白との関連性を解析するため、*Gene 1* のプロモーターを組み込んだレポータープラスミドと HBV 関連蛋白発現プラスミドを co-transfection し、転写活性の変化を解析した。その結果、HBx ならびに Large-HBs 蛋白発現を行

図4. HBV関連蛋白による*Gene 1* 転写活性の変化



った場合に、*Gene 1* の転写活性が有意に亢進した (図 4)。

D. 考察

本研究は、HBV 感染に伴うヒト肝細胞の遺伝子発現変化について、HBV 持続感染ヒト肝細胞キメラマウスより採取した肝組織を用いて、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行った。その結果、HBV 感染に伴い発現が誘導される遺伝子として *Gene 1* が抽出された。*Gene 1* の機能解析を行ったところ、HBV 増殖の抑制により発現が抑制されること (図 2)、HBV 関連蛋白発現により、転写が活性化されることが示唆された (図 3、4)。つまり、*Gene 1* 発現は HBV 増殖と密接に関わっていることが推定され、*Gene 1* を発現制御することで、肝臓内の炎症が抑制できる可能性も考えられる。

一方、*Gene 1* 発現制御において、HBx 蛋白や Large HBs 蛋白が密接に関わっていることが示唆された (図 4)。HBx 蛋白は核内へ移行することが良く知られており、転写因子とも相互作用することから、転写活性へ影響することが予測可能であるが、HBs 蛋白は分泌蛋白であり、核内へ直接作用する可能性は考え難い。つまり、HBs 蛋白が *Gene 1* の転写活性を制御するメカニズムは不明であり、本メカニズムを解明することで、より新規の肝炎治療薬開発に近づけるものと考えている。現在、本メカニズムの解明に取り組んでおり、転写変化に関与する因子の同定を目指す予定である。

E. 結論

HBV 感染後、HBV の直接的な作用により、ヒト肝細胞内で *Gene 1* 遺伝子の発現が亢進していることが確認された。*Gene 1* 遺伝子は、HBV 感染に伴い、転写レベルで制御され、特に、HBx 蛋白、Large HBs 蛋白に影響を受けていることが示された。本遺伝子を解析

することで、HBV 感染と肝炎発症メカニズムが解明できる可能性があり、新たな作用点からの HBV 治療の開発も期待できる。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清およびマウス、培養細胞株を用いた検討であり、患者に健康被害を与える可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E. Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*, 2015, in press.
- 2) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect*, 2014, in press.
- 3) Fujino H., Kimura T., Aikata H., Miyaki D., Kawaoka T., Kan H., Fukuhara T., Kobayashi T., Naeshiro N., Honda Y., Tsuge M., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Takahashi S., Yoshimatsu R., Yamagami T., Kenjo M., Nagata Y., Awai K. and Chayama K., Role of 3-D conformal radiotherapy for major portal vein tumor thrombosis combined with hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2014, in press.
- 4) Naeshiro N., Aikata H., Kakizawa H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Ohno A., Miyaki D., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Takahashi S., Awai K. and Chayama K., Long-term outcome of patients with gastric varices treated by balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J Gastroenterol Hepatol* 29(5): 1035-42, 2014.
- 5) Kohno T., Tsuge M., Murakami E., Hiraga N., Abe H., Miki D., Imamura M., Ochi H., Hayes C.N. and Chayama K., Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat*, 2014 in press.
- 6) Huang Y.W., Takahashi S., Tsuge M., Chen C.L., Wang T.C., Abe H., Hu J.T., Chen D.S., Yang S.S., Chayama K. and Kao J.H., On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*, 2014, in press.
- 7) Naeshiro N., Aikata H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Kawaoka T., Tsuge M., Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Ochi H. and Chayama K., Efficacy and safety of the anticoagulant drug, danaparoid sodium, in the treatment of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res*, 2014, in press.
- 6) Honda Y., Takahashi S., Zhang Y., Ono A., Murakami E., Shi N., Kawaoka T., Miki D., Tsuge M.,

Hiraga N., Abe H., Ochi H., Imamura M., Aikata H. and Chayama K., The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. J Gastroenterol Hepatol, 2014, in press.

- 7) 柘植雅貴、茶山一彰「B型肝炎に対する抗ウイルス療法」Annual Review 消化器 2014、中外医学社、104-111、2014
- 8) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「HBV感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化」消化器内科 58(2)、科学評論社、231-238、2014
- 9) 柘植雅貴、茶山一彰「テノホビル治療 (naïve 例と核酸アナログ治療抵抗例に対する成績)」医学と薬学 vol.71、自然科学社、1185-1190、2014
- 10) 柘植雅貴、茶山一彰「差分解説・B型慢性肝炎診療におけるHBs抗原測定」日本医事新報 No.4703、日本医事新報社、58、2014

2.学会発表

- 1) 柘植雅貴、村上英介、平賀伸彦、三木大樹、今村道雄、越智秀典、茶山一彰「HBV薬剤耐性変異株に対する核酸アナログの抗ウイルス効果」第51回日本臨床分子医学会 ポスター
- 2) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰「核酸アナログ投与症例におけるHBsAg低下に寄与する因子の検討」第100回日本消化器病学会総会 ワークショップ
- 4) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「核酸アナログ投与によるHBV感染ヒト肝細胞内の免疫応答の変化」第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム
- 5) 村上英介、柘植雅貴、藤野初江、

菅宏美、福原崇之、小林知樹、本田洋士、中原隆志、苗代典昭、大野敦司、宮木大輔、三木大樹、河岡友和、平賀伸彦、平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方浩、茶山一彰「当院におけるHBs抗原陰性化例の解析」第50回日本肝臓学会総会 一般演題

- 6) 村上英介、柘植雅貴、茶山一彰「B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療成績と肝発癌に関する検討」第18回日本肝臓学会大会 シンポジウム
- 7) 柘植雅貴、菅宏美、藤野初江、小林知樹、福原崇之、苗代典昭、本田洋士、宮木大輔、村上英介、河岡友和、平松憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方浩、茶山一彰「HBV genotype CにおけるHBsAg陰性化に関する検討」第18回日本肝臓学会大会 ポスター
- 8) Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama「Nucleotide analogue improves interferon responsiveness in HBV-infected human hepatocytes」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 9) Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takuro Uchida, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama「A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections」65th Annual Meeting of the American Association for the Study of

Liver Diseases (AASLD 2014)
ポスター

- 10) Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Satoshi Yoshimi, Eisuke Murakami, Takashi Nakahara, Atsushi Ono, Tomokazu Kawaoka, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama, 「A novel humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of HBV and HCV infections」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 11) C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama 「Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decreases with cell density in primary cultured hepatocytes」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 12) Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ono, Sakura Akamatsu, Takashi Nakahara, Noriaki Seki, Eisuke Murakami, Yizhou Zhang, Takuro Uchida, Yohji Honda, Keiichi Masaki, Hiromi Kan, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Michiaki Kubo, Kazuaki Chayama 「Two microRNA polymorphisms are associated with hepatitis B virus-related but not hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in the Japanese population」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 13) Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama 「Establishment of a mouse model of acute hepatitis B by activation of human cytotoxic T lymphocytes」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 14) Hiromi Abe, Tetsushi Sakuma, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, C. Nelson Hayes, Hiroshi Aikata, Takashi Yamamoto, Kazuaki Chayama 「Analysis of the effect on HBV life cycle by HBV genome editing using TALEN and CRISPR/Cas9 systems」 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2014) ポスター
- 15) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama 「Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients.」 The 11th JSH Single Topic Conference ポスター
- 16) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Kei Morio, Masahiro Hatooka, Keiichi Masaki,

Takayuki Fukuhara, Tomoki Kobayashi, Noriaki Naeshiro, Yoji Honda, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Akira Hiramatsu, Michio Imamura, Hiroshi Aikata and Kazuaki Chayama 「Analysis of clinical factors relating to the seroclearance of hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B virus infection」 The 11th JSH Single Topic Conference ポスター

- 17) C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Masataka Tsuge, Daiki Miki, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Kazuaki Chayama 「Hepatitis B virus infection leads to activation of interferon-stimulated genes in primary cultured human hepatocytes, but infection efficiency decreases monotonically with decreasing cell density」 The 11th JSH Single Topic Conference ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況

(※予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

分担研究者：渡邊綱正

分担研究課題：HBV ジェノタイプ別 IFN シグナル阻害効果の検討

研究要旨：母子感染などによるB型肝炎ウイルス(HBV) 遺伝子型Bおよび遺伝子型Cの感染に加えて、近年増加傾向にある遺伝子型AのHBV感染が問題となっている。さらに、これらHBV遺伝子型による病態や治療効果に差が認められることも報告されている。昨年度、新規手法により入手した初代ヒト肝細胞へHBVを感染させる *in vitro* 培養系による検討から、HBV感染した宿主肝細胞がインターフェロンλ (IFN-λ) 遺伝子発現を誘導することを明らかとした。本年度は、IFN応答の差が報告されている宿主遺伝子IL28BによるHBV感染初期の遺伝子誘導の差と、遺伝子型の異なるHBV持続感染におけるIFNの抗ウイルス効果について検討した。その結果、IL28B遺伝子型によるIFN-λ誘導能は異なるものの、HBV増殖に対する影響に差異は認めなかった。一方、HBV持続感染キメラマウスにおけるIFN誘導遺伝子による抗ウイルス効果は、IFN-λとIFN-αで差は認めなかった。

A. 研究目的

わが国では従来から存在するB型肝炎ウイルス(HBV) 遺伝子型B、遺伝子型Cに加え、若年者層を中心に遺伝子型Aが近年増加している。HBVはその遺伝子型ごとに肝がん発症率や肝炎遷延化など臨床的病態の差異が報告されている。またB型慢性肝炎に対するペグインターフェロンα (PEG-IFN-α) 治療応答性に関しても、HBV遺伝子型Aが他の遺伝子型より高いことが知られている。これら病態の違いや治療応答性を規定する因子として、ウイルス複製効率の差や宿主免疫応答の差が考えられる。

昨年度までに、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いたHBV感染実験から、感染初期のウイルス増殖がHBV遺伝子型によって

異なることを明らかとした。またキメラマウスで増殖させたヒト肝細胞を再度分離し、大量入手可能となった新規の初代ヒト肝細胞を使用し、HBV感染初期にType III インターフェロン(IFN) であるIFN-λ遺伝子が特異的に誘導され、Type I IFN (IFN-α、IFN-βなど) 遺伝子は誘導されないことを明らかとした。

以上の結果をふまえ、今年度はHBV遺伝子型が宿主自然免疫応答に及ぼす影響を探るため、HBV感染初期のIFN誘導、さらにHBV持続感染に対するIFNの抗ウイルス効果を検討した。さらにType I IFNとType III IFNによる抗ウイルス効果の差異やHBV感染した宿主肝細胞のIL28B遺伝子多型(SNP)の影響についても検討した。

B. 研究方法

初代ヒト肝細胞へのHBV感染：ヒト肝細胞置換キメラマウスから取得した初代ヒト肝細胞を24-well マルチプレートで培養し、遺伝子型AおよびCのHBV含有血清を感染させた。感染条件は細胞あたりHBVゲノム5コピーの感染源を4% PEG8000含有培地へ懸濁し、細胞へ暴露させた。24時間の暴露後、細胞を3回洗浄したのち経時的に培養上清および細胞内RNAを回収し、さらに培養上清中のHBs抗原濃度を定量した。なお、用いたキメラマウス由来の初代ヒト肝細胞は、宿主遺伝子であるIL28BのSNPがmajor typeとminor typeの2種類用意した。

HBV持続感染キメラマウスに対するIFN投与：ヒト肝細胞キメラマウスにHBV genotype CあるいはAを接種し持続感染が成立した後に、PEG-IFN- α またはPEG-IFN- λ を2週間投与した。投与開始から8時間、24時間の肝内インターフェロン誘導遺伝子群(ISG)誘導および、投与開始後3、7、10、14日目の血清HBV DNA量を定量PCRで測定した。同様に、移植したヒト肝細胞のIL28B SNPは、major typeとminor type 2種類のキメラマウスを用いた。

HBV DNA、mRNA HBsAgの発現解析：培養上清中のHBV DNAはG&Eサイエンス社SMITEST EX R&Dを用いて抽出した。細胞内RNAはニッポンジーン社ISOGENを用いて抽出した。DNAおよびRNA量は定量PCR法(TaqMan法)により定量した。

サイトカイン遺伝子群の発現解析：自然免

疫関連サイトカインのうち各種インターフェロン(IFN)遺伝子群IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ ($\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$)、および炎症性サイトカインIL-6、TNFの遺伝子発現を定量PCR法(TaqMan法)により測定した。同様に感染後経時的に各種インターフェロンおよび炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量PCR法により測定した。

なお、今回の検討ではインフォームドコンセントが取得された血液のみを取り扱い、使用にあたっては連結不可能匿名化を行うことで被験者のプライバシーは完全に保護した。本試験で結果を公表する際は、被験者・協力者を特定できる情報を含まないこととし、ヘルシンキ宣言の精神、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

C. 研究結果

HBVは感染初期にIFN- λ を誘導する

初代ヒト肝細胞を用いて、感染に伴う初期の自然免疫応答をHBV遺伝子型ごとに検討した。遺伝子型CのHBV血清を感染させると、48時間後にIFN- $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ の発現が誘導された。一方IFN- β 、TNFの誘導は弱くIFN- α 、IL-6はほとんど誘導されなかった。同様に遺伝子型Aでサイトカイン誘導の検討を行ったが、遺伝型Cとの差異はみとめられなかった。したがって、感染初期の自然免疫応答に、感染したHBV遺伝子型は影響を及ぼさないことが明らかとなった。

次にC型肝炎ウイルスに対するPEG-IFN- α /リバビリン併用療法の治療効果を規定する宿主遺伝子であるIL28B SNPについて検討を行った。Major typeおよびminor typeの初代ヒト肝細胞にHBV遺伝子

型Cを感染させサイトカイン誘導を測定した。その結果、興味深いことに Type III IFN の誘導は major type でのみ認められた。しかしながら、IFN 誘導に差があるにもかかわらずこの 2 種類の初代ヒト肝細胞の間で HBV 増殖に差は認めなかった。

HBV 持続感染キメラマウスにおける IFN の抗ウイルス効果

HBV 遺伝子型 C および A が持続感染したキメラマウスに PEG-IFN- α または PEG-IFN- λ を投与した結果、血中 HBV 濃度の低下率は遺伝子型 A に比較して遺伝子型 C で有意に高かった。一方、PEG-IFN 投与により誘導される肝内 ISG 発現は遺伝子型間で有意差は認めなかった。

興味深いことに遺伝子型 C、A 双方において PEG-IFN- λ による血中 HBV 濃度の低下率は PEG-IFN- α に比べて低かった。引き続いて、この違いが PEG-IFN によって誘導される感染細胞の内因性抗ウイルス応答の差に起因するのか、あるいはキメラマウスに残存する NK 細胞などの免疫系細胞に対する PEG-IFN による活性化の差に起因するのかを検討した。肝内の内因性 ISG の誘導を比較したところ 遺伝子型 C、A 双方において PEG-IFN- α と PEG-IFN- λ で差は認めなかった。対照的に、NK 細胞が標的細胞を殺傷する際の細胞傷害能を司る TRAIL 分子発現を検討したところ、TRAIL は PEG-IFN- α 投与でのみ誘導され PEG-IFN- λ では誘導されなかった。

さらに、HBV 持続感染に対する PEG-IFN- α 、PEG-IFN- λ の抗ウイルス効果について、HBV 感染した肝細胞の IL28B SNP による影響を検討した。その結果、遺伝子型 C、A、PEG-IFN- α 、 λ のいずれにおいても HBV に対する IFN の抗ウイルス効果は

IL28B SNP に依存しなかった。

D. 考察

初代ヒト肝細胞 *in vitro* 培養系を用いた検討から、HBV 感染初期に Type III IFN が特異的に誘導されることを明らかとした。この Type III IFN の誘導は HBV 遺伝子型に影響されなかった。一方、肝細胞の IL28B SNP major type でのみ HBV 感染に対して Type III IFN が誘導されたが、感染した HBV 増殖に影響は及ぼさなかった。以上より、感染初期に誘導される Type III IFN の抗 HBV 効果は弱く、ウイルス増殖抑制に不十分であることが示唆された。

一方、HBV 持続感染キメラマウスにおける IFN の抗ウイルス効果を検討した結果、投与された IFNs による抗 HBV 効果を確認した。特に PEG-IFN- α および λ の抗ウイルス効果は遺伝子型 C で有意に高いこと、HBV に対する PEG-IFN- λ の抗ウイルス効果は PEG-IFN- α に比べて低く、NK 細胞を介した抗ウイルス効果に差異がある可能性が示唆されること、そして IFN の HBV に対する抗ウイルス効果は IL28B SNP に依存しないことを明らかとした。注意すべき点として HBV 持続感染成立時のウイルス量が HBV 遺伝子型により異なっており、IFN の効果が血中ウイルス量により影響されている可能性が否定できなかった。具体的には、遺伝子型 A による持続感染成立時の血中ウイルス量が遺伝子型 C より高く、HBV 低下率は遺伝子型 A と比較して遺伝子型 C が高率に低下していた。現在、*in vitro* 培養系を用いた HBV 持続感染状態において PEG-IFN の抗ウイルス効果を検証している。

今後は HBV 感染が Type III IFN を誘導する分子メカニズムを解明し、さらに抗

HBV 効果を有する IFN 作用のメカニズムを解析する。これまでに HBV 産生の鋳型である cccDNA に対する IFN- α の制御効果が報告されており、HBV 制圧には cccDNA を減少させることが肝要である。HBV 感染を認識し産生される IFN- λ による cccDNA の減少効果、ならびに HBV 産生を調整するエピジェネティックな効果など、宿主の自然免疫を応用した治療法の開発を目指す。さらに、IFN 治療効果の差を生じる HBV 遺伝子型による治療効果修飾作用も合わせて検討する予定である。

E. 結論

初代ヒト肝細胞 *in vitro* 培養を用いて、HBV 感染により Tyep III IFN が誘導されること、IFN 誘導は HBV 遺伝子型による差は認めないこと、さらに感染肝細胞の IL28B SNP により IFN 誘導が異なることを明らかにした。さらに、HBV 持続感染に対する PEG-IFN- α / λ の抗ウイルス効果の検討から、IFN による抗 HBV 効果は HBV 遺伝子型および IL28B SNP に影響しないことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Post-Exposure Prophylactic Effect of HBV-active Antiretroviral Therapy Against Hepatitis B Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):1292-8.

2. 学会発表

1. Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iijima S, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, Tanaka Y. Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
2. Takaoka A, Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Rice C, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y. Host sensing mechanism for the activation of antiviral innate responses to HBV infection. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
3. Hayashi S, Khan A, Simons B, Jones C, Homan C, McMahan B, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Carcinogenic potential of hepatitis B virus genotype F is associated with accumulation of novel core mutations. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
4. 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 林佐奈衣, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人. 初代ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染初期の宿主免疫応答とウイルス生活環の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10 日~12 日. 横浜.
5. 林佐奈衣, 五十川正記, 村上周子, 飯島沙幸, 堤進, 尾曲克己, 渡邊綱正, 田中靖人. B 型肝炎ウイルス Genotype F における肝細胞癌関連因子の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10 日~12 日. 横浜.
6. 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, 田中靖人. 大量調整可能なヒト肝細

胞を用いた HBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第 50 回日本肝臓学会総会. 平成 26 年 5 月 29 日～30 日. 東京.

7. 堤進, 渡邊綱正, 田中靖人. ヒト初代肝細胞を用いた HBV in vitro 感染培養系の利用と創薬探索. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会. 平成 26 年 5 月 7 日～9 日. 山梨.

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

自然免疫を用いたHBV感染細胞の排除に関する研究
-HBV感染患者における樹状細胞の解析-

水腰英四郎 金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）に対する治療薬としては、数種類の抗ウイルス薬が使用されているが、ウイルスの完全排除に至る確率は低く、新しい機序を持つ薬の開発が必要である。本研究では、HBV感染患者の各病態における樹状細胞の機能解析ならびに発現遺伝子解析を行い、健常者と比較して低下している樹状細胞の機能と、これに関連する遺伝子を同定する。また、HBV感染下において低下した機能を回復させることによる、新しいHBV感染に対する治療方法の開発を行う。本年度はこれらの研究を遂行するために、健常者と比較してHBV感染患者の樹状細胞において発現が変化している各種遺伝子の同定を行った。

A. 研究目的

HBV は国内最大級の感染症の1つであり、感染を放置すると肝硬変、肝細胞癌といった重篤な病態へと進行する。HBV に対する治療薬としては、数種類の抗ウイルス薬が使用されているが、ウイルスの完全排除に至る確率は低く、新しい機序を持つ薬の開発が必要である。本研究はB型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析において、特に樹状細胞(Dendritic cell; DC)において機能低下を来している分子を同定するとともに、これらの分子の機能改善をもたらす方法を研究する。このことによって、宿主の自然免疫系へ影響を与えるHBV感染の病態解明を行うとともに、HBVに対する新しい治療法を開発を行う。

B. 研究方法

はじめに、HBV感染患者58例と健常者19例の末梢血単核球分画を採取し、フローサイトメーターを用いて樹状細胞の表面マーカーの発現レベルを測定した。樹状細胞の分離ははじめにSSCとFSCを用いた単核球分画を分離し、さらにLineage陰性・HLA-DR陽性分画を抽出し、その後CD123陽性分画のplasmacytoid DCとCD11c陽性分画のmyeloid DCに分けて解析を行った。DCの細胞表面マーカーとしては各種抗体を用いて、CD80、CD83、CD86、CD40、CCR7の発現レベルを測定した。また、DCの機能を解析する手法を確立するため、健常者から誘導したDCの各サブセットを用いて、CpG ODNや

poly IC等で刺激した際の各種サイトカイン産生能を測定するアッセイ系の作製を行った。さらに、DCの抗原貪食能、遊走能、抗原提示能を測定するためのアッセイ系の作製を行った。

次に、健常者7例に加え、58例のHBV感染患者の中から、肝機能が正常なHBVキャリアー7例、未治療のB型慢性肝炎患者6例、核酸アナログ製剤による治療を受けているB型慢性肝炎患者12例において、上記方法によりDCをplasmacytoid DCとmyeloid DCに分けて、それぞれソーティングし、分離した細胞からRNAの抽出を行った。抽出されたRNAはcDNAに逆転写後、マイクロアレイ法にて発現遺伝子解析を行った。発現遺伝子解析におけるチップにはAffymetrix Human 133U Plus 2.0を、解析ソフトにはBRB-Array-Tool (NCBI) とパスウェイ解析にはMetaCore™ (Thomson Reuters, NY, USA)を使用した。

倫理面への配慮として、本研究では臨床研究ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守しており、本研究に関しては、研究施設内の倫理委員会として、医学倫理審査委員会とヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を取得した。

C. 研究結果

はじめにDCの発現遺伝子解析結果について記載する。各DCサブセットにおける発現遺伝子解析では、plasmacytoid DC、myeloid DCのいずれにおいても、各患者群の病態を全体の遺伝子を用いて群別することはできなかつたが、 $p < 0.05$ でパスウェイ

解析を行うことが可能であった。各患者群での発現遺伝子の差を検討したところ、未治療のB型慢性肝炎患者では肝機能正常HBVキャリアーと比較して、plasmacytoid DCで3642個の遺伝子、myeloid DCで191個の遺伝子の発現低下が認められた。同様に、核酸アナログ製剤による治療を受けているB型慢性肝炎患者においては、肝機能正常HBVキャリアーと比較して、plasmacytoid DCで1558個の遺伝子、myeloid DCで290個の遺伝子の発現低下が認められた。核酸アナログ製剤による治療を受けている患者では未治療患者に比べ、plasmacytoid DCで568個の遺伝子、myeloid DCで198個の遺伝子の発現レベルの改善が認められた。これらHBV感染の状態によって発現レベルの変化を認める遺伝子の中には、IL-2やIL-6のシグナル伝達、T・B細胞レセプターのシグナル伝達、Cell cycle等に関与する遺伝子群が含まれており、宿主免疫機構に関連する遺伝子の発現が影響を受けていることが明らかになった。

さらなる詳細な解析では、健常者と比べHBVキャリアーや未治療慢性肝炎患者で発現が低下し、核酸アナログ製剤の投与によっても発現が改善しない遺伝子群を同定することができた。

DCの末梢血 frequency と表面マーカーの解析では、健常者と比べて、HBV感染患者ではmyeloid DCの数が減少していた。一方、plasmacytoid DCの数には有意な差は認められなかった。また、HBV感染患者におけるDCでは、健常者と比べて、myeloid DCにおけるCD80、CD83、CD86、CD40の発現レベルが亢進していた。

HBV 感染患者末梢血 DC のサイトカイン産生能、貪食能、遊走能、抗原提示能を測定するアッセイ系を確立した。

D. 考察

本年度の研究結果からは、HBV 感染患者では健常者と比べ、DC における遺伝子発現が大きく変化しており、一部のものではその発現が抑制されることによって、表面マーカーの変化や DC の機能低下を来していると考えられた。また、核酸アナログ製剤には、こうした HBV による DC の発現遺伝子変化の一部を改善させる効果があると考えられた。核酸アナログ製剤によって、発現レベルが改善せず、DC の機能に関連する遺伝子群を同定することにより、HBV 感染下において抑制されている DC の機能を改善させ、HBV の排除につながる免疫治療法の開発が行える可能性が示唆された。

E. 結論

HBV 感染患者では健常者と比較し、DC 数、細胞表面マーカー、細胞内発現遺伝子に変化が生じており、これらの変化は DC の各サブセットによって異なっていた。宿主の免疫応答に関連する遺伝子群においても、HBV 感染状態によって発現レベルが異なっていることから、樹状細胞数やその機能調節を遺伝子レベルで行うことにより、ウイルスに対する宿主の免疫応答を改善し、HBV 排除に向けた新しい治療方法の開発が可能になると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S. Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 21:346-353, 2014.
- 2) Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, Honda M, Kaneko S. P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 63:479-489, 2014.
- 3) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. *Cancer Immunol Immunother.* 63:347-356, 2014.
- 4) Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin-28B

genotypes. Hepatology. 59:828-838,
2014.

2. 学会発表
なし。

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

H. 知的所有権の出願・取得状況

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服実用化研究事業
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

HBV に対する自然免疫応答の解析

分担研究者： 竹原 徹郎
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学・教授

研究要旨：ウイルス感染に対する宿主免疫応答の中で、自然免疫は重要な役割を果たす。今回我々は自然免疫応答の中でも NK (Natural Killer) 細胞および NK 細胞レセプターに着目し、B型肝炎ウイルス (HBV) に対するその機能および役割を解明することで B型肝炎に対する創薬につなげることを目的とした。

B 型慢性肝炎患者及び健康者から末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーを用いて NK 細胞の頻度、活性型レセプターNKp46 や抑制型レセプターNKG2A の発現程度や、細胞傷害活性などの NK 細胞機能について解析を行った。対象は B 型慢性肝炎患者 68 例と健康者 34 例で、B 型慢性肝炎患者は HBV-DNA 4 log copies/ml を基準とし、高ウイルス群 19 例と低ウイルス群 49 例に分けて解析を行った。また、インターフェロン (IFN)・核酸アナログ製剤 (NA) といった治療介入による、NK 細胞亜分画の変化も検討した。さらに、これらのレセプターの意義について HBV 関連蛋白強制発現肝癌細胞株 (HepG2.2.15) と NK 細胞との共培養系を用いて *in vitro* での検討も行った。

末梢血単核球に占める CD56⁺ CD3⁻ NK 細胞の頻度は、高ウイルス群で健康群に比べて有意に減少した。また、NK 細胞には NKp46 と NKG2A が共に高発現となる亜分画が存在し、これを NKp46^{high} NKG2A^{high} 亜分画と定義した。この亜分画は高ウイルス群で低ウイルス群及び健康者に比べて増加していた。また、この亜分画は NK 細胞全体と比べて細胞傷害活性関連マーカーである CD107a の頻度が高く、この亜分画の頻度は血清 ALT 値と正の相関を認めた。本亜分画の頻度は無治療群に比べて 24 週以上の NA 投与群ではやや低下したが、24 週以上の IFN 投与群では著明な増加を認めた。*In vitro* での NKp46 中和抗体を用いた検討では、NKp46 の阻害によって NK 細胞の細胞傷害活性と IFN γ 分泌の著明な低下を認めた。

今回新たに同定された NKp46^{high} NKG2A^{high} 亜分画は高い細胞傷害活性を有しており、本分画の頻度が ALT と相関することから、肝障害との関連が示唆された。また、IFN 治療によって本亜分画は著明に増加し、IFN による HBV 排除に本亜分画が関連している可能性が考えられた。IFN 治療介入による NK 細胞亜分画の変化と治療効果との関連を解析するとともに、*in vitro* でさらに詳細な各レセプターの意義を検討することで、HBV に対する IFN 治療効果に関わる新規因子の同定ならびに治療標的の開発につながる可能性があると考えられた。

共同研究者

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 助教

吉岡鉄平 大阪大学消化器内科学 大学院生

A. 研究目的

ウイルス感染の際、宿主における初期応答である自然免疫はウイルスの排除に重要な役割を果たす。今回我々は自然免疫応答の中でも Natural Killer (NK) 細胞および NK 細胞レセプターに着目し、B 型肝炎ウイルス (HBV) に対するその機能および役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

B 型慢性肝炎患者 68 例と健康者 34 例 (HS) を対象とした。B 型慢性肝炎患者はさらに血清 HBV-DNA 4 log copies/ml を基準として、高ウイルス群 19 例 (CHB-H) と低ウイルス群 49 例 (CHB-L) に分けて解析を行った。対象より末梢血単核球を単離し、フローサイトメトリーでの解析を行った。細胞表面マーカーとして CD56⁺ CD3⁻ で NK 細胞を定義した。また NK 細胞における活性化型レセプター NKp46 と抑制型レセプター NKG2A との発現程度を解析した。これら NK 細胞レセプターの発現頻度により NK 細胞亜分画に分け、頻度・機能の解析を行った。インターフェロン (IFN)・核酸アナログ製剤 (NA) といった治療介入による NK 細胞亜分画の変化を検討した。HBV 関連蛋白強制発現肝癌細胞株 (HepG2.2.15) と健康者由来の NK 細胞を共培養し、細胞傷害活性を CFSE 染色による lysis assay で、サイトカイン分泌能として細胞上清の IFN γ を ELISA 法で検討した。

C. 研究成果

(1) 末梢血単核球に占める CD56⁺ CD3⁻ NK 細胞の頻度は、高ウイルス群で健康群に比べ有意に減少していた (CHB-H; 8.7 \pm 4.3%, HS; 12.4 \pm 6.8%)。NK 細胞における NKp46 発現程度 (MFI) は高ウイルス群で低ウイルス群及び健康者に比べて増加していた (CHB-H; 30.3 \pm 9.1, CHB-L; 24.4 \pm 7.2, HS; 22.3 \pm 6.5)。

(2) CD56⁺ CD3⁻ NK 細胞には NKp46 と NKG2A が共に高発現となる亜分画が存在し、NKp46^{high} NKG2A^{high} 亜分画と定義した。この亜分画は高ウイルス群で低ウイルス群及び健康者に比べ増加していた (CHB-H; 11.0 \pm 5.9%, CHB-L; 5.7 \pm 3.8%, HS; 5.9 \pm 7.1%)。

(3) NK 細胞感受性白血病細胞株である K562 との共培養による刺激下で、NKp46^{high} NKG2A^{high} 亜分画は全 NK 細胞と比べて細胞傷害活性を反映する CD107a の頻度が高かった。この亜分画の頻度は血清 ALT 値と正の相関を認めた ($r = 0.369$, $P < 0.01$)

(4) 本亜分画の頻度は無治療群に比べて 24 週以上の NA 投与群ではやや低下したが、IFN 投与群では著明な増加を認めた (無治療群; 7.7 \pm 5.8%, NA 投与群; 5.9 \pm 3.7%, IFN 投与群; 44.1 \pm 17.6%)。IFN 投与によって HBV-DNA、ALT は改善傾向であった。IFN 投与前後で NK 細胞亜分画の解析を行うことができた症例では、IFN 投与 48 週時をピークとして本亜分画の頻度が増加し、投与終了に伴って頻度が低下した。

(5) *in vitro* で NK 細胞と HepG2.2.15 とを共培養すると、NK 細胞の濃度依存的に細胞傷害活性・IFN γ 分泌が亢進した。NKG2A 中和抗体添加により、その活性に差を認めなかった。NKp46 中和抗体添加により細胞傷害活性と IFN γ 分泌量が著明に低下した。