

論 文 内 容 要 旨

Comparison of intracellular responses between HBV genotype A and C infection in human hepatocyte chimeric mice

(ヒト肝細胞キメラマウスにおけるHBV遺伝子型AおよびC感染間の細胞内応答の比較)

Journal of Gastroenterology, 54(7),650-659,2019.

主指導教員：茶山 一彰 教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

副指導教員：田妻 進 教授

(広島大学病院 総合診療医学)

副指導教員：伊藤 公訓 准教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

津島 健

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

B型肝炎ウイルス（HBV）はヘパドナウイルス科に属するDNAウイルスであり、ウイルス粒子内に3.2kbの環状2本鎖DNAを保有している。WHOからの報告によると、現在、2億5000万人以上の人々がHBVに持続感染し、年間887,000人がHBV関連肝疾患及びその合併症で死亡していると推定されており、世界的な健康問題の一つと考えられている。そのため、本邦では、1986年よりHBVの母子感染予防を目的にHBV持続感染の母親から出生した児に対するワクチン接種が開始され、若年層におけるHBV持続感染者は著明に減少している。一般に、HBV感染は、成人後感染の場合一過性感染に止まるとされているが、HBV遺伝子型Aでは、成人後の急性感染であっても慢性化の頻度が高いとされる。従来、本邦でのB型急性感染例の多くは遺伝子型BまたはC感染であったことから一過性感染で終息すると考えられてきたが、近年ではHBV遺伝子型A感染例が半数以上を占めるようになり、成人後の持続感染例の増加が危惧されている。そのため、持続感染を予防することも現在の診療において重要なポイントと考えられるが、HBV遺伝子型による臨床病態や抗ウイルス薬に対する反応性の相違が生じるメカニズムは明らかとなっていない。

【目的】

HBV感染に伴いヒト肝細胞内で生じる細胞内応答のHBV遺伝子型による相違を解析し、臨床病態や抗ウイルス薬に対する反応性への影響を明らかにする。

【方法】

マウス肝細胞でのプラスミノージェンアクチベーターの発現により生後肝不全を発症するSCIDマウス（uPA/SCIDマウス）に対しヒト肝細胞を移植し、マウス肝臓の95%以上がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを10頭準備し、HBV遺伝子型AまたはHBV遺伝子型Cを含有する血清を接種し、HBV持続感染マウスを作製した（遺伝子型A：5頭、遺伝子型C：5頭）。また、コントロールとしてHBV非感染ヒト肝細胞キメラマウスを5頭準備した。HBVを接種したマウスでは、2週間毎にマウス血清のHBV DNA量をリアルタイムPCRにて定量し、HBV DNA量が8Log copies/ml以上でプラトーに達したのを確認後、マウスをsacrificeした。その後、マウス肝臓からヒト肝細胞部分を採取し、total RNAを抽出。次世代シーケンス解析にて細胞内の遺伝子発現プロファイルを取得後、HBV感染・非感染マウスにおける遺伝子発現プロファイルの相違を比較した。

【結果】

HBV 遺伝子型 A および C 感染に伴い、それぞれ 780、208 遺伝子で有意な発現変化を認められた。HBV 遺伝子型 A 感染では、CXCL1、CFTR、LCN2 などの遺伝子において非感染マウスに比べ、100 倍以上の発現亢進が認められ、一方、遺伝子型 C 感染では CCL2、CXCL1、CXCL8 などの遺伝子で 100 倍以上の発現が亢進していた。HBV 感染に伴い発現が亢進した遺伝子の多くは遺伝子型 A および C で共通して発現亢進が認められ、CXCL6、CXCL11、CXCL8 などの免疫応答に関与するケモカインの一部は、HBV 遺伝子型 A および遺伝子型 C 感染によりほぼ同程度の発現レベルの変化であった。一方、LCN2、LYZ など 326 遺伝

子は、HBV 遺伝子型 C よりも遺伝子型 A において有意に高い発現を示し、CCL2、CXCL9 および CXCL10 など 32 遺伝子は HBV 遺伝子型 C において有意に高い発現を示した。そこで、細胞内応答の違いをより明確に理解するために、遺伝子型により発現レベルの変化が有意に異なった遺伝子のみを抽出し、PANTHER ソフトウェアを使用して HBV 遺伝子型特異的に制御される Pathway の同定を行った。その結果、ケモカインおよびサイトカインシグナル伝達経路によって媒介される p53 経路および炎症に関連する遺伝子は、遺伝子型 A 感染により強く誘導を受け、CCKR signaling map、Oxidative stress response、Wnt signaling pathway に関連する遺伝子は HBV 遺伝子型 C により強く誘導されることが明らかとなった。

【結語】

HBV感染後のヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を解析し、HBV遺伝子型による細胞内応答の相違を明らかにした。この細胞内応答の相違が、HBV遺伝子型による臨床経過や治療反応性の相違に関与している可能性が考えられた。