

## 論文内容要旨

Hepatitis B Virus (HBV) Upregulates TRAIL-R3 Expression in Hepatocytes Resulting in Escape From Both Cell Apoptosis and Suppression of HBV Replication by TRAIL

(HBV は肝細胞の TRAIL-R3 発現を上昇させ、TRAIL による細胞のアポトーシスと増殖抑制の両方を回避する)

*The Journal of Infectious Diseases, 2022, in press.*

主指導教員：岡 志郎 教授

(医系科学研究科 消化器内科学)

副指導教員：田中 信治 教授

(広島大学病院 内視鏡診療科)

副指導教員：宮内 睦美 教授

(医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

末廣 洋介

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】B型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染では、宿主内で強い免疫応答が生じた場合でも HBV を肝細胞内から完全に排除することは極めて困難である。その要因の一つとして、HBV の細胞内シグナル制御による宿主免疫回避機構の存在が考えられている。当研究室では、HBV 持続感染ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織を用いて cDNA マイクロアレイおよび次世代シーケンスによる遺伝子発現解析を実施し、HBV 感染に伴う細胞内遺伝子発現変化について解析してきた。本研究では、この遺伝子発現解析により抽出された tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 3 (TRAIL-R3) に着目し、HBV 感染における TRAIL-R3 発現亢進の意義について解析を行った。

【方法】HBV による TRAIL-R3 の発現制御機構ならびに TRAIL-R3 発現亢進による免疫応答への影響を、ヒト肝癌細胞株 (HepG2 細胞) 及びマウス肝臓がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを用いて構築した *in vitro*、*in vivo* HBV 感染・複製モデルを用いて解析した。

【結果】遺伝子発現解析の結果を確認するため、HBV 発現細胞株における TRAIL-R3 mRNA 発現を real time PCR にて測定したところ、HBV 非発現細胞株に比して有意な発現亢進を認め ( $P=0.034$ )、核酸アナログ製剤により HBV 増殖を抑制すると亢進した TRAIL-R3 発現は抑制された。これらは、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* モデルにおいても同様であり、HBV 持続感染マウスにおける肝組織内の TRAIL-R3 発現は HBV 非感染マウスよりも有意に高く ( $P=0.025$ )、核酸アナログ製剤投与により有意に低下した ( $P=0.028$ )。

次に、HBV による TRAIL-R3 発現制御機構を明らかにするため、様々な長さの TRAIL-R3 プロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作製し、転写活性を解析した。その結果、TRAIL-R3 は、転写開始点より上流-479~-969塩基の領域で HBV により転写制御を受けること、HBV 関連蛋白である HBx が TRAIL-R3 の転写活性化に寄与していることが明らかとなった。そこで、HBx 蛋白を持続発現する細胞を作製し、TRAIL-R3 発現を検討したところ、HBx 非発現細胞に比して、有意に TRAIL-R3 発現が亢進していることが示された ( $P=0.010$ )。

HBx 蛋白は Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 経路を活性化することから、HBx 蛋白による TRAIL-R3 転写活性化と NF- $\kappa$ B 経路との関連を解析したところ、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 用量依存的な TRAIL-R3 転写の活性を認め、NF- $\kappa$ B inhibitor (Bay11-7085) 用量依存的な転写抑制を認めた。

TRAIL-R3 発現亢進が宿主の免疫応答に及ぼす影響を解析するため、HBV 発現・非発現細胞を用いて TRAIL 依存性アポトーシスを解析した。HBV 非発現細胞では TRAIL 添加により有意な生細胞数の減少を認めたのに対し、HBV 発現細胞では TRAIL による生細胞数減少は認められなかった。アポトーシス調整因子の一つである short form の cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIPs) の誘導を確認したところ、HBV 非発現細胞では TRAIL 添加に伴い有意な発現亢進が認められたのに対し ( $P=0.033$ )、HBV 発現細胞では TRAIL 添加後も cFLIPs の発現が変化しないことが明らかとなった ( $P=0.255$ )。

最後に、TRAIL-R3 発現亢進の HBV 増殖への影響を *in vitro* HBV 感染モデルを用いて解析した。HBV 感染に伴い TRAIL-R3 発現が亢進し、HBV 増殖も亢進することが明らかとなった。

**【結論】**HBV が感染すると細胞内の TRAIL-R3 発現が亢進し、HBV 感染肝細胞における TRAIL 誘導性アポトーシスの回避、HBV 増殖の活性化が誘導され、HBV の宿主免疫回避、感染維持に寄与していることが明らかとなった。この回避機構を抑制することにより、宿主の HBV に対する免疫応答が効果的に誘導できる可能性があり、ヒト肝細胞からの HBV 完全排除に向けた治療標的となる可能性がある。