

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：エクソソームを介した HBV 感染及び発がんメカニズム解析と治療戦略
2. 研究開発代表者： 国立がん研究センター 分子細胞治療研究分野 主任分野長 落谷孝広
3. 研究開発の成果

### (研究の概要)

最近、細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームに関心が集まり、複数のウイルス感染機構やウイルスに寄る疾患メカニズムに多くの進展が有るが、HBV に関しては、未開発のままである。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事が緊急の課題である。そこで本研究では、1. HBV 感染培養系を用いたエクソソームによる感染機構の解明とエクソソーム阻害による感染防御の検討、2. HBV 感染肝細胞の分泌するエクソソーム内の HBV 関連タンパク質の解明と発がん関連分子の同定、を実施することで、エクソソームを起点とした HBV 感染とその肝臓疾患の防御の創薬研究を展開した。

### (研究成果)

1) エクソソームを介した HBV 感染及び発がんメカニズム解析と治療戦略：星細胞の活性化の引き金を引いている HBV 感染肝細胞に由来するエクソソーム分泌を抑制する阻害剤を開発するシステムを構築した。マイクロ RNA ライブラリーを用いた検索から、エクソソーム分泌を強力に阻害する候補を特定した (特許出願済み)。このマイクロ RNA が標的とする遺伝子群は、肝細胞がんや肝硬変で発現が更新しており、マイクロ RNA そのもの、あるいはその標的分子が、エクソソーム阻害剤開発の創薬の起点となることをつきとめ、本研究課題の目的を達成した。

2) エクソソーム由来宿主因子の細胞増殖分化能の解明：肝星細胞に miRNA を導入し、線維化関連遺伝子の発現変化を調べた。その結果、miR-29 を導入したヒト肝星細胞株ではネガティブコントロールに比して collagen1a1 や Timp1 が低下する傾向が認められた。また、エクソソームの肝臓における標的となりうる肝臓の自然免疫系細胞、肝星細胞、類洞内皮細胞の性状解析を行った結果、クッパー細胞と肝星細胞が相互作用して線維化に関与する可能性が示唆された。コンピュータ解析の結果、HBV 感染により発現の上昇が確認されたエクソソーム内 miRNA 群が、抗ウイルス免疫応答に重要なサイトカイン IL-21 を標的としている可能性が明らかになった。

3) エクソソームに含まれる宿主因子の同定と肝がん:HBV 感染肝細胞から放出されるエクソソームが、周辺細胞に作用して病態発症を誘導している可能性が示唆されている。それ故、エクソソームに含まれる宿主因子の同定は、重要な課題となっている。本研究では、高感度の質量分析装置を用いて、HBV 感染肝細胞から単離・精製されたエクソソームから、宿主因子を複数種類同定することに成功した。また、構成成分の特性を評価する目的で、ES 細胞を用いた感受性の高い細胞試験法の開発に成功した。

4) エクソソーム内 HBV-DNA・RNA および HBs 抗原の定量解: HBV 感染モデル細胞株である HepG2.2.15.7 細胞株由来エクソソームとコントロールである HepG2 DMEM/F12 細胞株由来エクソソームについて HBs 抗原の測定を行った。コントロールのエクソソームでは HBs 抗原は 0.2 mIU/L (カットオフ 0.5 mIU/L) と検出できなかったが感染モデル細胞株由来のエクソソームからは 363990 mIU/L という HBs 抗原を検出することが可能であった。以上より、HBs 抗原測定計はエクソソーム内の HBs 抗原の測定系となり得ることが分かった。