

201228008A

厚生労働省科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

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

H24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤田 尚志

平成25(2013)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
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 藤田 尚志	1
II. 分担研究報告書	
抗ウイルス自然免疫応答促進による HBV 増殖制御 藤田 尚志	11
HBV 感染増殖によるインターフェロンシステム攪乱機構の解析 加藤 宣之	13
HBV 感染複製細胞を用いたヒト肝細胞における自然免疫系の解析 土方 誠	17
B型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響 松浦 善治	19
<i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> HBV 感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答の解析 柘植 雅貴	23
HBV ジェノタイプ別 IFN シグナル阻害効果の検討 渡邊 綱正	27
自然免疫を用いた HBV 感染細胞の排除に関する研究 水腰 英四郎	31
HBV に対する自然免疫応答の解析 竹原 徹郎	33
HBV 感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給 斎藤 泉	35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別冊（別添）	43

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

研究代表者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：新規治療薬開発を目指したHBVと宿主の自然免疫応答に関する研究の初年度の研究報告である。HBVの培養細胞での増殖系と自然免疫の関連に関して解析を行なう系の立ち上げをおこなった。また、人肝臓を有するキメラマウスのHBV感染系を用い、HBVの感染による宿主の遺伝子発現パターンの変化を解析する系を立ち上げた。NK細胞、樹状細胞のサブセット分類の系を立ち上げ、HBV感染による応答を解析した。遺伝子治療用の新世代アデノウイルスベクターを開発した。HBV蛋白質を発現するアデノウイルスベクターを作製した。初年度は研究期間が短かったため、得られた成果は必ずしも十分とはいいがたいが、今後の研究の基礎として、実験系の立ち上げに主力をつぎ込んだ。来年度以降は確立した実験系を基にさらに発展させ、HBV治療へつなげる成果に発展させたい。

研究分担者

藤田 尚志 京大ウイルス研・教授
加藤 宣之 岡山大・教授
土方 誠 京大ウイルス研・准教授
松浦 善治 阪大微研・教授
柘植 雅貴 広大・助教
渡邊 綱正 名古屋市大・講師
水腰英四郎 金沢大・講師
竹原 徹郎 阪大・教授
斎藤 泉 東大医科研・教授

を開始した。

(1)自然免疫は細胞に備わるウイルス増殖抑制機構であり、その活性化はウイルスの感染排除に重要と考えられるがHBVに対する自然免疫機構は解明が進んでおらず、その解明を行う。
(2)HBVによる免疫系の阻害機構を解明し、新たな治療法の開発の基盤とする。
(3)複数の戦略によってHBV感染の治療法の糸口を開発することにより、新たな薬剤の開発、遺伝子治療法の開発へつなげる。

A. 研究目的

(1)HBVは持続感染となった場合、完治させる治療法がなく、肝硬変、肝臓がんの原因となっており、新たな治療法の開発が期待されている。
(2)HBVはヒトの肝臓で増殖するが、感染の実験系が確立しておらず、抗ウイルス薬剤の効果を的確に検討する系の確立は重要である。
(3)ウイルスは免疫系を阻害することによりその存在を図っているが、その機構の解明はHBVに対する新たな治療法の開発に必須である。
以上の現状に鑑み、以下の目標を設定し、研究

B. 研究方法

9つのグループによって研究を分担し、複数の戦略によるHBV治療法の開発を行う。
・研究代表者(藤田尚志)
(1)HBVゲノムを含むプラスミドを肝細胞株に導入し、その増殖を再現する。
(2)HBV感染の受容体分子として報告されたNTCPを肝細胞株に発現し、ウイルスの感染を再現する。
・研究分担者(加藤宣之)
(1)HBV蛋白質を恒常的に発現するヒト培養細胞

胞を作製する。

(2) インターフェロン産生に対する影響を解析できる HBV の細胞内増殖モデルの作成。

・研究分担者(土方誠)

(1) ヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞の自然免疫機構の解析を行う。

(2) HuS-E/2 細胞の HBV 受容体発現の検討を行う。

・研究分担者(松浦善治)

(1) HBV のコードする蛋白質によるインターフェロンの誘導の抑制の解析。

(2) HBV コア蛋白質と相互作用する宿主因子の探索。

(3) HBV による NK 細胞の活性を抑制の解析。

・研究分担者(柘植雅貴)

(1) HBV genotype C 感染患者血清をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、HBV 持続感染マウスを作製した。この系を用いて HBV による宿主遺伝子発現への影響を検討する。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1) HBV 遺伝子型ごとのウイルス複製効率の解析。

(2) 遺伝子型と病態の関連の解析。

(3) 臨床検体から分離した遺伝子型 A と遺伝子型 G の組み換えウイルスの解析を行う。

・研究分担者(水腰英四郎)

(1) HBV 感染患者における樹状細胞(DC)を plasmacytoid DC と myeloid DC に分離技術の確立。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1) NK 細胞のサブセット分類とその機能解析を行う。

・研究分担者(斎藤泉)

(1) HBV のコードする蛋白質を発現するアデノ

ウイルスベクターの作製。自然免疫応答を増強するための、新規アデノウイルスベクターの開発

(倫理面への配慮に関しては各分担研究の報告書に記載)

C. 研究結果

・研究代表者(藤田尚志)

(1) 肝細胞株に HBV ゲノムを含むプラスミドを導入してウイルス蛋白質の発現を確認した。ウイルスのゲノムの複製に関して確認中である。

(2) HBV 感染受容体である NTCP の発現ベクターを構築し、培養細胞で発現を確認した。安定発現細胞株の樹立を行っている。

・研究分担者(加藤宣之)

(1) すべての HBV 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養細胞を作製した。

・研究分担者(土方誠)

(1) ヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞の自然免疫機構を解析し、この細胞が初代培養ヒト肝細胞と極めて類似した自然免疫機構を有すること、今後の研究に有用と考えられる。

(2) 肝幹細胞様細胞 HMY1 細胞は肝細胞文化誘導を行うと HBV 受容体である NTCP の発現誘導がかかることを見出した。

・研究分担者(松浦善治)

(1) HBV のポリメラーゼに加え、コア蛋白質もインターフェロンの誘導を抑制することを発見した。

(2) HBV コア蛋白質と相互作用するいくつかの宿主因子を同定した。

(3) HBV は樹状細胞を介さずに、直接 NK 細胞の活性を抑制することを見出した。

・研究分担者(柘植雅貴)

(1) HBV genotype C 感染患者血清をヒト肝細胞

キメラマウスに接種し、HBV 持続感染マウスを作製した。この系を用いて HBV による宿主遺伝子発現への影響を検討した。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1)HBV 遺伝子型によるウイルス複製効率に差があることが明らかとなった。

(2)病態に伴う特異的なウイルス遺伝子変異がウイルス複製能を増強させることが明らかとなった。

・研究分担者(水腰英四郎)

(1)HBV 感染患者における樹状細胞 (DC) を plasmacytoid DC と myeloid DC に分離し、それぞれの細胞表面マーカーを患者末梢血単核球において同時に解析できるシステムを確立した。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1) NK を 4 つのサブセットに分類する技術を確立し、それぞれのサブセットにおける IFN シグナルをフローサイトメトリーにて定量化する系を確立した。

・研究分担者(斎藤泉)

(1) HBV の Pol、Large S、Small S、Pre-Core 及び Core を発現するアデノウイルスベクターを作製した。自然免疫応答を阻害するアデノウイルスの VA RNA を発現しない新世代のアデノウイルスベクターを開発した。

D. 考察

各分担研究者によって HBV 感染・複製のための細胞系の作製、探索が進められ、実用可能な細胞系が整いつつある。特に受容体 NTCP が報告どおり機能しているのであれば、大きなブレイクスルーとして研究推進に寄与するものと考えられる。HBV は極めて限られた蛋白質をコードしており、それらの発現アデノウイルスベクター安定発現細胞株などが整うことにより、感

染と宿主免疫阻害のける役割の解明が大いに進むものと期待される。樹状細胞、NK 細胞のサブセット分類、機能解析の技術が確立し、HBV の阻害標的解明が大いに進むことが期待される。ヒト肝を担うキメラマウスは患者由来のウイルスを増殖できる系であり、それを用いた解析により、ウイルスのジェノタイプ別のウイルス学的な性質が明らかとなってきた。この解析はジェノタイプ別の治療ストラテジーの構築に貢献すると考えられる。

E. 結論

本研究は9つの分担研究によって成り立っており、初年度は研究期間が短かったため、得られた成果は必ずしも十分とはいいがたいが、今後の研究の基礎として、実験系の立ち上げに主力をつぎ込んだ。来年度以降は確立した実験系を基にさらに発展させ、HBV 治療へつなげる成果に発展させたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. PLoS Pathogens, in press (2013).
- (2) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. Virus Res. 167:74-85 (2012).
- (3) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. Biochem. Biophys. Res. Commun., 430:592-597

- (2013).
- (4) 土方 誠、培養細胞による HBV 感染増殖系の構築とその応用、肝胆膵、65(4)、571-579、2012
 - (5) Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J. Virol.*, 2013, 87, 489-502.
 - (6) Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J. Virol.*, 2012, 86, 7918-7933.
 - (7) Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, 2012, 86, 6159-6170.
 - (8) Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.* 2012, 86, 1382-1393.
 - (9) Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J. Gastroenterol.*, 2012, doi : 10.1007/s00535-012-0661-5.
 - (10) Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 2012, 3, 54, doi: 10.3389/fmicb.2012.00054.
 - (11) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*, 2012, 432, 29-38.
 - (12) Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, Matsuura Y, and Sugahara K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconj. J.*, 2012, 29, 211-220.
 - (13) Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 2012, 11, 3664-3679.
 - (14) Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, and Nagano H. Upregulation of nuclear PA28γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 2012, 3, 379-385.
 - (15) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One.* 7(10):

- e47490, 2012.
- (16) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *Hepatology* 56(2): 555-66, 2012.
- (17) 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 薬剤感受性評価と臨床への応用」*肝胆膵* 65(4): 591-600, 2012
- (18) 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「HBV RT 領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討」*消化器内科* 54(5): 575-581, 2012
- (19) 柘植雅貴、茶山一彰「B 型肝炎の抗ウイルス療法③核酸アナログ (ラミブジン/アデホビル/エンテカビル/テノフォビル)」インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝炎ウイルス - B 型・C 型 38-43, 2012
- (20) Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong ZH, Ferrari C, Bertolotti A. Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells. *Gastroenterology*. 2012;143:78-87.
- (21) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, and Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *GUT*. 2012 in press.
- (22) Watanabe T, and Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulating systemic chemotherapy. *Hepatol Res*. 2013;43:113-21.
- (23) Kani S, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Yatsushashi H, Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, Mizokami M. Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay. *Microbiol Immunol*. 2012;56:318-23.
- (24) KOHGA, K., TATSUMI, T., TSUNEMATSU, H., AONO, S., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., YAMAMOTO, M., OZE, T., AKETA, H., HOSUI, A., MIYAGI, T., ISHIDA, H., HIRAMATSU, N., KANTO, T., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2012) Interleukin-18 enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 1425-32.
- (25) NAWA, T., ISHIDA, H., TATSUMI, T., LI, W., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., HOSUI, A., MIYAGI, T., KANTO, T., HIRAMATSU, N., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2012) Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology*, 432, 452-9.
- (26) SHIMIZU, S., TAKEHARA, T., HIKITA, H., KODAMA, T., TSUNEMATSU, H., MIYAGI, T., HOSUI, A., ISHIDA, H., TATSUMI, T., HIRAMATSU, T. K., FUJITA, N., YOSHIMORI, T. & HAYASHI, N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 131, 548-57.

- (27) HIKITA, H., KODAMA, T., SHIMIZU, S., LI, W., SHIGEKAWA, M., TANAKA, S., HOSUI, A., MIYAGI, T., TATSUMI, T., KANTO, T., HIRAMATSU, N., MORII, E., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2012) Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol*, 57, 92-100.
- (28) Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda H, Ono Y, Kondo S, Saito I, Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Reports* 2013; 3:1136.
- (29) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology* 2012; 432:29-38.
- (30) Pei Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito, I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to vector titration. *Biochem Biohys Res Commn* 2012; 417:945-950.
2. 学会発表
- (1) 瀬島寛恵、森京子、有海康雄、池田正徳、加藤宣之. C型肝炎ウイルスのゲノム複製が長期間に及ぶことで発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定. 第48回日本肝臓学会総会、金沢、2012年6月.
- (2) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with Li23 cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.
- (3) Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.
- (4) 松浦善治、C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子第132回日本薬学会年会、札幌、3月28-30日、2012
- (5) Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
- (6) 松浦善治、C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略～HCVの増殖を制御する宿主側因子について～: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日、2012
- (7) Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
- (8) Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on

- Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
- (9) Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
- (10) Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
- (11) Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
- (12) Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌、10月16日-19日, 2012
- (13) Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
- (14) 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に關与するヒト肝臟特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- (15) 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臟細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- (16) 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性は miR-122 の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- (17) 加藤大志、岡本徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森嘉生、神谷亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- (18) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- (19) Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.
- (20) Kowaki T, Ngoc PH, Fukuhara T, Okamoto T, Matsuura Y, Identification of host factors interact with hepatitis

- B virus X protein. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012
- (21) 塩川 舞、福原崇介、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生に關与するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012
- (22) 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原喜彦、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの細胞親和性における Quasispecies の意義、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012
- (23) 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012
- (24) 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本 徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司、HCV 複製に關わる新規宿主因子 FKBP6 : FKBP6 は NS5A と結合し HCV 複製を制御する、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012
- (25) Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「The effects on gene expression profiles in human hepatocytes by HBV and HCV infection」22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ポスター
- (26) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「Evaluation of antiviral effects of nucleos(t)ide analogues for hepatitis B virus using in vitro and in vivo models」22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ポスター
- (27) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰「血液悪性腫瘍に対する化学療法施行例における HBV 再活性化と核酸アナログ製剤による再活性化予防効果の解析」第 16 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 1
- (28) 小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における B 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果の検討」第 54 回日本消化器病学会大会 ポスター
- (29) 柘植雅貴「薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログの抗ウイルス効果」Hepatology Meeting in Japan 2012 一般演題
- (30) 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰「HBV 薬剤耐性変異株に対するテノホビルの抗ウイルス効果」第 48 回日本肝臓学会総会ワークショップ 5
- (31) 村上英介、柘植雅貴、今村道雄、小林知樹、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平賀伸彦、平松 憲、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「HBV 既往感染者に対する血液悪性疾患化学療法時の核酸アナログ製剤による HBV 再活性化予防についての検討」第 48 回日本肝臓学会総会 一般演題
- (32) 森奈美、柘植雅貴、茶山一彰、川上広育「B 型慢性肝炎に対する Lamivudine, interferon- α による Sequential therapy における治療効果と Th1/Th2 バランスの検討」広島・山口肝疾患研究会

- (33) 小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柁木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における B 型慢性肝炎 7 例に対するペグインターフェロン (PEG-IFN) α -2a の治療成績」第 98 回消化器病学会中国地方会 一般演題
- (34) Masataka Tsuge, Tomohiko Kohno, Nobuhiko Hiraga, Hiromi Abe, Daiki Miki, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama「Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication with targeting to HB core region」63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) ポスター
- (35) HIV 合併 HBV 感染例において核酸アナログ add-on ペグインターフェロン併用療法による HBs 抗原セロコンバージョンの可能性. 渡邊綱正、横幕能行、杉浦互、田中靖人. JDDW2012.平成 24 年 10 月 10 日～11 日.神戸.
- (36) B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差. 飯尾悦子, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸.
- (37) 核酸アナログを投与した B 型慢性肝炎患者における interferon-inducible protein-10 値の動態. 新海登, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 村上周子, 宮木知克, 藤原圭, 日下部篤宣, 飯尾悦子, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸
- (38) HIV 合併 HBV 感染例に対するペグインターフェロン治療. 渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦互、田中靖人. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会.平成 24 年 11 月 24 日～26 日.横浜 口演.
- (39) HIV 合併例を含めた B 型急性肝炎症例の検討.渡邊綱正、杉浦互、田中靖人. 第 39 回日本肝臓学会東部会.平成 24 年 12 月 6 日～7 日.東京.シンポジウム.
- (40) Immune restoration hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.22-25,2012. London.
- (41) Characteristics of anti-HBs titers by gender and age in HBV-resolved patients. Iio E, Watanabe T, Tanaka Y, Matsuura K, Shinkai N, Nojiri S, Joh T. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.9-13, 2012. Boston.
- (42) 前川文、裴崢、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、斎藤泉. 高力価 VA RNAs 欠失アデノウイルスベクター新規作製法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術総会, Osaka, 2012.
- (43) 裴崢、史国利、近藤小貴、伊藤昌彦、鐘ヶ江裕美、鈴木哲朗、斎藤泉. VA RNA 欠失型アデノウイルスベクターを用いた C 型肝炎治療法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術総会, Osaka, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

VA 遺伝子破壊アデノウイルスベクターおよびそれを調製するための前駆体ベクター

特願 2012-213069

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

自然免疫センサーRIG-IによるHCV増殖阻害の解明と抗HCV製剤の開発

分担研究者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：HBVと宿主の自然免疫応答に注目し、免疫の誘導とウイルスによる阻害を標的とした治療法を開発することを目的とした。肝培養細胞にHBVゲノムをプラスミドを用いて導入し、複製を再現することを試みた。ウイルスのコア蛋白質の発現を確認し、ウイルスの複製の検証を進めている。また、最近報告されたHBVの感染受容体NTCPの発現ベクターを構築し、肝細胞株での強制発現を行ない、発現を確認した。これらの系を完成させ、HBVによる自然免疫応答の誘導ならびにHBVによる免疫応答の阻害の解析に進む計画である。

A. 研究目的

HBVの治療効果向上を目的とする。本研究ではHBVと宿主の自然免疫応答に注目し、免疫の誘導とウイルスによる阻害を標的とした治療法を開発する。ウイルスは宿主と共に進化を遂げ、野外株ウイルスは免疫機構を回避する方法を獲得してその存在を保全している。HBVの免疫回避機構を明らかにすることは、ウイルスの増殖を制御して治療する上で必須である。本研究では特に感染初期に稼働する自然免疫機構に焦点を当てる。

B. 研究方法

H24-26年度においては、HBVの誘導する自然免疫応答および主要な免疫阻害機構を明らかにすることを目指した。まず細胞培養系を用いて検討するためのシステムの構築を行なった。報告されたHBVゲノムを含むプラスミドを肝細胞株にトランスフェクションしてHBVの増殖をcccDNAの検出で確認する系の立ち上げを試みた。このためのHBVプラスミドの分与を受け、細胞培養系で追試した。また、組換えHBVウイルスを産生する実験となるため、組換えDNAの大臣確認実験実施の申請を行ない、認可された。

最近、HBVの吸着、侵入のための受容体がSodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)であるということが報告された。それに関してNTCPの発現ベクター（天然型およびGFP融合タンパク型）の調製を行なった。（倫理面への配慮）培養細胞を用いた研究であるため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

HBVゲノムを1.3コピー有するプラスミドを肝由来細胞株にトランスフェクションし、ウイルスのコア蛋白質の発現を確認した。ウイルスのcccDNAの検出（ウイルスの複製がおきている検証）を行なっているところである。

NTCPの発現ベクターを肝培養細胞株に導入し、NTCPの発現を特異抗体ならびにGFPの蛍光によって確認した。NTCPを安定に発現する培養細胞株を樹立しつつあり、その細胞でのHBV粒子からの感染、増殖を検討する計画である。

D. 考察

プラスミドを用いた方法、ならびに受容体の強制発現に夜系の立ち上げが進行中であり、

25年度中には実験系の構築を完成させ、実際のデータを得る計画である。現在コア蛋白質の抗体による検出が出来る状態であるが、その他のウイルス蛋白質の検出も解析に有用であると考えられ、必要に応じて抗体の作製も行なう計画である。

E. 結論

HBV の増殖を培養細胞レベルで再現する系の立ち上げが進行中の段階であり、今後この系の確立を完成させ解析を行なうことに集中する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

HBV 感染増殖によるインターフェロンシステム攪乱機構の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授
研究協力者 團迫 浩方 岡山大学 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の感染増殖によりインターフェロン（IFN）応答性や IFN の産生システムがどのような影響を受けるかを明らかにすること、さらには、どの HBV タンパク質がどのような分子機序により免疫応答阻害を引き起こすかを明らかにすることを目的とした。今年度は、この目的を達成するための実験モデル系の開発を試み、以下に示すような成果を得た。（1）各種 HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞を作成した。（2）IFN 産生に対する影響を解析できる HBV の細胞内増殖モデルシステムを作成した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）による感染症は、患者数も多く、慢性肝炎、肝硬変および肝癌などの重篤な病態の原因になっている。C型肝炎ではインターフェロン（IFN）治療が改良され、治癒率も70%以上になることが期待されているものの、B型肝炎でのIFN治療の成績は30%程度に留まっており、HBVは治療に抵抗性を示す。核酸アナログ製剤により、HBVの増殖を抑えて肝炎を沈静化させることはできますが、薬を中止するとほとんどの症例で肝炎は再燃するため、HBVの完全排除ができない状況である。

本研究においては、HBVが宿主の自然免疫応答、特にIFN応答性やIFN産生系にどのような影響を与えているかについて、細胞モデル系を開発する。このようなモデル系を使うことによりHBVがIFNシステムにどのような影響を与えてIFN治療に抵抗性を示すかを明らかにする。また、研究期間内にヒト培養細胞を用いたHBV感染増殖システムが開発された場合には、そのシステムを使用して解析を行う。これらの解析により、HBV感染症に対する新たな治療法や薬剤の開発を目指す。

B. 研究方法

（1）HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞の作成。

HBV のゲノム DNA 上には、S 抗原遺伝子（preS1、preS2 と S 領域から成る）、C 抗原遺伝子（preC と C 領域から成る）、X 抗原遺伝子及び P 抗原遺伝子に対応する 4 つの読み枠が存在する。S 抗原遺伝子からは 3 種類のウイルスタンパク質が産生される（preS1、preS2 と S 領域からは Large HBs タンパク質、preS2 と S 領域からは Middle HBs タンパク質、S 領域からは Small HBs タンパク質）。また、C 抗原遺伝子からは 2 種類のウイルスタンパク質が産生される（preC と C 領域からは HBe タンパク質、C 領域からは HBc タンパク質）。このように、4 つの読み枠から、RNA を経て、X 抗原遺伝子から産生される HBx タンパク質と P 抗原遺伝子から産生される DNA ポリメラーゼを含め計 7 種類のウイルスタンパク質が最終的に翻訳される。今年度は Large HBs タンパク質、HBe タンパク質、HBx タンパク質あるいは DNA ポリメラーゼを発現するためのベクターの作成を行った。ベクターの作成後、これらのウイルスタンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞の作成を試みた。

最初に、HBV の全遺伝子構造物を含むベク

ターを鋳型として、各 HBV タンパク質をコードしている遺伝子領域を PCR 法にて増幅した。増幅した PCR 断片はレトロウイルスベクター (pCX4bsr) に導入した。このレトロウイルスベクターを用いることにより、各 HBV タンパク質は N 末端側に HA tag が付加された融合タンパク質として発現されるので、Western blot 法による発現の確認が容易に行うことができる。また、このレトロウイルスベクターはブラストサイジン耐性遺伝子もコードしており、HBV タンパク質を発現する細胞のみを選択することが可能である。

次に、作成した発現ベクターをパッケージング細胞 (BOSC23) にトランスフェクション後、各 HBV タンパク質をコードする遺伝子を含むレトロウイルスを回収した。回収したレトロウイルスはヒト肝がん細胞株 Li23 細胞に感染させ、ブラストサイジンにより、HBV タンパク質を発現する細胞のみを選択培養した。

(2) HBV の細胞内増殖モデルシステムの作成。

HBV のゲノム DNA は、一部が一本鎖構造をとる環状不完全二重鎖をなしている。HBV は感染後、自身の産生する DNA ポリメラーゼにより完全二重鎖になった後、マイナス鎖 DNA を鋳型にして、RNA を転写する。また、転写された RNA を鋳型にして、ゲノム DNA が複製される。この複製過程とは別に、中間的に直鎖状二本鎖 DNA も産生される。このように、HBV はその生活環において、複製中間体として二本鎖 DNA あるいは DNA:RNA 相補鎖を産生している可能性が示唆される。そこで、HBV の細胞内増殖を模倣するシステムとして、poly (dA:dT) (二本鎖 DNA) あるいは poly (A:dT) (RNA:DNA 相補鎖) をリガンドとして用いた実験モデルの構築を試みた。また、細胞内の poly (dA:dT) は RNA polymerase III により 5' -ppp dsRNA に変換され、RIG-I により認識されるという報告もあるので、5' -ppp

dsRNA や poly (I:C) の二本鎖 RNA もリガンドとして用いた。

ヒト不死化肝細胞である PH5CH8 細胞は二本鎖 RNA の認識に重要な RIG-I 経路や TLR3 経路が機能しており、自然免疫応答が正常肝細胞に近いことが知られている。そこで、PH5CH8 細胞に、上記の各種リガンドをトランスフェクションにより導入し、IFN-beta や IFN 誘導遺伝子群 (OAS1、IRF7、ISG15、ISG56 や IP-10) の発現誘導量を調べた。また、初代ヒト肝細胞、その他のヒト不死化肝細胞や肝がん細胞株 (Li23 や HepG2 等) にも同様に、各種リガンドを導入し、IFN 産生能を調べた。各種リガンドの導入には、Lipofectamine2000 を使い、細胞内に導入 6 時間後の細胞から、全 RNA を抽出した。IFN-beta や ISG56 などの IFN 誘導遺伝子群の mRNA 量はリアルタイム PCR 法により定量的に測定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後、廃棄した。

C. 研究結果

(1) HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞の作成。

HBV の各タンパク質をコードする遺伝子を含むレトロウイルスを感染させた Li23 細胞はブラストサイジンを含む培地中で約 2 週間、選択培養した。Li23 細胞内の Large HBs タンパク質、HBe タンパク質あるいは DNA ポリメラーゼの発現は Western blot 法により確認することができた。しかしながら、X 抗原遺伝子を導入した Li23 細胞では、ブラストサイジンによる選択培養の前から、細胞死が目立ち、

HBx タンパク質を恒常的に発現する Li23 細胞の作成には現在までのところ、至っていない。

(2) HBV の細胞内増殖モデルシステムの作成。

最初に、PH5CH8 細胞に、poly (I:C)、5' -ppp dsRNA (どちらも二本鎖 RNA) や poly (dA:dT) (二本鎖 DNA) をトランスフェクションにより導入したところ、IFN-beta や IFN 誘導遺伝子群 (OAS1、IRF7、ISG15、ISG56 や IP-10) の発現が誘導された。しかしながら、poly (A:dT) (RNA:DNA 相補鎖) を導入した場合は IFN-beta や IFN 誘導遺伝子群の発現誘導は確認できなかった。また、初代ヒト肝細胞や、NKNT3 細胞あるいは OUMS29 細胞といったその他のヒト不死化肝細胞でも同様に、poly (I:C)、5' -ppp dsRNA や poly (dA:dT) に対する応答性は確認できたが、poly (A:dT) に対する応答性は確認できなかった。一方、肝がん細胞株 (HuH-7、Li23、HepG2、PLC/PRF/5、HT17 及び HLE 細胞) では、程度の差はあるが、poly (I:C) や poly (dA:dT) に対する応答性は確認できたが、5' -ppp dsRNA や poly (A:dT) に対する応答性は確認できなかった。このように、5' -ppp dsRNA に関しては、肝がん細胞株と正常肝細胞 (あるいは正常肝細胞に近いと思われるヒト不死化肝細胞) では応答性に大きな違いが見られた。

次に、S 抗原遺伝子、C 抗原遺伝子、X 抗原遺伝子及び P 抗原遺伝子領域をそれぞれ増幅した PCR 断片を Li23 細胞に導入したところ、程度の差はあれ、いずれの PCR 断片も ISG56 の発現を誘導した。この結果から、HBV 由来の二本鎖 DNA も IFN 産生能を有するが、配列特異的な産生誘導ではないことが分かった。

さらに、poly (dA:dT) が RIG-I/IPS-1 経路を介して IFN を産生しているかどうかを調べた。HCV の NS3/4A タンパク質は IPS-1 を切断し、IFN の産生を抑制することが知られているので、HCV の NS3/4A タンパク質を恒常的に

発現している Li23 細胞に poly (I:C) を導入したところ、ISG56 の発現誘導が抑制されたが、poly (dA:dT) に対する応答性には変化が見られなかった。これらの結果により、二本鎖 DNA は RIG-I/IPS-1 経路とは別の経路を介して IFN を産生誘導していることが分かった。

D. 考察

(1) HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞の作成。

今年度、Large HBs タンパク質、HBe タンパク質あるいは DNA ポリメラーゼを恒常的に発現する Li23 細胞を作成することができたので、これらの HBV タンパク質が二本鎖 DNA に対する応答性を阻害するかどうかを次年度以降、検討する。また、これらの HBV タンパク質が宿主の IFN 産生系を活性化するかどうかも検討する予定である。一方、HBx タンパク質を恒常的に発現する Li23 細胞の作成には現在までのところ、至っていない。X 遺伝子を導入後、細胞死が目立つことから、HBx タンパク質がアポトーシスを誘導している可能性が考えられる。また、HBx タンパク質が TBK-1 の up-regulation を介して、NF- κ B 経路を活性化するという報告もあることから、IFN 産生系も活性化している可能性も考えられる。次年度以降、HBx タンパク質が IFN 産生系に対して、どのような働きをしているか検討する予定である。

(2) HBV の細胞内増殖モデルシステムの作成。

初代ヒト肝細胞、ヒト不死化肝細胞や肝がん細胞株のいずれも、HBV の複製中間体である二本鎖 DNA を模している poly (dA:dT) に応答して IFN を産生誘導していた。また、HBV 由来の二本鎖 DNA も同様に IFN 産生能を示したことから、HBV の細胞内増殖モデルシステムを作成することができたと考えられる。しかしながら、HCV の NS3/4A タンパク質

(RIG-I 経路のアダプター分子である IPS-1 を切断する) を恒常的に発現している Li23 細胞に poly (I:C) を導入したところ、ISG56 の発現誘導が抑制されたが、poly (dA:dT) に対する応答性は変化が見られなかったことから、二本鎖 DNA は RIG-I/IPS-1 経路とは別の経路を介して IFN を産生誘導している可能性がある。そこで、次年度以降、RIG-I 経路あるいはその他の DNA センサーなどの分子のノックダウン細胞を作成し、poly (dA:dT) がどのような機構で、IFN を産生誘導しているかを調べる予定である。また、HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞も作成できたことから、poly (dA:dT) による IFN 誘導を抑制する HBV タンパク質も探索する。

E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。

(1) 各種 HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞を作成した。(2) インターフェロン産生に対する影響を解析できる HBV の細胞内増殖モデルシステムを作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. PLoS Pathogens, in press (2013).
- 2) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of

hepatitis C virus RNA. Virus Res. 167:74-85 (2012).

- 3) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. Biochem. Biophys. Res. Commun., 430:592-597 (2013).

2. 学会発表

- 1) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. C 型肝炎ウイルスのゲノム複製が長期間に及ぶことで発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定. 第 48 回 日本肝臓学会総会、金沢、2012 年 6 月.
- 2) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with Li23 cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.
- 3) Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
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：土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題：HBV感染複製細胞を用いたヒト肝細胞における自然免疫系の解析

研究要旨：HBVの感染増殖に対するヒト肝細胞の自然免疫応答機構の詳細を明らかにする目的で、本年度はHBVが効率良く感染し増殖することが可能であり、且つ、出来るだけ本来のヒト肝細胞に近い性質を有する培養細胞の選択を行った。まず当研究室で独自に樹立し、最近、台湾の研究グループからそのHBV感染感受性が報告されている不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞について検討をおこなった。既知のインターフェロン誘導機構について初代培養ヒト肝細胞(PHH)と比較したところ、HuS-E/2細胞はPHHと非常に類似していた。そこでHBV陽性患者血清を用いてHBVを感染させたが、有意な感染は認められなかった。最近HBV受容体分子として報告されたNTCPのHuS-E/2細胞におけるmRNA発現量を確認したところ低レベルであった。そこで最近我々の研究室で樹立している肝幹細胞様細胞HMY1細胞におけるNTCP mRNAの発現を検討したところ、肝細胞分化誘導培養条件下においてNTCP mRNAの発現が誘導されることがわかった。そこで現在、HMY1細胞の自然免疫機構について解析をおこなっている。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染に対して防御的に働くヒト肝細胞の自然免疫機構を明らかにすることを第一の目的とした。またこの自然免疫機構を抑制するHBVの機能を明らかにすることを第二の目的とした。そして、最終的に前者を活性化し、後者を抑制することでHBVの感染を抑制することが可能な抗HBV戦略の構築を目指した。その為にまず、上記の解析が可能な、ヒト肝細胞に類似した自然免疫機構を有し、HBV受容体分子を発現している細胞の選択をおこなった。

B. 研究方法

1. 既知のインターフェロン(IFN)誘導機構について初代培養ヒト肝細胞(PHH)とHBV感染感受性が報告されている不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞を比較した。今回はセンダイウイルスの感染により誘導されるIFN関連遺伝子群の発現誘導についてそれぞれのmRNA量の変化をもとに検討した。
2. 最近台湾のグループからHBV感染増殖能が報告されたHuS-E/2細胞についてHBVの

感染感受性について検討をおこなった。報告同様に2%DMSOを含む培養液を用いて前培養した細胞にHBV陽性患者血清で処理し、HBVコアタンパク質に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法によりHBV感染細胞の検出をおこなった。

3. HuS-E/2細胞ならびに当研究室で最近樹立した肝幹細胞様細胞HMY1細胞において、HBV受容体分子として報告されているNTCPのmRNA発現量についてセミ定量RT-PCRによって解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト不死化肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。また、ヒト肝幹細胞様細胞は既に倫理審査を経た市販の初代培養ヒト

肝細胞を用いて作成されており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 既知のインターフェロン誘導機構について初代培養ヒト肝細胞(PHH)と比較したところ、HuS-E/2細胞はPHHと非常に類似していることがわかった。両細胞ではウイルス非感染状態でIRF7とIFN α 1が共通して発現していることがわかった。また、センダイウイルス感染によって発現誘導される一群のIFN刺激誘導遺伝子群の発現も経時変化と発現の強度に多少の相違がある場合も認められたが、ほぼ共通していた。

2. 2%DMSOを含む培養液を用いて前培養したHuS-E/2細胞をHBV陽性患者血清で処理することでHBV感染を検討したが、HBVコアタンパク質に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法ではHBV感染細胞を検出することができなかった。

3. HuS-E/2細胞とHMY1細胞ではHBV受容体分子として報告されたNTCPのmRNA発現量は低レベルであり、2%DMSOを含む培養液を用いて前培養した場合でもその発現量は低かった。しかしながらHMY1細胞を無血清肝細胞用培地によって肝分化誘導培養するとこれまで全く検出できなかったアルブミンmRNAの発現が誘導されると同時にNTCP mRNAの発現量が著しく上昇することが認められた。D. 考察

1. HuS-E/2細胞はPHHと同様の自然免疫機構を有する可能性が考えられた。これまでの研究では報告されたようなHBV感染増殖は認められなかったが、その原因の一つはHBV受容体NTCPの発現が低レベルであったためであると考えられた。そこで今後はこの細胞にNTCPを強制発現させることでHBVの感染が可能になるかどうか検討する必要があると考えられた。また今回我々は患者血清を用いているが、今後はさらに培養条件を検討し、また組換え体HBVを用いて感染実験をおこなう必要があると考えられた。HBV感染が可

能になれば、この培養細胞系を用いたヒト肝細胞自然免疫系とHBVの相互作用を明らかにすることが可能になると考えられた。

2. ヒト肝幹細胞用細胞HMY1細胞は肝分化誘導培養下において高いNTCP mRNAの発現が検出されたことから、この細胞はHBVに対して高い感受性を示す可能性が考えられたため、この細胞を用いたHBVとの相互作用の解析の可能性が考えられた。今後はこの細胞とPHHの自然免疫系の関連について解析する必要があると考えられた。

E. 結論

今後、HuS-E/2細胞に関してはNTCPの強制発現細胞を樹立し、また至適な培養条件を検討することでHBV感染が可能になることが期待される。この系を用いることで本来のヒト肝細胞におけるHBV感染に対する自然免疫系の解析が可能になると考えられた。またHMY1細胞に関しては肝分化培養条件下においてHBV感染感受性の検討を行い、また、その自然免疫をPHHと比較することが必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

土方 誠、培養細胞によるHBV感染増殖系の構築とその応用、肝胆膵、65(4)、571-579、2012

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし