

201228012A

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な
培養細胞評価系の開発に関する研究
(H24-B創-肝炎-一般-013)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究…………… 1 (名古屋市立大学 大学院医学研究科 田中 靖人)	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト肝細胞の採取と不死化肝細胞株の樹立、HBV 感染モデル作成 ……………17 (九州大学 消化器・総合外科学分野 調 憲)	
2. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた HBV 感染評価系の開発 ……………20 (大阪大学大学院薬学研究科 水口 裕之)	
3. ヒト肝細胞キメラマウス由来のヒト肝細胞を用いた HBV 長期感染培養法の構築 ……………31 (株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 第一課 石田 雄二)	
4. 肝機能維持に最適な 3 次元培養法の構築 ……………35 (公益財団法人東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 小原 道法)	
5. 肝細胞のスフェロイド形成による 3D 培養法の確立と機能解析 ……………38 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 松永 民秀)	
6. 肝炎ウイルス 3 次元培養系の構築 ……………41 (名古屋市立大学 大学院医学研究科 村上 周子)	
7. HBV の細胞内ライフサイクルに及ぼす miRNA 機能の解析 ……………45 (国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 落谷 孝広)	
8. 検体からの脂質調製とリピドミクス解析・多変量解析 ……………48 (秋田大学 生体情報研究センター 中西 広樹)	
9. HBV 感染による脂質代謝変動の解析・HBV 産生における脂質代謝系の影響の解析…………51 (国立感染症研究所 細胞化学部 深澤 征義)	
10. 自然免疫認識機構の制御による HBV 複製への影響 ……………56 (北海道大学 遺伝子病制御研究所 高岡 晃教)	
11. HBV 粒子の可視化技術を用いた HBV の細胞内侵入機構の解析 ……………61 (名古屋大学 大学院医学系研究科 石川 哲也)	

12. 生体イメージングの実行・肝炎ウイルスの標識化・データ解析	63
(大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 石井 優)	
13. HBV 感受性環境の構築：高効率な感染増殖に関連する HBV 遺伝子構造の解析	65
(北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野 坂本 直哉)	
14. HBV 増殖に関わる肝細胞環境因子の同定	70
(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 池田 正徳)	
15. 培養肝細胞による HBV の高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いた新規抗 HBV 薬剤の 評価および開発	75
(京都大学ウイルス研究所 土方 誠)	
16. 生理活性物質と HBV 複製増殖との関連解析	77
(国立感染症研究所 ウイルス第二部 渡士 幸一)	
III. 研究成果の刊行一覧	81
IV. 研究成果の刊行物・別冊	89

I. 総括研究報告書

研究課題: B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

研究代表者: 田中 靖人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授

研究要旨: B型肝炎ウイルス(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持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することが重要である。すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1)最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2)新規培養システムの構築(3次元培養)、(3)ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、トランスポーター、免疫反応)、(4)HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)により、できるだけ早期にHBV持続感染感受性培養細胞評価系を完成させる。また、(5)生体多光子励起イメージングを駆使して、*in vitro/in vivo*におけるHBVウイルス動態の可視化、さらに感染経路、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながる事が強く期待される。

A. 研究目的

チンパンジーやキメラマウス等を用いずに薬剤の評価ができる方法としては、これまでにヒト肝由来細胞を透過性を有する中空系の内腔に充填された細胞に、肝炎ウイルスを感染させて培養する方法等が報告されている。しかしこの方法においては、少量の細胞で多種の試験を行うのが困難であり、より簡便で高い効率で肝炎ウイルスを感染・増殖できる系が望まれている。本研究班では、B型肝炎ウイルス(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持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等を効率的に実施できる簡便な

システムを構築することが重要である。すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1)最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2)新規培養システムの構築(3次元培養)、(3)ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、トランスポーター、免疫反応)、(4)HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)により、できるだけ早期にHBV持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B型肝炎創薬実用化研究の推進を目指す。また、(5)生体多光子励起イメージングを駆使して、*in vitro/in vivo*におけるHBVウイルス動態の可視化、さらに感染経路、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画

期的な治療法の開発につながる事が強く期待される。

B. 研究方法

最適なヒト肝細胞の選択

(水口) Adベクターを用いた FOXA2、HNF1 α 遺伝子導入法を改良した方法で、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導及び細胞への遺伝子導入。ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染増殖因子の発現解析。ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の移植実験。(石田)キメラマウスの作製及びコラゲナーゼ灌流によるヒト肝細胞の分離。分離したヒト肝細胞は、10%FBSを添加したDMEM(DMEM10)に懸濁し、1型コラーゲンをコートした24ウェルプレートに、 2.1×10^5 cells/cm²の密度で播種し、4%のPEG8000とHBVに持続感染したキメラマウスの血清を用いた感染実験。(調)ヒト切除肝において正常と思われる肝組織を採取し、病理組織学的に正常肝細胞であることを確認。採取した肝組織に、脱血およびコラゲナーゼ灌流等の処置を行い、分散・単離された正常肝細胞を培養シャーレへ播種。初代肝細胞として、その後の研究に使用する。

新規培養システム(3次元培養)の構築

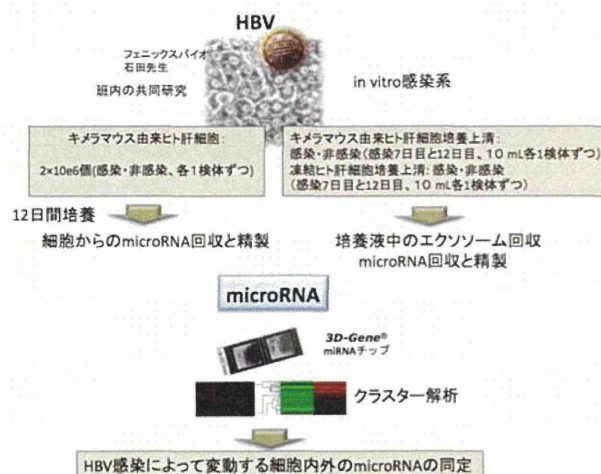
(小原)ヒト初代肝細胞と肝炎ウイルスとを混合振盪し、ヒト初代肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、ストローマ系のフィーダー細胞を培養した三次元培養基材上で培養(Cell-able)。また、TAL Effector Nucleases (TALEN[®])を用いてHBV完全閉鎖2本差DNA(cccDNA)の切断・改変による完全排除を試みた。(松永) *in vitro*における肝組織を再現することを目的として、3次元培養系構築(Cell-able plate(トランスパレント社))を目指し、それに伴うHBV感染性について従来の2次元培養系と比較し評価を行った。凍結成人肝細胞

(HAL細胞)及びヒト胎児正常肝細胞(HFL細胞)における形態並びに肝細胞マーカー及び薬物代謝酵素CYPのmRNA発現について2Dと3D培養で比較した。

(村上)感染源として、HBVのウイルス粒子を含む患者血清やキメラマウス血清を複数用いて、感染効率などを比較した。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

(落谷)キメラマウス由来ヒト肝細胞: 2×10^6 個(感染・非感染、各1検体)、キメラマウス由来ヒト肝細胞培養上清: 感染・非感染(感染7・12日目)、凍結ヒト肝細胞培養上清(感染・非感染 感染7・12日目)を解析。細胞からはmicroRNA回収、精製を、培養上清からは、超遠心によるエクソソーム分画の回収と精製、既に解析の最適化を終えているmicroRNAアレイ解析を実施(図)。



(中西)上記と同様のサンプルより脂質を抽出し、脂質解析はトリプル四重極型質量分析計を用いて生理活性を持つ微量脂質成分を高感度・特異的に測定し、イオンラップ型質量分析計を用いて恒常性維持に必須な量的に多い脂質成分を網羅的に測定した。(深澤)HBV産生による宿主細胞における脂質代謝変動を明らかにする目的で、HBVゲノムを一過性に導入したヒト肝由来Huh7系細胞を用い、代

謝標識法により脂質代謝変動を解析した。(石川) HBs 粒子を蛍光ラベル(脂溶性蛍光色素を用いてウイルス粒子膜を標識)によって可視化し、HBs 粒子添加時の不死化ヒト肝細胞(HuS-E/2)、ヒト肝癌細胞(HepG2)、マウス線維芽細胞(MEF)への取込みの有無、細胞内局在を解析した。(石井)生体における HBV 感染経路・抗ウイルス免疫の作動様式を動的に解析するために、肝臓の生体多光子励起イメージング系の開発を行った。(高岡)HBV により活性化される自然免疫認識機構を探るために、Huh7 細胞に 1.24 倍長の HBV plasmid を Transfection する系を用いて、遺伝子型の異なる HBV を感染させることによって IFN 遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。

HBV 感染感受性環境の構築

(渡士)既存の HBV 複製細胞株(HepG2.2.15、HepG2.2.15.7、HepAD38、Hep38.7-Tet)から単一細胞をクローニング。さらに約 20 種類の低分子化合物の HBV 複製に対する効果を検討した。

(土方)独自に樹立しているヒト不死化肝細胞、HuS-E/2 細胞及び肝幹細胞様 HMY1 細胞において、最近 HBV 受容体分子として報告された NTCP mRNA の発現、及び HBV 感染感受性について検討した。(池田)13 種類のヒト肝細胞株に対して、肝臓特異的なマイクロ RNA である miR122、IFN 応答性に関わる IL28B SNPs および最近 HBV 受容体として報告された NTCP について検討した。

(坂本)1.2 倍長 HBV 発現プラスミド(genotypes A、B、C)の HBX 蛋白発現を選択的に欠損した改変したプラスミド及び各ゲノタイプの HBX 蛋白強制発現プラスミドを構築。エピトープ欠失 X 蛋白、全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換した X 蛋白発現系を用いて、薬物の標的となる部位を網羅的に探索・特定する。

C. 研究結果

最適なヒト肝細胞の選択

(水口)ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化培養方法の改良と、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞における HBV 感染・増殖関連因子の発現解析:未分化状態のヒト iPS 細胞と比較し、分化肝細胞において HNF4 α 、HNF1 α 、ASGPR1、miR-1、miR-122a の発現量が上昇。遺伝子導入効率の検討:CA プロモーターを搭載した Ad ベクター(AdK7-CAGFP)を 300 および 3000VP/cell で作用させた場合には、それぞれ 86% および 92% の GFP 陽性細胞が得られた。さらにマウスへの移植実験を行った結果、血中ヒトアルブミン濃度は上昇し続け、最高約 15 g/ml のヒトアルブミンが検出された。

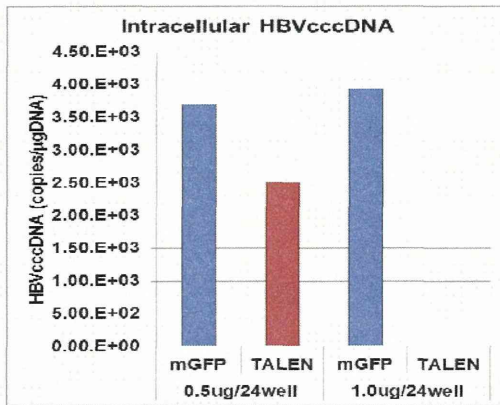
(石田)37°C で 7 日間培養してから HBV を接種した場合は、上清中の HBV DNA 量は 4.0×10^6 copies/mL を示した。3 日間の保存であれば、温度に関わらず同程度の HBV DNA 量を示した。25°C の場合は、7 日間保存したものは、3 日間保存したものの約 50% 程度の値を維持していた。

(調)平成 25 年 1 月 9 日に九州大学倫理委員会の承認を受け、同年 1 月 15 日に第 1 回目のヒト肝細胞採取(19 歳)。培養初代肝細胞は約 2 週間の間培養を行ったが、肝細胞は死滅。同年 1 月 31 日に第 2 回目のヒト肝細胞採取を行った(27 歳)。viability は前回同様 15% 前後であり、初代肝細胞の培養は十分に可能であったが、凍結肝細胞に関しては解凍後の十分量の肝細胞の dish への接着を認めなかった。

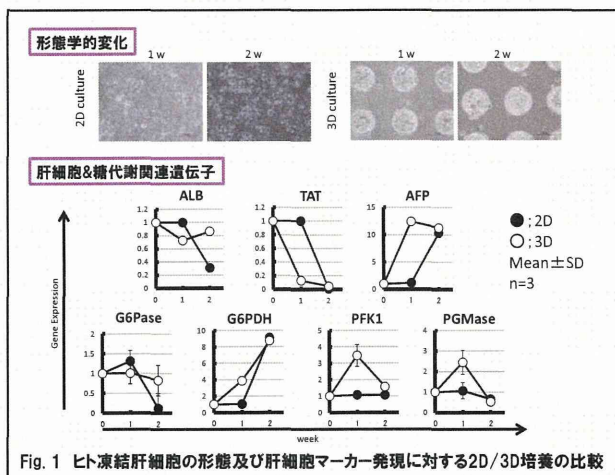
新規培養システム(3次元培養)の構築

(小原)三次元培養基材上で培養するという簡便で汎用性が高い方法によって、肝炎ウイルスを 2D 培養法に比較して 5-10 倍の感染増殖高率を得ることができた。また、TALEN により、HBV が感染して 1 日

目と25日目のヒト肝臓キメラマウス初代肝細胞中のcccDNAを抑制(図)。



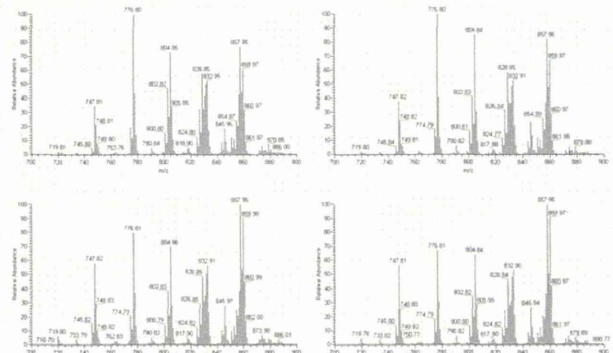
(松永)2D群は播種直後から剥離する細胞も認められたが、3D群では播種後2日でスフェロイドを形成し、その後2週間形態を維持した。遺伝子発現は、培養1週間後において全般的に2D群と比較して3D群で高く(図)、シトクロムP450(CYP)の発現においても3D群で高い発現が認められた。HBV感染1週間後の培地中のHBV-DNA量は、3D群で高い傾向が見られた。



(村上) 上清中のHBV-DNA量が培養期間を通じて 10^4 - 10^6 copies/mlで継続的に検出され、少なくとも1ヶ月間はHBVの培養が可能であった。特に、特定の感染源を用いた3次元培養系ではHBs抗原量の増加を認めた。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

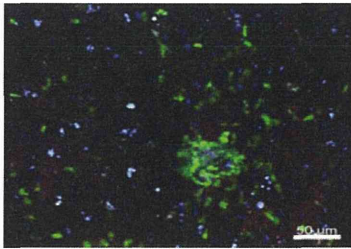
(落谷)細胞内のmicroRNA解析を優先的に進めるため、3D-Gene(東レ)による最新バージョンでのmicroRNAマイクロアレイ解析を実施した。その結果、有効な解析データの取得に成功し、HBV感染12日後に有意に変化する複数のmicroRNAの選定に成功した(HBV感染によって発現上昇したmicroRNAを15種類、発現が減少したmicroRNAを19種類)。(中西)HBV非感染細胞と感染細胞を比較したところ、非感染細胞に対して感染細胞で量が2倍以上増加していた分子数は、凍結ヒト肝細胞とキメラマウス由来ヒト肝細胞でどちらもおよそ100分子程度発見した。一方で、1/2倍以下に減少していた分子数は、凍結ヒト肝細胞でおよそ70分子、キメラマウス由来ヒト肝細胞で140分子程度見つけることができた(図)。



(深澤)HBV産生細胞でコレステロール生合成の上昇が有意に観察された。また、中性脂質代謝については、脂肪酸分子種により異なる影響が見られた。HBV産生・分泌に対する脂質代謝阻害剤等の影響:HBVの持続産生細胞であるHep2.2.15.7細胞では、コレステロール代謝関連薬剤に加え、リポタンパク質リパーゼ阻害剤として知られる分子が有意なHBV産生・分泌阻害傾向を示すことが明らかとなった。

(石川)蛍光HBs粒子は効率よくHuS-E/2に取込まれ、添加1時間後には細胞質内に局在することが確

認された。HBs 粒子は細胞膜との膜融合にはよらず、エンドサイトーシスによって細胞質内に取込まれることが示唆された。(石井)活性化したマクロファージ・好中球を蛍光標識したリポーターマウス(LysM-EGFP など)を用いることで、肝表面に炎症を惹起した際に、免疫・炎症細胞が局所的に集積し granuloma 様の構造物を形成していく様子を *in vivo* で可視化することに成功した(図)。



(高岡)HBV 感染により IFN- λ 1(IL-29)の mRNA の発現レベルの上昇を認めた。RIG-I シグナルが入らない RIG-I 遺伝子(T55I)に変異をもつ Huh7.5 細胞あるいは RIG-I に対する siRNA を用いたノックダウンの系で検討したところ、IFN- λ 1 は発現誘導されなことが示された。さらに、HBV 由来の mRNA に対する siRNA により、HBV 導入による IFN- λ 1 の発現誘導を引き起こさなくなった。以上の結果より HBV 感染において、ウイルス由来の RNA を介し RIG-I 依存的に IFN- λ 1 の発現誘導を導くことが示唆された。

HBV 感染感受性環境の構築

(渡士)親株に比較して HepG2.2.15.7 細胞は HBs 放出が高く、Hep38.7-Tet 細胞は HBV DNA および cccDNA 発現が上昇。また両者は核酸アナログに対する感受性が親株よりも高かった。このようにこれらの細胞株は抗 HBV 剤探索に有用なツールになり得る。実際に小規模な化合物スクリーニングを行ったところ、抗 HBV 作用を有すると考えられる低分子化合物が同定できた。

(土方)HuS-E/2 細胞では、NTCP の mRNA 発現量

も低レベルであったが、肝幹細胞様 HMY1 細胞においては mRNA の発現が誘導された。それぞれの細胞について HBV 感染に至適な培養条件の検討を開始した。(池田)HuH-7 および Li23 細胞株以外の細胞株では miR122 の発現は低レベルであった。代表的な IL28B SNP である rs8099917 と rs12979860 の遺伝子型は検討した肝細胞株で一致していたが、HepG2 細胞株では rs8099917 が IFN 応答型(T/T)、rs12979860 では IFN 抵抗型(C/T)となり乖離した。HBV 受容体候補の NTCP の肝細胞株における発現量は、陽性コントロールであるヒト肝臓に比べて HuH-6 が約 100 分の 1 の発現、他の肝細胞株では 10000 分の 1 以下であった。(坂本)HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍長 HBV プラスミドを構築し、Huh7 細胞に遺伝子導入したところ、HBX 野生株に比べ増殖能が著明に低下。全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換した X 蛋白発現系を構築し、培養細胞での発現を確認した。

D. 考察

できるだけ早期に HBV 持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B 型肝炎創薬実用化研究の推進を目指すために、4 つの大きな枠組みで研究班をスタートさせた。**1)最適なヒト肝細胞の選択:**今年度、キメラマウス由来のヒト肝細胞(石田)、ヒト胎児肝細胞、小児由来の正常肝細胞(調)、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞、インテグレーション・フリーヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞(水口)、不死化した各種肝細胞(土方・池田)における HBV 感染・複製効率の検討を開始した。来年度以降は、最適な細胞を選択し、**HBV 感染培養ヒト肝細胞における HBV ライフサイクルを解析する。**さらに、肝障害免疫不全マウスへの移植を行い、効率的な HBV 感染動物モデルを構築するとともに、キメラマ

ウスの肝細胞を灌流して、日本人由来の初代肝細胞を大量に作成する。**2)新規培養システム(3次元培養)の構築**:小原らは、Cell-able plate を用いた肝細胞 3 次元培養によりスフェロイド形成することで、肝細胞マーカー発現が長期間維持され、平面培養に比較して 5-10 倍効率よく HBV を 60 日以上にわたり感染・増殖させることが可能となった。また、効率的に感染・複製可能な感染源を同定しているが、今後は HBV 再感染モデルの構築を目指して、以下の検討を継続する。**3)ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明**:キメラマウス由来ヒト肝細胞・培養上清及び凍結ヒト肝細胞・培養上清(HBV 感染・非感染)を用いて、microRNA 解析(落谷)及びリピドミクス解析(中西)を開始した。HBV の感染及び複製によって発現上昇した microRNA を 15 種類、発現が減少した microRNA を 19 種類選定し、それらの機能解析の準備に取りかかっている。さらに、HBV 感染・複製に関連する複数の脂質分子も同定したので、今後は脂質代謝含めて 3 次元培養系を用いて検証する。

石川らが今回用いた HBs 粒子蛍光ラベル法は、ウイルス粒子を用いた場合にも感染性に影響することなく、高感度にウイルスの細胞内局在を検出することが可能であった。今後は、実験系をさらに発展させ、最近同定された NTCP などのレセプターを含めた HBV の細胞内侵入機構、複製機構など、HBV の生活環についての解析を進める予定である。さらに、HBV 粒子の蛍光ラベル法と生体イメージング技術を組み合わせ、HBV の生体内での動態、それにより惹起される免疫応答についての解析を行う。特に、石井らが有している多様な蛍光リポーターマウスを用いることで、HBV 感染細胞に対する免疫応答をイメージング解析することができる。これらの解析により、HBV 感染様式や抗ウイルス免疫を実体的に明ら

かにすることができ、これらの作用点を標的とする新しい創薬につながると期待される。また、高岡らの検討で HBV 感染において、RIG-I がウイルス由来の RNA を認識し、自然免疫応答を引き起こしていることが示唆された。IFN シグナル以外の自然免疫シグナルの HBV 感染制御への関与についても解析を行うことで、HBV 感染制御に重要な自然免疫認識機構およびシグナル経路を同定する。一方で、免疫回避の解析や樹状細胞などの免疫担当細胞を含めた形で、HBV 感染における自然免疫活性化機構の解析を進め、自然免疫による HBV 感染制御機構を包括的に解明することを目指す。**4)HBV 感染感受性環境の構築**:渡士らは、HBV 複製を効率的に行う細胞株(クローン株)を樹立した(HepG2.2.15.7 及び HepAD38.7-Tet 細胞)。親株より cccDNA 量が約 3-10 倍に上昇したが、異なる核酸アナログ感受性が観察された。これは薬剤感受性に重要なポリメラーゼの発現量や翻訳後修飾、あるいはその機能を制御する HSP90 など宿主因子の発現や活性が異なるためである可能性が考えられた。土方は、市販の凍結ヒト肝細胞からヒト肝幹細胞様の細胞をクローン化することに成功し、効率良く HBV 感染が可能な細胞を得るために複数の細胞株を構築。分化誘導した HMY1 細胞では高い 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。池田らは、13 種類のヒト肝細胞株に対して肝臓特異的宿主因子の検討を行った結果、HBV 受容体である NTCP はヒト肝臓では発現していたのに対して、検討した肝細胞株では発現が認められなかった。このことが HBV の感染細胞モデルの開発を困難にしている一因であることが示唆された。今後、各肝細胞株に NTCP を強制発現させて HBV 感染効率の検討を行う。また、坂本は、HBX 蛋白の機能ドメインの探索と化合物ライブ

ラリーを用いて、HBX 標的化合物スクリーニング系による阻害活性物質探索を行う予定である。

E. 結論

1) 採取した初代肝細胞あるいはヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を共同研究施設へ提供する体制を確立した。キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞は、25°C 付近での数日間の輸送に十分耐えうる可能性が有ることを示しており、幅広い HBV 感染の基礎研究への応用が期待される。

2) 今回の結果から肝機能維持のための長期培養系には Cell-able plate による 3 次元培養が良いことが示された。一方で Cell-able plate による 3 次元培養のみでは HBV 持続感染(再感染)は不十分であり、さらに感染効率の良い感染源を同定し、HBV 持続感染を制御する microRNAs 補充・抑制及び肝細胞への脂質代謝改変導入することで、HBV 持続感染・増殖がより優れた培養細胞系の構築を目指す。

3) HBV 粒子の蛍光ラベル法により HBV の細胞内侵入機構の解析が可能となった。HBV はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが確認された。また、2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内の免疫細胞の動態、肝細胞傷害を生きた個体内で可視化することに成功した。

4) HBV 感染により IFN- λ 1(IL-29)の mRNA 発現レベルの上昇を認めた。そして、RIG-I がウイルス由来の RNA を認識し、RIG-I を介して自然免疫応答を引き起こしていることが示唆された。

5) HBV 複製を誘導できる新たな細胞クローンを樹立した。このうち HepG2.2.15.7 細胞は高い HBs タンパク質放出を示したため、HBs 動態、代謝研究に有用であると考えられる。一方で Hep38.7-Tet 細胞は親株よりも HBV DNA および cccDNA 発現が高く、また核酸アナログに対して高感受性であったため、抗

HBV 剤スクリーニングに有用であり、大規模な抗 HBV 剤の探索に有用であると期待される。

6) 各種細胞株において、NTCP の強制発現などにより、HBV 感染増殖に至適な培養条件を見出す事が可能と思われた。

7) 現在の B 型肝炎治療を補完し、ウイルスの完全排除を達成する新規クラスの抗ウイルス薬物治療法の創出を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, **Tanaka Y**, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T. Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. *J Gastroenterol.* 2012;47(12):1323-35.
2. Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, **Tanaka Y**, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(2):503-6.
3. Sakamoto T, **Tanaka Y**, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama N, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Fuminaka S, Mizokami M. Mechanism of

the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. **J Viral Hepat.** 2013 in press.

4. 渡邊綱正, 菅内文中, 楠本茂, 新海登, 飯尾悦子, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 宮木知克, 野尻俊輔, **田中靖人**. 多剤耐性変異を認めた悪性リンパ腫合併 B 型慢性肝炎に対しテノフォビルが著効した一例. **肝臓**. 2012;53(1):35-41
5. 新海登, **田中靖人**, 杉山真也, 溝上雅史. 【B 型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性】核酸アナログ耐性変異パターン解析とその対策. **消化器内科**. 2012;54(5):582-585.

2. 学会発表

1. Sugiyama M, **Tanaka Y**, Nakanishi M, Mizokami M. The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford.
2. Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, **Tanaka Y**. Immune restoration Hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford.
3. Iio E, Watanabe T, **Tanaka Y**, Matsuura K, Shinkai N, Nojiri S, Joh T. Characteristics of anti-HBs titers by gender and age in HBV-resolved patients. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 9-13, 2012. Boston.
4. Kondo Y, Kimura O, Iwata T, Morosawa T, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Shimosegawa T, **Tanaka Y**. HBV-related hepatocellular carcinoma could express CX3CL1 and affect the migration of NKG2D^{low}CX3CR1⁺NK cells. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 9-13, 2012. Boston.
5. 渡邊綱正, 横幕能行, 杉浦互, **田中靖人**. 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. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日~11 日. 神戸.
6. 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**. 核酸アナログを投与した B 型肝炎患者における interferon-inducible protein-10 値の動態. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日~11 日. 神戸.
7. 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**. B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日~11 日. 神戸.
8. 杉山真也, **田中靖人**, 中西真, 溝上雅史. HBV 遺伝子型 D1 型に特異的なコアプロモーター変異 (G1757A/G1764T/C1766G) の機能解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 24 年 11 月 13 日~15 日. 大阪.
9. 渡邊綱正, 横幕能行, 今村淳治, 杉浦互, **田中靖人**. HIV 合併 HBV 感染例に対するペグインタ

ーフェロン治療. 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.

10. 渡邊綱正, 杉浦互, 田中靖人. HIV 治療に伴
うB型肝炎免疫再構築症候群の検討. 第39回
日本肝臓学会東部会. 平成 24 年 12 月 6 日～
7 日. 東京.

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

目的：HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系を開発し、B型肝炎創薬実用化研究を推進する

HBV持続培養系開発

HBVライフサイクル解明

薬剤スクリーニング

24年度研究成果

1) 最適なヒト肝細胞の選択

- ・ ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を移植したキメラマウスの作製(水口)
- ・ ヒト肝細胞キメラマウスより分離したヒト肝細胞を用いたHBV感染モデルの評価(石田)。HBV感染の適した培養条件の検討(田中)。
- ・ 小児肝良性腫瘍に対する肝切除で得られる非腫瘍部正常肝細胞の活用(調)

2) 新規培養系開発

- ・ 肝細胞長期培養のためのスフェロイド形成を用いた3次元培養法の確立及び機能解析(小原、松永)。TALENによるcccDNA抑制(小原)。
- ・ キメラマウス肝細胞による3次元培養系において、HBV感染患者血清を感染。効率的に感染・複製可能な感染源を同定した(村上)。

評価モデル ① HBV持続感染培養系 ② HBV感染キメラマウス

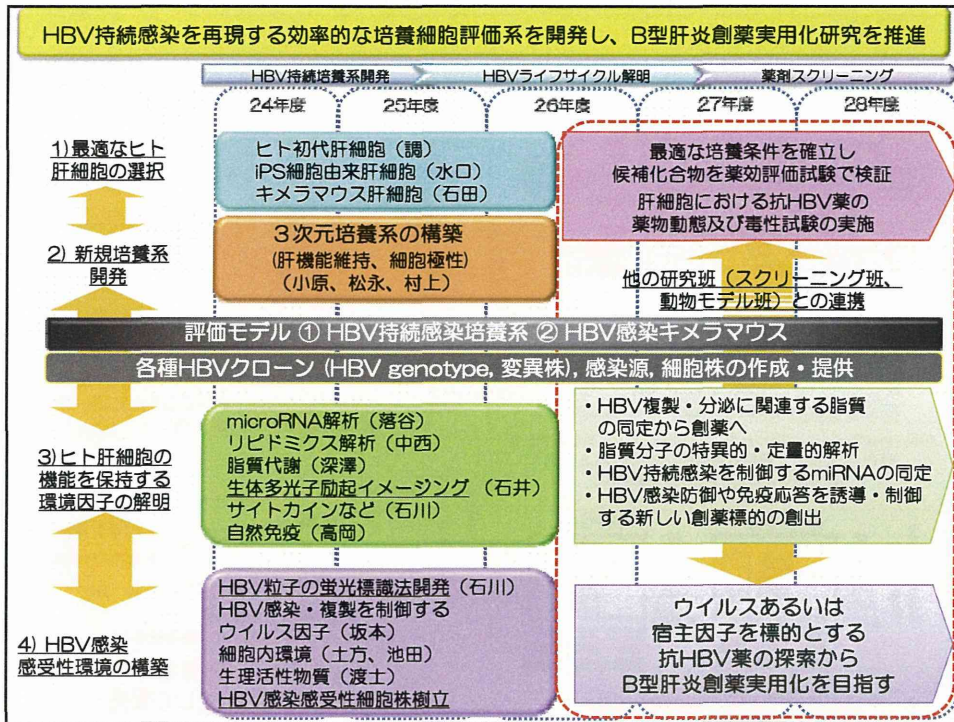
各種HBVクローン (HBV genotype, 変異株), 感染源, 細胞株の作成・提供

3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

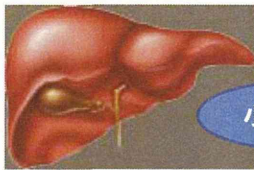
- ・ キメラマウス由来ヒト肝細胞・培養上清(HBV感染・非感染)、凍結ヒト肝細胞・培養上清(HBV感染・非感染)⇒microRNA(落谷), リピドミクス解析(中西)
- ・ HBV産生による宿主細胞における脂質代謝変動の解析(深澤)
- ・ 2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内の免疫細胞の動態血流、肝細胞傷害を生きたマウス個体内で可視化することに成功(石井)
- ・ HBV感染において、ウイルス由来のRNAを介しRIG-I依存的にIFN-λ1の発現誘導(高岡)。

4) HBV感染感受性環境の構築

- ・ HBV粒子の可視化技術(蛍光ラベル)を用いたHBV細胞内侵入機構の解析(石川)。エンドサイトーシスによって細胞質内へ取り込まれる。
- ・ HBV複製を効率的に行う細胞株を樹立(HepG2.2.15.7, Hep38.7-Tet細胞)(渡士)。抗HBV作用を有すると考えられる低分子化合物が同定。
- ・ ヒト肝幹細胞様の細胞をクローン化。より効率良くHBV感染が可能な細胞株を樹立(土方)。HBV受容体候補であるNTCP発現レベル
- ・ 13種類のヒト肝細胞株に対して肝臓特異的宿主因子の検討(池田)
- ・ 全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換したX蛋白発現系を構築・発現(坂本)



1) 最適なヒト肝細胞の選択



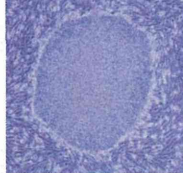
小児肝臓

ヒト初代肝細胞 (調)
iPS細胞由来肝細胞 (水口)
キメラマウス肝細胞 (石田)
肝細胞株 (土方、池田)

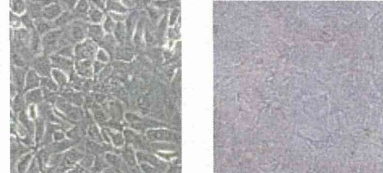
キメラマウス肝細胞



ヒトiPS細胞



独自に樹立したヒト肝由来細胞株

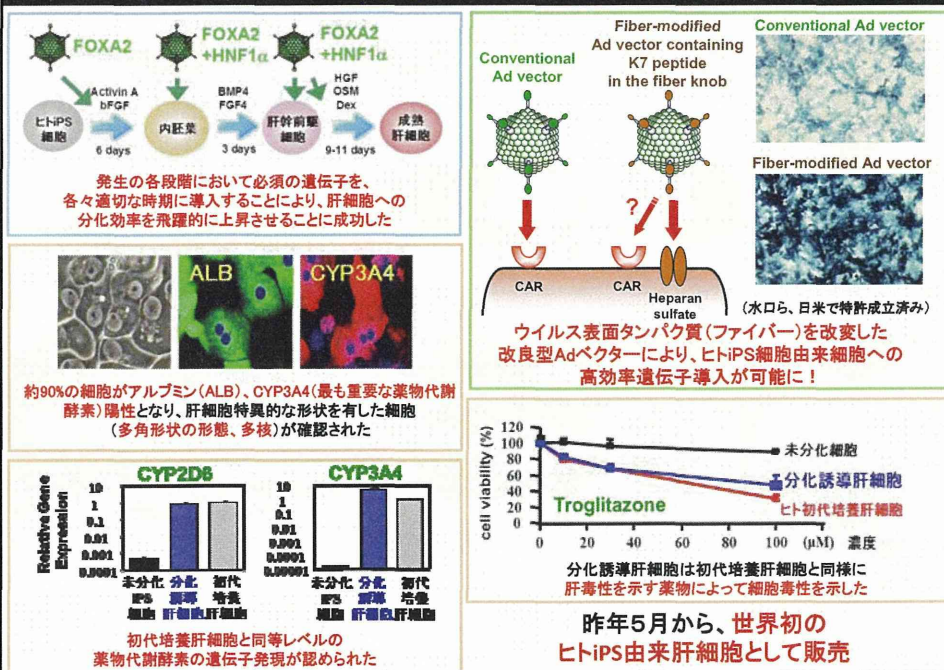


ヒト不死化肝細胞 (HuS-F細胞)
Aly, H.H. et al. J.Hepato1.46.26-36. (2007)
ヒト肝幹細胞分化誘導細胞
PCT/JP2012/057468

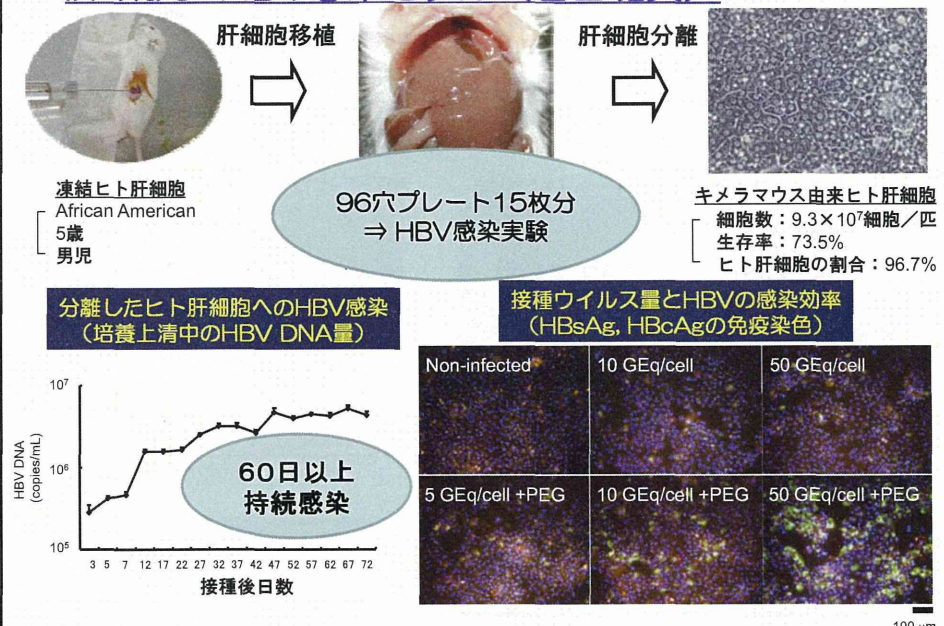
	IL28B SNP	miR-122発現
ヒト肝癌細胞株		
HuH-7	IFN抵抗型 (T/G)	高い
Li23	IFN反応型 (T/T)	高い
ヒト不死化肝細胞株		
NKNT3	IFN抵抗型 (T/G)	低い
PH5CH8	IFN反応型 (T/T)	低い

HBV感染感受性の検討

ヒトiPS由来分化誘導肝細胞の特徴 (水口班員)



ヒト肝細胞キメラマウス由来ヒト肝細胞を用いた *in vitro* HBV感染モデル (石田班員)



HBV持続感染を制御するmicroRNA及び脂質の同定



1. 初代肝細胞 vs. キメラマウス肝臓 vs. 分離キメラマウス肝細胞 (in vitro)
2. HBV感染に伴うmiRNA及び脂質の変化：持続感染に必須因子の同定

microRNA解析 (落谷班員)

リピドミクス解析 (中西班員)

HBV関連のmicroRNA 発現解析を3D-Geneアレイ法により実施

変化・変動する脂質分子の同定→HBV感染制御→創薬標的候補の検証

3D-Gene®
miRNAチップ

遺伝子発現解析

(創薬：生理活性脂質分子)

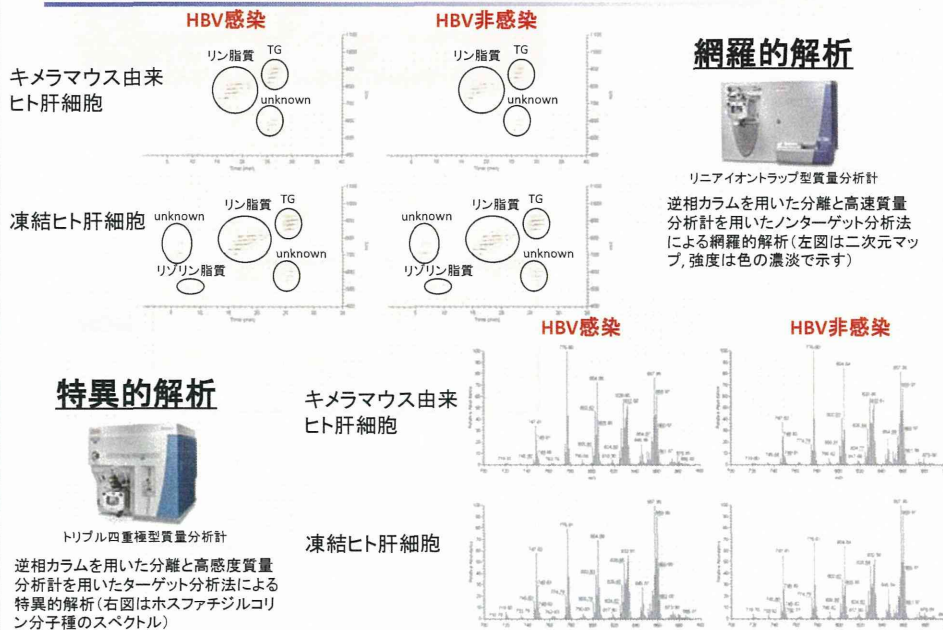
包括的リピドミクス解析 焦点化リピドミクス解析

糖鎖解析

リニアイオントラップ質量分析計

トリプル四重極質量分析計

ヒト肝細胞由来脂質の網羅的・特異的解析

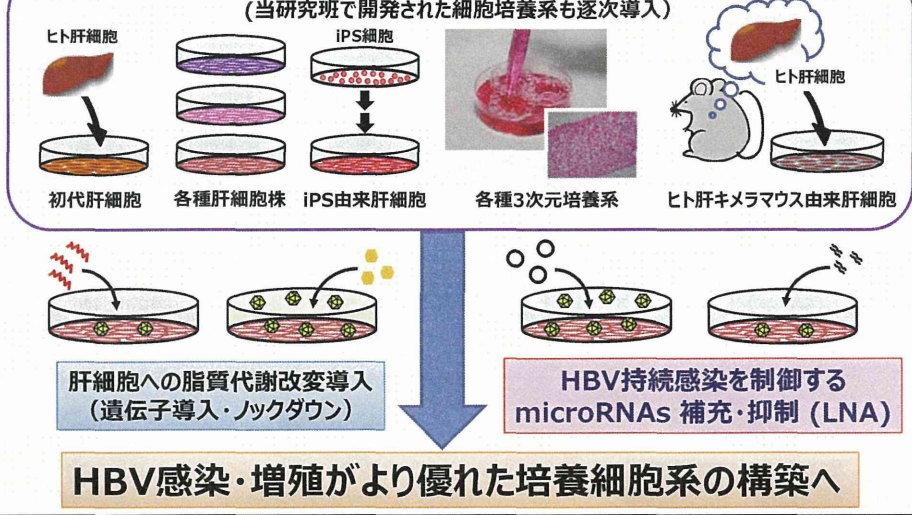


HBV持続感染における脂質・microRNAの役割

脂質代謝変動解析・リポミクス解析・microRNA解析等の結果を総合的に利用

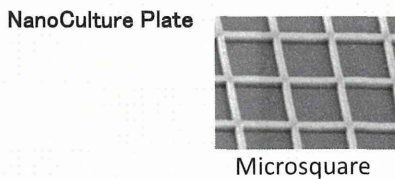
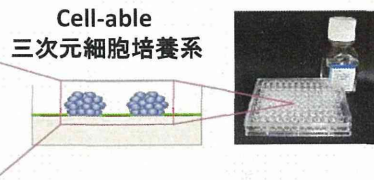
各種HBVウイルス産生培養細胞系

(当研究班で開発された細胞培養系も逐次導入)



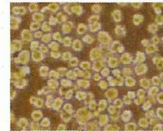
3) 新規培養系開発

スフェロイドプレート



3次元培養系の構築
(肝機能維持、細胞極性)
(小原、松永、村上)

TestLiver
(中空系)

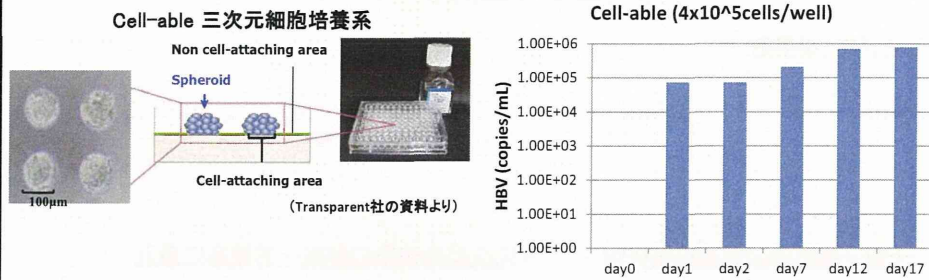


細胞極性の維持
(電顕、トランスポーター等局在性)
肝機能の維持
(薬物代謝能、アルブミン分泌能等)

中空系断面



肝機能維持に最適な3次元培養法の構築 ～HBV持続感染培養系～



HBV感染大量スクリーニング系の構築へ向けて

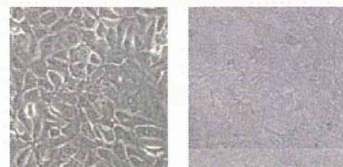
1. 初代培養肝細胞のHBV感染効率の上昇
レンチウイルス又はMEND (Multifunctional Envelope-type Nano Device) による遺伝子・shRNA導入
2. 培地中に放出されるHBVの再感染性の検討
ヒト肝臓キメラマウスへの感染実験、HBV放出量が増加した場合は初代肝細胞への再感染実験
3. キメラマウスのヒト肝細胞を取り出して遺伝子発現解析
マウスへの導入前のヒト肝細胞と比較して、HBV感染に関する遺伝子を同定

4) HBV感染感受性環境の構築 (ウイルス・宿主因子)

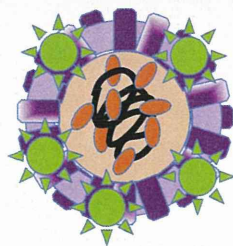
- HBV粒子の蛍光標識法開発 (石川、湯川、田中)
- 生体イメージング (石井)
- HBV感染・複製を制御するウイルス因子 (坂本)
- HBV感染感受性 (土方、池田)
- 薬剤スクリーニング系構築 (渡士、田中)

ウイルスあるいは宿主因子を標的とする抗HBV薬の探索からB型肝炎創薬実用化を目指す

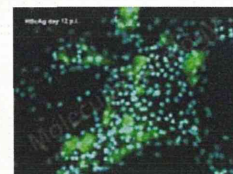
独自に樹立したヒト肝由来細胞株



蛍光発色HBV粒子の作成

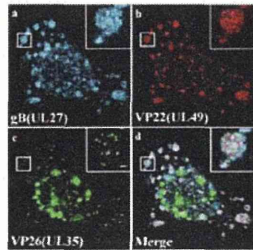


HBV-core expression in HBV-infected **HepaRG cells**

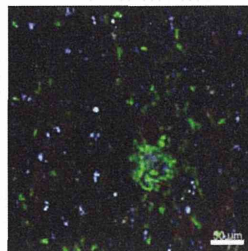


HBVのin vitro/in vivo動態・抗ウイルス免疫の可視化

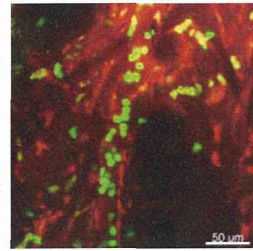
<HBV粒子の蛍光ラベリング>



Vero細胞におけるHPV可視化
(Sugimoto et al, Journal of virology, 2008)



肝臓の傷害部位に集積するマクロファージ



感染部位(結合組織)で急速に活性化する好中球

研究概要: HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系を開発し、B型肝炎創薬実用化研究を推進する

TALENによるHBV感染防御
や持続感染の制御

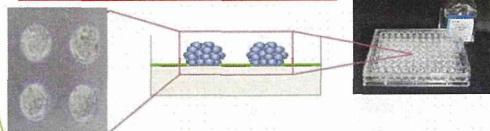
HBV持続感染に関連する
脂質の同定から創薬へ
(生理活性脂質分子の同定)

HBV持続感染を制御する
生理活性物質や**microRNA**
の同定からHBV感染阻止
の研究開発

最適な培養条件を確立し、**候補**
化合物を薬効評価試験で検証

肝細胞における**抗HBV薬の**
薬物動態及び毒性試験の実施

HBV持続感染系の確立



他の研究班(スクリーニング班
動物モデル班)との連携

ウイルスあるいは
宿主因子を標的とする
抗HBV薬の探索から
B型肝炎創薬実用化
を目指す