

量した。

HBV 完全閉鎖 2 本差 DNA(cccDNA)の切断に TALEffector Nucleases (TALEN®)を用いることにし、その配列を構築した。TALEN 発現プラスミドを 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にトランスフェクションして HBV cccDNA の減衰について定量解析を行った。cccDNA については RTD-PCR 法により定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

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。

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 に顕著な減少が認められた。

### D. 考察

三次元培養法により効率よく肝炎ウイルスを増殖することができる。さらに、この肝炎ウイルスの感染・増殖方法は、細胞接着領域の面積が小さいものを用いることができる。

また、構築した HBV TALEN には cccDNA の排除活性があることを明らかにした。

### E. 結論

我々が用いた 3D 培養法は細胞接着領域の面積

が小さいものを用いることができ、少量の細胞でも多種の試験を行なうことができる。

また、TELEN 技術を用いて HBV cccDNA の切断・改変による完全排除を試みたところ cccDNA の顕著な減少が認められた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Makoto Saito, **Michinori Kohara**, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol. 84:733-746 (2012).
- 2) Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and **Michinori Kohara**. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. PLoS Pathog. 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).
- 3) Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda1, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshiba and **Michinori Kohara**. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. Biochem Biophys Res Commun. 428(4):494-499 (2012).
- 4) Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko

Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and **Michinori Kohara**. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. PLoS ONE 7(12):e51656 (2012).

5) Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, **Michinori Kohara**. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. J. Med. Virol. (2013) in press.

## 2. 学会発表

1) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., **Kohara M** : Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The International Liver Congress 2012.4.18-22 Barcelona (SPAIN)

2) Tsukiyama-Kohara K., **Kohara M**. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in C cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第 11 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012.9.11-14. 兵庫

3) 小原恭子、佐藤正明、**小原道法** : C型肝炎ウイルスの複製に関する新規宿主因子 BGT-1. 第 7 1 回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21. 札幌

4) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., **Kohara M**.: Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)

5) Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T., Tokunaga Y.,

Tsukiyama-Kohara K., **Kohara M**.: Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the Hepatitis C Virus suppresses viral protein level in mouse liver. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)

## G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者：松永 民秀 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授

研究協力者：佐藤 大介 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 博士後期課程2年

近藤 祐樹 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 博士後期課程2年

分担研究課題：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

研究要旨：本研究では、接着性ヒト成人凍結肝細胞（HAL細胞）とヒト胎児肝細胞（HFL細胞）を用いた。細胞はcollagen plate（二次元培養群、2D群）あるいはCell-able plate（三次元培養群、3D群）に播種した。HAL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。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群で高いことが明らかとなった。また、シトクロムP450（CYP）の発現においても一部例外はあるものの3D群で高い発現が認められた。さらに、誘導剤による誘導能を評価するためにCYP3A4に対してはリファンピシン、CYP1A2に対してはオメプラゾールの影響を検討した。その結果、CYP3A4では2D及び3D群とも顕著な誘導が認められ、絶対値は3D群で高いものの、倍率はほぼ同じであった。一方、CYP1A2のmRNA発現は絶対値ではほぼ同じであったが、倍率は2D群で高いことが明らかになった。B型肝炎ウイルス（HBV）感染1週間後の培地中のHBc-DNA量は、HAL細胞及びHFL細胞とも2D群と3D群で顕著な差は認められなかったが、3D群で高い傾向が認められた。本研究により、HAL細胞の機能は3D培養において高く維持されることが明らかになった。また、HBV感染は3D培養が高かったものの顕著な差としては認められなかったことから、今後さらなる工夫が必要であることが示唆された。

#### A. 研究目的

肝臓は、生体成分や異物などの代謝あるいは胆汁産生など肝臓の主要な機能を担う肝実質細胞（肝細胞）と多種類の肝非実質細胞群から構成されており、その機能維持にはこれら細胞間相互作用が大きな役割を果たすと考えられている。一方、肝細胞を用いた研究においては、培養皿上での二次元培養法が最も一般的に用いられている方法で

あるが、長期間の培養が難しく、多くの指標において培養に伴い顕著に機能が低下するため、生体と比較して肝細胞機能が非常に低いことが問題点として挙げられる。この原因の一端は、二次元的な平面培養と非実質細胞も含めた細胞間相互作用の欠如に起因すると思われる。

B型肝炎ウイルス（HBV）は、これまで培養細胞系での維持感染が不可能であるため、感染メカ

ニズムの解明や創薬研究において大きな障害となっている。その原因として、平面培養に伴う肝細胞機能低下が考えられる。本研究では、*in vitro*における肝組織を再現することを目的として、三次元培養系構築を目指し、それに伴うHBV感染性について従来の二次元培養系と比較し評価を行った。

## B. 研究方法

凍結成人肝細胞 (HAL 細胞) 及びヒト胎児正常肝細胞 (HFL 細胞) は、各々Xeno-Tech 社及びDS Pharma 社より購入した。肝細胞は、Cell-able plate (トランスパレント社) または collagen plate (住友ベークライト社) に播種し、Cell-able plate を三次元培養群 (3D 群)、collagen plate を二次元培養群 (2D 群) とした。なお、Cell-able plate においては、取扱い説明に従いフィーダー細胞として3T3 swiss 細胞 (理研 BRC) を肝細胞播種の前日に播種した。培地は、2、3 日に1回の頻度で交換し、経時的に細胞をサンプリングした。

HBV 感染は、肝細胞播種3日後にHBV 患者血清 (最終濃度  $6 \times 10^{-7}$  vp/mL) を添加後、24 時間培養することで行った。

## C. 研究結果

HAL 細胞は、2D 群において播種直後から剥離する細胞が認められたのに対し、3D 群においては播種後2日でスフェロイドを形成し、その後3週間形態を維持した (Fig. 1)。遺伝子発現は、培養2週目の2D 群で肝細胞マーカーのアルブミン (ALB) や糖代謝関連遺伝子のグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) が顕著に減少し、特に接着性成人肝細胞のALB、チロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) 遺伝子発現は播種前の0.1-1%以下と顕著に低下した。一方、3D 群において TAT

は1週目から顕著に減少したが、ALB、G6Pase、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (PFK1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGMase) においては、発現量に顕著な変動は認められなかった。一方、 $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) やグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) は顕著に増加した。CYP の発現においては CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 及び CYP7A1 において2D 群と比較して3D 群では高かった (Fig. 1)。

誘導剤による誘導能を評価するために CYP3A4 に対してはリファンピシン、CYP1A2 に対してはオメプラゾールの影響を検討した。その結果、CYP3A4 では2D 及び3D 群とも顕著な誘導が認められ、絶対値は3D 群で高いものの、倍率はほぼ同じであった。一方、CYP1A2 においては、倍率は2D 群で高かったが、絶対値ではほぼ同じであった (Fig. 2)。

2D/3D 培養下にある肝細胞にHBVを感染させて、1週間後から経時的に培地中のHBs-DNA量を定量することで感染をモニターした (Fig. 3)。その結果、HBc-DNA量はHAL細胞及びHFL細胞とも2D群と3D群で顕著な差は認められなかったが、3D群で高い感染効率を示す傾向が認められた。しかし、両群とも培養に伴い減少したことから、持続感染するには至らなかった。

## D. 考察

本研究により、3D群は2D群と比較して肝細胞マーカー発現を顕著に維持したことから、HAL細胞の機能は3D培養において高く維持されることが明らかになった。このことは肝細胞微小環境が細胞間の相互作用に影響を与え、肝細胞機能維持に有効であることが示唆された。また、HBV感染においては、3D培養が高かったものの顕著な差としては認められなかったことから、今後さらな

る工夫が必要であることが示唆された。肝臓は主に肝実質細胞にて構成されているが、他にも数多くの肝非実質細胞を組織に含み、それらの細胞間相互作用により機能が維持される。HBV 感染には生体により近い環境あるいは構造が重要であると予想されることから、それらを考慮した培養系の構築が今後の課題である。

### E. 結論

今回の結果から肝機能維持の為の長期培養系には Cell-able plate による三次元培養が良いことが示された。一方で Cell-able plate による三次元培養のみでは HBV 持続感染系を構築することは困難であることが示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

特になし。

#### 2. 学会発表

特になし。

### G. 知的所得権の所得状況

#### 1. 特許取得

特になし。

#### 2. 実用新案登録

特になし。

#### 3. その他

特になし。

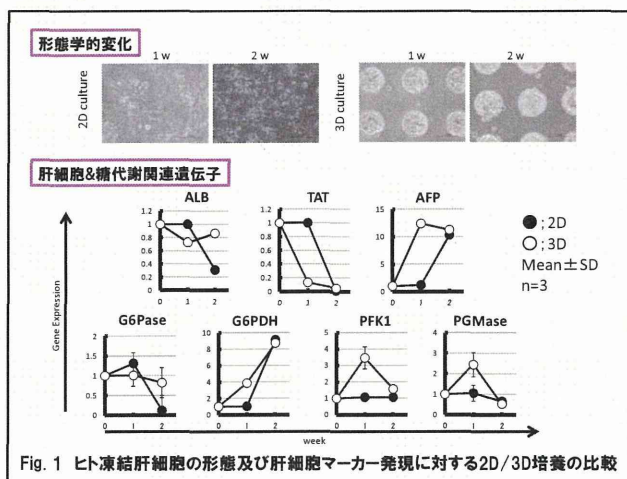


Fig. 1 ヒト凍結肝細胞の形態及び肝細胞マーカー発現に対する2D/3D培養の比較

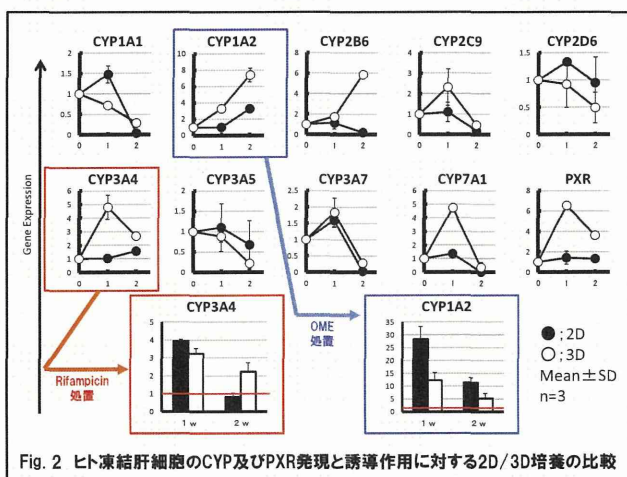


Fig. 2 ヒト凍結肝細胞のCYP及びPXR発現と誘導作用に対する2D/3D培養の比較

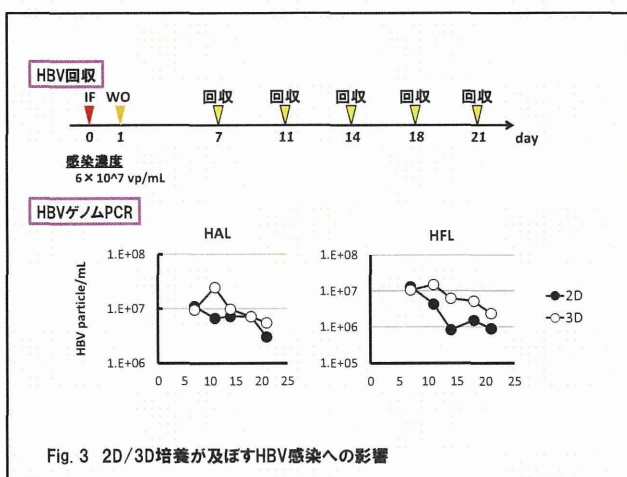


Fig. 3 2D/3D培養が及ぼすHBV感染への影響

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

分担研究者：村上 周子 名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教

分担研究課題：肝炎ウイルス3次元培養系の構築

研究要旨：細胞培養系による新規B型肝炎ウイルス（HBV）評価系の開発を目的として、HBV培養系について検討した。培養には、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用いて、一般的な単層培養系と、スフェロイドと呼ばれる組織様の細胞塊による3次元培養系について、HBVの感染・複製の可能性および感染源による違いを比較検討した。培地に人工的に作出したウイルス粒子や、ウイルス粒子を含むHBV感染患者血清、キメラマウス血清を添加してHBVを感染させた（ $10^4$ - $10^6$  copies/ml）。その結果、培養上清中にHBs抗原の増加を認めた。約1ヶ月の培養期間を通じた上清中のHBV-DNA量は $10^5$ - $10^6$  copies/mlであり、長期培養下で感染の持続を確認した。今後、HBV培養系の実用化に向けた改良を重ねるとともに、この系を用いてHBV各種変異体の感染効率の違いや新規抗ウイルス薬のスクリーニングなどについても検討を行いたい。

## A. 研究目的

本研究の目的はB型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBVの感染複製機構の詳細を明らかにするとともに、新たな治療標的を探索することにある。肝細胞の培養において、一般的な単層での培養系と比較して、3次元培養系はウイルスと細胞の親和性が高いことが知られているが、研究へ応用するためには肝炎ウイルスの感染効率や培養環境などの最適化が不可欠である。今年度は、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用いて単層培養と3次元培養を行い、患者血清からのHBV感染・複製について比較検討した。

## B. 研究方法

1) キメラマウス肝細胞を、type I コラーゲンを

コートした培養プレートによる単層培養系、あるいは特殊な加工を底面に施した培養プレートを用いたスフェロイド形成による3次元培養系で培養した。

2) 感染源として、人工的に作出したHBVウイルス粒子や、ウイルス粒子を含む患者血清、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。培養開始から3日後と14日後、各培養条件下においてHBV感染患者血清を $10^4$ - $10^6$  copies/wellとなるように添加することで感染を成立させ、培養上清中のHBV-DNA、HBs抗原、HBV core 関連抗原を測定し、HBV感染・複製を確認した。

（倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト

肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

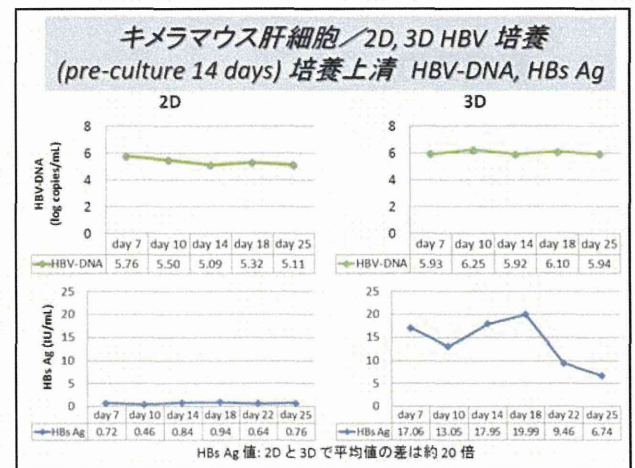
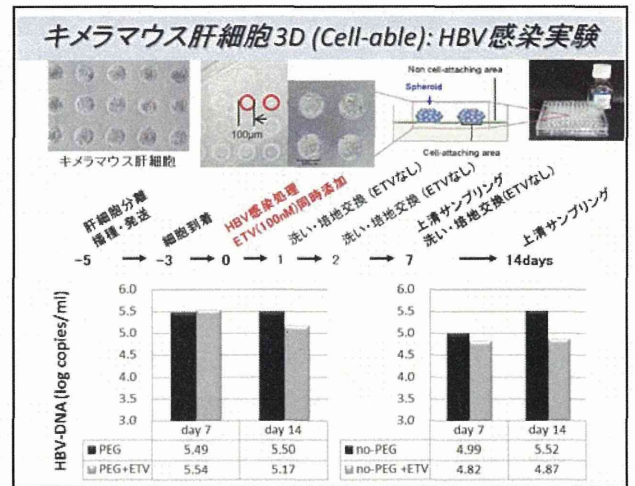
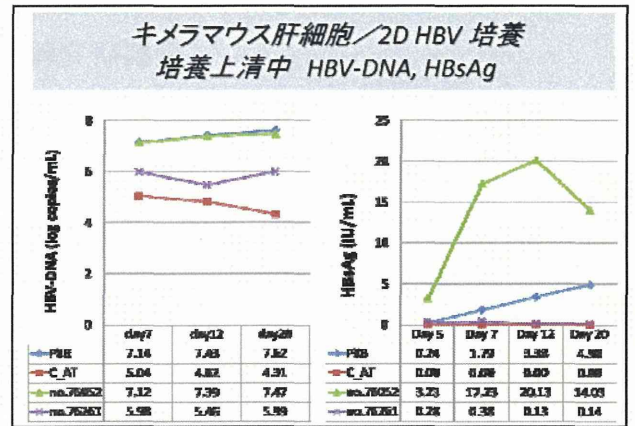
HBV 感染源						
感染源	AH/CH	Genotype	HBV-DNA (log copy/mL)	HBsAg (IU/mL)	HBeAg (C.O.I)	CP/PC
キメラマウス HBV 血清 (PXB)	-	C	9.2	-	-	W/W
C_AT 上清	-	C	9.5	-	-	W/W
患者血清 no. 76052	CH	C	9	35130.93	7863.1	M/W
患者血清 no. 76261	CH	C	8.6	2113.13	4794.1	M/W

### C. 研究結果

1) キメラマウス肝細胞は、特殊加工の培養プレートを用いることによりスフェロイドを形成、3次元化することに成功した。スフェロイド形成は約1ヶ月間持続することを認めた。また、単層培養系も安定しており、1ヶ月間は継続した培養が可能であった。

2) 培養開始から3日後の感染処理において単層、3次元培養系ともに培養上清中にHBV-DNAやHBs抗原、細胞内にHBV core関連抗原が検出された。また、上清中にもHBV core関連抗原の検出を認めた。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の培養が可能であることを確認した。特に、特定の感染源において、HBs抗原量の増加を認めた。さらに、3次元培養系において、感染源と同時に核酸アナログ製剤であるエンテカビル (ETV) を添加したところ、HBV-DNA量の抑制が認められた。

培養開始から14日間のpre-culture後に上記HBs抗原量の増加を認めた同一の感染源で感染処理を行った結果、単層培養系において上清中のHBs抗原量は3次元培養系と比較して低値であった。



### D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による培養は、肝組織より単離した初代培養であるため、特に3次元培養系ではより生体に近い状態での検討が期待できる。今年度の研究で用いたスフェロイド培養系では、約1ヶ月間は細胞塊の形状を維持している。この培養系を用いた長期間での培

養実験により、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式、粒子放出過程などが解析できる。また、患者血清からの感染が可能であり、種々の感染源に関して、キメラマウスを用いることにより *in vivo* と *in vitro* の比較検討も行えるため、検体別の多様な解析が期待できる。現在、HBV 培養上清からの *in vitro* における再感染実験を検討中である。

単層培養系では、3 次元培養系と比較すると培養開始から感染処理までの培養期間により感染効率が低下する恐れはあるものの、HBV-DNA 量が培養期間を通じて安定していた。単層培養は 3 次元環境よりも簡便且つ安価な培養系であるため、感染効率の安定化に向けた改善をはかるべく、培養系の改良を行う。また、より広く活用される評価系の確立を実現するためには、培養細胞株の利用が必要不可欠である。従って、今後は HuS-E/2 細胞などの不死化ヒト正常肝細胞株を用いた HBV 培養条件を改良し（研究班で得られる miRNA や脂質添加、NTCP 強制発現）、効率的な HBV 持続感染モデルの構築を目指す。さらに今回の検討では、3 次元培養系において ETV の HBV-DNA 抑制効果が確認できた。これらの培養系による新規抗ウイルス薬の検体別スクリーニングについても検討したい。

## E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による培養系は、単層、3 次元ともに長期間の培養が可能であり、患者血清からの HBV 感染・複製の可能性が示された。特に 3 次元培養系は *in vitro* の非常に有用な HBV 感染モデルとなることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, **Murakami S**, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. *J Viral. Hepat.*, in press.
- 2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsunami H, **Murakami S**, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\lambda$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.*, 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 3) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, **Murakami S**, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.*, 84(4):587-95, 2012.

### 2. 学会発表

- 1) 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 型慢性肝炎患者における interferoninducible protein-10 値の動態. 第 20 回日本消化器関連学会週間(第 16 回日本肝臓学会大会), 2012, 神戸市.



## 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

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

分担研究者：落谷 孝広 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 分野長

分担研究課題：HBVの細胞内ライフサイクルに及ぼすmiRNA機能の解析

研究要旨：初年度は、班組織内で既に確立しているin vitroおよびin vivo感染系のシステムを用いて、HBV関連のmicroRNA発現解析を実施するところを目標とした。まず、班内の研究者によりキメラマウス由来ヒト肝細胞：2×10<sup>6</sup>個（感染・非感染、各1検体ずつ）、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日目と12日目、10 mL各1検体ずつ）、凍結ヒト肝細胞培養上清（感染・非感染 感染7日目と12日目、10 mL各1検体ずつ）の供与を受け、細胞からはmicroRNA回収、精製を、培養上澄からは、超遠心によるエクソソーム分画の回収と精製を実施した。microRNA、エクソソーム、ともに高純度で精製する事に成功した。まず細胞内のmicroRNAに関しては、3D-GeneによるmicroRNAアレイ解析を実施し、有効な解析データを得る事が出来、初年度の目標を達成した。

### A. 研究目的

Non-coding RNAのかなで、microRNAの遺伝子発現の微調整に果たす役割は大きく、microRNAに起こるゲノム、エピゲノム変化は多くの疾患の原因と密接に関係している。すでにC型肝炎ウイルス(HCV)においてはmicroRNA122がその複製に関与する事実から、miR122のアンタゴニスト(LNA)を用いた臨床応用が始まっているが、HBVに関するmicroRNA制御の情報は安定な感染系等の欠如から極めて少ない。本研究では、主任研究者が確立する肝細胞培養およびそれを用いた感染系をもとに、microRNA発現解析を網羅的に行なう事で、ウイルス感染におけるmicroRNA制御の全貌を明らかにするとともに、HBVの細胞内ライフサイクル諸過程に及ぼす標的microRNAを特定する事を目的とする。初年度は、HBVの複製に

伴って変化する細胞内のmicroRNAの同定を目的に、感染細胞のmicroRNA網羅的解析による基盤データの獲得と解析系の整備を目的とした。

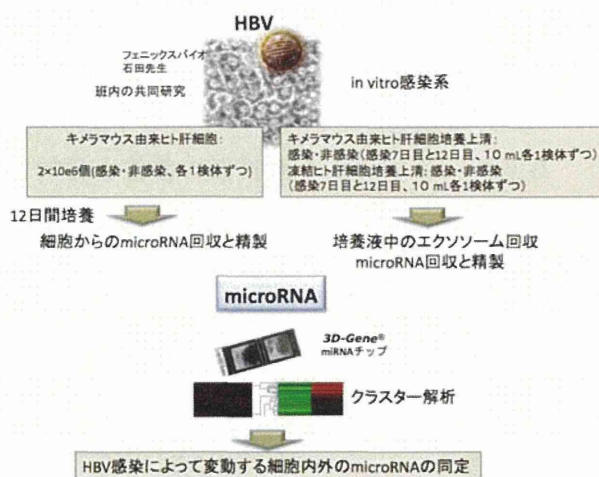


図：研究の概要

## B. 研究方法

主任研究者が中心に既に確立している *in vitro* および *in vivo* 感染系や、HBV 関連遺伝子改変動物のシステムを用いて、HBV 関連の microRNA 発現解析を 3D-Gene アレイ法により実施する。

具体的には、キメラマウス由来ヒト肝細胞： $2 \times 10^6$  個(感染・非感染、各 1 検体ずつ)、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 日目と 12 日目、10 mL 各 1 検体ずつ）、凍結ヒト肝細胞培養上清（感染・非感染 感染 7 日目と 12 日目、10 mL 各 1 検体ずつ）の供与を受け、細胞からは microRNA 回収、精製を、培養上澄からは、超遠心によるエクソソーム分画の回収と精製を実施し、既に分担研究者により解析の最適化を終えている microRNA アレイ解析に供する。



図：研究方法と目的

## C. 研究結果

細胞からは microRNA 回収、精製を、培養上澄からは、超遠心によるエクソソーム分画の回収と精製を実施した。バイオアナライザー（アジレント社）やウエスタン法によるエクソソーム特異的抗原の検出により、microRNA, エクソ

ソーム、ともに高純度で精製出来た事を確認した。初年度は先ず、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 1 2 日後に有意に変化する複数の microRNA の特定に成功した。

## D. 考察

HBV 関連の microRNA 発現解析の解明に向けて、着実に準備段階での成果を上げる事が出来、初年度の目標を達成した。現在、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。具体的には、まず *in silico* でこれらの microRNA の標的予測分子を洗い出し、ウイルスの感染、複製、肝細胞がん、等に関与する可能性を検討する。さらに、microRNA mimic あるいは anti-microRNA を合成し、主任研究者のチームの有する HBV 感染系に導入し、その効果を確認するための準備を開始した。

## E. 結論

初年度の細胞内での microRNA マイクロアレイの解析結果から、HBV の感染と複製に伴って実際に変動する microRNA の実態を把握する事が出来た事は、今後の本研究班の目的達成のために、重要な基盤を構築する事が出来たと言える。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Comprehensive miRNA Expression Analysis in Peripheral Blood Can Diagnose Liver Disease. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N,

Ochiya T, Taguchi YH. PLoS One. 7(10):  
e48366, 2012.

(2) microRNAs act as a fine-tuner of liver  
development, regeneration, and  
carcinogenesis. Katsuda T, Ochiya T.  
Seikagaku. 84(8): 666-674, 2012.

(3) Regenerative cells for transplantation  
in hepatic failure. Ishikawa T, Banas A,  
Teratani T, Iwaguro H, Ochiya T. Cell  
Transplant. 21(2-3): 387-399, 2012.

(4) Potential applications of miRNAs as  
diagnostic and prognostic markers in liver  
cancer. Gailhouste L, Gomez-Santos L,  
Ochiya T. Front Biosci. 2013 Jan  
1;18:199-223.

(5) Cancer-related microRNAs and their role  
as tumor suppressors and oncogenes in  
hepatocellular carcinoma. Gailhouste L,  
Ochiya T. Histol Histopathol. in press

## 2. 学会発表

特に無し

## 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

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

分担研究者：中西 広樹 秋田大学 生体情報研究センター 助教

分担研究課題：検体からの脂質調製とリポドミクス解析・多変量解析

研究要旨：HBVの複製・分泌に関わる脂質分子を同定することを目的とし、まずはHBVウイルス感染・非感染の凍結ヒト肝細胞とキメラマウス由来ヒト肝細胞由来の脂質分子の網羅的解析を行った。具体として、各細胞から抽出した脂質画分をトリプル四重極型とイオントラップ型の異なる特性をもつ2台の液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて網羅的な変動解析を行った。さらに得られた膨大なデータをピーク検出比較ソフト（2DICAL）と脂質同定ソフト（Lipid Search）を用いて解析し、非感染細胞に対し感染細胞で増減している脂質分子の絞り込みを行い、複数の変動している分子を見出した。

### A. 研究目的

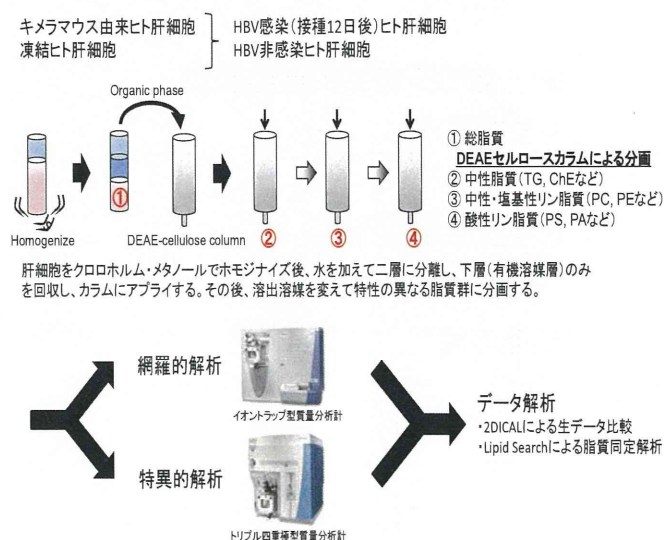
HBV ウイルスに感染する細胞としない細胞の違いを質量分析計を用いたリポドミクス解析により見出し、HBVの複製・分泌に関わる脂質分子を同定することを目的とする。さらに、その特異的な脂質分子が創薬に応用できるかどうかを検証する。

### B. 研究方法

HBV ウイルス感染（接種12日後）・非感染の凍結ヒト肝細胞とキメラマウス由来ヒト肝細胞より脂質を抽出し、トリプル四重極型とイオントラップ型の異なる特性をもつ2台の液体クロマトグラフィー質量分析計で行った。具体的には、ダイナミックレンジの広い脂質成分をより特異的かつ網羅的に解析するために、陰イオン交換カラムを用いて総脂質を回収後、さらに中性脂質群、塩基性脂質群、酸性脂質群に分離した。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、イオント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（図1）。

図1 脂質抽出から分析までのフローチャート



## C. 研究結果

分析に必要な細胞数の検討、ならびに分析系の最適化を行うことができた。質量分析計にて得た膨大なデータをピーク検出比較ソフト（2DICAL）と脂質同定ソフト（Lipid Search）を用いて解析を行った。結果として 10 万にも及ぶピークを検出し、そこから 600 近い脂質分子を同定・定量することができた。HBV ウイルス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。

## D. 考察

量比に差があった脂質分子を多数見つけることはできたが、その中で凍結ヒト肝細胞とキメラマウス由来ヒト肝細胞で共通性を見出すことはできなかった。解析データの再現性をとるためには検体数を増やしての解析が必須である。

## E. 結論

検体からの脂質調製と、その分析・解析についての詳細なプロトコールの検討は終了した。さらに、すでに HBV ウイルス非感染細胞と感染細胞で変動している脂質分子も一部見つけているが、再現性・統計処理を行うために次年度以降は検体数を増やして解析する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

特にございませ

### 2. 学会発表

特にございませ

## G. 知的所得権の所得状況

### 1. 特許取得

特にございませ

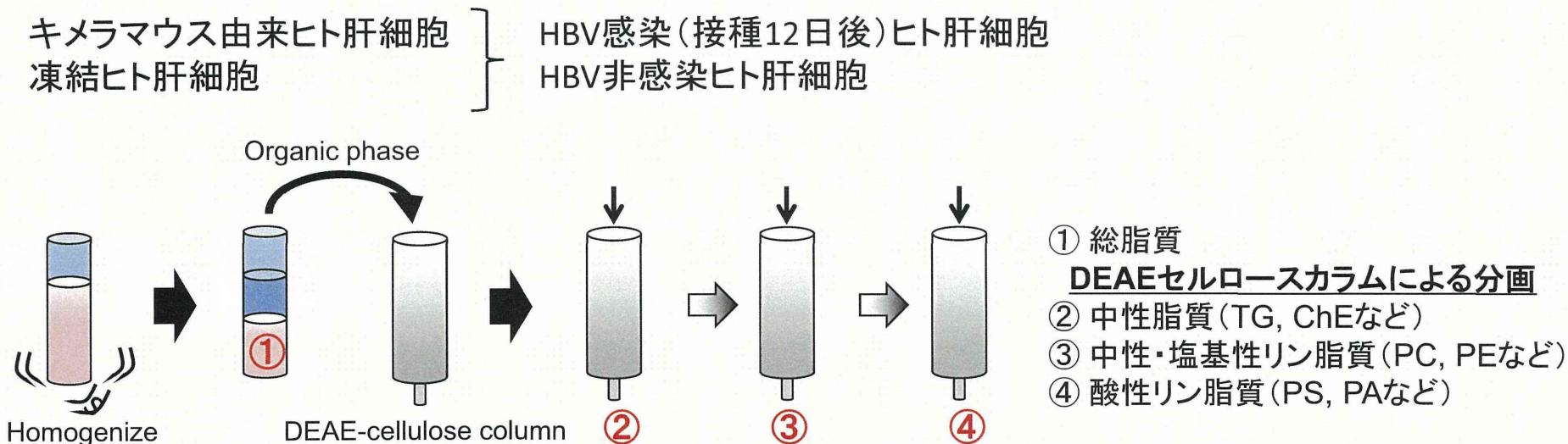
### 2. 実用新案登録

特にございませ

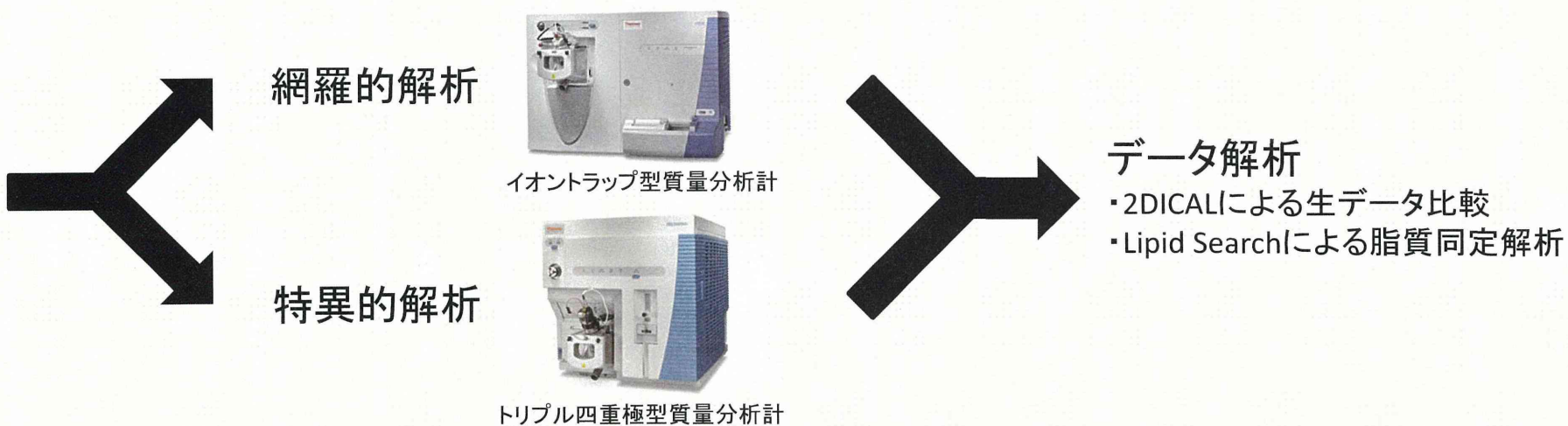
### 3. その他

特にございませ

# 図1 脂質抽出から分析までのフローチャート



肝細胞をクロロホルム・メタノールでホモジナイズ後、水を加えて二層に分離し、下層(有機溶媒層)のみを回収し、カラムにアプライする。その後、溶出溶媒を変えて特性の異なる脂質群に分画する。



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

分担研究者：深澤 征義 国立感染症研究所 細胞化学部 室長

分担研究課題：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

研究要旨：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。その結果、変動は大きくはないものの、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、リン脂質合成・代謝回転についてもHBV産生細胞で少ないながらも有意な亢進が認められた。一方、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、今後さらに詳細に解析していきたい。一方、HBVの持続産生細胞であるHep2.2.15.7細胞を用い、各種脂質代謝阻害剤等のHBV産生・分泌に対する影響についても広範に検討した。その結果、すでに報告のある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。

## A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染による慢性肝炎、それに伴う肝硬変・肝がん発症は大きな健康上の問題となっている。既存の薬剤療法では完全なウイルスの排除は難しい場合が多く、新たな薬剤の実用化が強く求められている。効率的な抗HBV創薬研究を行うためには、HBV持続感染を再現する簡便でウイルス産生能の高い培養細胞評価系が必須であるが、未だ確立されているとは言えない状況である。そこで当該培養細胞評価系の確立を最終目的として、我々は特に脂質代謝に着目した観点から研究に取り組むこととした。

具体的には、本年度は大きく2つの方法論を用い、本課題に取り組むことを考えた。1つは、遺伝子工学的にHBVを産生させる条件における宿主脂質代謝変動を調べることである。もう一つが、

HBV持続産生細胞を用いHBV産生・分泌下における宿主脂質代謝阻害剤等の薬剤の影響を検討することである。

## B. 研究方法

### HBV産生による宿主細胞における脂質代謝変動の解析

HBVの産生系は、Sugiyamaらの方法（Hepatology, 44: 915(2006)）に従い、1.24倍長のHBV全ゲノムを含むpUCプラスミドをヒト肝培養細胞であるHuh7系細胞にトランスフェクションにより導入することで行った。HBVの遺伝子型はC型のものを用いた。

この系においてHBVが産生されていることの確認は、いくつかの方法で行った。HBVプラスミドをトランスフェクション後に細胞破碎液を調



製し、抗 HBV pre-S1 抗体によるイムノブロット解析により、S 抗原の発現を確認した。また、HBV プラスミドをトランスフェクション後の細胞を HBc 抗原に対する抗体を用い免疫染色を行い、顕微鏡下で核周辺へのドット構造染色により確認した。さらに、細胞培養上清を回収し、DNaseI 処理後に核酸画分を精製し、Taqman 法による定量 PCR により HBV-DNA を測定することで、HBV の分泌を確認した。定量 PCR 法の具体的な方法は、Tatematsu らの方法に従った (J. Med. Virol., 83:587(2011))。加えて、HBV プラスミドをトランスフェクションした細胞の細胞培養上清を回収し、これを未感染の肝培養細胞系に接種した後、細胞内 DNA 画分を精製し、HBV-DNA を Taqman 法による定量 PCR を用い測定することで、分泌された HBV の感染能を確認した (非常に弱いながらもある条件で感染が確認された)。

代謝標識法による脂質代謝系の解析は以下のように行った。φ60mm-dish に Huh7 系細胞を播種し、HBV ゲノム全長プラスミドあるいは HBV ゲノム非含有プラスミドをトランスフェクションした。2 日後より、放射性標識脂質 (前駆体) を培地に添加し、各時間培養後、細胞画分から Bligh & Dyer 法により脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィー法により各脂質を分離後、イメージアナライザー (Typhoon FLA-7000) により、各脂質の定量解析を行った。

#### HBV 産生・分泌に対する脂質代謝阻害剤等の影響の解析

HBV 持続感染細胞として Hep2. 2. 15. 7 細胞を用いた。本細胞は、HBV ゲノム 2 倍長を導入した HepG2 細胞より分離された HBV 持続産生株である Hep2. 2. 15 細胞から渡士らによりクローニングされた細胞亜株である。HBV 分泌能が非常に高いことが特徴である。実際に、細胞培養上清中の HBV-DNA 濃度は、 $10^9$  コピー/ml 近くまでにな

ることを我々も確認している。

本細胞をコラーゲンコート 48 穴プレートに播種し、1 週間以上培養を行う (細胞は confluent の状態になっている)。この間 3 日おきに培地交換を行う。各薬剤を含む血清不含培地を調製し、細胞に添加する。2 日間 24 時間ごとに、薬剤入りの培地で培地交換を行いさらに 3 日後に、培養上清及び細胞を回収し、DNA を含む画分を精製し、定量 PCR により含有 HBV-DNA 量を測定した。薬剤による細胞毒性の検討は、XTT アッセイにより行った。

### C. 研究結果

#### HBV 産生による宿主細胞における脂質代謝変動の解析

まず、 $[^3\text{H}]$ 酢酸を代謝標識に用いてコレステロール生合成能を検討した。その結果、差は大きくないものの、再現性よく HBV 産生細胞でコレステロール生合成の亢進が認められた。一方、産生されたコレステロールの有意な量がエステル化されてコレステロールエステルとなるが、 $[^3\text{H}]$ コレステロールを用いた標識実験では、コレステロールエステルの生合成については、HBV 産生細胞で亢進は見られなかった。

次に、リン脂質の生合成について、 $[^3\text{H}]$ 酢酸、 $[^{14}\text{C}]$ 脂肪酸 (オレイン酸、アラキドン酸) を用いて検討した。その結果、こちらも差は大きくないものの、再現性よく HBV 産生細胞で標識されるリン脂質量が多い傾向が見られ、リン脂質の合成・代謝回転の亢進が明らかとなった。各リン脂質についてはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン等を検討したが、特に特定のリン脂質で変動に差が

あることはないようだった。

さらに、中性脂質（トリグリセリド、コレステリルエステル）の生合成について、 $[^{14}\text{C}]$ 脂肪酸（オレイン酸、アラキドン酸）を用いて検討した。その結果、リン脂質生合成とは異なる結果が見られた。1価不飽和脂肪酸であるオレイン酸(18:1)を用いた場合では、中性脂質への標識脂肪酸の取り込みがHBV産生細胞で亢進したのに対して、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(20:4)を用いた場合では、中性脂質への標識脂肪酸の取り込みがHBV産生細胞で低下していた。

#### HBV産生・分泌に対する脂質代謝阻害剤等の影響の解析

脂質代謝阻害剤を中心とした所有する50種類以上の薬剤を用いて、HBV産生・分泌への影響を検討した。条件検討の段階で、血清を含まない培地を用いることでより薬剤の効果が大きくなることが見られたので、(脂質代謝阻害剤の検討ではよく行われることであるが)無血清培養下で解析を行った。またHBV持続感染株を用いた検討であるため、有意な阻害の検出には、複数回(3回)の薬剤投与と、比較的長期(5日間)の処理時間がよいことも見出し、そのような条件で行った。また、ポジティブコントロールとして、インターフェロン $\alpha$ 、 $\gamma$ 、既存の核酸系阻害剤であるLamivudine, Telbivudine, 2', 3'-dideoxyguanosine、やAdefovirを用いて、当該測定系でHBV産生阻害が見られることを確認した。各種薬剤の検討の結果、これまでに報告があったように、コレステロールを細胞から引き抜く活性を有するMethyl- $\beta$  cyclodextrinでHBV産生阻害傾向が見られた。それ以外では、リポタンパク質リパーゼの阻害剤と言われるhexadimethrine bromideで有意なHBV産生・分泌

阻害が認められた(IC50: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。また、XTTアッセイによる細胞毒性の検討も行ったが、hexadimethrine bromide 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも全く細胞毒性は認められなかった。また、現段階では詳細を明らかにできないが、ある薬剤ではHBV分泌は有意に阻害するが、細胞内のHBV産生は阻害しない(見かけ上増えているように見える)というものも見つかってきている。この薬剤は、HBVの放出を阻害している可能性がある。それ以外の薬剤については若干のHBV産生・分泌の変動を示すものもあったが、有意な変動とは考えられなかった。

#### D. 考察

生体内ではHBVは極めて効率的に肝臓の肝細胞へ感染し、細胞内で急速に増殖し、細胞外へ分泌されるのに対して、肝細胞を体外の培養系に移してしまうと極めてHBV産生の効率が悪くなる。肝臓は生体内で脂質代謝が極めて盛んな臓器であるが、体外の培養系に移すと、周辺の脂質環境が大きく変わり、自身の脂質代謝も大きく変動することが知られている。このことから、HBVの感染・増殖・分泌に脂質環境が重要な影響を及ぼしている可能性が考えられ、この観点から脂質代謝に注目した検討を行うことにした。臓器と培養細胞で脂質代謝を比較するのは条件設定が非常に難しいため、本年度はまず、培養系のみを用いHBV産生により脂質代謝がどう変動するか、そして、HBV産生に対する脂質代謝阻害剤の効果について検討することにした。

代謝標識実験に用いたHBV産生細胞はHBVプラスミドを用いた擬似的な系ではあるが、様々な脂質変動が見られた。コレステロールの生合成上昇、リン脂質生合成・代謝回転の亢進が見られたことから、これらの代謝亢進がHBV産生に重要な可能性が考えられた。コレステロールについては、宿主細胞内で量を低下させるとHBV分泌が抑制されること(J. Virol. 85:13373-83(2011));

Antiviral Res. 97:195-7(2013)), HBV 粒子からコレステロールを引き抜くと感染性が低下すること (Cell. Microbiol. 11:249-260(2009); Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 17176-17181(2010)) などが最近報告されており、コレステロール生合成系の重要性と矛盾しない。コレステロールは脂質ラフトの主要な構成成分でもあり、Caveolin が HBV の侵入に関与するかもしれない (J. Virol. 84:243-253(2010)) という知見とも関連している可能性がある。

中性脂質代謝については脂肪酸分子種によって異なる影響が見られ、様々な脂肪酸分子種を用いてさらに詳細に解析する必要があると考えられた。

HBV 産生系として、できるだけ生体に近い形を再現した系を用いるのが理想的である。現在、ヒト肝臓を持つキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を導入し、HBV 感染・増殖・分泌が見られることまで確認できている。次年度では、この系を用いて、見いだした HBV 産生系における脂質代謝変動を確認していきたい。また、最近の報告からトランスポート分子である NTCP が HBV の感染受容体の一つであり、HepG2 細胞への発現で HBV 感染・増殖が見られることが報告された (eLife, 1:e00049(2012))。そこで、NTCP を発現させた HepG2 細胞を用いた検討も行っていく予定である。さらに、汎用されるヒト培養肝細胞株を用い、細胞の分化誘導など様々な処理を行うことで HBV 感染・産生・分泌能の変動を検討し始めており、20 倍以上の HBV 産生の上昇が見られる条件も見出してきている。これらをさらに最適化し、より HBV 産生能の高い細胞での検討も行っていきたい。

HBV 産生に対する脂質代謝阻害剤等の検討からは、hexadimethrine bromide が有意に HBV 産生・分泌を阻害することがわかった。本化合物はリポタンパク質リパーゼ阻害剤としても知られているため、リポタンパク質リパーゼの関与を今後詳細に検討していきたい。加えて、さらなる広範な

薬剤を用いた検討について、次年度以降も可能な限り行っていきたいと考えている。

今回の検討結果を合わせ、今後は変動が見られた脂質や脂質代謝関連物質を培地に添加するなどにより、HBV 産生に有利な培養条件の最適化も各細胞を用いて始めていきたい。

## E. 結論

HBV 持続感染を再現する簡便でウイルス産生能の高い培養細胞評価系の確立を最終目的として、特に脂質代謝に着目した研究を開始した。本年度は、HBV 産生による宿主細胞の脂質代謝変動を解析し、コレステロール生合成の亢進、リン脂質合成・代謝回転の亢進を HBV 産生細胞で見出した。一方、中性脂質代謝については脂肪酸分子種によって異なる代謝変動が見られたことから、今後詳細な解析を進め、その意義を明らかにすることが重要と考えている。今回の結果を受けて、今後は様々な細胞培養系を導入して、見出した代謝変動の重要性を検証していきたい。一方、HBV 産生・分泌に対する脂質代謝阻害剤等の影響の検討も行い、リポタンパク質リパーゼ阻害剤 hexadimethrine bromide が有意に HBV 産生・分泌を阻害することも明らかとなった。今後は阻害メカニズムをさらに解析するとともに、他の薬剤の影響の検討も続けていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

本研究事業に関するものはなし

### 2. 学会発表

本研究事業に関するものはなし

## G. 知的所得権の所得状況

### 1. 特許取得

(発明者) 深澤征義、花田賢太郎「培養細胞、及び、細胞構築方法」(特願 2012-154982) 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし