

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：高岡 晃教 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 教授

研究協力者：佐藤 精一 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 助教

李 凱 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 研究生

分担研究課題：自然免疫認識機構の制御による HBV 複製への影響

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)により活性化される自然免疫認識機構を探るために、肝癌細胞株(Huh7)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法により解析したところ、IFN- λ 1(IL-29)のmRNAの発現レベルの上昇を認めた。RIG-I(retinoic acid-inducible gene 1)シグナルが入らないRIG-I遺伝子(T55I)に変異をもつHuh7.5細胞で検討したところ、IFN- λ 1は発現誘導されないことが示された。同様に、Huh7細胞においてRIG-Iに対するsiRNAを用いたノックダウンの系でもこれを支持する結果が得られた。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。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)により活性化される自然免疫機構の解析により、HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発へ貢献するため、以下の3つの課題に取り組んだ。(1)異なる遺伝子型、特に、Ae, Bj, CのHBV感染による自然免疫応答の解析。(2)HBV感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定。(3)HBVによる自然免疫活性化メカニズムの解析を、平成24年度の研究内容とした。

B. 研究方法

試料：プラスミドpUC19-HBV-Ae, Bj, Cは田中靖人教授(名古屋市立大学)より分与して頂いた。

RNAiMAX lipofectamine reagent および Fugene HD は、それぞれ Invitrogen 社および、Promega 社より購入したものを使用した。本研究に使用した siRNA、Primer は、Sigma 社において合成したものを使用した。

細胞培養：HEK293T および、肝癌細胞である Huh7、Huh7.5 は、ダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ)に 10% 牛胎児血清、4 mM グルタミンを添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。プラスミド発現系においては、HBV type Ae, Bj, C のウイルスゲノムを Fugene HD を使用した。siRNA のトランスフェクションにおいては、RNAiMAX lipofectamine reagent を使用し、共に添付マニュアルに従いトランスフェク

ションした。

RNA 抽出、定量的-RT-PCR: HEK293T および、Huh7, Huh7.5 細胞を PBS にて一度洗浄し、Isogen (日本ジーン社)を用いて、RNA を抽出した。常法に従い、DNase I (Invitrogen 社)および ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO 社)を使用し cDNA を合成後、既知の IFNs やサイトカインの転写変動をプライマー、SYBR Premix Ex Taq (TAKARA 社)、Real time PCR (Step One Plus: Applied Biosystems)を用いて解析した。

HBV 1.24 倍長ゲノムと、RIG-I との相互作用の解析: 以下の核酸、3pRNA、B-DNA、pUC19、pUC-HBV-Ae、pUC-HBV-Bj、pUC-HBV-C を LabelIT Biotin Labeling Kit (Takara)を用いて、ビオチン化した。バッファー(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 ug/mL Leupeptin, 1% NP-40, pH 7.2)で、可溶化した FLAG-RIG-I を過剰発現させた HEK293T 細胞抽出液と各種核酸を混合し、室温で、1時間ローテートし反応させた。その後、Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen 社)と混合し、室温で一時間ローテートし Biotin 核酸を沈降させた。ビーズを 4°C 2000rpm にて、沈降させ、バッファーにて3回洗浄後、SDS-PAGE を行い、抗 FLAG 抗体(Sigma 社)にて、Western blot を行った。

C. 研究結果

HBV 感染(1.24 倍 HBV ゲノム導入)による IFN 応答: HBV の異なる遺伝子型、特に、Ae, Bj, C の HBV 感染による自然免疫応答の解析を行うため、まず始めに肝癌細胞 Huh7 に pUC19 (Mock)、pUC19-HBV-Ae、pUC19-HBV-Bj、pUC19-HBV-C を導

入し、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間後の、インターフェロン IFN- β 、IFN- λ 1、炎症性サイトカイン IL-6、TNF- α の mRNA の発現を解析した。IFN- β 、IL-6 の発現誘導は観察されなかった(図 1-A, C)。しかしながら、興味深いことに、IFN- λ 1(図 1-B)、TNF- α (図 1-D)の発現誘導が観察された。その際、IFN- λ 1においては、Genotype Ae が一番効果的に上昇させ、一方、TNF- α においては、Genotype Bj が効率よく上昇させていた。HBV X タンパクの mRNA を評価すると、Bj が効率よく mRNA の転写を行っていた(図 1-E)。培地中の HBV の DNA コピー数を計測したところ、それと、相関して、Bj が効率よくウイルスを作製していた(図 1-F)。

HBV 感染に關与する自然免疫系センサー分子の同定: HBV 感染に關与する自然免疫系センサー分子の同定を行うため、RIG-I、MDA-5、IFI16、Ku70、DAI といった既知の核酸センサーの HBV Ae 導入による IFN- λ 1誘導に対する効果を調べた。Huh7 細胞に各種 siRNA を導入し、その後、HBV 1.24 倍長ゲノム Ae を導入後、IFN- λ 1誘導を解析した。siRNA により RIG-I を発現抑制した場合、IFN- λ 1誘導は有意に阻害され、その他、MDA-5、IFI16、Ku70、DAI に対する siRNA は有意な変化は示さなかった(図 2-A)。同様に、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 細胞で検討したところ、IFN- λ 1 は発現誘導されないことが示された(図 2-B)。また、Ae ウイルス感染においても評価を行ったところ、同様の結果が得られた(図 2-C)。以上のことより、HBV 感染(特に Genotype Ae)により、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 による自然免疫活性化メカニズムの解析： RIG-IはRNAのみならずDNA認識との関連性も報告されており、HBV由来のどの核酸がRIG-I活性化を誘導するのか詳細を明らかにするため、まず始めに、HBV由来RNAに対するsiRNAによる効果を解析した。HBV由来RNAに対するsiRNAを導入したところ、HBV Ae導入によるIFN- λ 1の発現誘導の減少が認められた(図3-B)。また、DNAとの相互作用を解析す

るために、pUC19に挿入されたHBVゲノム並びに、RIG-Iのリガンドである、3pRNAをビオチン化し、RIG-Iが発現したHEK293T細胞抽出液を用いて、in vitroにおける結合解析を行った。3pRNAとRIG-Iの相互作用は確認できたが、pUC19に挿入されたHBVゲノムとRIG-Iの相互作用は確認することができなかった(図3-C)。

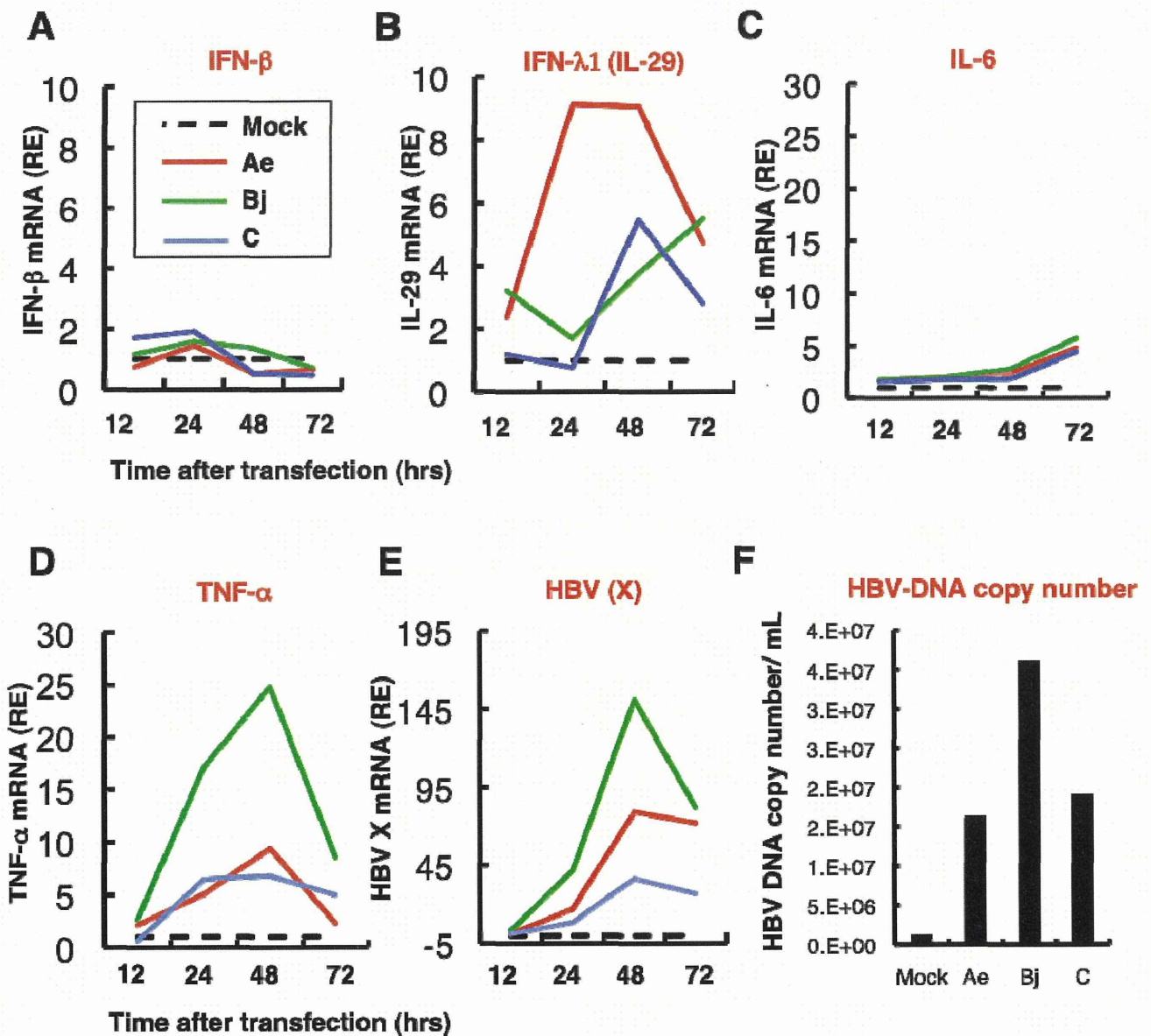


図1: Huh7細胞において1.24倍長HBVゲノム導入により、IFN- λ 1 (IL-29) および TNF- α 遺伝子誘導を引き起こす。

Huh7細胞に、1.24倍長HBV Genotype Aeならびに、Bj, Cゲノムを導入後、12、24、48、72時間後のIFN- β (A) および IFN- λ (B), IL-6 (C), TNF- α (D), HBV X (E) mRNAの変動を定量的PCRにより解析した。点線: Mock, 赤線: Genotype Ae, 緑線: Genotype Bj, 青線: Genotype C。また、ゲノムを導入後、72時間後の培養上清中のHBVのコピー数を測定した(F)。

D. 考察

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る結果を得た。興味深いことに、異なる

遺伝子型 (Ae, Bj, C) で自然免疫応答が異なっていることがわかった。この Genotype 間の配列の違いが、自然免疫応答活性の相違を導いているのかもしれない。

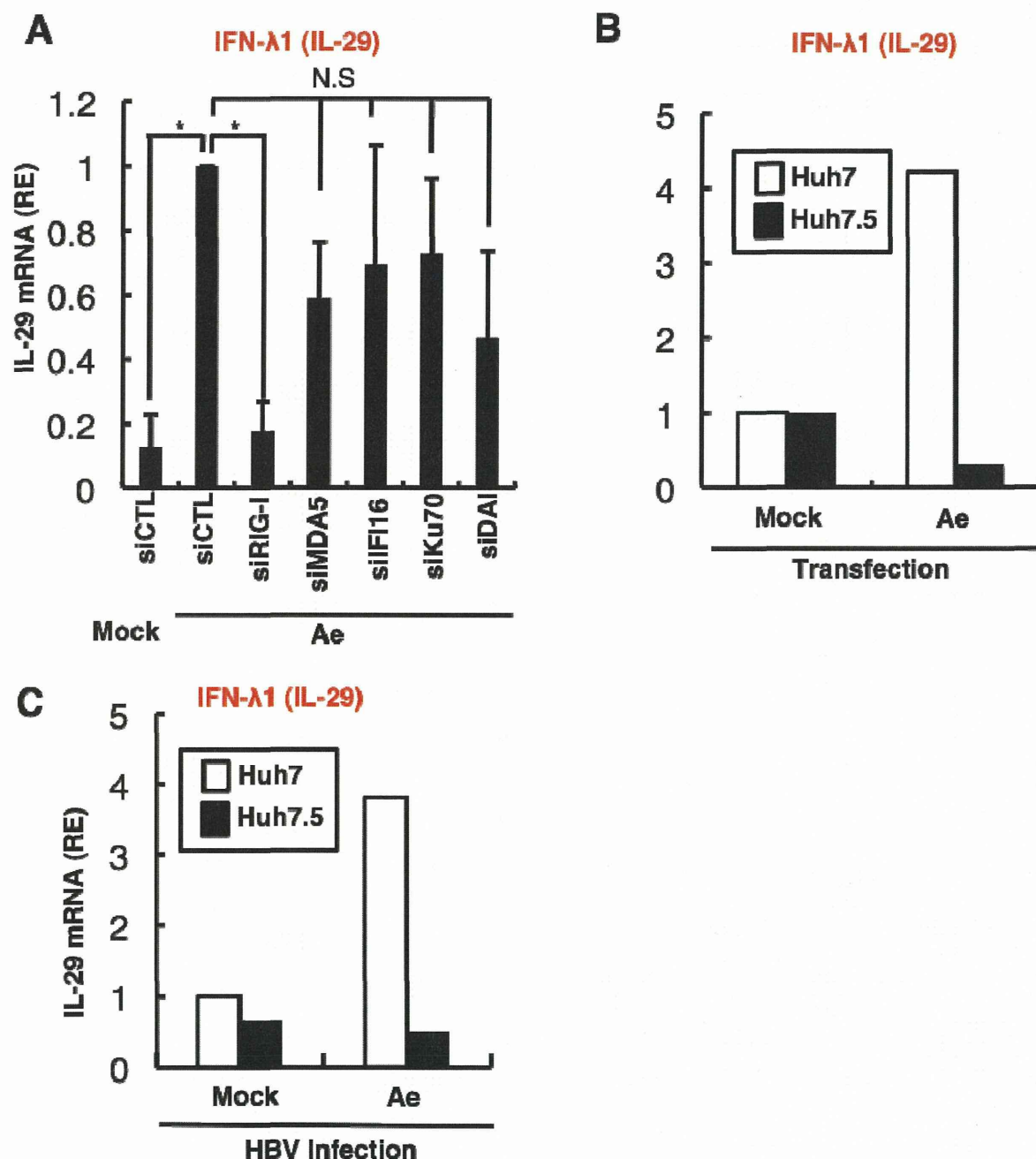


図2: HBVゲノム導入およびHBV感染実験において、RIG-I経路を介してIFN-λ1 (IL-29)の誘導を引き起こす。

(A) Huh7細胞に、RIG-I、MDA-5、IFI16、Ku70、DAIに対するsiRNAならびにCTL (コントロール) siRNAを導入し48時間後、1.24倍長HBV Aeゲノム導入を行った。その後24時間後のIFN-λ mRNAの変動を定量的PCRにより解析した。(B) Huh7細胞または、Huh7.5細胞に、1.24倍長HBV Aeゲノムを導入24時間後のIFN-λ mRNAの変動を定量的PCRにより解析した。(C) Huh7細胞または、Huh7.5細胞に、HBV Ae感染24時間後のIFN-λ mRNAの変動を定量的PCRにより解析した。

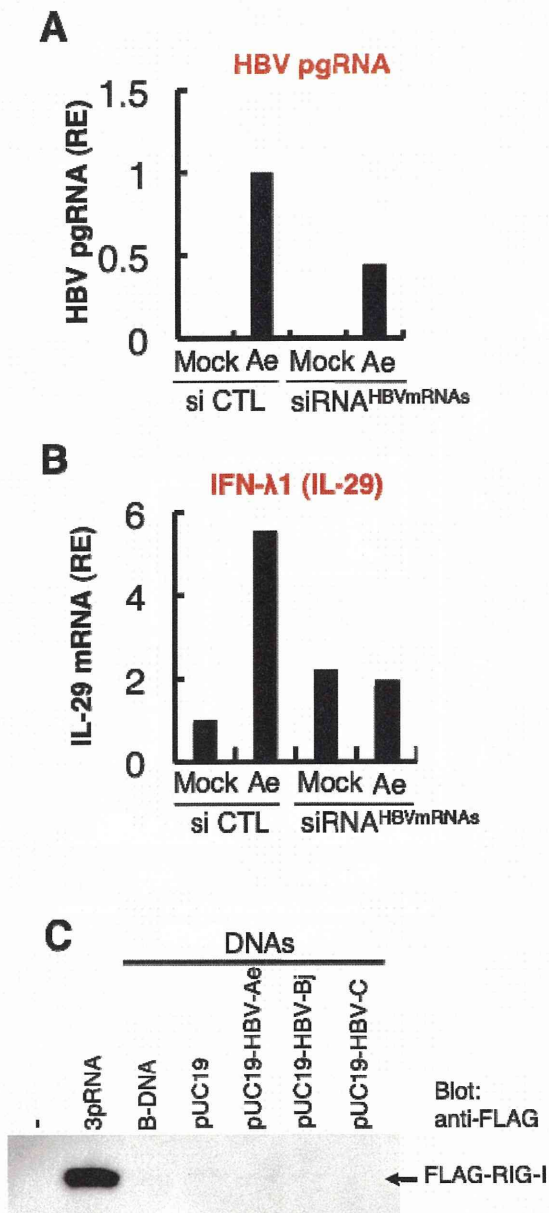


図3:HBVによる自然免疫活性化経路の解析

(A-B)Huh7細胞に、コントロールsiRNA(siCTL)または、HBV由来RNAsに対するsiRNA(siRNA^{HBVmRNAs})を導入し12時間後、1.24倍長HBV Aeゲノム導入を行った。導入24時間後のHBV pgRNA (A)およびIFN-λ (B)mRNAの変動を定量的PCRにより解析した。(C) 図に示した核酸をピオチン化し、FLAG-RIG-Iを過剰発現させたHEK293T細胞抽出液と混合した。ピオチン化した核酸をストレプトアビジンビーズを用いて沈降させ、洗浄後、SDS-PAGEし、FLAG抗体にて、Western blotを行った。

今後は、初年度で得られた知見に基づいて、HBVによるRIG-I経路のさらに詳細な活性化機構について明らかにする(H25)。RIG-IとHBV由来RNAの相関が見出され始めているので、その相互作用解析を現在行っているところである。また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

についても、例えばインフラマソーム活性化を誘導するDNAセンサーであるAIM2などとの関連性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(～H25-26)。同定した自然免疫認識機構を制御することによるHBVの効率的な持続感染モデルの構築を試みる(～H26-27)。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(～H27-28)。

E. 結論

本年度においては、肝癌細胞株Huh7においてHBV感染によりインターフェロンであるIFN-λ1(IL-29)のmRNAの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る結果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
該当無し

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

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：石川 哲也 名古屋大学 大学院医学系研究科 教授

研究協力者：湯川 博 名古屋大学 革新ナノデバイス研究センター 特任講師

分担研究課題：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

研究要旨：HBs粒子を蛍光ラベルによって可視化し、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。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。また、エンドサイトーシス抑制条件下で取込み効率は著明に低下した。これより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。また、通常、HBV感染が起こらないとされているHepG2やMEFにおいては、添加1時間後には取込みが確認されなかったが、24時間後には細胞質内に局在することが確認された。

A. 研究目的

HBVの細胞内侵入機構、細胞内での局在、存在形態、複製機構についての詳細は未だに明らかにされていない。HBVの可視化技術を用いて、これらHBVの生活環を明らかにすることで、培養細胞評価系の確立とともに新たな創薬の方向性を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

蛍光ラベル（赤色蛍光、Ex.:551nm, Em.:567nm）したHBs粒子を不死化ヒト肝細胞（HuS-E/2）に添加し、1～24時間後の細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらにヒト肝癌細胞（HepG2）、マウス線維芽細胞（MEF）においても同様の実験を行った。HuS-E/2においては、蛍光ラベルHBs粒子を4℃あるいはsodium azide + 2-deoxy-D-glucoseの存在下で添加し、HBs粒

子の取込みにエンドサイトーシスが関与するかどうかを検討した。

C. 研究結果

HuS-E/2では、添加後1時間より蛍光ラベルHBs粒子が細胞質内に局在することを確認した。4℃あるいはsodium azide + 2-deoxy-D-glucoseの存在下では、HBs粒子はHuS-E/2の細胞質内に移行せず、HBVの細胞内侵入機構にエンドサイトーシスが関与することが示唆された。HepG2、MEFでは、添加後1時間では細胞質内への移行を認めなかったが、24時間後には細胞質内に局在することを確認した。

D. 考察

今回、我々の用いた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る。最近になり、NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) が、ヒト肝細胞に特異的に存在する HBV レセプターであるという報告がなされたが、今回の我々の結果では、マウス MEF にも HBs 粒子の取込みがみられており、上記報告についての検証が必要と考えている。今後、実験系をさらに発展させ、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予定である (大阪大学免疫学フロンティア研究センター 石井優先生との共同研究)。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) **Ishikawa T**. Immunoregulation of hepatitis B virus infection -rationale and clinical application-. Nagoya J Med Sci 74: 217-232, 2012.

2) Ohtaki H, Ito H, Hoshi M, Osawa Y, Takamatsu M, Hara A, **Ishikawa T**, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. High susceptibility to lipopolysaccharide-induced lethal shock in encephalomyocarditis virus-infected mice. Sci Rep 2: 1-8, 2012.

3) Hayashi K, Katano Y, Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, **Ishikawa T**, Nakano I, Urano F, Yoshioka K,

Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. J Med Virol 8: 438-444, 2012.

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

「エンベロープ被覆型ウイルスの蛍光イメージングに向けた標識手法」湯川博、馬場嘉信、石川哲也、田中靖人 (申請予定) .

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：石井 優 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 教授

分担研究課題：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

研究要旨：当該研究分担者は、生体イメージング技術を駆使してB型肝炎ウイルスの肝細胞への感染、および抗ウイルス免疫機構を可視化して解析し、これにより新しい創薬ターゲットの開発、および新規薬剤の評価系の確立を目指しているが、初年度である平成24年度には、肝臓の生体イメージング系の基本システムの確立を行った。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血流、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。また、経日的に病態の進行を観察できるように、腹膜にwindowを設置して開腹を必要としないで観察を行う実験系を確立した。

A. 研究目的

HBV のヒト肝細胞への感染様式、および感染細胞に対する免疫応答については不明な点が多い。本分担研究では、ヒト肝細胞キメラマウスに蛍光標識した HBV を感染させ、当該研究分担者が世界的にも高い技術を有する生体多光子励起イメージングを駆使することで、HBV の感染経路、感染免疫の作動様式の解明を目指す。これにより、HBV 感染の *in vivo* での病態解明・新規の治療ターゲットの創出につながることを期待される。

B. 研究方法

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。実験動物を生かしたままの状態、麻酔下で肝臓の表面部位を開腹してガラスチェンバーを装着することで経時的な観察が可能な系を確立する。

一方で、本研究班内の共同研究により HBV ウィルス粒子の蛍光色素標識の予備的検討を行った。

ウィルス粒子にサクシニミジルエステルを介してフルオレセイン（緑色）やローダミン（赤色）を共有結合させ、この標識粒子の感染能について *in vitro* 培養系において確認する。

C. 研究結果

初年度である平成 24 年度には、HBV 感染経路・抗ウイルス免疫の作動様式の解析のための、肝組織の生体多光子励起イメージング系の開発を行った。活性化したマクロファージ・好中球を蛍光標識したりポーターマウス（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 1 参照）。

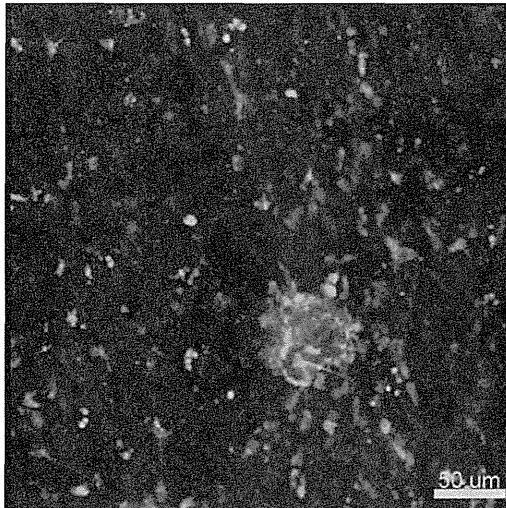


図1. 生体多光子励起イメージングによる肝臓の動的可視化. 右下の部位に人為的に傷害を与えると、その部位に炎症性マクロファージの集積が見られる(実際の映像はカラー表示されている). スケールバー: 50 μm

また平成24年度には、生体組織において炎症細胞動態を定量的に評価する画像解析法の開発や、特殊な蛍光プローブを用いた生体内での細胞動態の評価法の検討について成果報告を行ったが、次年度よりこれらの方法論を、肝臓におけるHBV感染動態・免疫応答のイメージングに活用する計画とする。

D. 考察

当該研究班内での共同研究者によって開発が行われている蛍光標識されたHBVウイルス(脂溶性蛍光色素を用いてウイルス粒子膜を標識)を用いることで、HBVの感染過程、およびHBV感染細胞の動態を生きた個体において、時系列を追って解析することが可能になると期待される。また、本研究分担者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、既存の候補薬剤の効果を本解析系において検証することにより、薬剤の最適化を図っていく。

E. 結論

本年度の研究成果として、肝臓の生体イメージング系の基本システムの確立を行った。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, **Ishii M.** (2013) Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. *J. Immunol.*, 190: 605-612.
- 2) Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G-H, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, **Ishii M.** (2013) Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.*, published online.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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：坂本 直哉 北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野 教授

分担研究課題：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

研究要旨：高効率な感染増殖に関連する HBV 遺伝子・アミノ酸構造決定：HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を目的として分担研究を遂行し、以下の結果を得た。

(1) HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍長 HBV 感染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することを確認した。(2)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。平成 25 年度以降も引き続き、HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を遂行する。(1) 変異 HBX 蛋白発現プラスミドを用いての細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する。(2) 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。(3) ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスより単離した初代一缶細胞株を用いて HBV 増殖能、HBX 蛋白の効果を検証する。本研究の成果により、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。

A. 研究目的

現在の核酸アナログ薬を主体とした抗ウイルス療法には以下の問題がある。即ち(1)薬物の標的が HBV-DNA ポリメラーゼの同一ドメインであり、ウイルスの薬剤耐性変異は複数の薬剤に交差耐性を獲得する、(2)作用が感染性ウイルス粒子の産生抑制であるため作用発現が遅く重症急性発症例に対する効果が限定的である、さらに(3)ウイルスの産生母体である感染細胞核内の環状二重鎖 DNA (cccDNA) を排除する効果がないため、継続的に使用され多剤耐性ウイルスの出現、医療

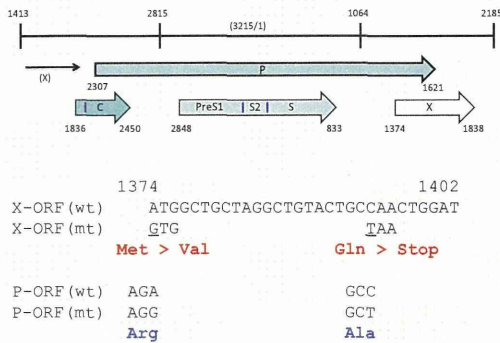
経済学上の問題となる。

ヒト HBV ゲノムにコードされる HBX 蛋白は感染宿主細胞に作用しウイルス蛋白産生を亢進させることが知られており、HBX 蛋白の機能を阻害する化合物が新たな抗ウイルス薬となり得る。しかし、ヒト X 蛋白の機能とその特異的阻害薬開発に特化した研究は十分になされていない。本研究で我々はウイルス蛋白発現亢進に働く HBX 蛋白の詳細な機能解析を行う。

B. 研究方法

HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、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を構築した。

X ORF 欠損 1.2× HBV プラスミドの作成



さらに、各ゲノタイプの HBX 蛋白強制発現プラスミドを構築し、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。

HBx 発現プラスミドの作成



HBx mutation の作成

MAARLCCQLDPARDVLCRLRPVGAESRGRPVSGPFGTLSSPSSSAVPADHGAHLSL
RGLPVCASFSSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQVLPKVLVKRTLGLSAMSTTDLEA
YFKDCLFKDWEELGEEIRLKIIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFPSA*



5アミノ酸ずつアラニン置換を実施
X蛋白 mutationを30個作成

1: MAA-AAAA-LDPARDVLC.....

2: MAARLCCQ-AAAA-DVLCRLRPVGAESRGRPVSGP.....

3: MAARLCCQLDPAR-AAAA-RPVGAESRGRPVSGPFGT.....

...

29: GEEIRLKIIFVLGGCRHKL-AAAA-CNFFPSA*

30: GEEIRLKIIFVLGGCRHKLVCSPAP-AAAA-SA*

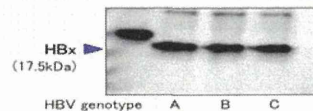
C. 研究結果

(1) HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍長 HBV 感染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することを確認した。

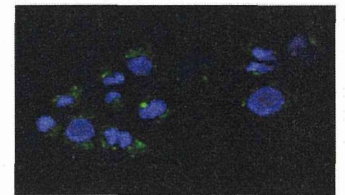
(2) 野生型 X 蛋白発現プラスミド、および全長にわたりアミノ酸を 4 個ずつ網羅的にアラニンに置換した X 蛋白発現系を構築し、培養細胞での発現を確認した。

HBx プラスミド遺伝子導入による HBX 蛋白発現

Western blotting



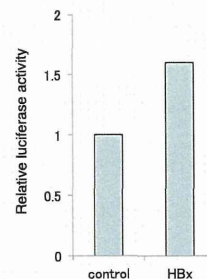
Immunocytochemistry



Anti-FLAG-Alexa 488 / DAPI

HBX 蛋白の転写活性化能を確認するため、野生型 HBX 蛋白と AP1 promoter-luciferase プラスミドを強制発現したところ、HBX 蛋白強制発現により AP1 転写活性化能が優位に上昇することを確認した。

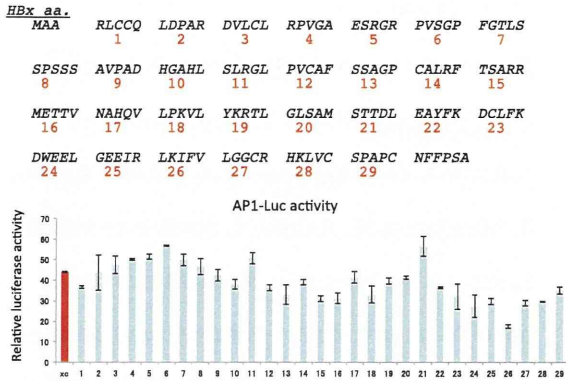
HBx 蛋白強制発現による AP1 promoter 活性化能



網羅的にアラニン置換を導入した変異 X 蛋白に

よる AP1 転写活性化能を解析したところ、HBX 蛋白の C 末端側への変異導入によりその転写活性化能がブロックされることが確認され、X 蛋白側の転写活性化ドメインが C 末端よりに存在することを確認した。

変異HBx蛋白によるAP1活性化能の解析



D. 結論

平成 25 年度以降も引き続き、HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を遂行する。

- (1) 変異 HBX 蛋白発現プラスミドを用いての細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する。
- (2) 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。
- (3) ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスより単離した初代一缶細胞株を用いて HBV 増殖能、HBX 蛋白の効果を検証する。本研究の成果により、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。

E. 研究発表

1.論文発表

1. Nakagawa M, **Sakamoto N**, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka Y, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; *Epub ahead of print*.
2. Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, **Sakamoto N**, Tanaka Y, Nakamuta M. Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(2):250-260.
3. Nitta S, **Sakamoto N**, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57(1):46-58.
4. Yamashita A, Abdus K, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, **Sakamoto N**, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Thuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K:

- Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2012; 10(4):744-761.
5. Kobayashi T, Hige S, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Ogawa K, Chuma M, **Sakamoto N**, Asaka M: Anemia and thrombocytosis induced by ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012; 47(11):1228-1237.
 6. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, tani H, Ikeda M, Kato N, **Sakamoto N**, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Haliclona* (*Reniera*) sp. *Plos One* 2012;7(11):e48685.
 7. Li YJ, Wu HH, Weng CH, Chen YC, Hung CC, Yang CW, Wang YL, **Sakamoto N**, Tian YC: Cyclophilin A and nuclear factor of activated T cells are essential in cyclosporin A-mediated suppression of polyomavirus BK replication. *Am J Transplantation* 2012; 12:2348-2362.
 8. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, **Sakamoto N**, Katayama K, Mizuguchi H: Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Research* 2012; 165(2):214-218.
 9. Cheng J-C, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, **Sakamoto N**, Huang HD: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15):2621-2633.
 10. Nichols DB, Fournet G, Gurukumar KR, Basu A, Lee JC, **Sakamoto N**, Kozielski F, Musmuca I, Joseph B, Ragno R, Kaushik-Basu N: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; 49:191-199.
 11. Kusano-Kitazume A, **Sakamoto N (equal contribution)**, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 2012; 56(3):1315-1323.
 12. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, **Sakamoto N**, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. *Hepatology* 2012; 55(1):20-29.
2. 学会発表
 1. Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, **Sakamoto N**, Huang HD, Cheng JC: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *J Hepatol* 2011; in submission.. 19th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-5-2012, Venice, Italy.

F. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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：池田 正徳 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 准教授

分担研究課題：HBV 増殖に関わる肝細胞環境因子の同定

研究要旨：HBVの持続感染細胞モデルの開発にあたり本年度は、ヒト肝細胞株のバックグラウンドについて解析した。宿主因子のうち、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。今回検討した肝細胞株はHBV受容体であるNTCPを発現していなかったことから、HBV感染細胞モデルの開発に際してはNTCPを発現させることが重要であることがわかった。また、ヒト肝細胞株にHBVプラスミドを導入したところ、細胞株の違いによりHBsAgの産生量に違いが認められることがわかった。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）の培養細胞モデルは現在、一過性のウイルス産生細胞モデル（HepG2. 2. 15 細胞）や、一過性のウイルス感染細胞モデル（HepaRG 細胞）に限定されている。本研究班では、持続的にHBVを産生し、HBVの再感染が可能なHBVの持続感染細胞モデル開発を目的とする。HBVの増殖に適した肝細胞株の選択にあたり、本年度は、分担者の研究室で樹立したユニークなヒト肝細胞を含む、肝細胞株のHBV受容体を含む宿主因子についての検討を行った。また、HBVプラスミドの肝細胞株への導入効率についても検討した。

B. 研究方法

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。13種類のうち10種類はヒト肝癌細胞株（Li21, Li22, Li23, Li24, PLC/PRF/5, HepG2, HuH-6, HuH-7, HLE, HLF）、また3種類は不死化肝細胞株（OUNS-29,

PH5CH8, NKNT3）由来の細胞株である。宿主因子については、肝臓特異的であるmiR122、IFN応答性に関わるIL28B SNP（rs8099917 およびrs12979860）および、最近、YanらによりHBV受容体として報告されたsodium taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP）の発現について検討した。

HBVの導入効率については肝細胞由来の不死化肝細胞株であるPH5CH8、胎児肝細胞由来の不死化肝細胞株であるOUMS29、肝癌細胞株であるHepG2, Hep3B, Li23, RSc, PLC/PRF/5を用いた。10 cm dishに80%コンフルエントに培養した肝細胞株をトリプシン/EDTAで剥離し、10%FBS含有培地でトリプシンを中和後、異なる細胞密度で6 wellのI型コラーゲンコートプレートに播種し24時間培養した。HBVプラスミドは遺伝型CのpUC19/C_JPNATを用い、FuGene HDで各細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後、経時的に4日目ま

で培養上清と細胞を回収した。細胞から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) で細胞内の total DNA を精製し、HBV 特異的プライマー (Forward primer : 5' -taggaccacctgctcgtgtta-3' , Reverse primer : 5' -agaaaattgagagaagtccaccac-3') を用いて LightCycler Nano (Roche) を用いて測定した。HBV DNA のコピー数は pUC19/C_JPNAT をスタンダードとして定量した。培養上清中の HBsAg は化学発光免疫測定法 CLIA 法で行った。

C. 研究結果

肝細胞株 (Li23, HuH-7, HepG2, HLF, PH5CH8, NKNT3) における miR122 の発現値について検討した。miR122 の発現量は HuH-7 および Li23 細胞に比べて HepG2 細胞では約 100 分の 1 であった。それ以外の細胞では約 1000 分の 1 のであり非肝細胞である Hela 細胞 (陰性コントロール) と同レベルの発現量であった。

肝細胞株 (Li21, Li22, Li23, Li24, PLC/PRF/5, OUMS-29, PH5CH8, HepG2, NKNT3, HuH-6, HuH-7, HLE および HLF) の IL28B SNP について検討した。Rs8099917 の遺伝子型は Li21, Li22, Li23, Li24, PLC/PRF/5, OUMS-29, PH5CH8, および HepG2 細胞株で IFN 応答型 (T/T)、NKNT3, HuH-6, HuH-7, HLE および HLF では IFN 抵抗型 (T/G あるいは G/G) であった。Rs12979860 の遺伝子型は Li21, Li22, Li23, Li24, PLC/PRF/5, OUMS-29, および PH5CH8 細胞株で IFN 応答型 (C/C)、HepG2, NKNT3, HuH-6, HuH-7, HLE および HLF では IFN 抵抗型 (C/T あるいは T/T) であった。

HBV 受容体の NTCP の肝細胞株 (HepG2, Hep3B, Li22, Li23, PLC/PRF/5, HLE, HLF, PH5CH8, NKNT3, OUMS-29) の発現量を検討した。陽性コントロール

としてヒト肝臓の mRNA (Takara 社より購入) を使用した。ヒト肝臓に比べて HuH-6 が約 100 分の 1 の発現を認めるものの、他の肝細胞株では 10000 分の 1 以下の発現であった。

Hep3B, PLC/PRF/5, HepG2, RSc, Li23, PH5CH8, OUMS29 に対して HBV プラスミドのトランスフェクションを行い HBV DNA 量、HBs 抗原の定量を実施した。細胞内の HBV DNA 量は、培養期間中すべての細胞株で Log 7-8 であったことから、トランスフェクションしたプラスミドが一定レベルで存在していると考えられた。一方で HBsAg の培養上清への分泌量は、Hep3B > PLC/PRF/5 > HepG2 > RSc, Li23 > PH5CH8, OUMS29 の順に高かった。この中で Hep3B と PLC/PRF/5 はゲノム中に HBV DNA が存在する細胞株であるため、コントロール細胞と比較したところ、Hep3B では内在性の HBsAg は検出限界以下であったが、PLC/PRF/5 では HBV プラスミドトランスフェクションとほぼ同レベルで HBsAg が検出された。

D. 考察

miR122 は肝臓特異的に発現するマイクロ RNA で、C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖に重要な役割を果たすことが知られている。HBV の増殖については促進、抑制するとの報告があり結論がでない。今回、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。HuH-7 および Li23 細胞は HCV の増殖が可能な細胞であり、検討した他の細胞株では効率良く HCV が増殖できないことから miR122 の HCV 増殖に重要な役割を果たすことが確認できた。HBV についても今回の成果を生かしてその増殖における役割を今後検討してゆきたい。

IFN 応答に関わる IL28B SNP のメカニズムについての詳細はあきらかとなっていない。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、ほぼ一致していたが、唯一、HepG2 細胞株では rs8099917 が IFN 桜桃型(T/T)を示したのに対して、rs12979860 では IFN 抵抗型 (C/T)となり乖離した結果となった。今後、これらの肝細胞株を用いて IL28B SNP の HBV 増殖における役割について検討してゆきたい。

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 を強制発現させて感染効率の検討を行いたい。

肝細胞株への HBV プラスミドのトランスフェクションでは、細胞内にほぼ一定レベルで HBV が存在しても、細胞株により、分泌される HBsAg 量が異なることが明らかになり、細胞内環境の差により HBV の複製レベルが異なることが考えられた。

E. 結論

- 1) 肝細胞株における宿主因子 (miR122, IL28B SNP, NTCP) について検討した。
- 2) HBV 受容体 (NTCP) は肝細胞株では発現していなかった。
- 3) 肝細胞株において HBsAg の産生に違いを認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, **Ikeda M**, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, 44(3):374-81, 2012.
- (2) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, **Ikeda M**, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(3):1407-13, 2012.
- (3) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H,

Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, **Ikeda M**, Kato N, Isomoto H, Tkashima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J Gastroenterol*, 47(2):195-202, 2012.

- (4) Takeda M, **Ikeda M**, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 93(7):1422-31,2012.
- (5) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, **Ikeda M**, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar. Drugs*, 10:744-761,2012.
- (6) 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(1):74-85,2012.
- (7) Takeda M, **Ikeda M**, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio.*, 2:279-283,2012.
- (8) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, **Ikeda M**, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7:e48685 ,2012.

2. 学会発表

- (1) **池田 正徳**、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 IL28B SNPs の制限酵素法による判定法と比較 第16回日本肝臓学会大会、神戸、2012年10月
- (2) **池田 正徳**、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 新規 IL28B

SNP(rs8113007)のHCVに対するIFN応答性の
検討第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、
2012年11月

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

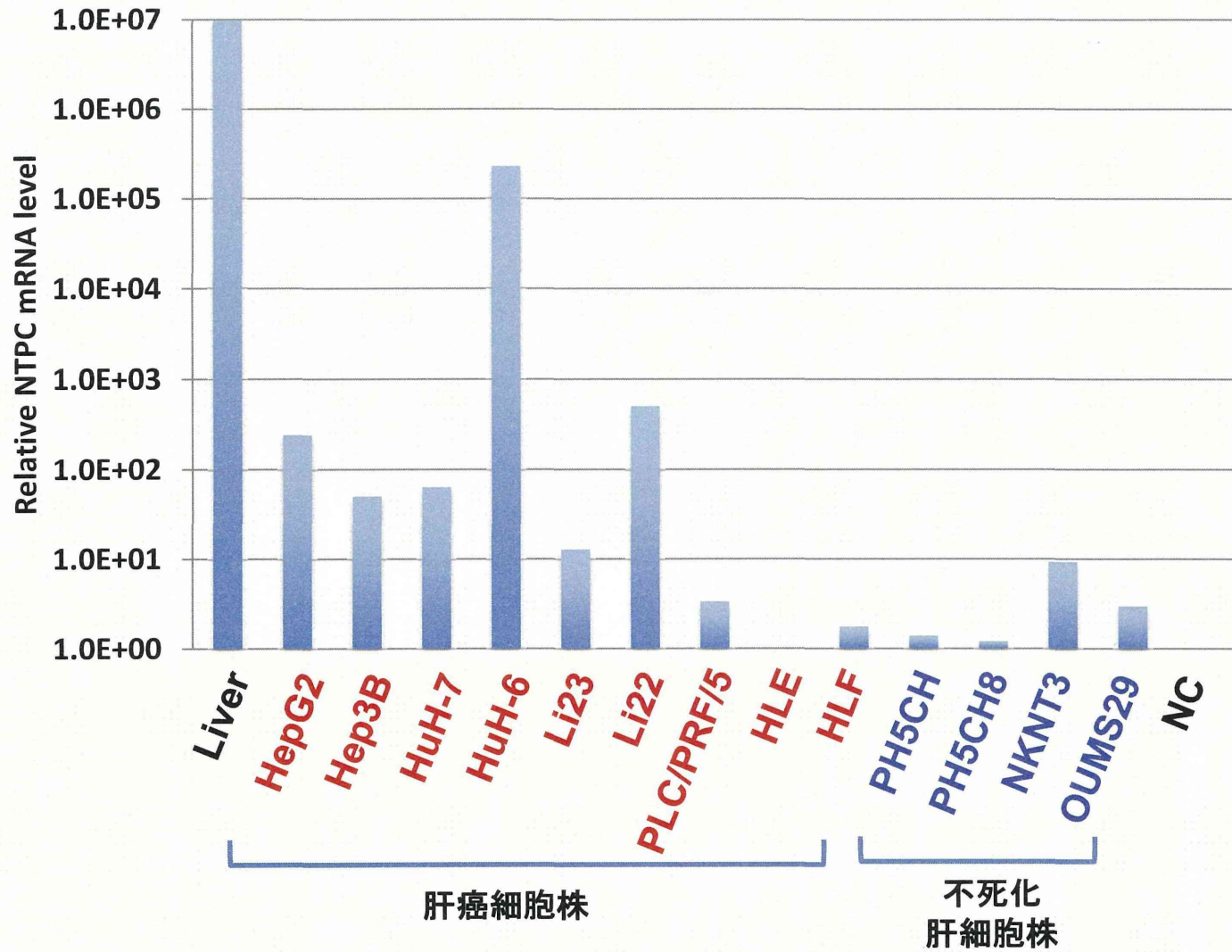
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト肝細胞株におけるHBV受容体 (NTCP)の発現



Liver: human liver
NC: water

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：土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題：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

研究要旨：現時点においてHBVの感染増殖を高効率で再現する培養細胞はないため、これまでに独自に樹立してきたヒト肝細胞由来の細胞を用いてこれを可能にする培養システムの構築を目指した。まず独自に樹立しているヒト不死化肝細胞、HuS-E/2細胞のHBV感染感受性について検討をおこなった。この細胞は、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が、現時点の培養法においては有意な感染は認められなかった。また最近HBV受容体分子として報告されたNTCPのmRNA発現量も低レベルであった。同時に最近我々の研究室で樹立している肝幹細胞様細胞HMY1細胞においてNTCP mRNAの発現を検討したところ、肝細胞への分化条件で培養することでNTCP mRNAの発現が誘導され、上昇することがわかった。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おこなっている。

A. 研究目的

これまでに独自に樹立したヒト不死化肝細胞やヒト肝幹細胞様細胞を用いて、B型肝炎ウイルスが効率良く感染増殖する新たな細胞培養系を構築することを第一の目的とした。また、これらHBV培養系を用いて、その感染増殖機構を解明することにより、このウイルスの感染増殖に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗HBV薬候補として同定し、またHBV薬評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 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。

2. 最近HBV受容体分子として報告されたNTCPのmRNA発現量について各細胞の総RNAを抽出してセミ定量RT-PCRによって検討した。

3. HBVがヒト肝細胞に類似した細胞に効率良く感染することが考えられるため、我々の研究室で樹立している肝幹細胞様細胞HMY1細胞について効果的に肝細胞に分化する培養法について検討をおこなった。

C. 研究結果

1. 2% DMSOを含む培養液を用いて前培養した