

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）  
分担研究報告書

HBV 感染モデル細胞系の樹立

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

研究要旨：スクリーニングに用いる感染細胞の利用については、これまでの研究からヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、落谷らは独自に開発した YPAC などの因子（インヒビターカクテル）を用いた感染効率の高い細胞株を得る事、あるいは肝幹細胞や成体幹細胞からの肝細胞分化技術を駆使するなどして感染効率の高い培養細胞の獲得をおこなう。平成 25 年度の成果は以下の通りである：（1）最終分化を遂げた成熟肝細胞から、小分子シグナル阻害剤刺激下で、増殖能および成熟肝細胞・胆管上皮細胞への分化能を持つ肝幹細胞様細胞を誘導した。（2）形態的、機能的にも肝細胞様の細胞を分化誘導する事に成功、HBV の受容体とされる NTCP も分化誘導前に比較して 40 倍以上、mRNA 発現量が増大していた

A．研究目的

抗ウイルス薬開発のスクリーニングに用いる感染細胞の利用については、これまでの研究からヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、分担研究者らは独自に開発した YPAC などのインヒビター（低分子化合物）を用いた感染効率の高い細胞株を得る事、あるいは肝幹細胞や成体幹細胞からの肝細胞分化技術を駆使するなどして感染効率の高い培養細胞の獲得をおこなう。

B．研究方法

HBV 感染過程を再現するために最適かつ安定な肝細胞の培養系が確立されていない。分担研究者（落谷）が独自に発見した 4 種のシグナル伝達阻害剤カクテルである YPAC (PNAS, 2010) を応用する事で、初期感染過程を標的とした新規治療薬の

開発に有用な細胞系を提供する。具体的には、この 4 種類の低分子化合物の組み合わせを変える事で、最も効率的に、ヒト肝細胞の長期機能維持培養を可能にするインヒビターカクテルを同定する。さらに、エピジェネティクス制御因子によるヒト肝細胞誘導を試みる。

（倫理面への配慮）

本研究で使用する細胞は、いずれもインフォームド Consent のもとに倫理審査を得て採取され、市販されているヒト肝細胞であるため、倫理的な問題点はない。ラットの肝細胞に関しては、所内の動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護に基づく実験を実施する。

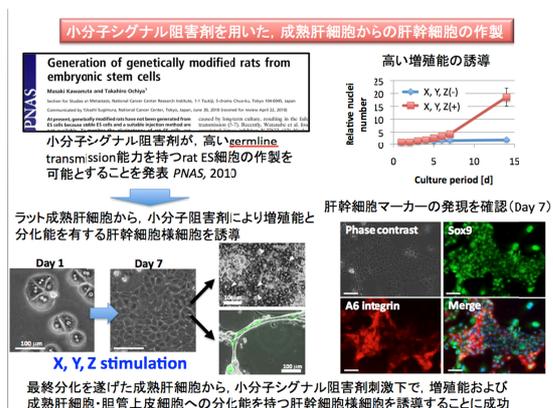
C．研究結果

1) 4 種のシグナル伝達阻害剤カクテル

である YPAC をラット初代培養肝細胞に添加し、その細胞増殖、肝細胞様形態の維持を観察した結果、YPAC 未処理の細胞は培養 1 4 日後には 9 7 % が細胞老化用の形態を示して死滅したのに対し、YPAC 処理群では、正常な染色体数を保ちながら、7 0 % の肝細胞が正常な肝細胞様の形態と生存率を保持しており、YPAC の有効性が示唆された。

2) YPAC 処理によって、成熟肝細胞の指標となる microRNA122 の発現も、培養 1 4 日間に渡って維持されていた。

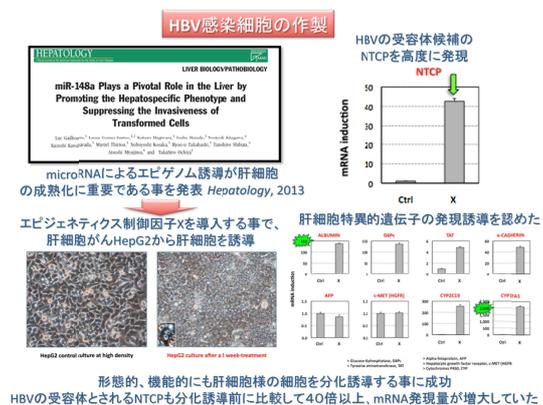
図 1



3) さらに、図 1 に示す様に、小分子阻害剤の組み合わせで誘導された細胞は、肝幹細胞の性質を持ち、最適な環境下で、成熟肝細胞と胆管細胞の二方向性分化能を示した。

4) 本年度の成果として、microRNA148a が、エピゲノムの制御を介して、肝細胞の成熟化を担う事が明らかとなった (*Hepatology*, 2013)。この成果をもとに、エピジェネティクス制御因子 X を導入する事で、肝細胞がん HepG2 から成熟肝細胞の性質を有する細胞を誘導する事に成功した (図 2)。

図 2



#### D. 考察

(1) YPAC の肝細胞形態・機能維持の能力に加えて、インヒビターの組み合わせが、ラット肝幹細胞様に細胞を誘導できる事が明らかとなった。

(2) エピジェネティクス制御因子 X を導入する事で、肝細胞がん HepG2 から成熟肝細胞の性質を有する細胞を誘導する事が可能な事が判明した。この細胞をうまく利用する事で、HBV 感染の初期過程や持続感染を再現できる可能性を検討するチャンスが生まれた。

#### E. 結論

インヒビターによる遺伝子発現変化の誘導が、肝細胞の分化機能維持や長期培養に貢献する可能性が明らかとなった。さらに、エピジェネティクス制御因子が、肝がん細胞を正常な肝細胞様細胞にリプログラミング可能な事も明らかになった事は大きな成果である。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

1. 論文発表

1.Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, and Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. Springer. ISBN 978-3-319-03724-0.

2.Thirion M and Ochiya T. Roles of micrornas in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases. Viruses 2013; 5(11), 2690-703; doi:10.3390/v5112690.

3.Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawarahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. Hepatology. 2013; 58(3), 1153-65.

4.Thirion M and Ochiya T. Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In MicroRNAs in cancer (pp. 308-332). 2013; Enfield, New Hampshire, Science Publishers.

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

6.Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular

carcinoma. Histol histopathol, 28:437-451, 2013

7.Gailhouste L, Ochiya T. MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression. Cancer Diagnostics, pp 12-14, 2013

## 2. 学会発表

1. 「The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.」、落谷孝広、第20回肝細胞研究会 イブニングセミナー (2013.9.26 大阪)

2. Ochiya T. 「Hepatocyte from other sources of stem cell」. APASL Liver Week 2013, Suntec.Singapore. June 6-10

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

出願名称： ラット胚性幹細胞を用いたキメララットの作製法

出願人：国立がん研究センター；DSファーマバイオメディカル株式会社

発明者 落谷 孝広、川又 理樹

出願日時 平成22年7月23日

出願番号 特願 2010-166571

### 2. 実用新案登録

なし

### 1. その他

なし