

201321008A

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

H25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤田 尚志

平成 26 (2014) 年 5 月

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**

H25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤田 尚志

平成 26 (2014) 年 5 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	1
藤田尚志	
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	5
藤田尚志	
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	7
加藤 宣之	
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	13
土方 誠	
B型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響	17
松浦 善治	
<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	21
柘植 雅貴	
HBVジェノタイプ別IFNシグナル阻害効果の検討	27
渡邊 綱正	
自然免疫を用いたHBV感染細胞の排除に関する研究	33
水腰英四郎	
HBVに対する自然免疫応答の解析	37
竹原 徹郎	
HBV感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給	41
斎藤 泉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別冊（別添）	49

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）
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

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。それぞれの分担者はin vitroあるいはin vivoのHBVの増殖系を確立し、それらを用いて解析を開始している。HBV感染によって自然免疫応答が誘導され、λ型を含むインターフェロンの誘導、インターフェトン誘導遺伝子群の誘導が起きることが示されてきている。今後は自然免疫系の活性化の強化、さらにはHBVがどのようにして自然免疫を逃れて増殖するのかについて解析を進める必要がある。また、斎藤のグループはshRNAを発現する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。このベクターのin vitroあるいはin vivoでの有効性の検証が今後の課題である。

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・准教授
竹原 徹郎 阪大・教授
斎藤 泉 東大医科研・教授

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、研究を開

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) 1.3長HBVゲノムを肝細胞株に導入し、その増殖を再現する系を用い、HBV増殖と自然免疫の関連を解析する。
(2) HBV感染の受容体分子として報告されたヒトNTCPを肝細胞株に強制発現し、ウイルス粒子からの感染系を作り、HBV増殖と自然免疫の関連を解析する。

・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 細胞を用いた HBV 感染系の立ち上げを行なう。

(2)HBV 感受性の HuS-E/2 細胞を用いて HBV と自然免疫の関連を解析する。

・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する系を用いて HBV による宿主遺伝子発現への影響、特に免疫系の制御を行なう分子に注目して検討を行なう。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1) ヒト肝臓置換キメラマウスおよび初代ヒト肝細胞を用いて、HBV 遺伝子型ごとのウイルス複製効率の解析を行なう。

(2) 遺伝子型と病態の関連を解明する。

・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 に分離技術を確立して HBV 感染者と非感染者でその比較を行ない、慢性化の原因を解明する。

・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。HBV 感染者と非感染者でその比較を行ない慢性化の原因を解明し、それを基にした新たな治療法の

開発を行なう。

・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を行なう。HBV 感染の遺伝子治療を目的とした shRNA 発現ベクターの構築を行なう。

(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) 1.3 長 HBV ゲノムを肝細胞株に導入するとウイルス複製が起きることを確認した。ヒト NTCP を発現させた肝細胞では HBV 粒子を用いた感染が成立することを確認した。

(2) 上記の系で自然免疫応答に必要な分子をノックダウンするとウイルス増殖が増加すること、すなわちこれらの細胞では免疫応答が起きており、ウイルス増殖を抑制していることが強く示唆された。

・研究分担者(加藤宣之)

(1)すでに作成している HBV 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養細胞を二重鎖 DNA で刺激をしたが、ウイルス蛋白質による刺激抑制は観察されなかった。

・研究分担者(土方誠)

(1) ヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞は初代肝細胞と類似した性質を示すことが明らかとなった。

(2)。HuS-E/2 細胞に NTCP を発現させた細胞は HBV 感染に有効であることが期待された。

・研究分担者(松浦善治)

(1) HBV が複製している細胞の培養上清には NK 細胞の活性を抑制する液性因子が存在することが判明した。この因子はサイトカイン様の活性を示すことから今後新たな治療法の開発に関連させて研究を進めて行く。

・研究分担者(柘植雅貴)

(1) ヒト肝キメラマウスを用いた感染実験で、遺伝子発現プロファイルを解析した所、感染後8週で大きな発現変化が観察された。これらの発現とHBV複製の関連を今後解析して行く。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1) ヒト肝キメラマウスより分離した初代(ヒト)肝細胞を用いてウイルス感染を行ない、ウイルス粒子からの感染、増殖を確認した。この系ではIFN-1が誘導されること、その誘導の程度はウイルスの遺伝子型に依存することを見出した。

・研究分担者(水腰英四郎)

(1) HBV感染患者では樹状細胞(DC)の細胞表面マーカーの発現が異なることを見出した。この結果は細胞表面マーカーの発現を指標に治療のストラテジーが組める可能性を示している。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1) HBV感染者のNK細胞の解析により、高ウイルス群ではNK細胞の低下が見られた。またNK細胞が亜型に分類され、ウイルスDNA量との関連が見出されることが判明した。これらの機能とB型肝炎の慢性化の関連を今後、追求する。

・研究分担者(斎藤泉)

(1) HBVに対する有用性の高いshRNAを同定し、その発現ウイルスベクターを作成した。HBVゲノム複製検出系と組み合わせることによって今後これらの治療

への有用性を検証する。

D. 考察

各分担研究者によってHBV感染・複製のための系が樹立されている。HBV感染と自然免疫応答の誘導、その機構の解明が今後の課題である。HBV感染は自然免疫応答を誘導しながら増殖していることが示唆されており、HBVがどのように免疫応答を乗り越えているのか今後の課題である。

E. 結論

核研究グループで研究の基礎の系が確立し、実際にHBV感染実験結果が得られてきている。着実に研究が進行していると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照。

2. 学会発表

分担者の学会発表リストを参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

分担者の特許リストを参照。

2. 実用新案登録

分担者の登録リストを参照。

3. その他

なし。

抗ウイルス自然免疫応答促進によるHBV増殖制御

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その阻害を標的として治療法を開発することを目的とした。肝培養細胞にHBVゲノムを導入し、コア蛋白質の発現、cccDNAの形成が認められ、ウイルス複製が確認された。またHBV受容体として報告されたNTCPを強制発現することで肝細胞株でHBV感染および増殖が起きるようになることを確認した。これらの細胞では宿主の自然免疫応答が誘導され、ウイルスの増殖が一部抑制されていることが示唆された。

A. 研究目的

HBVの治療効果向上を目的とする。本研究では特に感染初期に稼働する宿主の自然免疫応答に焦点を当てる。宿主の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。

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。細胞培養系を用いたシステムを構築した。このような実験は組換え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認可を得た。1.3長HBVゲノムを安定に発現する肝細胞株でのHBV複製の確認を行なった。

HBVの吸着、侵入のための受容体として報告された、ヒトSodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)を発現する

細胞を作製し、そこでのHBV粒子からの感染、増殖を検討した。（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。ヒトNTCPを肝臓で発現するトランスジェニックマウスを用いた感染実験を計画した。この実験のため、新たな組換えDNAの大臣確認実験実施の許可の申請を行なった。肝臓特異的なプロモーターの制御下でNTCPを発現する遺伝子の構築を終了した。

C. 研究結果

1.3長HBVゲノムを安定に発現する肝細胞株ではコア蛋白質、cccDNAの検出に成功し、ウイルスの複製が起っていることが明らかとなった。また、この細胞で細胞質ウイルスRNAセンサーであるRIG-Iのシグナルに関与する分子をノックダウンするとウイルスの増殖が増加することが判明した。

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。GFP-NTCP融合蛋白質を安定に発現する培養細胞株を樹立、その細胞で患者血清由来のHBV粒子からの

感染、増殖を確認した。

D. 考察

HBV の増殖、ならびに粒子からの感染増殖系を培養細胞で立ち上げることができた。自然免疫の制御因子のノックアウトで HBV の増殖が増加したことは HBV が自然免疫応答を誘導し、それにより増殖制御を受けていることを示している。自然免疫応答の強化によりウイルスの人為的な制御の可能性が示唆される。培養細胞を用いた実験結果からは NTCP を肝臓で発現するマウスが HBV 感染動物モデルとして有用である可能性が示唆される。また自然免疫応答の不全なノックアウトマウスとの掛け合わせにより HBV の増殖する動物モデルの作成の可能性が示唆される。

E. 結論

HBV の増殖を培養細胞レベルで再現する系を立ち上げることが出来、動物感染モデルの作成が進行中である。従来明確でなかった、HBV と自然免疫応答の関連が明らかになりつつあり、次段階としては免疫の強化とウイルスによる阻害機構の解明を通して新たな治療法の開発を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0089869

2. 学会発表

1) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において I 型および III 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸 2013 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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（平成25年度）

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

研究分担者 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、前年度に作成したHBVの細胞内増殖モデルシステムや各種HBVタンパク質を恒常的に発現する各種ヒト培養細胞を用いて、以下に示すような成果を得た。（1）細胞内二本鎖DNAの認識に関与する宿主因子として最近同定されたcyclic GMP-AMP synthase（cGAS）がHBVのゲノムDNAを認識することが示唆された。（2）遺伝子型Cの各HBVタンパク質に細胞内二本鎖DNAにより誘導されるIFN産生を抑制する活性は認められなかった。

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IFN治療に抵抗性を示す。また、ラミブジンやエンテカビルなどの核酸アナログ製剤は、HBVの増殖を抑えて肝炎を沈静化させることができるが、薬を中止するとほとんどの症例で肝炎が再燃するため、HBVの完全排除ができない状況にある。

本研究はHBVが宿主の自然免疫応答、

特にIFN応答性やIFN産生システムにどのような影響を与えているか明らかにすることを目的としている。この目的を達成するために、前年度にHBVの細胞内増殖モデルシステムや各種HBVタンパク質を恒常的に発現する各種ヒト培養細胞を作成した。今年度はこれらのモデルシステムを使うことにより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ことを目的とした。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) 細胞内の HBV ゲノム DNA の認識機構の解析.

前年度、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が、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 の産生を誘導することが分かった。そのため、この HBV の細胞内増殖モデルシステムは poly (dA:dT) による IFN の産生を抑制する HBV タンパク質の探索には有用であるものの、細胞内の HBV ゲノム DNA の認識に関わる宿主因子の探索には労力を要することが予想される。そこで、本年度は、poly (dA:dT) とは配列や三次構造が異なる人工二本鎖 DNA : poly (dG:dC) による IFN 産生誘導能を指標として、HBV ゲノム DNA の認識に関わる宿主因子の探索に利用できる細胞をさらに絞り込むことを試みた。

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、poly (dG:dC) を導入し、IFN-beta や IFN 誘導遺伝子群 (OAS1、IRF7、ISG15、ISG56 および IP-10) の発現誘導量を調べた。また、その他のヒト不死化肝細胞 (NKNT-3 と OUMS29) や肝がん細胞株 (HuH-7、Li23、HepG2、PLC/PRF/5、HT17 および HLE 細胞) にも同様に、poly (dG:dC) を導入し、IFN 産生能を調べた。さらに、HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA も人工的に作成し、同様に細胞

内に導入後、IFN 産生能を調べた。poly (dG:dC) を含む人工二本鎖 DNA の導入には、Lipofectamine2000 を用い、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。

上記の実験により、細胞間で poly (dG:dC) に対する IFN 産生能に違いが認められた場合には、当研究室の様々な肝由来の細胞株の遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイ解析したデータを用いて、poly (dG:dC) の認識に関与する宿主因子を比較し同定する。

(2) 二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する HBV の抑制機構の解析.

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)。その他、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。前年度、作成した HBs

タンパク質 (Small、Middle 及び Large)、HBe タンパク質、HBc タンパク質、HBx 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ヒト培養細胞を用いて、細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する HBV タンパク質が存在するかどうかを調べた。

各種 HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞に、人工二本鎖 DNA を導入後、IFN 産生能に対する影響を調べた。人工二本鎖 DNA の導入には、Lipofectamine2000 を用い、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に廃棄した。

C. 研究結果

(1) 細胞内の HBV ゲノム DNA の認識機構の解析.

最初に、poly (dA:dT) とは配列や高次構造が異なる poly (dG:dC) をトランスフェクションにより PH5CH8 細胞に導入した。しかしながら、IFN-beta や IFN 誘導遺伝子群 (OAS1、IRF7、ISG15、ISG56 および IP-10) の発現が誘導さ

れなかった。そこで、その他のヒト不死化肝細胞 (NKNT-3 と OUMS29 細胞) や肝がん細胞株 (HuH-7、Li23、HepG2、PLC/PRF/5、HT17 及び HLE 細胞) に poly (dG:dC) を導入し同様に解析した。その結果、NKNT-3 と Li23 細胞でのみ ISG56 の発現が誘導されることが分かった。

このような現象の違いを引き起こす原因を探るために、次に、様々な肝由来の細胞株の遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイ解析したデータ (当該研究室独自で実施し保有しているデータ) を用いて、これまでに外来二本鎖 DNA の認識に関与すると報告されている宿主因子のシグナル強度を比較した。その結果、NKNT-3 と Li23 細胞でのみ、細胞内二本鎖 DNA を認識する宿主因子として最近同定された cGAS のシグナル強度が高いことが分かった。そこで、これらの細胞の cGAS の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により定量的に測定した。その結果、マイクロアレイ解析で得られた結果と同様の結果が得られた。また、初代ヒト肝細胞やヒト肝臓から得られた全 RNA においても、cGAS の発現を確認できたことから、正常肝細胞でも cGAS は機能しているものと思われる。一方、cGAS をノックダウンした Li23 細胞では、poly (dG:dC) だけではなく、人工的に合成した HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA に対する応答性も抑制されていることが分かった。従って、cGAS が HBV のゲノム DNA も認識できると予想された。

(2)二本鎖DNAにより誘導されるIFN産生に対するHBVの抑制機構の解析.

HBs タンパク質(Small、Middle 及び Large)、HBe タンパク質、HBc タンパク質、HBx 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 細胞を用いて、HBV タンパク質が細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する機能を有するかどうかを調べた。

これらの細胞に、Lipofectamine2000 を用いて、poly (dG:dC)を導入 6 時間後の細胞から、全 RNA を抽出し、ISG56 の mRNA 量を定量的に測定した。しかしながら、いずれの HBV タンパク質を発現している細胞においても poly(dG:dC)による ISG56 の誘導抑制は認められなかった。

D. 考察

(1)細胞内のHBVゲノムDNAの認識機構の解析.

今年度、当研究室が所有する様々な肝がん細胞株やヒト不死化肝細胞株に、poly (dA:dT)とは配列や高次構造が異なる人工二本鎖 DNA である poly (dG:dC)を導入したところ、Li23(肝がん細胞株)と NKNT-3(ヒト不死化肝細胞株)の 2 種類の岡山大学オリジナル細胞で IFN 応答性を示した。Li23 細胞は poly (dG:dC)だけでなく、HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA に対しても IFN 応答性を示したことから、最近、細胞内二本鎖 DNA の認識に関与する宿主因子として同定された cGAS が関与していることが示唆された。cGAS は、

単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスといった DNA ウイルスの感染認識に関与していることが報告されている。HBV もこれらのウイルスと同じ DNA ウイルスに属していることから、今年度得られた実験結果は HBV の感染認識に cGAS が関与していることを示している。しかしながら、今年度、使用した HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA は人工的なものであるため、次年度は、Li23 細胞に感染性 HBV 粒子を感染させる実験系を用いる予定である。現在、使用可能な HBV 複製細胞は感染性 HBV 粒子の産生量が低いため、培養上清を濃縮し、HBV の感染実験に供する必要がある。また、ヒト培養細胞を用いたより効率の良い 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予定である。

(2)二本鎖DNAにより誘導されるIFN産生に対するHBVの抑制機構の解析.

今年度の実験においては、HBV タンパク質に細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する活性は認められなかった。しかしながら、今回使用した HBV タンパク質は、いずれも遺伝子型 C に属する特定のウイルス株由来の物であった。そのため、次年度は、別のウイルス株や遺伝子型 C 以外ウイルス株由来の各種 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てさらに検討を加える予定である。

また、HBV タンパク質単独では、細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN

産生に対する抑制効果を示さない可能性もある。そこで、次年度は、現在、当該研究室で使用可能な HBV 複製細胞株を用いて、細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する抑制効果の有無を調べる予定である。

E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。(1) 細胞内二本鎖 DNA の認識に関与する宿主因子として最近同定された cGAS が HBV のゲノム DNA を認識することが示唆された。(2) 遺伝子型 C の各 HBV タンパク質に細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する活性は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. PLoS One. 9, e91156 (2014).
- 2) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. Biochem. Biophys. Res. Commun., in press (2014).
- 3) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi

Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. Hepatology, 58:1236-1244 (2013).

- 4) 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, 9, e1003345 (2013).

2. 学会発表

- 1) 團迫 浩方、佐藤 伸哉、溝上 雅史、池田 正徳、加藤 宣之. B 型肝炎ウイルスの自然免疫応答モデルの構築. 第 28 回 中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月.
- 2) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、佐藤 伸哉、團迫 浩方、加藤 宣之. 肝細胞株における HBV 複製能の評価. 第 28 回 中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月.
- 3) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、團迫 浩方、加藤 宣之. HBV 複製系の開発に向けた肝細胞株の選択. 第 17 回日本肝臓学会大会(JDDW)、東京、2013 年 10 月.
- 4) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之. ヒト肝細胞株における HBV 複製能の評価. 第 61 回 日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

年11月.

- 5) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、
佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、
加藤 宣之. HBV持続感染培養系の
確立に向けたヒト肝細胞株のHBV複
製能の解析. 第36回日本分子生
物学会年会、神戸、2013年12月.

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

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（平成25年度）

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：ヒト肝細胞におけるHBVに対する自然免疫応答機構を明らかにし、これを利用したHBV感染増殖抑制方法を開発する目的で、本年度はHBV感染増殖を検出する事が可能であり、本来のヒト肝細胞に近い自然免疫機構を有する培養細胞を用いてHBVのインターフェロン（IFN）感受性の検討をおこなった。まず当研究室で独自に樹立した不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞のIFN誘導について検討した。近年ヒト肝細胞の自然免疫反応重要な役割を果たすことが報告されているIII型IFN（IFN- λ ）のウイルス感染初期の機能について解析し、以下の結果を得た。ヒト肝細胞ではRNAウイルスの感染によってI型IFNとIII型IFNが協調的に誘導され、長期的な誘導は主としてIII型IFNであることが明らかとなった。また、HuS-E/2細胞に遺伝子型CのHBV遺伝子を含むプラスミドを導入したところ、長期間、HBV遺伝子が複製し、培養上清にHBV粒子を産生することを示唆する結果を得た。この細胞をIFN- α あるいはIFN- λ で処理することで有意に培養上清中のHBV DNAが現象したことから、IFN処理はヒト肝細胞で複製するHBVを直接抑制する可能性が考えられ、このIFNによる効果を高める事がHBV治療に有用であることが考えられた。

A. 研究目的

当研究室で独自に樹立し、初代培養ヒト肝細胞に類似した性質を有するヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞を用いて、B型肝炎ウイルス（HBV）の生活環を効率良く再現し、この培養細胞系を用いて HBV 感染増殖を抑制する自然免疫機構を明らかにすることを第一の目的とした。第二の目的として、その自然免疫系を活性化することにより、HBV 感染増殖を抑制する抗 HBV 薬候補を同定しすることを目的とした。

B. 研究方法

1) HBV 感染の宿主細胞であるヒト肝細胞の自然免疫システムを包括的に解明するため、独自に樹立したヒト不死化肝細胞

HuS-E/2 細胞の自然免疫系について解析した。これまでに、初代培養ヒト肝細胞(PHH)と HuS-E/2 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を見出していたので、特に IFN α 1 のウイルス感染に対する役割を解析した。ウイルス非感染の HuS-E/2 細胞を IFN α 中和抗体あるいは IFN 受容体に対する中和抗体で前処理してセンダイウイルス等を感染させ、感染後の自然免疫系の誘導ならびにウイルスの感染増殖を解析した。また、この時、誘導される IFN λ について、IFN α との相互作用について検討をおこなった。

2) IFN の HBV 増殖に対する効果を検証するため、遺伝子型 D の HBV ゲノムが恒常

的にトランスフェクションされている HepG2.2.15.7 細胞ならびに 1.24 倍長の遺伝子型 C の HBV ゲノムを含むプラスミドを一過性にトランスフェクションした HuS-E/2 細胞を IFN α あるいは IFN λ で処理し、HuS-E/2 細胞における HBV 遺伝子複製の確認ならびに培養液中への HBV DNA 放出量の定量による HBV 増殖に対する IFN の効果を検討した。

3) HuS-E/2 細胞に恒常的に HBV 受容体分子、NTCP を発現させることを目的として、京都大学ウイルス研究所の藤田尚志教授より、NTCP-tGFP 発現プラスミドを供与していただき、このプラスミドを恒常的に導入した HuS-E/2 細胞の作成をおこなった。

(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。

C. 研究結果

1) ウイルス非感染の HuS-E/2 細胞を IFN α 中和抗体あるいは IFN 受容体に対する中和抗体で前処理することで恒常発現している IFN α 1 の効果を抑制することができた。その後、センダイウイルス等を感染させると前処理しない細胞では、ウイルス感染によ

って、RIG-I や IRF7 などの遺伝子発現が誘導されるが、前処理によってその発現が抑制あるいは遅延することがわかった。また、ウイルスの増殖が前処理によって亢進されることも明らかになった。前処理無しの HuS-E/2 細胞において、ウイルス感染により I 型 IFN と III 型 IFN が誘導された。I 型 IFN と III 型 IFN はそれぞれ細胞膜上の受容体が異なることが知られているが、IFN 刺激により誘導される遺伝子群は共通するものが多いことが知られている。そこで III 型 IFN 受容体の発現を siRNA で抑制することで、ウイルス感染初期のヒト肝細胞における I 型 IFN と III 型 IFN の役割についても解析をおこなった。その結果、この細胞では I 型 IFN と III 型 IFN が協調して、抗ウイルス自然免疫効果を誘導していることがわかった。

2) HepG2.2.15.7 細胞を IFN α あるいは IFN λ で処理し、その培養上清中の HBV DNA 量の継時変化を測定したところ、IFN α は比較的高い力価による処理でもほとんど影響がなかった。IFN λ による処理もあまり効果的ではなかったが比較的高い処理力価の場合に培養上清中の HBV DNA の低下が認められた。一方、一過性に HBV ゲノムをトランスフェクションした HuS-E/2 細胞を同様に処理した場合は、IFN α 処理でも IFN λ 処理でも処理後 3 日には培養上清中の HBV DNA が 10 分の 1 程度に低下することがわかった。

3) HuS-E/2 細胞に NTCP-tGFP 発現プラスミドを導入し、薬剤選択によりクローンを 23 クローン得た。tGFP の蛍光を指標にして、発現が蛍光顕微鏡下で観察する事が可能な

クローンを選択した。次にこれらのクローンにおけるタンパク質発現をイムノブロット法で検証した結果、おそらく糖鎖修飾を受けた NTCP-tGFP タンパク質が強く発現している細胞 2 クローンを得た。

D. 考察

これまで HuS-E/2 細胞は PHH と非常に類似した遺伝子発現様式を示していることがわかってきた。そこでこの細胞は PHH 同様の抗ウイルス自然免疫機構を有し、PHH の代わりにウイルス感染と宿主自然免疫系の解析に用いることが可能であると考えられた。PHH ならびに HuS-E/2 細胞ではウイルス非感染時に極低レベルの IFN α 1 の発現があるが、この活性を低下させることでウイルス感染後の自然免疫系の低下や遅延を引き起こすことは、この恒常発現 IFN α 1 がヒト肝細胞における抗ウイルス機能として役立っていることを示すものと考えられる。また、その時、効率的な抗ウイルス効果を誘導するためには I 型 IFN と III 型 IFN の協調的な作用が機能している可能性が考えられた。本研究結果から、HuS-E/2 細胞で複製し粒子を産生していると考えられる組換え体 HBV は、I 型 IFN も III 型 IFN 処理でも有効に抑制されることから、これらの抗ウイルス効果は直接ウイルス感染細胞に働き、少なくとも HBV 粒子の培地への産生を抑制する働きがあることがわかった。今後、各 IFN が実際に HBV 増殖のどの過程を抑制するのか、またその効果を高めるためにはどのような方法が最適であるかなど検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

HuS-E/2 細胞は、特に自然免疫系が PHH と比較的類似した細胞であることから、今

後、HBV 感染増殖によって誘導される自然免疫系の解析に有用である事がわかった。このことは、これまでの HBV 培養系ではみることの出来なかった自然免疫関連の薬剤のスクリーニングや評価に用いることが可能であることを示している。現在得られている HBV 受容体因子 NTCP 発現 HuS-E/2 細胞は今後の HBV 研究や抗 HBV 薬開発に有用であると期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0089869

2. 学会発表

1) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において I 型および III 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸 2013 年

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠、肝炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日

2. 実用新案登録

3. その他

1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、膵臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074026、出願日 2013/09/06

2) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腎臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074028、出願日 2013/09/06

3) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腸上皮由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074032、出願日 2013/09/06

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
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
分担研究報告書

B型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨： Natural Killer (NK)細胞は自然免疫系において重要な働きを担っている。HBV 複製細胞株と健常人末梢血由来のNK細胞を共培養し、HBV感染によってNK細胞の活性が樹状細胞を介さずに直接低下していることを明らかにした。さらに、HBV感染細胞との共培養によるNK細胞の抑制は、IL12の投与によって回復し、HBVに対する抗ウイルス活性も上昇した。今後、HBV感染時にNK活性を抑制する因子の同定を進め、これらの宿主因子を標的として、宿主免疫を賦活化させることでHBVを排除できる新しい創薬の可能性を検討する。

A. 研究目的

B型肝炎に対するインターフェロン (IFN) 治療の奏効率は低く、標準治療である逆転写酵素阻害剤は、核内に存在するcccDNAには効果が無く、さらに一生涯に渡って服用する必要がある。そのため、HBV感染を根治するには、免疫応答に関わる新たな宿主因子の同定と、その分子を標的とした創薬が重要である。本研究では、HBV感染におけるNK細胞の活性抑制機構を明らかにすることによって、新たな治療標的を同定することを目的とした。

B. 研究方法

健常人から採取したNK細胞をHBV複製細胞と共培養し、HBV-DNAの複製能に与える影響を検討した。また、NK細胞とHepG2/Huh7細胞、及びHBV複製細胞株であるHepG2.2.15/T23/YE12細胞を共培養し、IFN α 500U/mlで刺激後、上清中のIFN γ をELISA法で定量した。また、HBV感染細胞と共培養するNK細胞にIL12を添加し、IFN γ の産生能とHBV-DNAの複製への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている

「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HBV持続複製細胞であるHepG2.2.15、および、1.28倍長のHBV-DNAを導入したHuh7細胞において、NK細胞との共培養により、HBV DNAの複製は有意に抑制された。また、HepG2/Huh7細胞と共培養したNK細胞に比べ、HepG2.2.15/T23/YE12細胞と共培養したNK細胞は、IFN γ 産生能が低下していた。1.28倍長HBV DNA導入後のHepG2細胞においても同様の結果であったが、各ウイルス蛋白質だけを発現させたHepG2細胞との共培養では、NK細胞の活性低下は認められなかった。HepG2.2.15/T23/YE12細胞の上清でNK細胞を培養しても、同様にIFN γ 産生能の低下を認めた。以上のことから、HBV感染細胞はNK細胞のサイトカイン産生能を抑制することが示唆された。また、IL12を添加し、共培養することによって、NK細胞のIFN γ の産生能が回復し、HBVに対する抗ウイルス活性が増強した。

D. 考察

HBV感染に伴って、NK細胞の活性が直接

抑制されている可能性が示唆された。さらに、IL12の添加により、NK細胞の活性は回復したことから、IL12の投与がNK細胞を介した新たな治療標的になる可能性が示唆された。今後はその抑制機構の解明を検討する予定である。

E. 結論

HBV感染細胞は、NK細胞の活性化能を直接抑制する。

F. 健康危険情報

特になし。

・ 研究発表

1. 論文発表

1. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, and 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.
2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS. Pathog.*, 2013 (doi: 10.1371/journal.ppat.1003589).
3. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, and Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110, 12379-12384.
4. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2013, 57, 1705-1715
5. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, and Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol.*, 2013, 87, 9997-10003.
6. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura

Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J. Proteome Res.*, 2013, 12, 2537-2551.

7. Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, and Kobayashi R. Ca (2+)/S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 2013, 33, 1008-1018.
 8. Takei F, Tani H, Matsuura Y, and Nakatani K. Detection of hepatitis C virus by single-step hairpin primer RT-PCR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013 (doi: 10.1016/j.bmcl.2013.10.021).
- #### 2. 学会発表
1. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
 2. Toru Okamoto, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
 3. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links" Marsala, Italy, October 20th-21st, 2013.
 4. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, Infectious diseases in elderly symposium, Izmir, Turkey, October 25th-29st, 2013.
 5. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, November 16th-17st, 2013
 6. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合