

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、 $\alpha$  型を含むインターフェロンの誘導、インターフェロ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

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

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)複数のストラテジーによって 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。

B. 研究方法

9つのグループによって研究を分担し、複数のストラテジーによる 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-I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。