

201321012A

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
(H24-B創-肝炎-一般-013)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
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…………… 1 (名古屋市立大学 大学院医学研究科 田中 靖人)	
II. 分担研究報告書	
1. 日本人由来のヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルスの持続感染モデルの作成 ……………21 (九州大学 大学院消化器・総合外科 調 憲)	
2. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた HBV 感染評価系の開発 ……………23 (大阪大学 大学院薬学研究科 水口 裕之)	
3. キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV 長期感染系の検討 ……………28 (株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 石田 雄二)	
4. 肝機能維持に最適な 3 次元培養法の構築 ……………31 (公益財団法人東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 棟方 翼)	
5. 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 ……………34 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 松永 民秀)	
6. HBV の細胞内ライフサイクルに及ぼす miRNA 機能の解析 ……………45 (国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 落谷 孝広)	
7. 検体からの脂質調製とリピドミクス解析・多変量解析 ……………48 (秋田大学 生体情報研究センター 中西 広樹)	
8. 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 ……………51 (国立感染症研究所 細胞化学部 深澤 征義)	
9. 自然免疫認識機構の制御による HBV 複製への影響 ……………55 (北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 高岡 晃教)	
10. 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 ……………60 (名古屋大学 大学院医学系研究科 石川 哲也)	
11. 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 ……………63 (大阪大学 大学院医学系研究科 石井 優)	

12. 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	66
(北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野 坂本 直哉)	
13. HBV 増殖に関わる肝細胞環境因子の同定	69
(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 池田 正徳)	
14. 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	72
(京都大学ウイルス研究所 土方 誠)	
15. B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容細胞株の樹立とこれを用いた HBV 感染機構の解析	75
(国立感染症研究所 ウイルス第二部 渡士 幸一)	
III. 研究成果の刊行一覧	79
IV. 研究成果の刊行物・別冊	85

I. 総括研究報告書

研究課題: 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

研究代表者: 田中 靖人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授

研究要旨: B型肝炎ウイルス(HBV)根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構から病態メカニズムの解明、薬剤スクリーニングを効率的に実施できる簡便なシステムを構築することが重要である。すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1)最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2)新規培養システムの構築: HBV DNA産生能が高いHep38.7-Tet細胞及びHepG2.2.15.7細胞を用いた低分子化合物のスクリーニング系を構築し、オキシステロールなど複数の抗HBV活性を有する化合物を同定。HepG2-hNTCP-C4細胞は血清由来及びHBV複製細胞由来のHBVに対して感染許容性を示し、この感染はHBs抗体、NTCPトランスポーター阻害剤あるいはシクロスポリンA及びその誘導体などにより阻害。キメラマウス由来の肝細胞を用いたHBV持続感染培養系を構築し、HBV感染防御試験や薬剤感受性試験を開始。遺伝子型間で保存されている3カ所の塩基配列を標的としたsiRNAやHBV感染により変化するmicroRNA、高度不飽和脂肪酸(アラキドン酸、EPA、DHA)及びhexadimethrine bromideによるHBV産生・放出阻害を証明。(3)ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、免疫反応): HBVはRIG-Iを介してⅢ型IFNs誘導。Pre-genomic RNA (pgRNA)がRIG-Iのリガンドであり、RIG-Iは62-mer領域を認識し自然免疫応答を活性化するのみならず、HBVタンパク質を阻害。(4)HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)、(5)生体多光子励起イメージングを駆使して、*in vitro/in vivo*におけるHBVウイルス動態の可視化、さらに感染経路、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながる事が強く期待される。

A. 研究目的

チンパンジーやキメラマウス等を用いずに薬剤の評価ができる方法としては、これまでにヒト肝由来細胞を透過性を有する中空系の内腔に充填された細胞に、肝炎ウイルスを感染させて培養する方法等が報告されている。しかしこの方法においては、少量

の細胞で多種の試験を行うのが困難であり、より簡便で高い効率で肝炎ウイルスを感染・増殖できる系が望まれている。本研究班では、B型肝炎ウイルス(HBV)根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖

機構から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することが重要である。すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1) 最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2) 新規培養システムの構築(3次元培養)、(3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、トランスポーター、免疫反応)、(4) HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)により、できるだけ早期にHBV持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B型肝炎創薬実用化研究の推進を目指す。また、(5) 生体多光子励起イメージングを駆使して、*in vitro/in vivo*におけるHBVウイルス動態を可視化し、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながる事が強く期待される。

B. 研究方法

(田中) a) 組換えDNA実験に関する大臣申請用の書類を作成・分担者へ配布。b) 1.2倍長のHBV plasmid (HBV genotype A~C)及び肝細胞株を各分担施設に分配(MTA提携)。c) ヒト肝細胞キメラマウスを用いたHBV感染培養系の構築。d) キメラマウス肝細胞2次元あるいは3次元培養による*in vitro* HBV感染中和試験:ビームゲン®由来の抗体前処理後にHBVを添加。e) キメラマウス肝細胞96穴/単層培養による*in vitro* HBV感染系の構築。ハイスループット薬剤感受性試験の実施。

最適なヒト肝細胞の選択

(水口) Adベクターを用いたFOXA2、HNF1 α 遺伝子導入法を改良した方法で、ヒトES/iPS細胞由来肝細胞の分化誘導及び細胞への遺伝子導入。ヒトES/iPS細胞由来肝細胞を肝障害免疫不全マウス

(uPA-SCIDマウス)へ移植し、ヒト肝臓キメラマウスを作成。(石田) 昨年の報告書に記載した方法に従って32日目まで培養を継続、HBV DNA 定量及びHBsAg陽性細胞数(免疫染色)をカウントした。HBIG(ヘブスブリン)は、2日目以降、500 ng/wellで培地に添加。(調)九州大学の倫理委員会で承認され、同意書を得た生体肝移植ドナーよりコラゲナーゼ灌流法で肝細胞を採取。uPA/SCIDマウスに接種し、キメラマウスの作成及びHBV感染実験を実施。

新規培養システム(3次元培養)の構築

(棟方) 初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞をCell-ableプレート(3D)、またはコラーゲンコートした平面プレート(2D)に播種し、肝機能及びHBVの増殖性を比較。保存性の高いHBVプレゲノムRNAの3領域を標的としたsiRNAを設計し、肝細胞への効率的なDDSである多機能性エンベロープ型ナノ構造体のpH応答性MENDに包含した。HBV持続感染培養系及びヒト肝細胞キメラマウスを用いてpH応答性MEND/siRNAmixのHBV増殖と抗原量抑制効果を評価。(松永) 希少なhuman adult hepatocytes(HAH)に代わる肝細胞として増殖能力が非常に高いhuman fetal hepatocytes(HFH)及び無限に自己増殖可能なhuman induced pluripotent stem cells(iPS cells)-derived-hepatocytes(HiH)を利用し、3次元培養法によるヒト肝臓を模したモデルを構築し、HBV感染実験を実施。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

(落谷) キメラマウス由来ヒト肝細胞: 2×10^6 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2, 5, 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2, 5, 12日目、10 mL各1検体ずつ)のmicroRNA発現の網羅的解析を続行し、HBV感

染に関連のある microRNA を選別した(図1)。

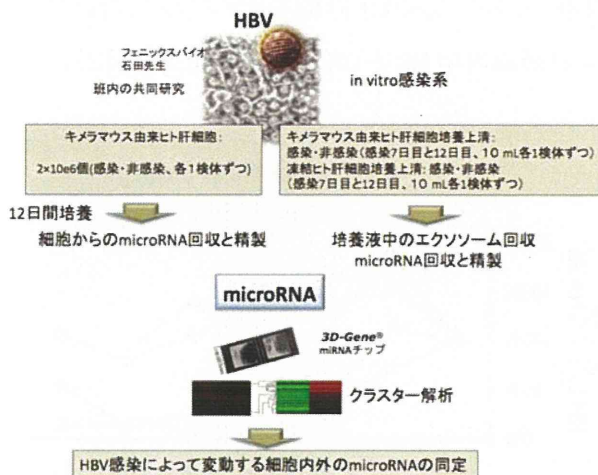


図1

(中西)上記と同様のサンプルより脂質を抽出し、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。(深澤)HBV 持続感染細胞として Hep2.2.15.7 細胞を用いて、HBV 産生に対する宿主脂質関連化合物の影響を解析する。HepG2 細胞に pcDNA3.1/NTCP-FLAG (C 末に FLAG タグを付けた NTCP) を導入後、NTCP-FLAG を発現する細胞クローン(#2)を樹立。抗 NTCP モノクローナル抗体作製の試み。(石川)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)、ヒト肝癌細胞(HepG2, Huh-7)、ラット肝癌細胞(MH1C1)、マウス線維芽細胞(MEF)、ヒト腎癌細胞(HEK293)、NTCP 発現 HEK293 (NTCP-HEK293)に感作し、1~24 時間後の細胞内局在を、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。(石井)平成 24 年度に確立していた肝臓の生体多光子励起イメージングによる可視化系をさらに改良し、特に肝臓内での肝細胞や類洞血

管を標識して明瞭に可視化する他、HBV ウィルスモデル粒子(BNC)を蛍光標識し、その肝臓内動態を可視化する系を開発した。(高岡)RNA pull down による 62-mer RNA と RIG-I との相互作用の解析。Encapsidated HBV DNA の定量。キメラマウスにおける 62-mer RNA-MEND 投与: HBV 感染後 4 weeks のキメラマウスに対して、2 日おきに、62-mer RNA-MEND、control-MEND を投与。血清 HBV DNA copy は Q-PCR にて定量。OCT 包埋した肝組織を免疫染色により HBV 感染を確認。

HBV 感染感受性環境の構築

(渡士) HepG2-hNTCP-C4 細胞の単離。Hep38.7-Tet 細胞由来の HBV 約 12000GEq/cell を 4% PEG8000 存在下で 16 時間処理することにより、HBV 感染後 12 日目の培地中 HBs 抗原、HBe 抗原、細胞内 HBV DNA、cccDNA、HBc タンパク質をそれぞれ検出した。HBV 感染を阻害するためには、Myrcludex-B 100 nM を HBV 感染時に処理した。(土方)独自に樹立しているヒト不死化肝細胞、HuS-E/2 細胞及び肝幹細胞様 HMY1 細胞において、HBV 遺伝子複製ならびに粒子産生が効率良く行われるか否かについて検討。HepG2.2.15.7 細胞培養上清(HBV 粒子含有)を用いた感染実験。(池田)ヒト肝癌細胞株 (HuH-7, Li23, HepG2, Hep3B)およびヒト不死化肝細胞株(PH5CH8, NKNT3)における HBV 増殖について検討。HepG2.2.15 細胞に NTCP を強制発現させて HBV 増殖能を確認。(坂本)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及び各ゲノタイプの HBX 蛋白強制発現プラスミドを構築。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。

C. 研究結果

(田中) キメラマウス由来の肝細胞を用いたHBV持続感染系を構築した。ビームゲン(genotype C)由来のモノクローナル抗体により、genotype Aやワクチンエスケープ変異株のHBV感染を防御可能。96穴plateを用いたハイスループット薬剤感受性試験を開始。新規化合物の薬効評価。microRNA解析、リポドミクス解析のための研究計画を立案・実施。microRNAによるHBV複製制御の解析。

最適なヒト肝細胞の選択

(水口) HBV 発現アデノウイルスベクター作製(70%以上の導入効率)、HBV複製を確認。ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞をuPA-SCIDマウスに移植し、キメラマウス作成に成功: 血中ヒトアルブミン濃度は、凍結ヒト肝細胞を移植したマウスに匹敵する非常に高い濃度のヒトアルブミンが検出された。

(石田) 接種後12-22日目までは、上清のHBV DNA量は 1×10^7 copies/mL程度であったが、27日目で明らかに上昇し、32日目では 5×10^7 copies/mLを超えた。HBsAg陽性の細胞の割合も、接種12日目から32日目にかけて10%から80%に上昇したが、持続的にHBIGを培地に添加すると、HBV DNA量とHBsAg陽性細胞の増加が完全に阻害された。

(調) 十分な細胞数と生着率の得られた27歳ドナーからの肝細胞を用いて、高置換ヒト肝細胞キメラマウスを作成に成功。HBV持続感染も証明された。

新規培養システム(3次元培養)の構築

(棟方) 3次元培養系はコラーゲンコートした2次元培養プレートに比べて遺伝子型Cの細胞あたりのウイルス産生量は2次元培養系より7倍、キメラマウスの肝臓より300倍多かった。また、培地中の子孫ウイルスは高い感染性を有しており、自然感染で他の細胞に感染拡大した。pH応答性MEND/siRNAmixは、本培養系において単回投与で

14日間HBV産生量を抑制。また、5mg/kgで単回投与したHBV感染ヒト肝臓キメラマウスにおいても、14日間血清中HBV-DNA量を抑制した(図2)。

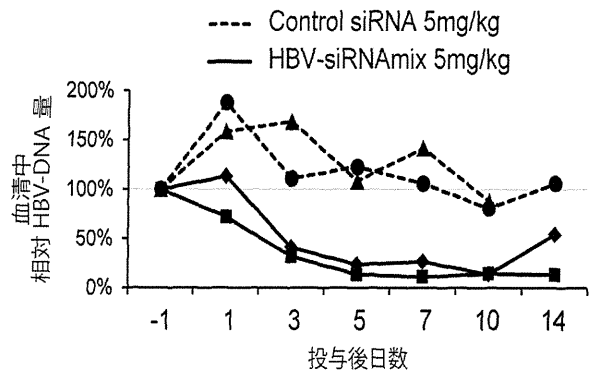


図2

(松永) 3次元培養法では、そのスフェロイド外膜表面は肝臓血管側特異的に発現するトランスポーターNTCP、OATP1B1が発現し、肝臓毛細胆管側で発現するトランスポーターの発現は低かった。また、3次元培養によって肝細胞機能が亢進したことに加え、肝細胞スフェロイドがHBVレセプターであるNTCPをその外膜に強発現しており、HBV感染は3次元培養法を用いることで上昇した。HFH、HiHはHAHと同様にHBV感染性を有することが証明された。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

(落谷) HBV感染によって5倍以上の発現上昇を認めたmiR-3649あるいは発現が顕著に低下するmiR-30cに焦点を当てて、検討した。HBV感染によって発現上昇するmiR-3649は、主にかん抑制遺伝子や転写制御因子を制御する可能性が示された。また発現の低下したmiR-30cはras関連遺伝子やヒストン修飾に関与する遺伝子群を制御する可能性が示唆された。(中西) HBV感染によりLysoPC、LysoPEとPIP2の量が増加。その内訳を詳細に解析すると不飽和度が高い分子種の割合が増加傾向にあった。一方、同じリゾリン脂質でもLysoPIや

LysoPS の量はほとんど変動しなかった(図3)。また、網羅的解析により生体膜主要成分を分析したところスフィンゴリン脂質であるセラミドが増加(図4)。

図3. HBV感染によるイノシトールリン脂質の変動

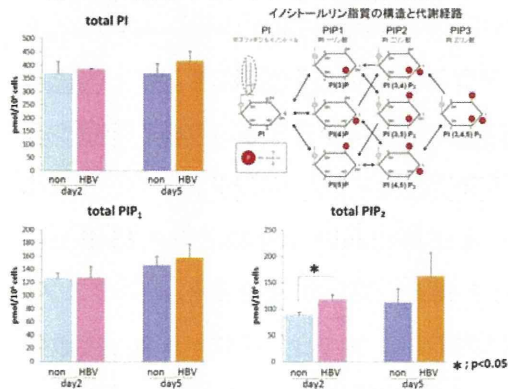
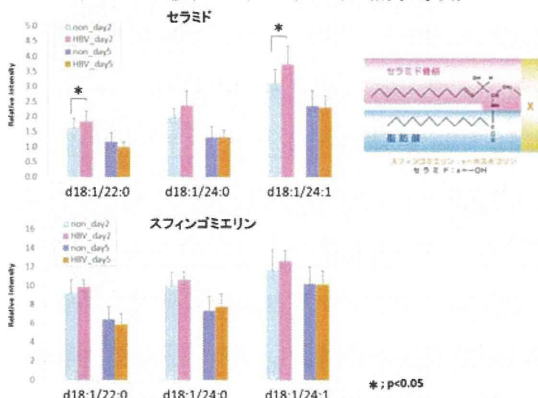


図4. HBV感染によるスフィンゴリン脂質の変動



(深澤)多価不飽和脂肪酸については、10 μ M アラキドン酸、EPA、DHA などの高度不飽和脂肪酸が HBV 産生を抑制することが見出された。NTCP の安定発現 HepG2 細胞株(HepG2-hNTCP-C4)が HBV 感染を再現できることが示されたが(Biochem. Biophys. Res. Commun. 443, 808-813 (2014))、その感染効率はそれほど高くはなかった。(石川)HBs 粒子は不死化ヒト肝細胞(HuS-E/2)において最も効率よく取込まれたが、ヒト肝癌細胞(HepG2, Huh-7)などでの取込み効率は低かった。HuS-E/2における、種々のエンドサイトーシス阻害剤を用いた取込み阻害実験より、HBs 粒子の取込みには、ダイナミン依存的経路、マクロピノサイトーシスが利用されること

が示唆された。また、NTCPは主にHBVの細胞表面への接着に関与し、実際の細胞内侵入にはアシアロ糖タンパクレセプター(ASGPR)が関与することが示唆された。(石井)HBV 表面抗原(HBsAg)を発現させたバイオナノカプセル(BNC)に抗 ASGPR 抗体を負荷してマウス肝細胞への取り込み能を賦与した粒子を蛍光標識し、これを *in vivo* (2光子励起顕微鏡)で投与・観察することで、肝細胞への粒子の取り込み及び初期免疫応答を可視化する実験系を世界に先駆けて確立(図5)。

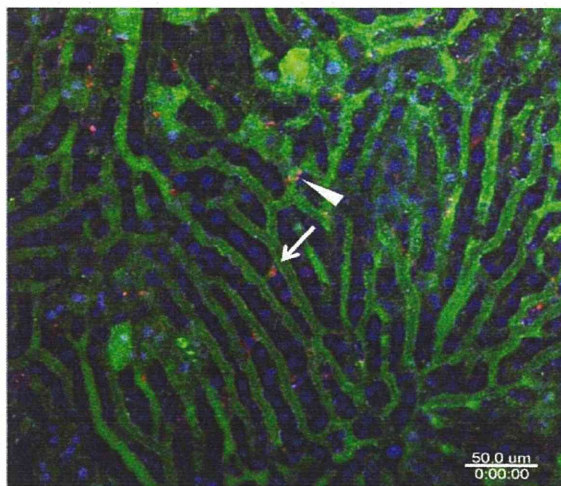


図5

(高岡)HBV は RIG-I を介して III 型 IFNs 誘導。Pre-genomic RNA (pgRNA)が RIG-I のリガンドであり、RIG-I は、62-mer 領域を認識し自然免疫応答を活性化するのみならず、HBV タンパク質を阻害するという直接的な抗ウイルス因子としての新しい役割を担っていることも見出した。リポゾームに load させた 62-mer RNA-MEND を作成し、ヒト肝細胞のキメラマウスを用いた *in vivo* の実験を遂行させ、62-mer RNA の治療応用の可能性を示した。

HBV 感染感受性環境の構築

(渡士)HepG2-hNTCP-C4 細胞は HBV 感染後に HBs 抗原、HBV DNA、cccDNA、HBc 蛋白の発現を

認め、これらシグナルは HBV 侵入を阻害することが知られているペプチドを感染時に処理することにより有意に低下。また NTCP トランスポーター阻害剤やシクロスポリン誘導体を処理することにより、この細胞への HBV 感染は阻害された。HBV 感染 HepG2-hNTCP-C4 細胞において小規模な化合物スクリーニングを行った結果、酸化ステロールが HBV 感染を阻害することが示された。

(土方)HuS-E/2 細胞及び肝幹細胞様 HMY1 細胞において、HBV 複製が確認された。特に、HMY1 細胞では肝分化誘導させることで、NTCP の発現が上昇し、平面培養下においても、立体培養下においても、組換え体 HBV の感染が成立することがわかった。

(池田)pgRNA は HepG2 で最も高く、他の細胞では低い傾向がみられた。HBV 産生が可能な HepG2.2.15 細胞に NTCP を発現させたところ、HBV 増殖能が増強した。(坂本)HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍長 HBV 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。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。HBX 蛋白は SOCS3、PP2A による STAT1/2 の脱リン酸化促進により IFN 感受性を低下させることが示された。

D. 考察

できるだけ早期に HBV 持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B 型肝炎創薬実用化研究の推進を目指すために、4 つの大きな枠組みで研究班を継続した。**1) 最適なヒト肝細胞の選択:**キメラマウス由来のヒト肝細胞(石田)、ヒト胎児肝細胞、ドナー由来の正常肝細胞(調)、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞、インテグレーション・フリーヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞(水口)、不死化した各種

肝細胞(土方・池田)における HBV 感染・複製効率の検討を開始した。最適な細胞を選択し、HBV 感染培養ヒト肝細胞における HBV ライフサイクルを解析する。さらに、肝障害免疫不全マウスへの移植を行い、効率的な HBV 感染動物モデルを構築するとともに、キメラマウスの肝細胞を灌流して、日本人由来の初代肝細胞を大量に作成する。**2) 新規培養システムの構築及び薬剤スクリーニング:**25 年度までに、HBV DNA 産生能が高い Hep38.7-Tet 細胞及び HepG2.2.15.7 細胞を用いた低分子化合物のスクリーニング系を構築し、オキシステロールなど複数の化合物が HBV 感染阻害効果を有することを見出した。また、HepG2-hNTCP-C4 細胞は血清由来及び HBV 複製細胞由来の HBV に対して感染許容性を示し(Iwamoto, Watashi et al, BBRC 2013 in press)、この感染は HBs 抗体、NTCP トランスポーター阻害剤あるいはシクロスポリン A 及びその誘導体などにより阻害された(Watashi, S et al, Hepatology 2013 in press)。さらに、キメラマウス由来の肝細胞を用いた HBV 持続感染培養系を構築し、HBV 感染防御試験や薬剤感受性試験を開始している。遺伝子型間で保存されている 3 カ所の塩基配列を標的とした siRNA や HBV 感染により変化する microRNA、高度不飽和脂肪酸(アラキドン酸、EPA、DHA)及び hexadimethrine bromide による HBV 産生・放出阻害を証明した。**3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明:**キメラマウス由来ヒト肝細胞・培養上清及び凍結ヒト肝細胞・培養上清(HBV 感染・非感染)を用いて、microRNA 解析(落谷)及びリピドミクス解析(中西)を継続した。HBV 感染によって5倍以上の発現上昇を認めた miR-3649 あるいは発現が顕著に低下する miR-30c に焦点を当てて、機能解析を開始した。さらに、HBV 感染により LysoPC、LysoPE

と PIP2 の量が増加することがわかり、今後は HBV 感染培養系を用いて検証する。

高岡らの検討において、HBV は RIG-I を介して III 型 IFNs を誘導した。Pre-genomic RNA (pgRNA) が RIG-I のリガンドであり、RIG-I は 62-mer 領域を認識し自然免疫応答を活性化するのみならず、HBV タンパク質を阻害するという直接的な抗ウイルス因子としての新しい役割を担っていることも見出した。また、石川らは、HBV 粒子の可視化に成功。蛍光ラベル HBs 粒子はエンドサイトーシス(クラスリン介在性経路)により効率よく HuSE/2 細胞に取込まれ、細胞質内に局在。また、NTCP、アジアロ糖蛋白レセプターの阻害剤は、HuSE/2 細胞での取込みを抑制することより、新たなレセプターの存在が示唆された。今後は、石井ら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。**4) HBV 感染感受性環境の構築**: HepG2-hNTCP-C4 細胞、HuS-E/2 細胞及び肝幹細胞様 HMY1 細胞、HepG2.2.15-NTCP 細胞を樹立し、HBV 感染実験から生活環の解明及び薬剤スクリーニングを開始した。これまでに各種 HBV 持続培養系は構築され、引き続き新規薬剤の探索と機能解析を継続する。他のスクリーニング班(満屋班、小嶋班)との共同研究もすでに開始している。

E. 結論

1) 採取した 初代肝細胞あるいはヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を共同研究施設へ提供する体制を確立した。キメラマウス由来の培養ヒト肝細胞は、25°C 付近での数日間の輸送に十分耐えうる可能性があ

ることを示しており、幅広い HBV 感染の基礎研究への応用が期待される。

- 2) HBV DNA 産生能が高い Hep38.7-Tet 細胞及び HepG2.2.15.7 細胞を用いた低分子化合物のスクリーニング系を構築し、オキシステロールなど複数の化合物が HBV 感染阻害効果を有することを見出した。
- 3) HepG2-hNTCP-C4 細胞は血清由来及び HBV 複製細胞由来の HBV に対して感染許容性を示し、この感染は HBs 抗体、NTCP トランスポーター阻害剤あるいはシクロスポリン A 及びその誘導体などにより阻害された。
- 4) キメラマウス由来の 初代肝細胞を用いた HBV 持続感染培養系を構築し、HBV 感染防御試験や薬剤感受性試験を開始している。遺伝子型間で保存されている 3 カ所の塩基配列を標的とした siRNA や HBV 感染により変化する microRNA、高度不飽和脂肪酸(アラキドン酸、EPA、DHA) 及び hexadimethrine bromide による HBV 産生・放出阻害を証明した。
- 5) HBV は RIG-I を介して III 型 IFNs を誘導。pgRNA が RIG-I のリガンドであり、RIG-I は 62-mer 領域を認識し自然免疫応答を活性化するのみならず、HBV タンパク質を阻害した。
- 6) 蛍光ラベル HBs 粒子はエンドサイトーシス(クラスリン介在性経路)により効率よく HuSE/2 細胞に取込まれ、細胞質内に局在。NTCP、アジアロ糖蛋白レセプターの阻害剤は、HuSE/2 細胞での取込みを抑制することより、新たなレセプターの存在が示唆された。また、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。
- 7) 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2013;12(6):2630-40.
2. Wong DK, Watanabe T, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese. *PLoS One.* 2013;8(6):e66920.
3. Khan A, Al Balwi MA, Tanaka Y, Hajeer A, Sanai FM, Al Abdulkarim I, Al Ayyar L, Badri M, Saudi D, Tamimi W, Mizokami M, Al Knawy B. Novel point mutations and mutational complexes in the enhancer II, core promoter and precore regions of hepatitis B virus genotype D1 associated with hepatocellular carcinoma in Saudi Arabia. *Int J Cancer.* 2013;133(12):2864-71.
4. Matsui T, Kang JH, Nojima M, Tomonari A, Aoki H, Yamazaki H, Yane K, Tsuji K, Andoh S, Andoh S, Sakai H, Maemori M, Maguchi H, Tanaka Y. Reactivation of hepatitis B virus in patients with undetectable HBsAg undergoing chemotherapy for malignant lymphoma or multiple myeloma. *J Med Virol.* 2013;85(11):1900-6.
5. Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3484-91.
6. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α Trigger Restriction of Hepatitis B Virus Infection via a Cytidine Deaminase Activation-induced Cytidine Deaminase (AID). *J Biol Chem.* 2013;288(44):31715-27.
7. Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behaviour regarding its parental genotypes. *J Gen Virol.* 2013;94 Pt 12:2724-8.
8. Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in

- hematological malignant patients in south Egypt. *World J Gastroenterol*. 2013;19(37):6214-20.
9. Kusumoto S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Ueda R. Is Antiviral Prophylaxis Necessary to Prevent Hepatitis B Virus (HBV) Reactivation in Patients With HBV-Resolved Infection Receiving Rituximab-Containing Chemotherapy? *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4480.
 10. Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, **Tanaka Y**. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population. *PLoS One*. 2014;9(1):e86007.
 11. Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, **Tanaka Y**, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; the Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2014;59(1):89-97.
 12. Kusumoto S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved HBV infection following rituximab-containing chemotherapy. *Hepatology*. 2013 in press.
 13. Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, **Tanaka Y**, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology*. 2013 in press.
- ## 2. 学会発表
1. Murakami S, Watanabe T, Omagari K, Inoue T, Iijima S, Hamada-Tsutsumi S, Hayashi S, Tajiri K, Kishi H, **Tanaka Y**. A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai.
 2. Watashi K, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Nakajima S, Iwamoto M, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, **Tanaka Y**, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai.

3. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Kitamura K, Muramatsu M, Suzuki R, Li J, Tong S, **Tanaka Y**, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai.
4. Shinkai N, Iio E, Watanabe T, Matsuura K, Endo M, Fujiwara K, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Application of a newly-developed high sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay“Lumipulse HBsAg-HQ“ for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
5. Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, **Tanaka Y**. Incomplete prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues using in vitro hepatitis B virus infection model. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014. Mar. 12-15, 2014. Brisbane.
6. Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Watanabe T, **Tanaka Y**. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype F in Alaska: A retrospective case-control study. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014. Mar. 12-15, 2014. Brisbane.
7. Shinkai N, Oone K, Ogawa S, Iio E, Watanabe T, Matsuura K, Endo M, Fujiwara K, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Clinical evaluation of a newly developed high-sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by a semi-automated immune complex transfer chemiluminescent enzyme immunoassay. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014. Mar. 12-15, 2014. Brisbane.
8. 松居剛志, 姜貞憲, **田中靖人**. 札幌地区と名古屋地区における HBV genotype の分布とその変遷. 第 49 回日本肝臓学会総会. 平成 25 年 6 月 6 日～7 日. 東京.
9. 豊田秀徳, 熊田卓, **田中靖人**. 超高感度 HBs 抗原測定系での HBs 抗原消失例の検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 平成 25 年 6 月 6 日～7 日. 東京.
10. 杉山真也, **田中靖人**, 溝上雅史. B 型肝炎ウイルス複製に関連する脂質分子の同定とその効果. 第 49 回日本肝臓学会総会. 平成 25 年 6 月 6 日～7 日. 東京.
11. **田中靖人**, 新海登, 渡邊綱正. 免疫複合体転移-化学発光酵素免疫測定法(ICT-CLEIA 法)による超高感度 HBs 抗原測定試薬の基礎的・臨床的性能評価. 第 49 回日本肝臓学会総会. 平成 25 年 6 月 6 日～7 日. 東京.
12. **田中靖人**. 肝炎ウイルスと生体応答～C 型肝炎の克服と B 型肝炎の再興. 第 37 回阿蘇シンポジウム. 平成 25 年 8 月 2 日～3 日. 阿蘇.
13. 松居剛志, 新海登, **田中靖人**. IL28B SNP・IP10 値に基づいたペグインターフェロン療法の早期治療効果予測の試み. 第 17 回日本肝臓学会大会. 平成 25 年 10 月 9 日～10 日. 東京.
14. 渡邊綱正, 杉浦互, **田中靖人**. HBV/HIV 共感染における HBs 抗原を制御するサイトカインの推移.

第 17 回日本肝臓学会大会 . 平成 25 年 10 月 9 日～10 日. 東京.

15. 田中靖人. B 型肝炎ウイルスの基礎知識～創薬研究へ. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 25 年 11 月 10 日～12 日. 神戸.

16. 飯尾悦子, 松居剛志, 狩野吉康, 村上周子, 新海登, 渡邊綱正, 城卓志, 田中靖人. 次世代シーケンサーを用いた B 型肝炎ウイルス Entecavir 耐性変異パターンの検討. 第 40 回日本肝臓学会西部会. 平成 25 年 12 月 6 日～7 日. 岐阜.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

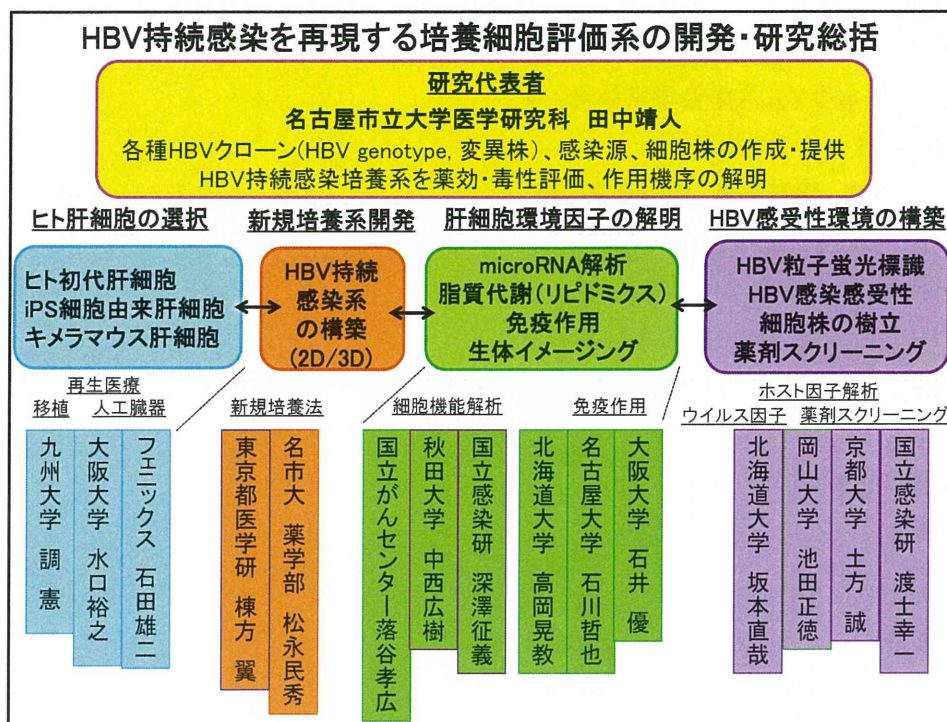
なし

2. 実用新案登録

なし

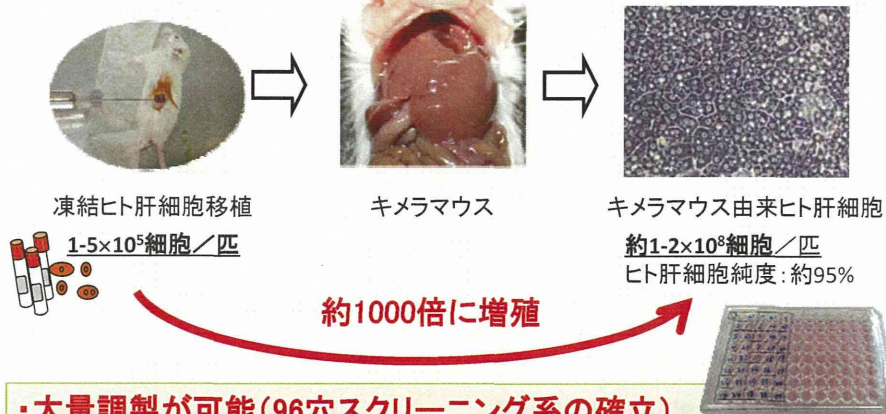
3. その他

なし



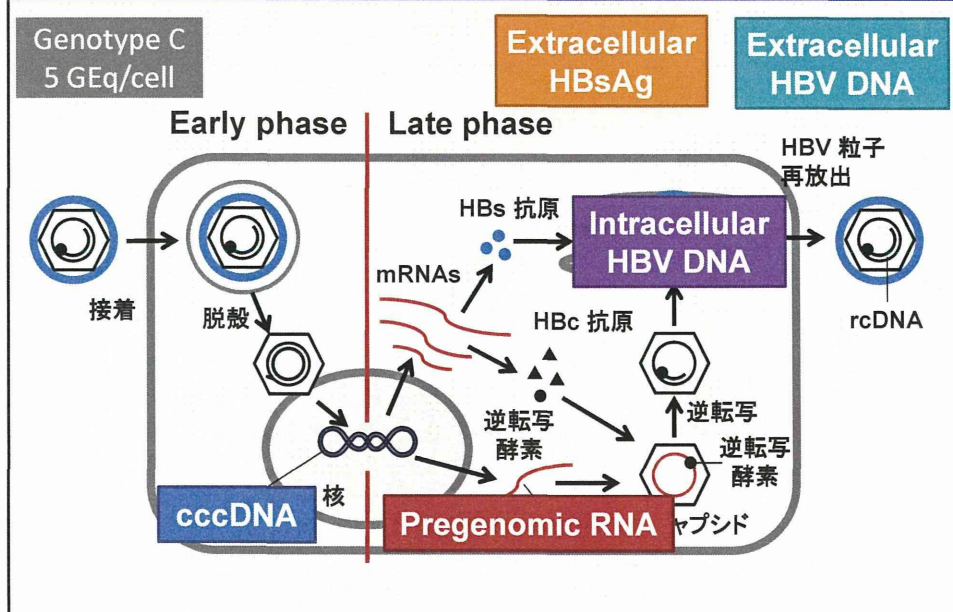
- ## HBV感染(培養)評価系~2年間の成果
1. キメラマウス肝細胞を用いたHBV持続感染モデルの構築 → HBV持続感染実験から薬剤スクリーニング系の構築 (HTS: ハイスループットスクリーニング)
 2. HepG2-NTCP-C4細胞(DMSO処理)
 3. 3次元培養系による薬効・毒性評価 (iPS細胞由来肝細胞、初代肝細胞、ヒト肝幹細胞など)
 4. HepAD38.7-Tet細胞(Genotype D)
 5. HBV粒子蛍光標識~培養・生体イメージング
 6. In vivo HBV感染系での薬効評価 (前臨床試験)

大量調製可能な肝細胞キメラマウスの人肝細胞 (PHH) を用いて HBV の増殖サイクルを再現

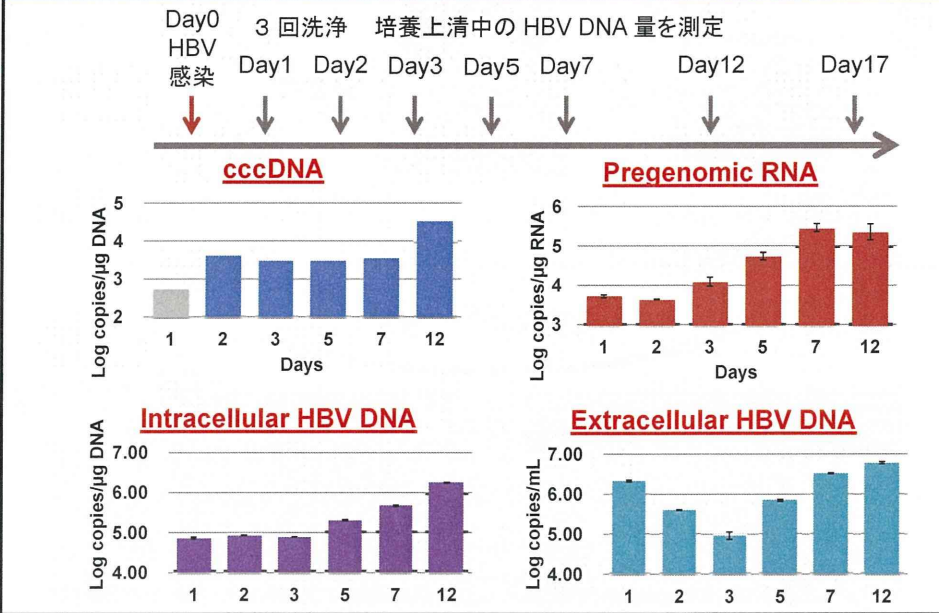


- ・大量調製が可能(96穴スクリーニング系の確立)
- ・ヒト肝細胞の性質を保持 (HBV レセプター-NTCP などを発現)
- ・高い HBV 感染効率
- ・遺伝子導入等分子生物学的実験ができる
- ・経時的に HBV の動態を観察できる

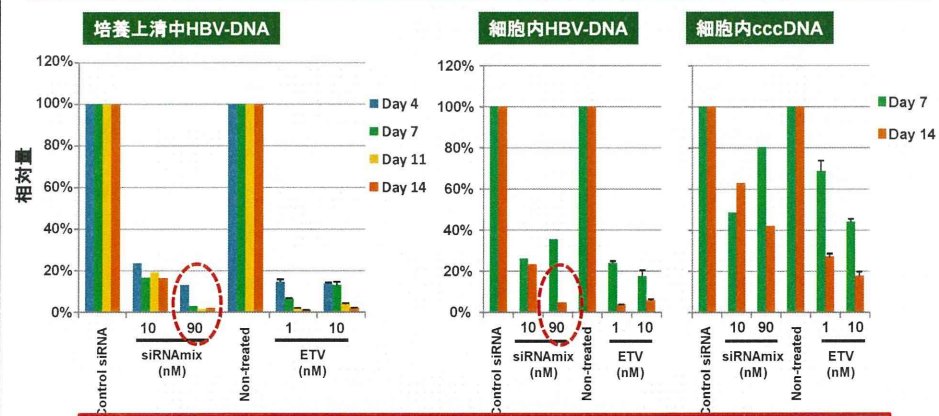
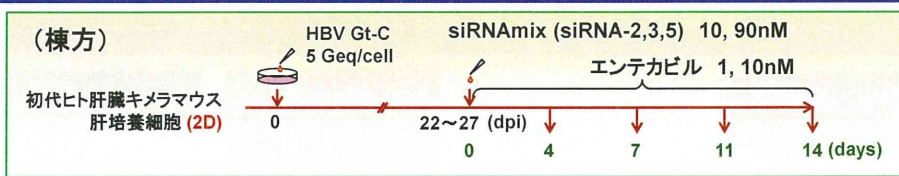
HBV の感染増殖サイクル



PHH に HBV を感染させ cccDNA, pregenomic RNA HBV-DNA, HBs抗原を定量

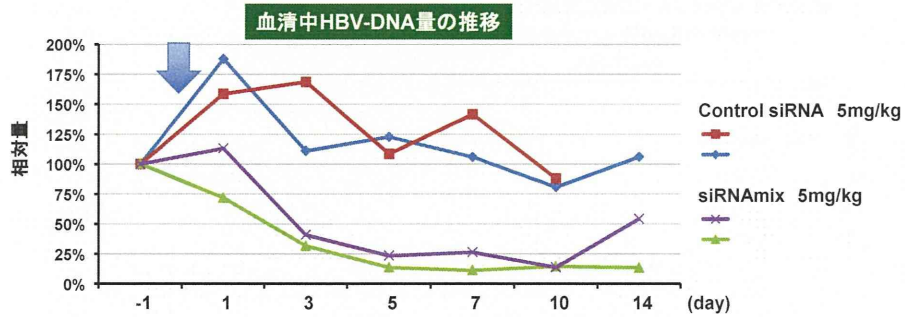
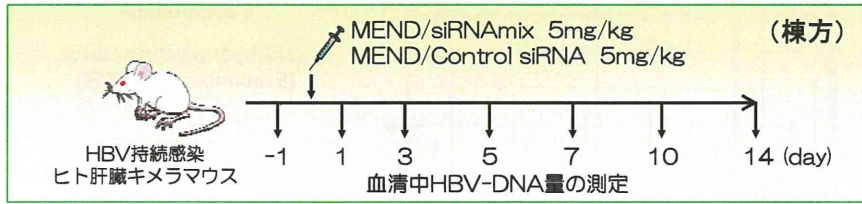


pgRNA 標的 siRNA による HBV(Gt-C) 抑制効果 (2D)



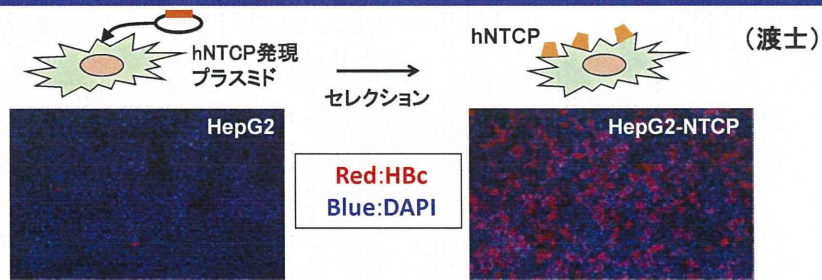
90nM siRNAmix 単回投与で14日間にわたってエンテカビルに匹敵する上清中HBV量と細胞内HBV-DNA量の抑制効果を示した。

HBV持続感染ヒト肝臓キメラマウスにおけるpH応答性MEND/siRNAmixによるHBV抑制効果(前臨床試験)

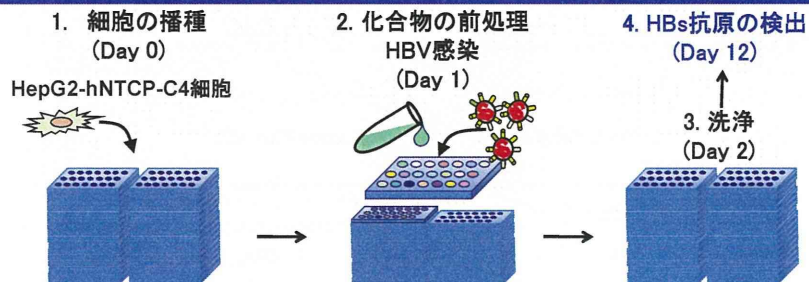


pH応答性MEND/siRNAmixは単回投与によりキメラマウス血清中HBVを14日間抑制

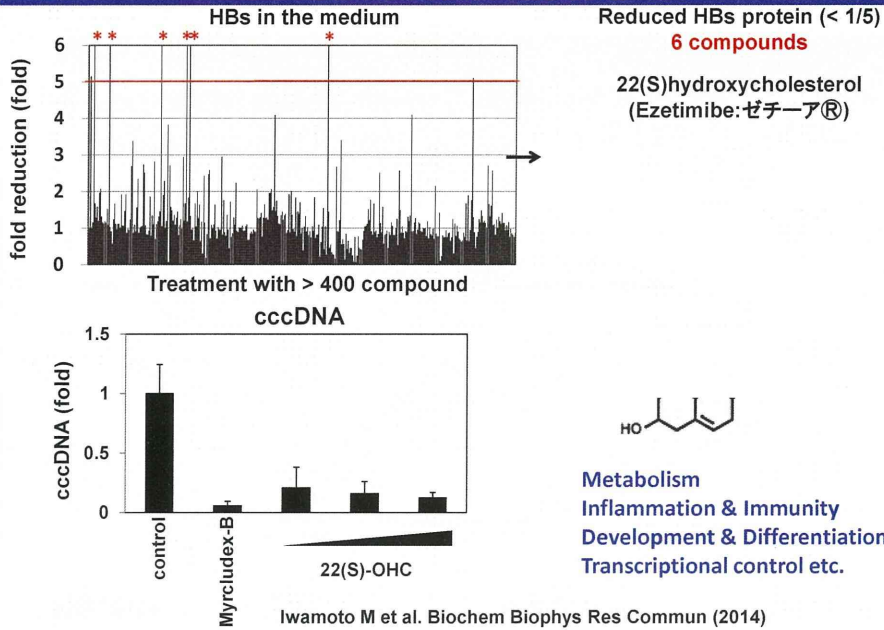
HBV感染許容性細胞株の樹立



HepG2-hNTCP細胞を用いたHBV阻害剤のスクリーニング

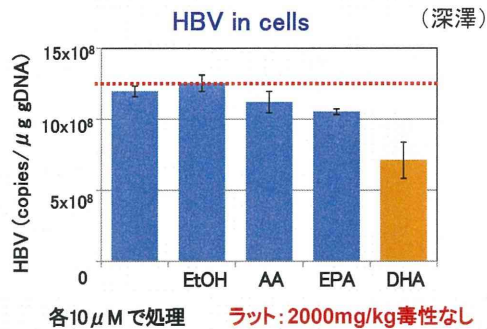
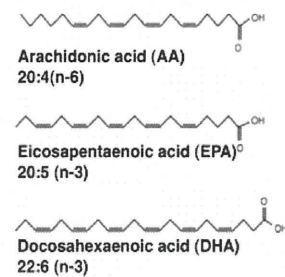


HepG2-hNTCP細胞を用いたHTS系による抗HBV活性を有する化合物の探索



HBV産生に対する各種脂質(成分)添加の影響

高度不飽和脂肪酸(PUFA)



高度不飽和脂肪酸、特にDHAがHBV産生を阻害した

n-3 PUFAsはHBV-associated HCCのriskを低下させる

Consumption of n-3 Fatty Acids and Fish Reduces Risk of Hepatocellular Carcinoma

NORIE SAWADA,* MANAMI INOUE,* MOTOKI IWASAKI,* SHIZUKA SASAZUKI,* TAICHI SHIMAZU,* TAIKI YAMAJI,* RIBEKA TAKAGI,* YASUHIRO TANAKA,* MASASHI MIZOKAMI,|| SHOICHIRO TSUGANE,* and the Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group

GASTROENTEROLOGY 2012;142:1468-1475

Consumption of n-3 PUFA-rich fish or n-3 PUFAs, particularly **EPA, DPA, and DHA**, appears to protect against the development of HCC, even among subjects with HBV and/or HCV infection.