

富山化学との共同研究

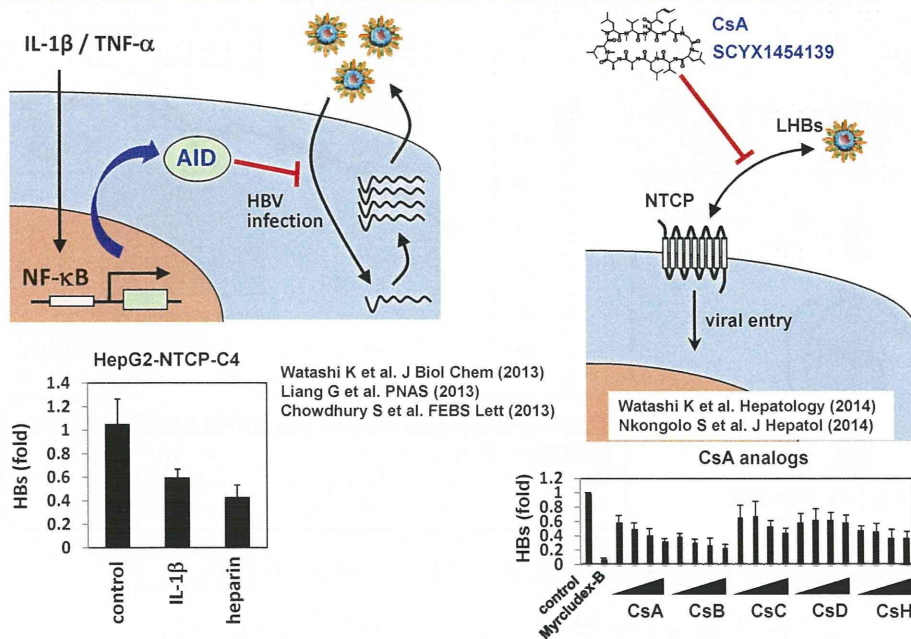
- HTS系を使用し、培養上清中HBV DNA量に対する阻害活性を指標にスクリーニング
- 2 uMで阻害率50%以上を示す**8化合物**が得られている
→ 一部の化合物でIC50を算出した

	HepG2.2.15 (7 days culture)		MaRBLE* (7 days culture)
	抗HBV活性, uM	細胞毒性, uM	抗HIV活性, uM
化合物1	0.031	>5	<0.010
化合物2	0.020	>5	<0.010
化合物3	0.0065	>5	<0.010
lamivudine	0.034	>5	0.044

*Human T cell line

- いずれも**非核酸系**低分子化合物
- 作用機序解析については未実施だが、本化合物は強い抗HIV活性も有している

HTS系による新規HBV阻害剤の同定

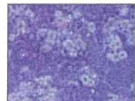


日本人由来肝細胞キメラマウスの作出 →日本人由来の初代肝細胞の供給へ

(調)

Case 3.

27 y.o. M LDLT donor 部分肝



4.8×10^5 cells

移植①



uPA/SCID
(推定置換率90%)

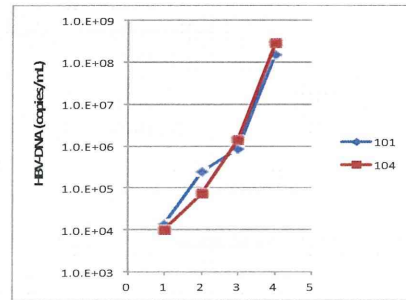
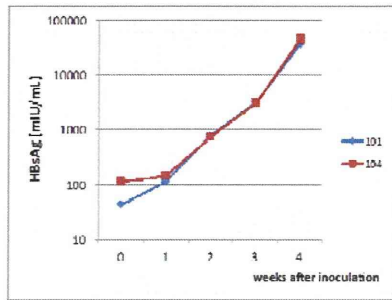
移植②



uPA/SCID

Total $1-2 \times 10^7$ cellsを
20匹に継代移植

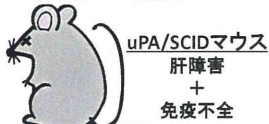
中置換マウス2匹にHBV感染実験
(推定置換率40-50%)



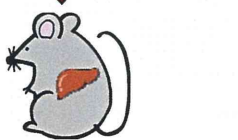
iPS細胞由来肝細胞キメラマウスの作出

(水口)

#肝細胞由来
ゲノムインテグレーションフリー
ヒトiPS細胞株iHC-1を使用

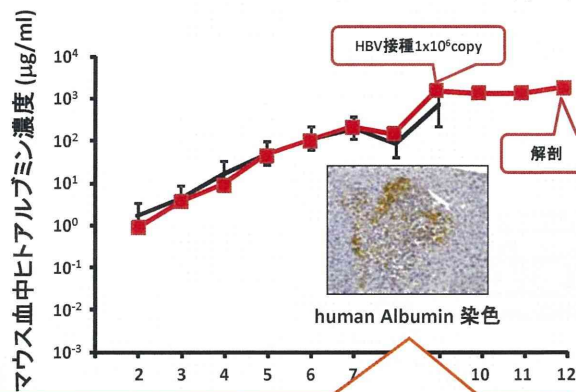


uPA/SCIDマウス
肝障害
+
免疫不全



脾臓経由で移植

血中ヒトアルブミン測定



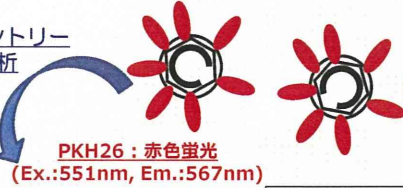
過去に報告された血中ヒトALB濃度の値と比較して非常に
値が高い 最高1.9 mg/mlのヒトアルブミンが検出された
Woo DH et al. *Gastroenterology*. 2011. : 4,000 ng/ml
Basma H et al. *Gastroenterology*. 2009. : 2,000 ng/ml など

非常に高濃度のヒトアルブミンが検出された上、
これまでの2倍以上生存期間が延長した。

HBVのin vitro/in vivo動態・抗ウイルス免疫の可視化

〈HBV粒子の蛍光ラベリング〉

HBVエンタリー
機構の解析



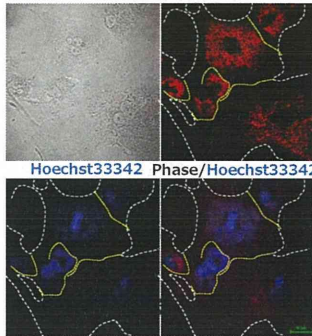
肝臓の生体多光子励起イメージングに成功

PKH26 : 赤色蛍光
(Ex.:551nm, Em.:567nm)

HepG2-NTCP-C4へ感染

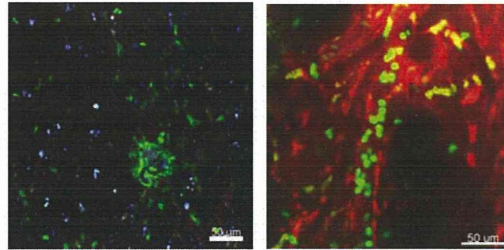
Phase

PKH26



Hoechst33342 Phase/Hoechst33342/PKH26

色つきマウス/ヒト肝細胞キメラマウスへ感染
→生体内でのウイルス動態・免疫細胞の解析
(石井班員)

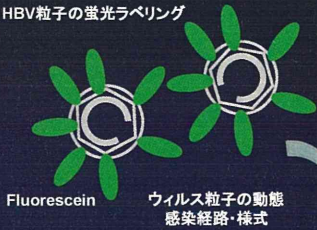


肝臓の傷害部位に集積するマクロファージ

感染部位(結合組織)で急速に活性化する好中球

生体多光子励起イメージングによる HBVウイルスのin vivo動態・抗ウイルス免疫の可視化

HBV粒子の蛍光ラベリング



Fluorescein

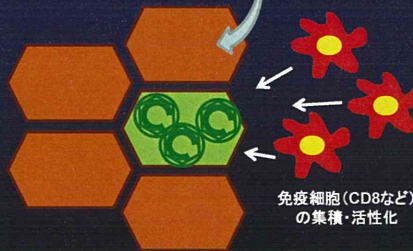
ウイルス粒子の動態
感染経路・様式

・HBVウイルスの肝細胞への感染様式の可視化

・HBV感染細胞に対する免疫応答の可視化



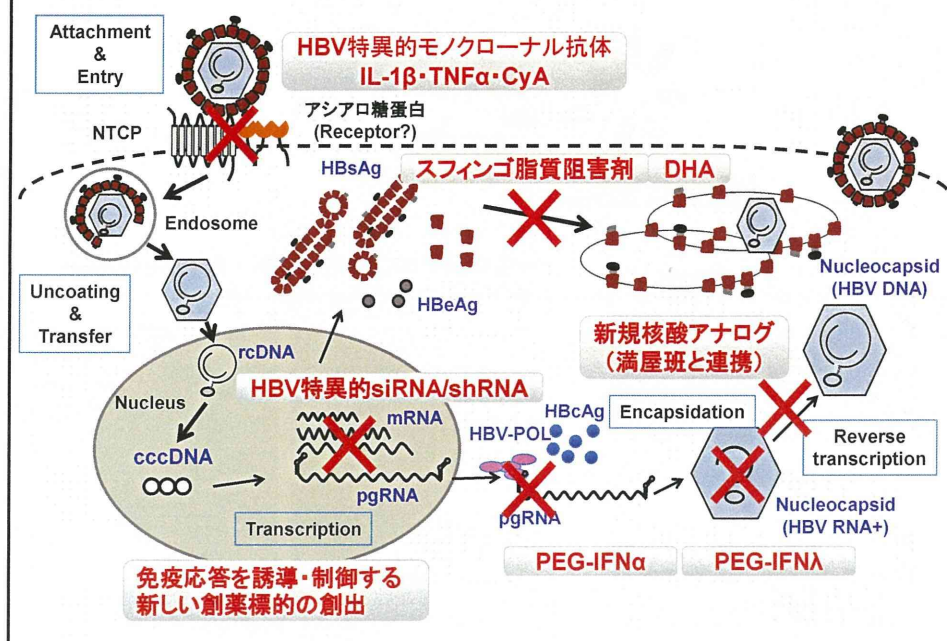
・感染・免疫に関わる新たな創薬標的の創出
・新規の薬効評価系の開発



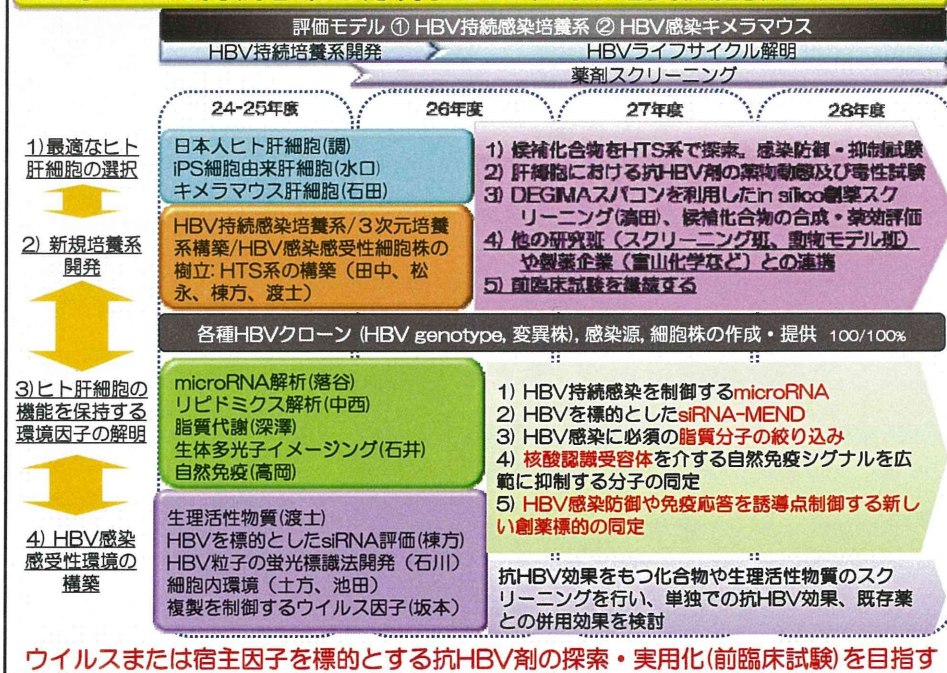
免疫細胞 (CD8など) の集積・活性化

ヒト肝細胞キメラマウスへ感染

これまでの創薬研究～候補薬剤



目的：HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発



II. 分担研究報告書

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

研究分担者：調 憲 九州大学 大学院消化器・総合外科 准教授
研究協力者：中川原英和 九州大学 大学院消化器・総合外科 大学院生

分担研究課題：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

研究要旨：近年、B型肝炎ウイルスの感染成立には罹患者側の遺伝的背景が重要であることが報告されている。したがって日本人由来のヒト肝細胞を用いた感染モデルは極めて重要である。われわれはB型肝炎ウイルスの持続感染モデルの作成のために生体肝移植ドナーの肝臓から肝細胞を採取し、SV40、hTERT、E6/E7を遺伝子導入し不死化肝細胞を作成するとともにuPA/SCIDマウスの肝臓に播種した。不死化細胞においてはHBVの感染レセプターであるNTCPの発現は低値であった。uPA/SCIDマウスに生着、置換したヒト肝細胞はNTCPの良好な発現を認め、マウスにHBVの感染実験を行ったところマウス血清中のHBs抗原の持続的な上昇を認め、HBVの感染が成立した。

A. 研究目的

日本人由来のHBVの持続感染モデルを作成する。

B. 研究方法

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した。SV40、hTERT、E6/E7を遺伝子導入し不死化細胞を作成した。uPA/SCIDマウスの肝臓に播種し継代した。肝臓特異的遺伝子発現、とくにHBVの感染受容体とされるNTCPの発現を確認した。最後にuPA/SCIDマウスにHBVを投与し血清中のHBs抗原を確認した。

C. 研究結果

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、まず不死化を行った。不死化には成功したものの2NTCPの発現は低く、感染実験に用いるには不十分であった。

uPA/SCIDマウスには十分な生着が得られ、2代まで継代可能であった。生着肝細胞ではNTCPの発現は高値であった。HBVのマウスへの投与により、血清中のHBs抗原は経時的に上昇し、持続感染が成立した。

D. 考察

日本人由来のヒト肝細胞を用いてHBVの感染モデルを作成することを目的として研究を行った。最近、肝細胞上のNTCPはHBVの受容体として報告された。不死化細胞では既報のごとく、不死化細胞のNTCPの発現は低く、感染モデルとしては適さなかった。uPA/SCIDマウスにて継代された肝細胞においてはNTCPをはじめとする肝特異的遺伝子の発現は良好であり、HBVの持続感染モデルが成立した。本モデルは感染予防などの創薬研究に重要な役割を果たすものと考えられた。

E. 結論

uPA/SCIDマウスを用いたヒト肝細胞の継代に

より、日本人由来の肝細胞を用いた HBV の持続感染系が成立した。今後、HBV 感染の機序解明に重要な役割を果たすものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Toshima T, **Shirabe K**, Matsumoto Y, Yoshiya S, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Maehara Y. .Autophagy enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of mitochondrial β -oxidation. J Gastroenterol. 2013 May 24. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

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

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

研究分担者：水口 裕之 大阪大学 大学院薬学研究科 教授
研究協力者：櫻井 文教 大阪大学 大学院薬学研究科 准教授
高山 和雄 大阪大学 大学院薬学研究科 大学院生
長基 康人 大阪大学 大学院薬学研究科 大学院生
山本 達郎 大阪大学 大学院薬学研究科 大学院生

分担研究課題：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

研究要旨：現在、新規抗B型肝炎治療薬開発における最大の問題点は、B型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus; HBV）の生活環を再現可能で、簡便なin vitro培養細胞系が存在しない点である。一方で、以前より我々は、ヒトES/iPS細胞から高効率に機能的な肝細胞への分化培養方法を確立してきた。そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来肝細胞に対しHBVが感染・増殖可能か検討することとした。本研究によりヒトiPS細胞由来肝細胞にHBVが感染・増殖可能となれば、抗HBV薬の評価などを通して新規抗HBV薬開発に大きく貢献できるとともに、HBVの感染・増殖機構の解明に向けて極めて有用な実験ツールになるものと期待される。本年度は、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞へHBVゲノムの導入によるHBV粒子の産生、およびヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の免疫不全マウスへの移植実験を行った。

A. 研究目的

新規B型肝炎治療薬開発ならびにB型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus; HBV）の感染・増殖機構の解明に向けた最大の問題点は、ヒト初代肝細胞と同等の性質を有するとともに、HBVの感染・増殖が可能で汎用性の高い細胞が存在しない点である。一方で、ヒトiPS細胞は種々の細胞に分化誘導可能であることから、再生医療における重要な細胞供給源であるだけでなく、ヒトiPS細胞より分化誘導した細胞は、創薬研究や細胞の分化発生などの基礎研究においても極めて重要な実験材料となりつつある。我々は以前より薬物の代

謝毒性評価に資するヒトiPS細胞由来肝細胞の分化培養法の確立に取り組んできており、既に初代ヒト肝細胞に匹敵する薬物代謝酵素やトランスポーターを発現するヒトiPS細胞由来肝細胞を分化誘導することに成功している。また、このヒトiPS細胞由来肝細胞に対しC型肝炎ウイルスのレプリコンゲノムを導入したところ、レプリコンゲノムが維持されることを明らかにしている。そこで本研究では、我々が分化誘導したヒトES/iPS細胞由来肝細胞にHBVが感染・増殖可能か検討することとした。本研究により、ヒトiPS細胞由来肝細胞にHBVが感染・増殖可能であるこ

とが明らかとなれば、初代ヒト肝細胞に代わる in vitro HBV 感染増殖系となり、抗 HBV 薬の創製や HBV の感染増殖機構の解明に向けて極めて有用な実験材料になるものと期待される。さらには様々な遺伝的バックグラウンドを持つヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HBV 感染増殖評価系が構築可能になるものと考えられる。

本年度は、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞へ HBV ゲノムを導入することにより HBV 粒子が産生されるか検討を行った。さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を免疫不全マウスに移植し、ヒト肝臓キメラマウスの作成に関する検討もあわせて行った。

B. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から肝細胞への分化誘導は、申請者が過去に報告したアデノウイルス (Ad) ベクターを用いた FOXA2、HNF1 α 遺伝子導入法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. J Hepatol. 2012) を改良した方法で行った。

2. Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞への HBV ゲノム導入

各分化段階の iPS 細胞由来肝細胞 (分化培養開始より 4, 9, 20 日培養したもの)、HepG2 細胞へそれぞれ HBV genome 搭載 Ad ベクターを 300VP/cell もしくは 3000VP/cell で 1.5 時間作用させた。作用後は PBS Wash を 5 回行った後、培地を添加し培養した。遺伝子導入 72 時間後に、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) を用いて上清中の HBs 抗原量ならびに HBcr 抗原量を測定した。また、同時に上清中の DNA を回収し、リアルタイム PCR 法により HBV genome 量を測定した。なお、測定は SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を用いて定法に従って行った。用いたプ

ライマーの配列を以下に示す。HBV genome in the supernatants forward; 5' -CCCGTTTGTCTCTACTTCC-3' , reverse; 5' -GTCCGAAGGTTTTGTACAGC-3' .

3. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いたヒト肝臓キメラマウスの作成

移植のレシピエントマウスには、ヒトアルブミンプロモーターによって uPA 遺伝子を発現する uPA トランスジェニックマウスと、免疫不全マウス SCID を交配して得られた uPA/SCID マウスの 2~4 週齢を用いた。移植細胞は、申請者が過去に報告したスフェロイド形成法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. Biomaterials. 2013) を用いて、ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から分化誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞に対し、Ad ベクターを用いて *FNK* 遺伝子を過剰発現させた細胞を用いた。この細胞を、マウス脾臓へ 25 μ l (1×10^6 細胞) 注入、移植し、各種解析を行った。

C. 研究結果

1. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞への HBV ゲノム導入

これまでに HepG2 細胞や Huh-7 細胞といったヒト肝がん細胞株においても、HBV genome を導入することで、HBV 遺伝子の発現およびウイルス粒子の形成が観察されることが報告されている。そこでヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞に対して、HBV genome 搭載 Ad ベクターを 300 VP/cell もしくは 3000 VP/cell で作用させ、72 時間培養後の培養上清中における、HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV genome 量をそれぞれ検討した。HBs 抗原ならびに HBcr 抗原は、それぞれ HBV 粒子を構成するタンパク質であり、HBV genome 導入後、genome 発現によりウイルス複製が起これば検出されること

が報告されている。検討したすべての分化段階の細胞において、有意な HBs 抗原ならびに HBcr 抗原が測定された。ただし、HepG2 細胞と比較すると、その量は同程度かそれ以下であった。一方、上清中の HBV genome 量についても、検討したすべての細胞において検出された。また、4, 9, 20 日間培養と培養期間が長くなるにつれて、検出される HBV genome 量が増加した。

2. ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いたヒト肝臓キメラマウスの作成

in vivo における HBV 感染増殖系を目指し、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を有したキメラマウス作成に関する検討を行った。また、この際に昨年度、置換効率の向上に寄与することを明らかにした FNK 遺伝子の過剰発現も併せて行った。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を移植したマウスから経時的に採血を行い、血中ヒトアルブミン濃度を ELISA 法にて測定したところ、凍結ヒト肝細胞を移植したマウスに匹敵するレベルの、非常に高い濃度のヒトアルブミンが検出された。また、マウス肝切片を作製し、HE 染色を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来肝細胞と思われるコロニーが多数観察された。

D. 考察

昨年度は、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における種々の HBV 感染増殖関連因子の発現レベルを検討したところ、ヒト初代培養肝細胞と同等の発現レベルが観察された。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HBV ゲノム導入に向けて、遺伝子導入法の検討を行ったところ、ファイバー改変 Ad ベクターを用いることで高効率に遺伝子を導入可能であることが明らかとなった。そこで本年度は、各分化段階の細胞（iPS 細胞、内胚葉細胞、肝幹

前駆細胞、肝細胞）に対して、HBV genome 搭載 Ad ベクターを導入し、HBV 粒子の産生について検討した。その結果、肝細胞のみならず、全ての分化段階の細胞の培養上清中において、HBs 抗原・HBcr 抗原・HBV genome がそれぞれ検出できた。従って、肝細胞のみならず、未分化な状態においても HBV ゲノムを導入することで、HBV 粒子が産生可能であると考えられる。来年度は、各分化段階の細胞に HBV 粒子を作用させることで、感染可能かどうか検討する予定である。

また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を uPA/SCID マウスへ移植する実験を行ったところ、非常に高い濃度のヒトアルブミンが検出された。これは Ad ベクターを用いて過剰発現させた FNK 遺伝子が置換率向上に寄与したものと考えられる。検出されたマウス血中ヒトアルブミン濃度、およびマウス肝切片中のヒト細胞コロニー数を考慮すると、HBV への感染が十分期待できるレベルであった。そこで、来年度は作成したキメラマウスが HBV に感染可能であるか、HBV をマウスに接種することで検討する予定である。

E. 結論

1. ヒト iPS 細胞から肝細胞までの各分化段階の細胞に Ad ベクターを用いて HBV ゲノムを導入したところ、培養上清に HBV 抗原ならびに HBV ゲノムが検出されたことから、肝細胞のみならず、未分化な細胞においても HBV ゲノムを導入することで HBV 粒子が産生されることが示唆された。
2. FNK 遺伝子を過剰発現させたヒト iPS 細胞由来肝細胞を uPA/SCID マウスへ移植したところ、凍結ヒト肝細胞に匹敵するレベルの血中ヒトアルブミンが検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Rep.*, 1, 322-335 (2013)

2) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Inamura M., Ohashi K., Okuno H., Yamaguchi T., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Okano T., Furue MK., Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision. *Development*, 141, 91-100 (2014)

3) Higuchi M., Mizuguchi H. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro. *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application (the Springer publishing)*, in press.

4) 長基康人、高山和雄、水口裕之；3次元組織化技術を利用したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法、遺伝子医学 MOOK、印刷中

5) 水口裕之、高山和雄；iPS 細胞由来組織細胞を用いた毒性試験、実験医学、印刷中

6) 高山和雄、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用、*Tiss. Cult. Res. Commun.*, 32, 183-187 (2013)

7) 水口裕之、高山和雄、川端健二；ヒト iPS 細胞

由来肝細胞を用いた毒性評価、In vitro 毒性・動態評価の最前線、シーエムシー、小島肇夫監修、63-70 (2013)

2. 学会発表

1) Takayama K., Nagamoto Y., Kawabata K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human pluripotent stem cells, Boston, June, 2013

2) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Comparative analysis of transplantation efficacy of human iPS cell-derived hepatic cells at various differentiation stages in mice. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, June, 2013

3) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice、第 20 回大会、肝細胞研究会、大阪、2013 年 9 月

4) 長基康人、高山和雄、田代克久、立野知世、櫻井文教、立花雅史、川端健二、池田一雄、田中靖人、水口裕之、活性型 Bcl-xL (FNK) 過剰発現によるヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス生着効率向上、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014 年 3 月

5) 高山和雄、水口裕之、創薬研究への応用を目

指したヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014 年 3 月

6) 長基康人、高山和雄、田代克久、立野知世、櫻井文教、立花雅史、川端健二、池田一雄、田中靖人、水口裕之、活性増強型 Bcl-xL (FNK) 過剰発現を利用したヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス肝置換効率向上、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

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

研究分担者：石田 雄二 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 課長
研究協力者：立野 知世 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 部長
山崎 ちひろ 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部

分担研究課題：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

研究要旨：キメラマウス由来の新鮮肝細胞に対してHBVを接種した後、上清中のHBV DNA量を32日間測定した。その結果、上清中のHBV DNA量は接種22日目以降に、明らかに上昇している事が分かった。HBsAg陽性の細胞の割合も、接種12日から32日目にかけて10%から80%に上昇していた。その一方で、接種2日目から持続的にHepatitis B Immunoglobulin (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。以上の結果から、本培養系において上清に放出された感染性粒子が再感染する事で、HBVの水平感染が拡大している事が明らかになった。

A. 研究目的

HBV の再現性の良い持続感染モデルの構築は、新規抗 HBV 薬の開発において非常に重要な課題である。これまでに我々は、ヒト肝細胞キメラマウス由来の新鮮肝細胞は、培養下で HBV に対する感染性を示すだけでなく、感染性の HBV 粒子を産生し培養上清中に放出可能であることを示してきた。今年度の研究において、我々はこの感染モデルにおいて、持続的な HBV の水平感染が起きているか検討を行った。

B. 研究方法

—キメラマウスの作製及びコラゲナーゼ灌流によるヒト肝細胞の分離—

昨年の報告書に記載した方法に従って実施した。移植には Hispanic、2才、女兒由来の凍結ヒト肝細胞を用いた。

—ヒト肝細胞の培養および HBV の接種及び上清中の HBV DNA 量の定量—

昨年の報告書に記載した方法に従って培養及び HBV DNA 量の定量を行った。培地交換は5日毎で、32日目まで培養を継続した。32日目に上清を回収した後、細胞をホルマリンで固定した。

—HBIG 処理—

実験に用いた HBIG（ヘブスブリン）は、田辺三菱製薬より購入した。感染源を接種して2日目以降、32日目まで500 ng/well で培地に添加した。

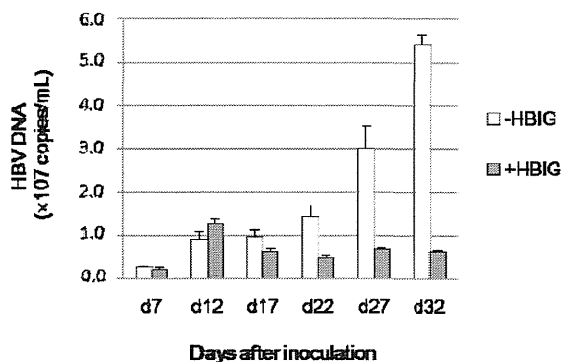
—免疫染色—

細胞を中性緩衝ホルマリンで固定した後、TritonX 100 (0.25%) で10分間処理した。10% Donkey serum でブロッキングし、抗 HBsAg 抗体（100倍希釈：Bioss）を4℃で一晩反応させた。その後 PBST で洗い、Alexa488 標識抗 Donkey 抗体（1000倍希釈：Molecular probes）を室温で1時間反応させた。PBST で洗浄後 Hoechst により核を染色し、倒立蛍光顕微鏡で観察した。1well あたり 5 視野写真を撮影し、全細胞数および

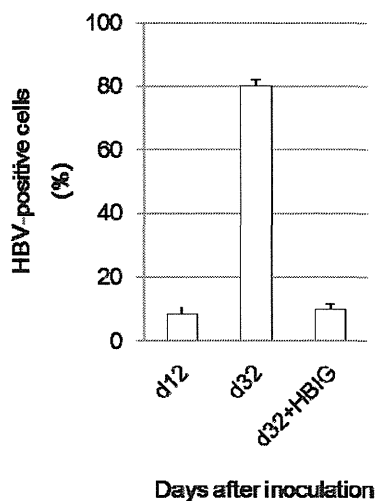
HBsAg 陽性細胞数をカウントした (n=3)。

C. 研究結果

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 日目で見らかな上昇が認められ、32 日目では 5×10^7 copies/mL を超えていた。(Fig. 1)



さらに、HBsAg 陽性の細胞数の割合を、接種 12 日目と 32 日目で比較を行った。その結果、接種 12 日目の陽性率は約 10%であったのに対して、接種 32 日目では陽性率は約 80%に達していた。(Fig. 2)



その一方で、接種 2 日目から持続的に HBIG を添加した場合、HBV DNA 量並びに HBsAg 陽性率は、

接種 12 日目から 32 日目まで有意な変化は見られなかった。

D. 考察

今回の結果から、我々の in vitro HBV 感染モデルにおいて、持続的な水平感染が成立している事が明らかになった。またその水平感染は HBIG 処理によって完全に阻害された事から、細胞間の接着を介した感染ではなく、上清に放出された感染性粒子が細胞に再感染する事で拡大している事が判明した。また今回の結果から、我々が確立した培養モデルは、培養下でも感染性粒子の産生能や、HBV 感染に対する高い感受性を、約 1 月間にわたり維持しているものと考えられた。感染、ゲノム複製、ウイルス粒子産生を観察出来る本感染モデルは、今後の抗 HBV 薬の開発に非常に有用であると思われる。

E. 結論

キメラマウス由来の新鮮ヒト肝細胞の培養系では、HBV の持続的な水平感染が成立している事を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies. *Int J Mol Sci.* 2013 Dec 20;15(1):58-74.
- (2) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV

infections. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 8;441(1):230-5.

- (3) 石田 雄二、山崎 ちひろ、立野 知世
ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 “PXB-cells” 「細胞」7月号

2. 学会発表

- (1) 石田雄二、茶山一彰、立野知世「肝細胞キメラマウス由来培養ヒト肝細胞のHBVに対する感染性に関する解析」2013年 日本肝臓学会 東京
- (2) Yuji Ishida, Chihiro Yamasaki, Ami Yanagi, Yasumi Yoshizane, Kazuaki Chayama, Chise Tateno. Primary human hepatocytes isolated from mice with humanized livers as a novel in vitro hepatitis B virus infection model. 2013. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells. Osaka.
- (3) Ami Yanagi, Chihiro Yamasaki, Yasumi Yoshizane, Yuji Ishida, Tateno Chise. Cellular reaction of the humanized chimeric mouse liver after bile-duct ligation. 2013. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells. Osaka.
- (4) Chihiro Yamasaki, Ami Yanagi, Yasumi Yoshizane, Yutaka Kageyama, Yumiko Iwasaki, Yuji Ishida, Chise Tateno. In vitro evaluation of the utility of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice) 2013年 日本薬物動態学会 千葉
- (5) Yuji Ishida, Chihiro Yamasaki, Ami Yanagi, Yasumi Yoshizane, Kazuaki

Chayama, Chise Tateno. Development of a novel in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse liver. 2013. HBV meeting. Shanghai.

- (6) 石田雄二、山崎ちひろ、柳愛美、吉実康美、藤川和幸、茶山一彰、立野知世「PXB マウス由来の初代培養ヒト肝細胞に対するHBVの持続感染」2013年 広島肝臓研究プロジェクトシンポジウム 広島
- (7) Chise Tateno, Hiroko Iwanari, Takashi Shimada, Tatsuji Kimura, Yumiko Iwasaki, Chihiro Yamasaki, Masakazu Kakuni, Yuji Ishida. Detection of human hepatic toxicity in chimeric mice with humanized liver by human ALT-1 ELISA system. 2014. SOT. Arizona.
- (8) Tje Lin Chung, Yuji Ishida, Kazuaki Chayama, Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Susan L. Uprichard, Alan S. Perelson, Harel Dahari. Multiscale mathematical modeling of HBV kinetics in humanized chimeric mice during treatment with lamivudine and/or pegylated interferon- α -2a. 2013 AASLD.

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

研究分担者：棟方 翼 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 主席研究員

分担研究課題：肝機能維持に最適な3次元培養法の構築

研究要旨：均一なスフェロイドを形成させるCell-ableプレートで初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞を3次元培養することで、40日以上遺伝子型A、B及びCのB型肝炎ウイルス(HBV)産生量が増加し続ける持続感染培養系を構築した。本培養系ではコーゲンコートした2次元培養系に比べて遺伝子型Cのウイルスの増殖効率が10倍、細胞内HBV-DNA複製効率は3倍高かった。培地中の子孫ウイルスは高い感染性を有しており、自然感染で周囲の細胞に感染拡大していた。また、培地中へ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も300倍多かった。以上の結果から本培養系はハイスループット解析への応用が可能であると考えられる。本培養系を用いて、HBV株間で保存されている3カ所の塩基配列を標的としたsiRNAを作成、等量混合し、肝細胞へ特異的に導入できるpH応答性MENDに包含したMEND/siRNAmixのHBV抑制効果を検討した。MEND/siRNAmixを単回投与した初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞及びヒト肝臓キメラマウスにおいて14日間にわたってウイルス産生量を抑制し続けることが出来た。よって、MEND/siRNAmixはHBVのコントロールに応用可能だと考えられる。

A. 研究目的

肝機能維持に最適な3次元培養法を検討することで、HBVの効率的な持続感染培養系を構築する。そして、新規抗HBV薬スクリーニングに資するハイスループット実験系を確立する。

B. 研究方法

肝機能維持に優れた培養法の検討

3次元培養法としてスフェロイドを形成するナノカルチャープレートとCell-ableプレート、多孔質膜を足場にするベセルプレート、及び中空糸に細胞を充填する中空糸モジュールを用いて初代凍結ヒト肝培養細胞を培養した。これら培養系におけるAlbumin、HNF4 α 及びCYP3A4発現量を、コーゲンコートプレート(2D)の2次元培養系

と比較することで肝機能維持に優れた培養法を検討した。

HBVの効率的な持続感染培養系の検討

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)、またはコーゲンコートした平面プレート(2D)に播種し、HBVの増殖性を比較した。

HBV制御を目的としたsiRNAの評価

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、変異による効果減弱を防ぐためこれらを混合し(siRNAmix)、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。pH応答性MENDとは、脂質エンベロープを構成する脂質

に pH 応答性脂質が含まれており、エンドソームの低 pH に応答して、細胞質に siRNA を速やかに放出する DDS である。HBV 持続感染培養系及びヒト肝臓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した。

C. 研究結果

本試験で検討した 3 次元培養系の中で、スフェロイドを形成する Cell-able プレートが最も肝機能維持に優れていた。初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞を Cell-able プレートで培養することで、遺伝子型 A、B 及び C の HBV が 40 日以上増殖し続ける持続感染培養系を構築した。また、本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 のウイルス増殖効率が 10 倍、細胞内 HBV-DNA 複製効率は 3 倍高かった (図 1)。また、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。更に、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ていた。

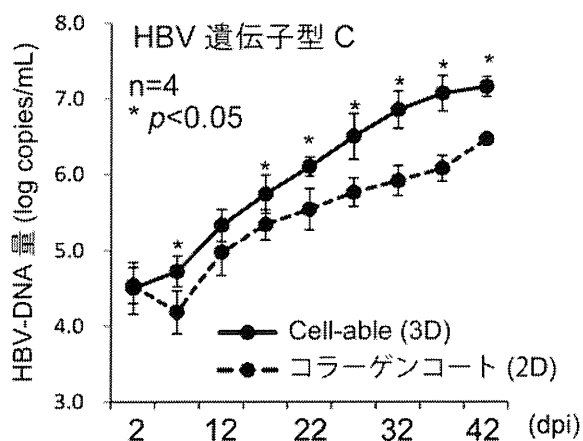


図 1 培養上清中 HBV-DNA 量

HBV 株間で保存性の高い 3 つの領域を標的とした siRNA を、変異による siRNA 効果減弱を防ぐために混合し、pH 応答性 MEND に包含した pH 応答性 MEND/siRNAmix は、本培養系において単回投与

で 14 日間継続的に HBV 産生量を抑制し続けた。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 量を抑制し続けた (図 2)。

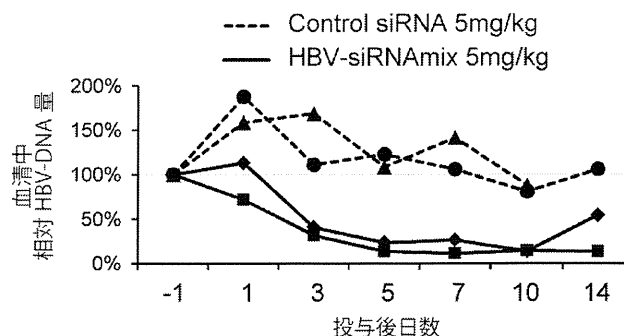


図 2 血清中 HBV-DNA 量の推移

D. 考察

Cell-able プレートを用いて 3 次元培養することで、2 次元培養に比べて細胞内 HBV-DNA 複製効率が高くなっていた。従って、本培養系は HBV の効率的な持続感染培養系として優れている。また、3 次元培養系における細胞あたりのウイルス産生量は、2 次元培養系だけでなくキメラマウスの肝臓よりも高かったことから、ハイスループット解析系に適用可能であると考えられる。

pH 応答性 MEND/siRNAmix は持続感染培養細胞系だけでなく、ヒト肝臓キメラマウスにおいても単回投与で 14 日効果的に HBV 増殖と抗原量を抑制出来たので、pH 応答性 MEND/siRNAmix は HBV のコントロールに適用可能だと考えられる。

E. 結論

今回、ハイスループット解析に適用可能な HBV 持続感染培養系を構築できた。また、既知の薬物であるエンテカビルが作用する逆転写段階より前の作用点である HBV プレゲノム RNA を標的とすることで、抗 HBV 効果が高い治療薬候補を見出した。

今後は、本培養系をハイスループット解析に適応化する。具体的には、384 穴プレートでの培養条

件の検討と微量多検体からの B 型肝炎ウイルス (HBV)DNA 抽出・定量系の構築を行う。さらに、既存の抗ウイルス薬を用いて本培養・解析系の妥当性を評価する。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Naoki Yamamoto, Yuichi Hirata,
Hitohisa Hayashi, Tsubasa Munakata,
Koichi Yokota, Yuji Ishida, Chihiro
Yamasaki, Chise Tateno, Michinori
Kohara. : Establishment of efficient HBV
infection and replication system in vitro.
2013 International HBV Meeting (平成 25
年 10 月 20-23 日、上海) Award of
Excellence Poster Presentation を受賞

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

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

研究分担者：松永 民秀 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 臨床薬学分野 教授

研究協力者：佐藤 大介 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 臨床薬学分野

分担研究課題：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

研究要旨：本研究はB型肝炎モデル構築のため、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human induced pluripotent stem cells-derived-hepatocytes (HiH)を利用し、三次元培養法による微小肝臓モデルを構築した。その結果HFH、HiHはHAHと同様にhepatitis B virus (HBV)感染性を有することが認められた。また、三次元培養法によって肝細胞はスフェロイドを形成し、その遺伝子発現は、二次元培養法と比較し高かった。また、三次元スフェロイド外膜はNTCPやOATP1B1を高発現し、肝臓血管側極性を示した。またHBV感染は三次元培養法を用いることで上昇した。このことは、三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た結果であることが示唆された。さらに肝実質細胞と非実質細胞との共培養によって、肝細胞単独で培養するよりもHBV産生は上昇した。この結果は、HBV感染には細胞間相互作用が必要であることを示唆するとともに、肝非実質細胞との共培養によって、より生体に近い肝臓構造を形成した結果であることが示唆された。これらの結果は、今後のHBV感染モデルとして有用な知見であることを示唆した。

A. 研究目的

現在、全世界に、3億5千万人以上のhepatitis B virus (HBV)感染者が存在すると推定されている[1-4]。HBVのスクリーニング検査方法が確立された現在においてもHBV感染による急性肝炎が問題となっている。また、HBV持続感染者は、慢性肝炎を発症し、さらに肝硬変、肝細胞ガンに移行する危険を負う[5]。従って、HBVの複製や感染のメカニズムを解明し、HBV感染の有効な予防又は治療薬を開発することが求められている。

HBVの複製や感染のメカニズムは不明な点が多く、未だ十分に研究が進んでいない。HBV感染の分子レベルでの解析が進まない理由の一つに、ヒト、チンパンジーなど感染し得る宿主が限られており[6-8]、HBVの病態を予測し得る*in vitro*感染モデルが確立されていないことが挙げられる。これまで、研究用のヒト肝組織や肝細胞として市販や手術時に得られた生体試料が用いられてきたが、ロット間差や数量、あるいは人種差の問題がある。また、チンパンジーの研究利用に関しては、現在ヒトと同等、あるいはヒト以上

に厳しく制限されている。HBV 研究を行うためには、これらに代わる *in vitro* 感染モデルを構築する必要がある。

肝臓は、生体成分や異物などの代謝あるいは胆汁産生など肝臓の主要な機能を担う肝実質細胞（肝細胞）と多種類の肝非実質細胞群から構成されており、その機能維持にはこれら細胞間相互作用が大きな役割を果たすと考えられている [9-18]。一方、肝細胞を用いた研究においては、培養皿上での二次元培養法が最も一般的に用いられている方法であるが、長期間の培養が難しく、多くの指標において培養に伴い顕著に機能が低下するため、生体と比較して肝細胞機能が非常に低いことが問題点として挙げられる [19]。その為、ヒト肝細胞を用いた培養系の確立は、生体内での生理反応や毒性反応、病態を予測するうえで非常に重要となる。

そこで本研究では B 型肝炎モデル構築のため、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、三次元培養法によるヒト肝臓を模したモデル形成を行い、ヒト生体での HBV 持続感染を再現し得る *in vitro* 微小肝臓モデルの構築を目的とした。

B. 研究方法

試薬

HAH は XenoTech (Lenexa, KC, USA)より、HFH は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)より、Swiss 3T3 cells は Riken BRC (Tokyo, Japan)より、Mouse embryonic fibroblasts は Oriental Yeast (Tokyo, Japan)より入手した。Cell-able plate 及び RM101 medium は Toyo Gosei (Tokyo, Japan)より、Collagen

I-coated plate は Sumitomo Bakelite (Tokyo, Japan)より、Cosmedium 004 は Cosmo Bio (Tokyo, Japan)より、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、DMEM 及び Ham's nutrient mixture F-12、oncostatin M、dexamethasone、non-essential amino acids、及び DAPI solution は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より、SMITEST DNA extraction kit was G&G life science Co. LTD (Hukushima, Japan)より、Fetal bovine serum (FBS)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より、SYBR Premix ExTaqII は Takara Bio (Osaka, Japan)より、Knockout Serum Replacement、Knockout DMEM、RPMI + GlutaMax medium、GlutaMax solution、Superscript II Reverse Transcriptase、Alexa Fluor 488 (goat-anti mouse IgM 及び rabbit IgG)、及び Alexa Fluor 568 (goat-anti mouse IgG 及び rabbit IgG)は Invitrogen Life Science (Carlsbad, CA, USA)より、Basic fibroblast growth factor、activin A、及び hepatocyte growth factor は Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA)より、RNeasy Mini Kit は Qiagen (Valencia, CA, USA)より、Anti-human albumin、organic anion transporting polypeptide (OATP)、Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)、bile salt export pump (BSEP)、及び multidrug resistance related protein 2 (MRP2) antibodies は Abcam (Cambridge, United Kingdom)より、The Bio-Rad Protein Assay kit は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)より購入した。その他試薬は特級を使用した。

Humanized liver mice 由来肝実質細胞及び肝非実質細胞の調製

本研究に用いた肝非実質細胞は humanized liver mice (PhoenixBio, Hiroshima, Japan)より調製した。humanized liver mice から摘出した肝臓を脱血し、コラゲナーゼを含むかん流液にて肝臓をほぐした。肝臓を 1%albumin 含有 HBSS にて浸し、メスで細断した。細断した肝臓を細胞塊や血塊の