

除去を目的としてフィルターでろ過した。ろ液を遠心 (50 x g, 2分) し、上清 (上清 I) を別のチューブに回収し、肝細胞ペレットを 10%FBS 含有 DMEM 培地に懸濁した。肝細胞懸濁液を遠心 (50 x g, 2分) し、上清 (上清 II) を別のチューブに回収し、再度肝細胞ペレットを 10%FBS 含有 DMEM 培地に懸濁した。肝細胞懸濁液を遠心 (50 x g, 2分) し、上清 (上清 III) を別のチューブに回収し、再度肝細胞ペレットを 10%FBS 含有 DMEM 培地に懸濁した。こうして得られた肝細胞を humanized liver mice-derived-hepatocytes (HMH) とした。また操作途中で回収された上清 I—III はひとつにまとめられ、遠心 (200 x g, 5分) し、細胞ペレットを 10%FBS 含有 DMEM 培地に懸濁した。こうして得られた細胞を肝非実質細胞とした。最終的に 1 匹のマウスより、HMH は  $1.29 \times 10^8$  cells 及び肝非実質細胞は  $4.53 \times 10^7$  cells 回収された。この回収した結果をもとに、肝細胞と肝非実質細胞との共培養は、肝非実質細胞 1 cells に対して肝細胞 2.8 cells の割合になるように細胞を懸濁し、実験に用いた。

HMH、HAH、HFH のいずれかと NHC との共培養群は、前述した細胞の割合になるように混合し、同様に播種した。

#### Cell-able plate への HMH、HAH 及び HFH の播種

HMH、HAH 及び HFH を  $2 \times 10^4$  cells/well/24-well plate or  $4 \times 10^4$  cells/well/12-well plate になるように、播種前日に swiss 3T3 cells ( $4 \times 10^4$  cells/well/24-well plate or  $8 \times 10^4$  cells/well/12-well plate) を播種した Cell-able plate へ播種された。その後、細胞は RM101 medium に

て培養された。HMH、HAH、HFH のいずれかと NHC との共培養群は、前述した細胞の割合になるように混合し、同様に播種した。

#### Collagen I-coated plate への HMH、HAH 及び HFH の播種

HMH、HAH 及び HFH を  $2 \times 10^4$  cells/well/24-well plate or  $4 \times 10^4$  cells/well/12-well plate になるように collagen I-coated plate へ播種された。その後、細胞は Cosmedium 004 にて培養された。HMH、HAH、HFH のいずれかと NHC との共培養群は、前述した細胞の割合になるように混合し、同様に播種した。

#### iPS 細胞から肝細胞への分化誘導、及び再播種

Human iPS cells は Umezawa ら (国立成育医療研究センター) より入手した。Human iPS cells は mitomycin C 処理した mouse embryonic fibroblasts cells をフィーダー細胞とし、20% Knockout Serum Replacement、2 mM L-glutamine、0.08 mM MEM nonessential amino acids、0.1 mM 2-mercaptoethanol、及び 5 ng/mL basic fibroblast growth factor 含有 DMEM and Ham's nutrient mixture F-12 medium にて培養した。

iPS 細胞から肝細胞への分化誘導方法は我々の研究室の方法に従った [20]。簡単に、まず iPS 細胞を 100 ng/mL activin A にて 5 日間培養することで内胚様へと誘導し、1% DMSO 刺激にて 7 日間培養することで肝芽細胞、10 ng/mL hepatocyte growth factor、20 ng/mL oncostatin M、及び 100 nM dexamethasone 共存下にて 8 日間培養することで肝細胞 (HiH) へと誘導した。こうして得られた肝細胞は前述の方法で Cell-able plate または collagen I-coated plate へ播種、培養された。また

HiH と NHC との共培養群は、前述した細胞の割合になるように混合し、同様に播種した。

### 肝細胞への HBV の感染

HBV の感染は、それぞれ肝細胞を播種後 5 日目に行った。HBV 感染濃度が 2 virus particles/cells になるように、細胞にウイルス液を添加した。感染翌日及び翌々日に細胞を洗浄した。2 回目の洗浄を終えた日を day 0 とした。その後、細胞は 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養された。day 5、8、12、15、19、22、26 及び 29 に培地上清を回収し、その後培地は新鮮な培地に交換された。培地上清は HBV-DNA 回収のために使用された。

## C. 研究結果

### 肝細胞の長期培養に伴う形態変化及び遺伝子変化

HAH、HFH、HiH の長期培養による形態変化及び遺伝子変化について検討した。二次元培養法では、今回用いた肝細胞それぞれ独特な形態を示した。HAH、HiH は肝細胞様の多核、敷石状の形態であったのに対し、HFH は未分化な単核の小型肝細胞が多数を占めた。また HAH、HiH は培養 2 週間程度の培養によって、剥離が認められ、plate に残った細胞は線維化が認められた。また HFH は増殖能が高く、1 週間程度で完全にコンフルエントになった。一方で三次元培養法では培養開始 24 時間以内にスフェロイドを形成した。その後 HAH、HiH は 3 週間を超えて、その形態を維持した。また HFH はスフェロイド直径が大きくなることで、plate から外れるものが存在した。また遺伝子変化について検討すると、二次元培養法と比較して、三次元培養法ではその遺伝子発現は高くなった。

### 肝細胞の三次元培養に伴う細胞表面極性、及び HBV 持続感染への影響

HAH について二次元培養法及び三次元培養法に伴う肝臓血管側特異的に発現するトランスポーター NTCP、OATP1B1、及び肝臓毛細胆管側特異的に発現するトランスポーター BSEP、MRP2 について免疫染色を行った。その結果、二次元培養法では肝細胞全面に肝臓血管側及び肝臓毛細胆管側で発現するトランスポーターが発現しており、肝臓に認められるような部位特異的な局在分布は認められなかった。一方で三次元培養法では、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、スフェロイド外膜特異的な極性は、HFH、HiH についても認められた。

次に、二次元培養法及び三次元培養法に伴う HBV 持続感染への影響について検討した。細胞集団に HBV が感染したことは、培養上清中の HBV 量を定量することで確認できる。本研究では、DNA 抽出キットを使用して培養上清から HBV-DNA を抽出し、培養上清中に存在する HBV-DNA の HBc コピー数を、リアルタイム PCR 法により測定した [21]。その結果、いずれの細胞群においても培養開始から経時的に培地上清の HBV は増加した。また二次元培養法と比較して三次元培養法では、HBV 産生量がより上昇した。

### 肝非実質細胞との共培養に伴う HBV 持続感染への影響

Humanized liver mice の肝臓をコラゲナーゼ処理し、遠心分離法によって肝実質細胞と肝非実質細胞に分離した。肝実質細胞は tight な球状のスフェロイドを形成したが、肝実質細胞由来スフェ

ロイドの形状は不安定であった。また HBV への感染は肝実質細胞に比較して、肝非実質細胞では 1/10~1/100 であった。

次に肝非実質細胞を肝細胞 (HAH、HFH、HiH) と 1: 2.8 の割合で混合し、培養 plate に播種し、HBV 持続感染への影響について検討した。その結果、肝非実質細胞との共培養法においても、二次元培養法と比較して三次元培養法では、培地上清中の HBV 量は高くなった。また、肝実質細胞のみで培養するよりも、肝非実質細胞との共培養を行うことで培地上清中の HBV 量は高くなった。

#### 肝細胞スフェロイド径の違いによる HBV 持続感染への影響

本研究では、直径 100  $\mu\text{m}$ 、250-300  $\mu\text{m}$ 、300-400  $\mu\text{m}$ 、350-400  $\mu\text{m}$ 、500-800  $\mu\text{m}$  のスフェロイドを形成し、そのスフェロイド径の違いによる肝細胞への HBV 持続感染への影響について検討した。その結果前述したスフェロイド (直径 100  $\mu\text{m}$ ) と同様、直径 250-300  $\mu\text{m}$ 、300-400  $\mu\text{m}$ 、350-400  $\mu\text{m}$ 、500-800  $\mu\text{m}$  のスフェロイドにおいても大きさは異なるがいずれも tight な構造の球形のスフェロイドを形成した。また細胞表面マーカーについても、スフェロイド外膜は肝臓血管側特異的な極性を示した。

次に肝細胞スフェロイド径の違いによる HBV 持続感染への影響について検討を行った。その結果、肝細胞の種類 (HMH、HAH、HFH、HiH) によらず HBV 感染は同程度であった。また、肝細胞 (HMH、HAH、HFH、HiH) と肝非実質細胞との共培養においても、肝細胞スフェロイド径の違いによる HBV 感染の向上は認められなかった。

肝細胞スフェロイド径を変えた時の肝非実質

細胞との共培養による感染効率の変化について検討を行った。その結果 HMH では変化は認められなかったが、HAH、HLH、HiH については肝細胞スフェロイド径によらず、肝細胞のみで培養するよりも肝非実質細胞との共培養によって培地上清中の HBV 量は増加した。

#### D. 考察

現在、HBV 持続感染モデルに用いられている肝細胞として、手術時に得られたヒト肝組織を処理し市販されている成人肝細胞が研究に用いられているが、その生体試料の均一性や量的問題により研究に用いるには十分ではない。また、ヒト肝ガン細胞 HepG2 のゲノムに HBV ゲノムを組み込んだ HBV 産生モデル細胞がある [22、23]。この細胞は、細胞のゲノムに HBV ゲノムが組み込まれているため、半永久的に HBV を産生することができるが、その産生を制御できない。また、細胞表面に HBV レセプターを有さないため、HBV を感染させることはできない。実際の肝臓への HBV の感染は、一部の肝細胞に HBV が感染し、その細胞から放出された新たな HBV が別の肝細胞に感染し、これを繰り返すことにより進行する。従って、HBV を産生するだけで感染させることができない細胞では HBV 持続感染モデル細胞としては使用できない。さらに、ヒト肝ガン細胞 HepaRG は、高分子化合物である PEG8000 の存在下で、HBV を感染させることができる [24-26]。この細胞は、PEG8000 の存在下という生体内ではあり得ない条件でのみ HBV を感染させることができるため、生体内での HBV 持続感染を再現したモデルにはならない。PEG8000 存在下での HBV 感染は、レセプターを介さない細胞への HBV の物理的付着を介したものである可能性

があり、特にこの点で、実際の生体での HBV 感染を再現したものではない可能性がある。従って、こうした問題を解決可能な肝細胞及び培養法の確立が HBV 研究には求められている。本研究では、増殖能力が非常に高い HFH、及び無限に自己増殖可能な iPS 細胞から分化誘導した肝細胞 HiH の 2 つの肝細胞を用いて肝細胞の性質、及び HBV 持続感染モデルとしての有効性を検討した。今回実験に使用した HFH は小型肝細胞が多く、その増殖能力は非常に高かった。胎児肝細胞には未熟な肝細胞が多く存在する一方で、肝細胞幹細胞を成人肝より多く含むことが考えられるため、長期に培養に耐えうるモデルとして利用可能であると考えられる。本研究においては HAH と同様に肝細胞マーカーを高発現した。一方で二次元培養と比較し、三次元培養によってその発現量はより高くなった。一方で、細増殖が速く二次元培養法では 3 週間目では線維化した部分も存在した。また三次元培養法では構成されたスフェロイドが大きくなりすぎることによってプレートから外れるものも多数存在した。今後こうした増殖細胞に対して細胞数を均一に保つ培養法の工夫が必要であることが示唆された。また、iPS 細胞は無限に増殖が可能で大量に安定的に供給できるため、低コストでの活用が期待される。また、規格化により均一な品質を持つロットが調製できれば、評価の再現性も確保できる。従って、正確な病態評価ができることから、新薬の開発期間や費用を大幅に縮小することが可能である。本研究においても iPS 細胞から肝細胞へと誘導し、その長期培養による影響について検討した。その結果分化誘導した肝細胞は前述した 2 つ細胞と同レベルの albumin 遺伝子発現量を示したが、HAH の主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 発現は低かった。今

後、HiH の成熟化の改良が課題として挙げられた。HFH や HiH を用いた HBV 感染モデルとしての有効性は次の段落から説明する。

一般に臓器や組織の実質部分を構成する上皮細胞は、培養表面に接着して増殖し、二次元の細胞シートを形成する。これに対して、肝臓のような生体内の臓器は複雑な三次元構造を有するため、細胞を二次元で培養するだけでなく、生体内に類似した三次元構造を生体外で再構築する必要がある。したがって、組織工学においては、細胞から三次元組織を再構築する手法を開発することが大きな課題になっている。このような課題を解決する手段として、本研究では Cell-able plate を用いたスフェロイド形成を行った。Cell-able plate の底面は細胞非接着面に直径 100  $\mu\text{m}$  の円状の細胞接着面が等間隔に整列配置されている。この plate に swiss-3T3 cells をフィーダー細胞として播種し、その上に肝細胞を播種することで、細胞が接着面に対して全く同じ大きさの三次元スフェロイドを形成する。本研究においても Cell-able plate 上へ播種された肝細胞は、培養 24 時間以内に立体球状の肝細胞スフェロイドを形成した（我々はこの Cell-able plate を用いた培養法を三次元培養法と呼んだ。また collagen-plate を用いた培養法を二次元培養法と呼んだ）。Cell-able plate または collagen plate へ播種してから 5 日後に免疫染色を行った。その結果、二次元培養法および三次元培養法で培養した肝細胞は肝細胞マーカーである albumin を高発現した。二次元培養法では肝臓血管側特異的に発現する OATP1B1、NTCP および肝細胞毛細胆管側特異的に発現する BSEP、MRP2 の発現が認められたことから両極性を示した [27-33]。また三次元培養法では、スフェロイド膜表面は OATP1B1、NTCP を強く発現した

が、BSEP、MRP2 の発現は弱かった。これらの結果は、肝細胞が立体構造を形成したことによって、スフェロイド内部への栄養吸収を促進するために、その表面に血管側極性を表現したことが原因であると考えられた。この結果は、本研究で使用した HAH、HFH、HiH の全てで認められた。次に、三次元培養法と二次元培養法の違いによる HBV 感染への影響について検討した。その結果、遺伝子発現と同様に三次元培養法を用いることによって、HAH、HFH、HiH の全てで培地中への HBV 放出が増加した。この結果は、三次元培養することで肝細胞機能が向上したことのみならず [19]、スフェロイド外膜が肝臓血管側極性を得た結果であることが考えられる。近年、HBV のレセプターの候補として NTCP の存在が明らかにされた [34、35]。Yan らは HBV 感染に種差が存在するのは NTCP 遺伝子の種差に起因することを示した [35]。従って、三次元培養法によって HBV 放出が亢進した結果は、スフェロイド外膜表面への NTCP 発現の促進による可能性を示唆した。

次に我々は、肝非実質細胞との共培養法について検討した。一般に HBV は肝実質細胞のみに感染する。しかしながら、肝臓は肝細胞のみから構成されるのではなく、40%の細胞は肝非実質細胞である。肝臓はこうした肝実質細胞と肝非実質細胞の働きにより機能を持つ [9-18]。現在までに HBV 感染と肝非実質細胞の関係は未だ十分に解明されておらず、従って本研究ではこうした肝非実質細胞の存在が *in vitro* における HBV 感染への程度影響するか検討を行った。実験の結果、共培養においても二次元培養法と比較し、三次元培養法の方が培地上清への HBV 放出は高かった。また肝細胞のみで培養するよりも、肝非実質細胞

と共培養することで HBV 放出は上昇した。これらの結果は、肝非実質細胞との共培養法が HBV 感染実験系に有効であることのみならず、その感染メカニズムの解明の利用にも有用な知見であると考えられた。

肝臓組織は肝小葉という構造単位の集合からなる [45-47]。肝小葉は、直径及び長さ 1~2 mm の六角柱、または多角柱の構造で、肝臓には約 50 万個もの肝小葉が含まれ、一つの肝小葉には約 50 万個もの肝細胞が含まれる。小腸からの栄養を含んだ門脈血と、酸素を十分に含んだ動脈血は類洞から中心静脈に向かう。その間の肝細胞は、類洞と活発に物質のやり取りをして様々な化学反応を行い、生命活動に不可欠な物質を血液中に送り出す。肝小葉は単なる肝細胞の集まりではなく、周囲を小葉間門脈、小葉間動脈、小葉間胆管、などに囲まれ、中心静脈から伸びた毛細血管などを中心に、樹状細胞や、ピット細胞、クッパー細胞があり、肝臓の構成単位として非常に複雑で重要な役目を担う。従って肝細胞の三次元培養法の構築は、この肝小葉の *in vitro* における形成法の確立と言い換えることができる。そこでスフェロイド直径を 100  $\mu\text{m}$ ~800  $\mu\text{m}$  の範囲で構築し、スフェロイド径をより肝小葉へと近づけることで、肝細胞スフェロイドへの HBV 感染がどの程度影響するか検討を行った。その結果、いずれのスフェロイド直径の群においてもスフェロイド外膜は肝臓血管側極性を有していた。また HBV 感染への影響は、いずれのスフェロイド直径の群においても変化は無かった。このことは、今後より生体内で認められるような精巧な肝小葉構築が必要であることが示唆された。一方で肝細胞スフェロイド径に関わらず、肝非実質細胞との共培養をすることで HBV 産生量が増加した結果は、HBV

感染研究において肝非実質細胞との共培養法が有効であることが示唆された。

## E. 結論

本研究では、三次元培養したヒト肝細胞は、長期にわたり HBV の感染能を維持するとともに、一旦 HBV が感染すると、長期にわたり、その感染状態を維持できた。さらに、持続的に培地中の HBV 量が増加した結果は、day 0 に感染が成立した肝細胞で HBV 感染が成立し、放出された HBV が感染していない肝細胞に再感染するという生体内における HBV の持続感染機構を模倣したと考えられた。また、これらの結果は HAH のみではなく、増殖能力が非常に高い HFH、及び無限に自己増殖可能な iPS 細胞から分化誘導した HiH においても認められた。このことは HAH に存在する生体試料の均一性や量的問題を解決可能な手段として有効であることを示した。さらに今回、肝実質細胞に加え、肝非実質細胞を共培養することで HBV 感染を向上させた。この結果は HBV 感染が肝実質細胞以外の肝非実質細胞との相互作用で感染を向上させることを示唆した。本研究の成果は、HBV 感染モデルの構築には肝細胞と肝非実質細胞の相互作用が必要であり、今度より精巧な生体内肝臓モデルの構築によって、HBV 感染のメカニズムの解明につながるモデルとして有効であること示唆した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Daisuke Satoh, Shuko Murakami, Yasuhito Tanaka, Yuji Ishida, Katsunori Nakamura, and Tamihide Matsunaga. The establishment of a hepatitis B virus infection model with an in vitro micro-liver composed of three-dimensional spheroids formed from induced pluripotent stem cells. *in preparation*.

### 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

引用文献

- [1] Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 52 (2010) 594-604.
- [2] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2000) 51-68.
- [3] Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 337 (1997) 1733-1745.
- [4] Lok AS, McMahon BJ. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic hepatitis B. *Hepatology.* 34 (2001) 1225-1241.
- [5] Cacciola I, Cerenzia G, Pollicino T, Squadrito G, Castellaneta S, Zanetti AR, Mieli-Vergani G, Raimondo G. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) and outcome of perinatal HBV infection. *J Hepatol.* 36 (2002) 426-432.
- [6] Lyons S, Sharp C, LeBreton M, Djoko CF, Kiyang JA, Lankester F, Bibila TG, Tamoufé U, Fair J, Wolfe ND, Simmonds P. Species association of hepatitis B virus (HBV) in non-human apes; evidence for recombination between gorilla and chimpanzee variants. *PLoS One.* 7 (2012) e33430.
- [7] Sureau C, Eichberg JW, Hubbard GB, Romet-Lemonne JL, Essex M. A molecularly cloned hepatitis B virus produced in vitro is infectious in a chimpanzee. *J Virol.* 62 (1988) 3064-3067.
- [8] Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* 3 (1984) 2191-2196.
- [9] Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology.* 29 (1999) 111-125.
- [10] Harada K, Mitaka T, Miyamoto S, Sugimoto S, Ikeda S, Takeda H, Mochizuki Y, Hirata K. Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *J Hepatol.* 39 (2003) 716-723.
- [11] Sudo R, Ikeda S, Sugimoto S, Harada K, Hirata K, Tanishita K, Mochizuki Y, Mitaka T. Bile canalicular formation in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes and nonparenchymal cells. *J Cell Physiol.* 199 (2004) 252-261.
- [12] Sudo R, Kohara H, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Coordinated movement of bile canalicular networks reconstructed by rat small hepatocytes. *Ann Biomed Eng.* 33 (2005) 696-708.
- [13] Sugimoto S, Harada K, Shiotani T, Ikeda S, Katsura N, Ikai I, Mizuguchi T, Hirata K, Yamaoka Y, Mitaka T. Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver tissues. *Tissue Eng.* 11 (2005) 626-633.
- [14] Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on microporous membranes. *FASEB J.* 19 (2005) 1695-1697.
- [15] Kasuya J, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Hepatic stellate cell-mediated three-dimensional hepatocyte and endothelial cell triculture model. *Tissue Eng Part A.* 17 (2011) 361-370.
- [16] Kasuya J, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Spatio-temporal control of hepatic stellate cell-endothelial cell interactions for reconstruction of liver sinusoids in vitro. *Tissue Eng Part A.* 18 (2012) 1045-1056.
- [17] Kasuya J, Sudo R, Tamogami R, Masuda G, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of 3D stacked hepatocyte tissues using degradable, microporous poly(D,L-lactide-co-glycolide) membranes. *Biomaterials.* 33 (2012) 2693-2700.
- [18] Kasuya J, Sudo R, Masuda G, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of hepatic stellate cell-incorporated liver sinusoidal structures in small hepatocyte tri-culture using microporous membranes. *J Tissue Eng Regen Med (TERMS), J Tissue Eng Regen Med.* 2012. [Epub ahead of print]
- [19] Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T, Nagamori S, Oda H. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the three-dimensional cell shape. *J Cell Physiol.* 227 (2012) 2898-2906
- [20] Satoh D, Maeda T, Ito T et al: Establishment and directed differentiation of induced pluripotent stem cells from glycogen storage disease type Ib patient. *Genes to Cells* 18 (2013) 1053-1069.
- [21] Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, Tanaka S, Yoshida M, Kohara M. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol.* 37 (1999) 2899-2903.
- [22] Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW.

- Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother.* 41 (1997) 1715-1720.
- [23] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 (1987) 1005-1009.
- [24] Ni Y, Sonnabend J, Seitz S, Urban S. The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly. *J Virol.* 84 (2010) 3879-3888.
- [25] Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol.* 84 (2010) 1989-2000.
- [26] Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol.* 90 (2009) 127-135.
- [27] Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of unconjugated and conjugated bile salts by monolayers of LLC-PK1 cells doubly transfected with human NTCP and BSEP or with rat Ntcp and Bsep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290 (2006) G550-G556.
- [28] Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 34 (2013) 45-78.
- [29] Fenner KS, Jones HM, Ullah M, Kempshall S, Dickins M, Lai Y, Morgan P, Barton HA. The evolution of the OATP hepatic uptake transport protein family in DMPK sciences: from obscure liver transporters to key determinants of hepatobiliary clearance. *Xenobiotica.* 42 (2012) 28-45.
- [30] Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 201 (2011) 299-323.
- [31] Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2 (2006) 351-366.
- [32] Kubitz R, Dröge C, Stindt J, Weissenberger K, Häussinger D. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 36 (2012) 536-553.
- [33] Stieger B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol.* 201 (2011) 205-259.
- [34] Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife.* 2012;1:e00049.
- [35] Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, Gao Z, Jing Z, Song M, Xu G, Sui J, Li W. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol.* 87 (2013) 7977-7991.
- [36] Müller M, Jansen PL. The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J Hepatol.* 28 (1998) 344-354.
- [37] Anwer MS, Hegner D. Effect of Na on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Evidence for a heterogeneous system. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 359 (1978) 181-192.
- [38] Scharschmidt BF, Stephens JE. Transport of sodium, chloride, and taurocholate by cultured rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78 (1981) 986-990.
- [39] Yamazaki M, Suzuki H, Hanano M, Sugiyama Y. Different relationships between cellular ATP and hepatic uptake among taurocholate, cholate, and organic anions. *Am J Physiol.* 264 (1993) G693-G701.
- [40] Kouzuki H, Suzuki H, Ito K, Ohashi R, Sugiyama Y. Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 286 (1998) 1043-1050.
- [41] Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 10629-10633.



- [42] Cattori V, Eckhardt U, Hagenbuch B. Molecular cloning and functional characterization of two alternatively spliced Ntcp isoforms from mouse liver1. *Biochim Biophys Acta.* 1445 (1999) 154-159.
- [43] Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhsen A, Heuer H, Becker W, Corsiero D, Girbig F, Noll R, Weyland C. Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res.* 40 (1999) 1604-1617.
- [44] Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest.* 93 (1994) 1326-1331.
- [45] Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol.* 33 (2005) 27-34.
- [46] Hellerbrand C. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch.* 465 (2013) 775-758.
- [47] Senoo H, Imai K, Matano Y, Sato M. Molecular mechanisms in the reversible regulation of morphology, proliferation and collagen metabolism in hepatic stellate cells by the three-dimensional structure of the extracellular matrix. *J Gastroenterol Hepatol.* 13 (1998) Suppl:S19-S32.

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：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

研究協力者：Muriel Thirion 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野

分担研究課題：HBV の細胞内ライフサイクルに及ぼす miRNA 機能の解析

研究要旨：キメラマウス由来ヒト肝細胞： $2 \times 10^6$ 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。このなかで、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などの候補マイクロRNを同定する事が出来、これらの標的とする分子群の解明や、その生物学的意義についての考察を深めた。

## A. 研究目的

Non-coding RNA のなかで、microRNA の遺伝子発現の微調整に果たす役割は大きく、microRNA に起こるゲノム、エピゲノム変化は多くの疾患の原因と密接に関係している。すでにC型肝炎ウイルス(HCV)においては microRNA122 がその複製に関与する事実から、miR122 のアンタゴニスト(LNA)を用いた臨床応用が始まっているが、HBVに関する microRNA 制御の情報は安定な感染系等の欠如から極めて少ない。本研究では、主任研究者が確立する肝細胞培養およびそれを用いた感染系をもとに、microRNA 発現解析を網羅的に行なう事で、ウイルス感染における microRNA 制御の全貌を明らかにするとともに、HBV の細胞内ライフサイクル諸過程に関与する標的 microRNA を特定する事を目的とする。初年度は、HBV の複製に伴って変化する細胞内の microRNA の同定を目的に、感染細胞の microRNA 網羅的解析による基盤データの獲得と解析系の整備を完成させ、本年

度は、HBV 感染後の細胞内での microRNA の網羅的発現解析を終了し、HBV 感染制御に関与する可能性の有る複数の microRNA 候補の特定とその生物学的意義の解明が課題である。

## B. 研究方法

キメラマウス由来ヒト肝細胞： $2 \times 10^6$  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。

## C. 研究結果

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。まずそれぞれの標的分子を表1、2に示す。

表 1 : miR-3649の制御予測分子

## 1a/Predicted targets of mir-3649

- **WNT5B**: Wnt family member
  - Family members implicated in oncogenesis
- **FOXP1**: Forkhead box transcription factor
  - Act as tumor suppressor in several cancers
  - Important roles in regulation of tissue and cell type-specific gene transcription
- **XPO4**: exportin 4
  - Tumor suppressor
  - HCC cancer genes
- **OKL38 (OSGIN1)**: oxidative stress related protein
  - Regulate cell death

表 2 : miR-30c の制御予測分子

## 1a/Predicted targets of mir-30c

- **PIK3R2**:
  - Role in PI3K/Ras signaling
- **RHEBL1**: Ras homolog
  - Activated transcriptional activities of NFkB
- **RRAD**: Ras related protein
  - Among the genes used to characterize primary cultured invasive HCC phenotype (Lin *et al.*, 2012)
- **HDAC9**: histone deacetylase 9
  - Involved in inflammation-induced tumorigenesis

HBV 感染によって発現の上昇する miR-3649 は、主にが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。

### D. 考察

HBV の感染及び複製によって発現上昇した microRNA-3649、発現が減少した microRNA-30c を中心に、それぞれの標的分子とその作用機序を解明し、HBV の感染維持に関するメカニズムの検証を実施する。すでに、それぞれ、細胞周期、ユビキチン化プロセス、IFN レベル調節、炎症、がん化、そして自然免疫系の制御に係る分子が候補として挙がっている。これらの microRNA を正常のレベルに戻す事で、HBV の持続感染の打破や、複製の阻止に有効であるかどうかを、班内の主任研

究者らのチームと共同で検討する。また、肝細胞の成熟、機能維持に働く microRNA148a は、HBV-X タンパク質によってその発現が抑制される事や、HBV レセプター候補の NTCP の発現増強の誘導に係る事から、この microRNA の発現を抑制する anti-miR を用いる事で、HBV の感染阻害が可能かどうかを検証する。これらの作業を平成 26~27 年度で終了し、28 年度は、これらの microRNAs 核酸医薬の有効性を班内で用いられているキメラマウス感染モデル系で実証検討し、創薬としての可能性を判断する。

### E. 結論

HBV の最適な培養系として、ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子は重要であるが、網羅的なアレイ解析の結果から、肝細胞の成熟、機能維持に働く microRNA を同定した。この microRNA148a を導入すると、肝細胞の機能 (HBV レセプター候補の NTCP の発現増強、miR122 の発現上昇など) を誘導、維持する事を明らかにした。さらに、主任研究者や同班内の分担研究者と共同で、HBV 複製、分泌を制御する microRNAs の候補の同定を試みた。キメラマウス由来ヒト肝細胞:  $2 \times 10^6$  個、キメラマウス由来ヒト肝細胞培養上清: 感染・非感染の供与を受け、細胞からは microRNA 回収、精製を、培養上清からは、超遠心によるエクソソーム分画の回収と精製を実施した。microRNA、エクソソーム、ともに高純度で精製する事に成功した。まず細胞内の microRNA に関しては、3D-Gene による microRNA アレイ解析を実施し、HBV 感染 12 日後に有意に変化する複数の microRNA の特定に成功した。現在、HBV の感染及び複製によって発現上昇した microRNA を 15 種類、発現が減少した microRNA を 19 種類選定し、特に 2 つの miRNAs に注目、それらの機能解析を継続して実

施する計画である。

## F. 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

## 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：中西 広樹 秋田大学 生体情報研究センター 助教

分担研究課題：検体からの脂質調製とリポドミクス解析・多変量解析

研究要旨：HBVウイルスを感染させたキメラマウス由来ヒト肝細胞から抽出した脂溶性代謝物を特異的かつ網羅的に解析することでHBVの複製・分泌に関わる分子の同定を目指した。生理活性脂質はトリプル四重極型質量分析装置により特異的に分析し、細胞膜主要脂質はイオントラップ型質量分析装置を用いて網羅的に分析を行った。得られた膨大なデータは脂質同定ソフト（Lipid Search）と統計処理により解析し、非感染細胞に対し感染細胞で変動している脂質分子の絞り込みを行い、複数の変動している分子を見出した。

**A. 研究目的**

HBV ウイルスを感染させたキメラマウス由来ヒト肝細胞から抽出した脂溶性代謝物を特異的かつ網羅的に解析することでHBVの複製・分泌に関わる脂質分子を同定することを目的とする。さらに、その特異的な脂質分子が創薬に応用できるかどうかを検証する。

**B. 研究方法（図1）**

・検体

HBV ウイルス感染（接種2日後、5日後）・非感染のキメラマウス由来ヒト肝細胞

・脂質抽出

Bligh & Dyer 法による総脂質の抽出後、その一部を残し、陰イオン交換カラムによる分画を行った。各リン脂質極性部位のイオン交換能の違いによって徐々に分離・溶出し、中性脂質群、塩基性脂質群、酸性脂質群に分画した。

・質量分析

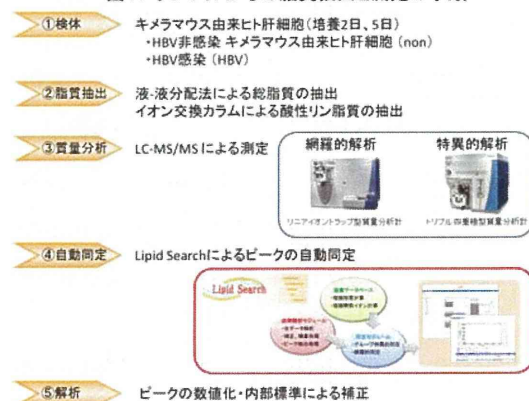
脂質解析はトリプル四重極型質量分析装置を

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。

・解析

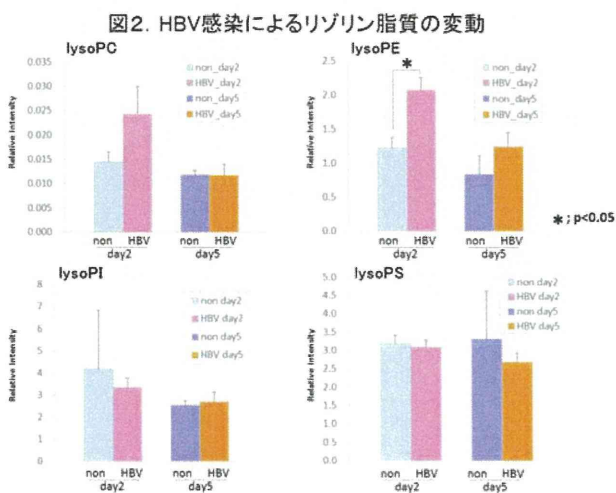
Lipid Search を用いて得られたピークの中から脂質分子のみの同定を行った。そして同定された脂質分子のピークを内部標準により補正のち数値化し統計処理を行い、有意に差がある分子を見出した。

図1. サンプルからの脂質抽出と測定の手順

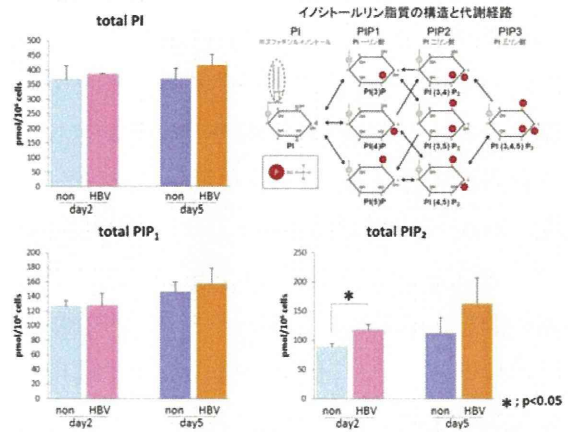


### C. 研究結果

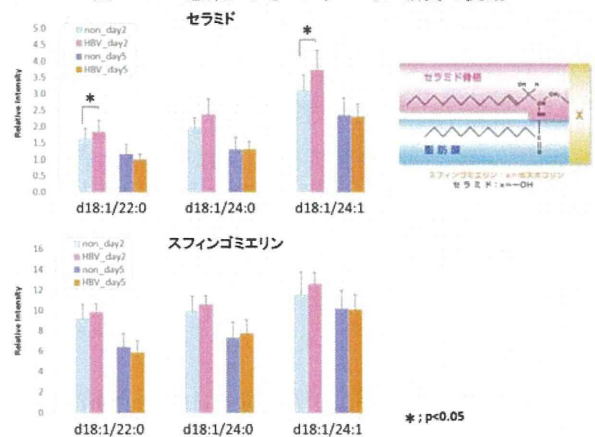
HBV ウイルス感染・非感染のキメラマウス由来ヒト肝細胞から脂質成分を抽出し、トリプル四重極型とイオントラップ型の異なる特性をもつ2台の液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて特異的かつ網羅的にリン脂質の解析を行った。細胞内外の生理活性分子またはその前駆体として働くことが知られているグリセロリン酸骨格に一つの脂肪酸側鎖をもつリゾリン脂質とイノシトール環の 3, 4, 5 位が可逆的にリン酸化された状態であるイノシトールリン脂質 (PIPs) を高感度に測定・解析したところ、HBV 感染により LysoPC、LysoPE と PIP2 の量が増加していた。その内訳を詳細に解析すると不飽和度が高い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 2, 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していた (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**



### D. 考察

今回得られたデータの一部に関してはすでに報告のある論文との整合性がとれている。LysoPE の増加に関しては HBV 感染肝細胞による NKT 細胞の活性化に必要なことの報告がある (Nat. Med. 2012; 18: 1060-1068)。また、スフィンゴリン脂質の合成阻害剤によりウイルス複製が抑制されるとの報告もある (J. Med. Virol. 2011; 83: 587-593)。創薬のターゲットとなるのは持続感染時に増加してくる分子であることから、LysoPE と PIP2 が候補に挙げられる。しかし、このうち LysoPE は単独での制御が難しく生体膜主要成分であることから、現時点で創薬候補となるのは生理活性分子である PIP2 が候補となる。イノシトールリン脂質は近年、遺伝子改変マウスやヒトの疾患遺伝子解析から発がんやアレルギー、

糖代謝、骨代謝、血管新生、神経発生など多様な生体調節機能を有することが明らかとなっている。PIPs と HBV との関連についてもこれまで何報か報告があるが、実際の代謝物の量を測定したのは本報告が初となる。

現在、PIPs 代謝酵素のうち PIP3 代謝酵素であるクラス I PI3K は、がんの治療標的としてその阻害剤の開発が進んでいるが、クラス I PI3K 以外の代謝酵素については、特異性の観点で信用できる阻害剤や活性化剤は存在しない。そのため、PIP2 は革新的な医薬の有望な作用点として期待できる。

次年度からは感染日数のポイントを増やし感染時期特異的な分子種の絞り込みを行っていく。さらに、開発中の新規中性脂質定量分析法を用いてトリアシルグリセリドやコレステロールなどがウイルス感染により変動するかどうか質的、量的解析を行いたいと考えている。

## E. 結論

リピドミクス解析により HBV ウイルス持続感染時に細胞内外の生理活性分子であるリゾリン脂質とイノシトールリン脂質の有意な増加を見出した。得られた脂質解析データはゲノム解析のデータと統合的に解析し、関連タンパク質などの同定を進めていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 中西 広樹. 脂質量分析の高感度化. 遺伝子医学 MOOK 24 号 最新生理活性脂質研究 実験手法, 基礎的知識とその応用. 77-82. 2013.
- (2) 中西 広樹. 酸性リゾリン脂質を量る. 実験医学別冊 見つける、量る、可視化する! 質量分析実験ガイド. 118-123. 2013.

### 2. 学会発表

特にございません

## G. 知的所得権の所得状況

### 1. 特許取得

特にございません

### 2. 実用新案登録

特にございません

### 3. その他

特にございません

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：深澤 征義 国立感染症研究所 細胞化学部 室長

分担研究課題：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

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染に対する新たな治療法が強く求められている。我々は本年も引き続きHBV産生に対する宿主脂質関連化合物の影響について解析を行い、今回新たに高度不飽和脂肪酸、特にDHAがHBV産生を有意に抑制することを見出した。

一方、培養細胞レベルでHBV感染各ステップを効率的に再現する系の確立も創薬研究上極めて有用である。そこで、HepG2/NTCP-FLAG#2細胞を樹立し、宿主細胞へのHBV結合を評価する系を作製した。さらに、HepG2-hNTCP-C4細胞における、より高感染の系も確立した。

また、HBV感染受容体の一つであるNTCPに対するマウスモノクローナル抗体の作製を試み、血清の抗体価が上昇すること、抗血清がHBVの宿主細胞への結合を阻害することを示した。このことからNTCPを標的とする抗HBV創薬戦略が可能であることを提示できたものと考えている。

## A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染による慢性肝炎、それに伴う肝硬変・肝がん発症は大きな健康上の問題である。既存の薬剤療法では完全なウイルスの排除は難しい場合が多く、新たな薬剤の実用化が強く求められている。効率的な抗HBV創薬研究を行うためには、HBV持続感染を再現する簡便でウイルス産生能の高い培養細胞評価系が必須であるが、未だ確立されているとは言えない状況である。そこで当該培養細胞評価系の確立を最終目的として、我々は主に脂質（代謝）に着目した観点から研究に取り組んでいる。

具体的には、本年度はHBV持続産生細胞を用いHBV産生下における宿主脂質代謝関連化合物等の影響を検討した。また一方で、近年、胆汁酸の一つであるタウロコール酸（コレステロール代謝

物）の輸送体であるNa<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP）がHBV粒子の侵入に重要であることがわかってきており、別途、創薬標的としてのNTCPの可能性についても、抗体の作製の試みを通じて検討を始めたのでその経過を報告する。

## B. 研究方法

### B-1. HBV産生に対する宿主脂質関連化合物の影響の解析

HBV持続感染細胞としてHep2.2.15.7細胞を用いた。本細胞は、HBVゲノム2倍長を導入したHepG2細胞より分離されたHBV持続産生株であるHepG2.2.15細胞から渡士らによりクローニングされた細胞亜株である。HBV分泌能が非常に高いことが特徴である。実際に、細胞培養上清中の



HBV-DNNA 濃度は、 $10^9$  コピー/ml 近くまでになることが確認されている。

本細胞をコラーゲンコート 48 穴プレートに播種し、1 週間以上培養を行う（細胞は confluent の状態になっている）。この間 3 日おきに培地交換を行う。各脂質を含む培地を調製し、細胞に添加する。2 日間 24 時間ごとに、各脂質入りの培地で培地交換を行いさらに 3 日後に、培養上清及び細胞を回収し、DNA を含む画分を精製し、定量 PCR により含有 HBV-DNA 量を測定した。各脂質による細胞毒性の検討は、XTT アッセイにより行った。

#### B-2. HBV 感染各ステップを効率的に再現する系の確立の試み

ヒト肝細胞株 HepG2 細胞に NTCP を発現させることで、HBV 感染が見られるとの報告 (Elife 1:e00049 (2012)) に基づいて、HepG2 細胞に pcDNA3.1/NTCP-FLAG (C 末に FLAG タグをつけた NTCP) を導入後、NTCP-FLAG を発現する細胞クローン (#2) を樹立した。NTCP-FLAG の発現は細胞破碎液のイムノブロットにて確認した。また、細胞表面への発現は、蛍光免疫染色にて行った。機能的な発現は [ $^3$ H]taurocholate 輸送活性を測定する (Biochem. J. 441, 1007-1015(2012)) ことで行った。

### C. 研究結果

#### C-1. HBV 産生に対する宿主脂質関連化合物の影響の解析

様々な宿主脂質代謝関連化合物を用いた検討から、昨年度までに、コレステロール代謝関連薬剤等による HBV 産生阻害を見出してきた。また、脂質代謝標識実験から脂肪酸代謝が HBV 産生細胞で有意に変動していることもわかってきた。そこで本年度はまず、HBV 産生に対する各種脂肪酸の効果を検討した。飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸（一

価、二価、多価）について検討を行った結果、飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸以外の不飽和脂肪酸については、HBV 産生に有意な変化が見られなかった。一方、多価不飽和脂肪酸については、 $10\mu\text{M}$  アラキドン酸、EPA、DHA において感染阻害が確認された。特に DHA は阻害の程度が強かった。

#### C-2. HBV 感染各ステップを効率的に再現する系の確立の試み

研究方法に従って HepG2/NTCP-FLAG#2 細胞を樹立した。本細胞は細胞表面に機能的な NTCP を発現しているにもかかわらず、HBV 感染は（ほとんど）認められなかった。一つの可能性としては、本細胞には他の感染に必要な因子が欠損している可能性が考えられる。ただし、細胞表面への HBV の結合は確認され、(下記にも述べるが、)抗 NTCP 血清でその結合が阻害されることから(少なくとも一部は)NTCP 特異的な結合を反映しているものと考えられた。

ヒト 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。我々は感染源として Hep2.2.15.7 細胞の濃縮上清を用いることで、同様のプロトコルにて、 $\sim 7 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{g}$  gDNA(これまでの 10 倍以上)の感染を実現することができるようになった。

#### C-3. 抗 NTCP モノクローナル抗体作製の試み

先にも述べたが、HepG2 細胞に NTCP 分子を発現させることで、HBV の感染が顕著に見られるようになることから、NTCP が HBV の侵入に重要な分子であることが近年報告された (Elife 1:e00049 (2012))。我々は、これまでに、C 型肝炎ウイルス感染系において、その侵入に必須の因

子である Claudin-1 分子に対するモノクローナル抗体を複数樹立し、これらの抗体が感染を強く阻止する事を明らかにしてきており、感染受容体を標的とした創薬の可能性について検討を重ね、成果を積み上げてきている。今回、HBV 感染受容体(の一つ)である NTCP についても、抗体作製を通じて創薬標的としての可能性を検討したいと考え、以下の検討を始めた。

NTCP は N 末端が細胞外側に出た 7 回膜貫通タンパク質であり、第 2、3 細胞外ドメインが HBV 感染に重要だとされている (J. Virol. 87(14):7977-91 (2013))。インタクトの複数膜貫通タンパク質に対する抗体作製は極めて難しいことが知られており、NTCP は種間のホモロジーも高いことから抗体作製は非常に困難を伴うものと想定された。そこで、これまでの経験から最も成功率が高いと思われる DNA 免疫法を用い、免疫動物を自己免疫疾患マウス (BXSb マウス) にすることでモノクローナル抗体の作製に着手した。有効な抗体を分離するためにはスクリーニング系も極めて重要であり、以下の 3 つの方法を構築した。1) NTCP の発現がほとんど見られない HepG2 細胞に、NTCP-FLAG (C 末に FLAG タグをつけた NTCP) を恒常的に発現した株 (HepG2/NTCP-FLAG#2) を樹立し、HepG2 細胞と HepG2/NTCP-FLAG#2 細胞への結合の違いを FACS で分析する方法、2) コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて NTCP/リポソームを合成し、これを ELISA システムの抗原として使用した抗 NTCP 抗体検出法、3) NTCP による [<sup>3</sup>H]taurocholate 輸送活性に対する抗体阻害をみる方法、である。

2 週間おきに皮下に NTCP 発現ベクターを免疫後、血清中の免疫タイトルの測定を行った。20 匹中 6 匹のマウス血清で、HepG2/NTCP-FLAG#2 細

胞に対して (FACS において) 有意に結合性が高い結果が得られた。ELISA 系では 20 匹中 3 匹のマウス血清で結合が見られ、特に 1 匹では高い値を示した。さらに、HepG2/NTCP-FLAG#2 細胞への HBV の結合に対する各抗血清の効果を検討してみた。その結果、複数のマウス血清で、(コントロール血清を用いた場合と比較して) 有意に HBV の結合が低下していた。

そこで、常法に従い B 細胞をマウスミエロマ細胞と融合しハイブリドーマを作製しスクリーニングを行った。その結果、FACS 解析において 4 つのポジティブウェルが見出された。そこからクローンの樹立を試みたが、残念ながら、すべてのクローンで結合活性が失われてしまっていた。

最終段階までは、非常に良好な結果であったため、現在、方法を若干修正し再度抗体作製を直している。

## D. 考察

今回、Hep2. 2. 15. 7 細胞を用いた検討から、飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸以外の不飽和脂肪酸については、HBV 産生に有意な変化が見られなかった。しかし、他の(実際の感染をより反映した)HBV 産生系を用いることで変動が見られる可能性もあるので、今回導入・確立した別の細胞系でも今後検討を行ってみたい。

Hep2. 2. 15. 7 細胞において、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。これまでの疫学研究から、n-3 脂肪酸(DHA などの高度不飽和脂肪酸)が HBV 感染に関連した肝細胞がんのリスクを低減させるとの興味深い報告 (Gastroenterology 142:1468-1475 (2012)、J. Biomed. Res. 26:395-399(2012)) があり、これらの現象と相関があるかもしれない。

今回の結果と同研究班のリピドミクス研究の結果等を合わせるとホスホリパーゼの関与の可

能性も示唆され、今後この点についても検討していきたい。

インタクトの NTCP 細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体の作製については、これまでに全く報告が無い。これは、NTCP が複数膜貫通型タンパク質であり、細胞外ドメインも非常に狭い領域に限定されている事が一つの大きな原因と考えられる。今回 DNA 免疫法を用いることで、抗体価の上昇が確認されたことは、一つの進歩であると考えている。ただし、抗体サブクラスがすべて IgM であった可能性が高く、そのためにより不安定で抗体クローン樹立に至らなかったと想定され、次回は IgG サブクラスの誘導を目指したい。また、抗血清が HBV の宿主細胞への結合を阻害することもわかったことから、NTCP を標的とする感染阻害のコンセプトが実行可能である可能性を提示できたとも考えている。

## E. 結論

本年度も引き続き HBV 産生に対する宿主脂質関連化合物等の影響の解析を行い、高度不飽和脂肪酸、特に DHA が HBV 産生を有意に抑制することを見出した。

一方、HepG2/NTCP-FLAG#2 細胞を用い宿主細胞への HBV 結合を評価する系を作製した。さらに、HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いてより感染の高い条件を確立した。

また、HBV の感染受容体の一つと考えられる NTCP に対するマウスモノクローナル抗体の作製を試み、抗体価の上昇、HBV の宿主細胞への結合を阻害することを示した。このことから抗 HBV 薬として NTCP を標的とする創薬ストラテジーが可能であることを提示できたものと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki

H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. “ Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP ” Biochem. Biophys. Res. Commun., 443, 808-813 (2014)

- 2) Fukasawa M, Cornea A, Varlamov O. “Selective control of SNARE recycling by Golgi retention” FEBS Letters 587, 2377-2384 (2013)

### 2. 学会発表

該当なし

## G. 知的所得権の所得状況

### 1. 特許取得

(発明者) 近藤昌夫、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁、渡利彰浩「抗体、フラグメント、分子及び抗 HCV 治療剤」(PCT/JP2013/006602) 出願中

### 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：高岡 晃教 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 教授

研究協力者：

佐藤 精一 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 助教

李 凱 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 博士課程 1 年

亀山 武志 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 博士研究員

林 隆也 北海道大学 遺伝子病制御研究所 附属感染癌研究センター 特任助教

原島 秀吉 北海道大学 薬学部 薬剤分子設計学研究室 教授

秋田 英万 北海道大学 薬学部 薬剤分子設計学研究室 准教授

櫻井 遊 北海道大学 薬学部 薬剤分子設計学研究室 特任助教

分担研究課題：自然免疫認識機構の制御による HBV 複製への影響

研究要旨：HBV の自然免疫認識機構を探るために、ヒト肝細胞のキメラマウス、初代ヒト肝細胞や肝がん細胞株の感染の系を利用して解析を進めた結果、HBV は RIG-I を介して III 型 IFNs 誘導を引き起こすことが示された。さらに HBV の由来の RNA、特に pre-genomic RNA (pgRNA)が RIG-I のリガンドであることが示され、中でも HBV の特定のタンパク質と結合することが知られていた 62-mer 領域を認識していることが明らかとなった。さらに検討を進め、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。これらの結果に基づいて、他班と連携いただき、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証明する事ができた。

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV)により活性化される自然免疫機構の解析により、HBV 持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発へ貢献するため、以下の 3 つの課題に取り組んだ。(1)HBV 感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定。(2)HBV による自然免疫活性化メカニズムの同定および応用を平成 25 年度の研究内容とした。

#### B. 研究方法

試料:プラスミド pUC19-HBV-Ae、C は田中靖人教授(名古屋市立大学)より分与して頂いた。RNAiMAX lipofectamine reagent および Lipofectamine 2000 は Invitrogen 社および Fugene HD は、Promega 社より購入したものを使用した。本研究に使用した siRNA、Primer は、Sigma 社において合成したものを使用した。GST-RIG-I 精製タンパク質は Sf9 細胞に Bac-to-bac baculovirus expression