

system (invitrogen)を使用し、添付のプロトコルに従い発現させ、Glutathione Sepharose 4B beads (GE healthcare)を使用し精製、Precision protease (GE healthcare)を使用し、GST タグを除去したものを使用した。

細胞培養: HEK293T および、肝癌細胞である HepG2、Huh7、Huh7.5 は、ダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ)に 10% 牛胎児血清、4 mM グルタミンを添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。初代ヒト肝細胞(PHH)はフェニックスバイオより購入した。HepG2 や Huh-7 や Huh-7.5 細胞でのプラスミド発現系においては、Fugene HD をまた HEK293T 細胞に対しては Lipofectamine2000 を使用した。siRNA のトランスフェクションにおいては、RNAiMAX lipofectamine reagent を使用し、共に添付マニュアルに従いトランスフェクションした。

RNA 抽出、定量的-RT-PCR: HEK293T および、PHH、HepG2、Huh7、Huh7.5 細胞を PBS にて一度洗浄し、Isogen (日本ジーン社)を用いて、RNA を抽出した。常法に従い、DNase I (Invitrogen 社)および ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO 社)を使用し cDNA を合成後、既知の IFNs やサイトカインの転写変動をプライマー、SYBR Premix Ex Taq (TAKARA 社)、Real time PCR (Step One Plus: Applied Biosystems)を用いて解析した。

RNA pull down による 62-mer RNA と RIG-I との相互作用の解析: T7 promoter with MEGAscript (Ambion)を使用して *in vitro* 転写させた 62-mer RNA および、Control RNA を LabelIT Biotin Labeling Kit (Takara)を用いて、ビオチン化した。バッファー(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1

mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 ug/mL Leupeptin, 1% NP-40, pH7.2)で、可溶化した FLAG-RIG-I を過剰発現させた HEK293T 細胞抽出液と各種核酸を混合し、室温で、1 時間ローテートし反応させた。その後、Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen 社)と混合し、室温で一時間ローテートし Biotin 核酸を沈降させた。ビーズを 4°C 2000rpm にて、沈降させ、バッファーにて 3 回洗浄後、SDS-PAGE を行い、抗 Flag 抗体(Sigma 社)にて、Immunoblot を行った。

Encapsidated HBV DNA の定量: 感染後の PHH もしくは Huh-7.5 細胞をバッファー(50 mM Tris (pH7.4)、1 mM EDTA, 1% NP-40)で可溶化した後、6 mM になるように、MgOAc を加え、DNase I ならびに RNase A 処理を行った。反応 3 時間後、10 mM EDTA を加え、65°C 15 min の反応で失活させ、Proteinase K 処理後、フェノールクロロホルムを使用し、HBV DNA を精製した。その後 Q-PCR にて Encapsidated HBV DNA の定量を行った。

RIP assay: HEK293T もしくは Huh-7.5 細胞を以下のバッファー(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 1mM DTT, 1 •g/ml leupeptin, 100 U/ml RNaseOUT(Invitrogen))で可溶化した。HA-tag 抗体を細胞抽出液に混合し2時間ローテートした後、Protein-G Dynabeads を加え、さらに 1 時間ローテートした。ビーズを洗浄後、結合した RNA を Isogen にて抽出し、qRT-PCR にて pgRNA の共沈降量を定量した。

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 を投与した。血清 HBV DNA copy は Q-PCR にて定量を行っ

た。OCT 包埋した肝組織をクリオスタットにて切片を作製し、アセトンとメタノールにて固定を行った。抗 HBc 抗体(Dako)、抗 human albumin 抗体(Bethl laboratories)を使用し、間接免疫抗体法にて染色した。

C. 研究結果

HBV 感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定: 昨年度、HepG2 や Huh-7 を用いた系で HBV 感染に関与する自然免疫系センサー分子として retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) 同定した。PHH にて ウイルス感染においても評価を行ったところ、同様に、RIG-I を発現抑制した場合、HBV 感染による IFN- λ 1 の誘導が抑制した結果が得られた(図 1)。以上のことより、HBV 感染により、RIG-I 依存的に IFN- λ 1 の発現誘導を導くことが示された。

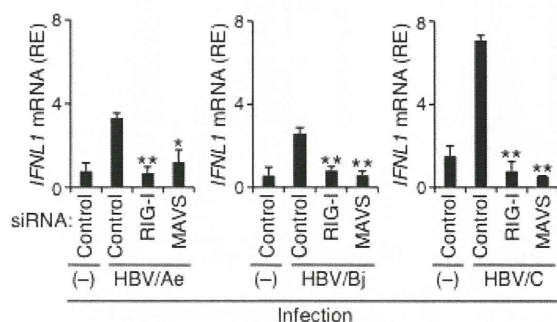


図1: 初代ヒト肝細胞におけるHBV感染によるRIG-I依存的なIFN- λ 1誘導。各種siRNAを処理した初代ヒト肝細胞(PHH)にHBV感染後のIFN- λ 1のmRNAの誘導を定量的PCR法により検出した。

HBV による自然免疫活性化メカニズムの解析: RIG-I は RNA のみならず DNA 認識との関連性も報告されており、HBV 由来のどの核酸が RIG-I 活性化を誘導するのか詳細を明らかにするため、HBV 由来 RNA に対する siRNA による効果を解析した。HBV 由来 RNA に対する siRNA を導入したところ、HBV Ae 導入による IFN- λ 1 の発現誘導の減少が認められた(昨年度の報告書参照)。また、4 種類の HBV 由来の

RNAs をそれぞれ HEK293T に発現させると pgRNA の発現により IFN- λ 1 の発現誘導を導くことが示された(図 2-a)。さらに、欠失変異体を用いた解析により、5' に存在している 62 mer 領域が IFN- λ 1 の発現誘導を導くことが示された(図 2-b)。実際、in vitro 転写させた 62 mer 領域の RNA を導入する実験系においても、これを支持する結果が得られた。さらに、RIG-I が 62 mer 領域と結合することが示された。以上の結果より、HBV の特定のタンパク質が相互作用する HBV の pgRNA の 62 mer 領域が RIG-I のリガンドとなることが示された。

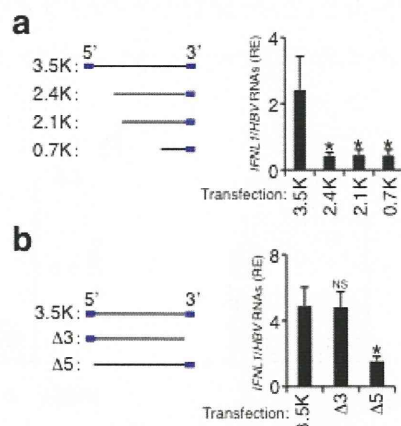


図2: pgRNAの特定領域がRIG-Iにより認識されIFN- λ 1誘導を引き起こす。(a)各種HBV由来RNA(3.5K, 2.4K, 2.1Kと0.7K)をHEK293T細胞に発現させIFN- λ 1のmRNAの誘導を定量的PCR法により検出した。(b)各種HBV由来RNA(3.5K, Δ 3や Δ 5)をHEK293T細胞に発現させIFN- λ 1のmRNAの誘導を定量的PCR法により検出した。

次に、我々は RIG-I の抗 HBV 効果を解析するために、siRNA により発現抑制させた RIG-I に HBV 感染させ、HBV の複製に与える効果を解析した。RIG-I の発現抑制は HBV のコピー数を上昇させた(図 3-a)。これらの結果は RIG-I が HBV 感染において抗ウイルス活性を活性化させる因子であることが示された。さらに一方で、62 mer RNA 領域は HBV の複製において重要な逆転写反応を導く HBV protein が結合する部位であることが明らかにされていた。これらの結果に基づき、我々は RIG-I が HBV Protein

の 62 mer RNA 領域への結合を阻害させるのではないかと仮説を立てた。実際、*in vitro* の系において RIG-I を存在させると量依存的に HBV Protein と pgRNA の相互作用が阻害された(図 3-b)。さらに我々は、RIG-I の RDドメインを Huh-7.5 細胞に発現させると、HBV の複製が阻害され、興味深いことに、RNA 結合能が無い変異体ではその能力を失っていた(図 3-c)。以上の結果に基づいて、我々は 62 mer RNA の治療応用の可能性について解析を行った。62 mer RNA は *in vitro* において、HBV protein と pgRNA の相互作用を阻害し(図 3-d)、HBV 複製を阻害させた(図 3-e)。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

-MEND を投与したマウス群においてコントロール群に比べて、血清中の HBV コピーナンバーの減少(図 3-f)や、肝臓組織での core タンパク質の発現量の減少を導いた。

D. 考察

2年間で得られた HBV の自然免疫認識機構の知見に基づいて見出された RIG-I 経路や“62 mer RNA”の感染防御における治療応用の可能性を中心に解析を継続していきたいと考えている。具体的には、RIG-I 経路に対する免疫回避の分子機構の詳細を解析する一方で、当該班内で構築された各種 HBV 感染の系を用いて、62 mer RNA -MEND の効果に関する評価を行いたい。また、一方で、現在、核酸に対する各種パターン認識受容体を介する自

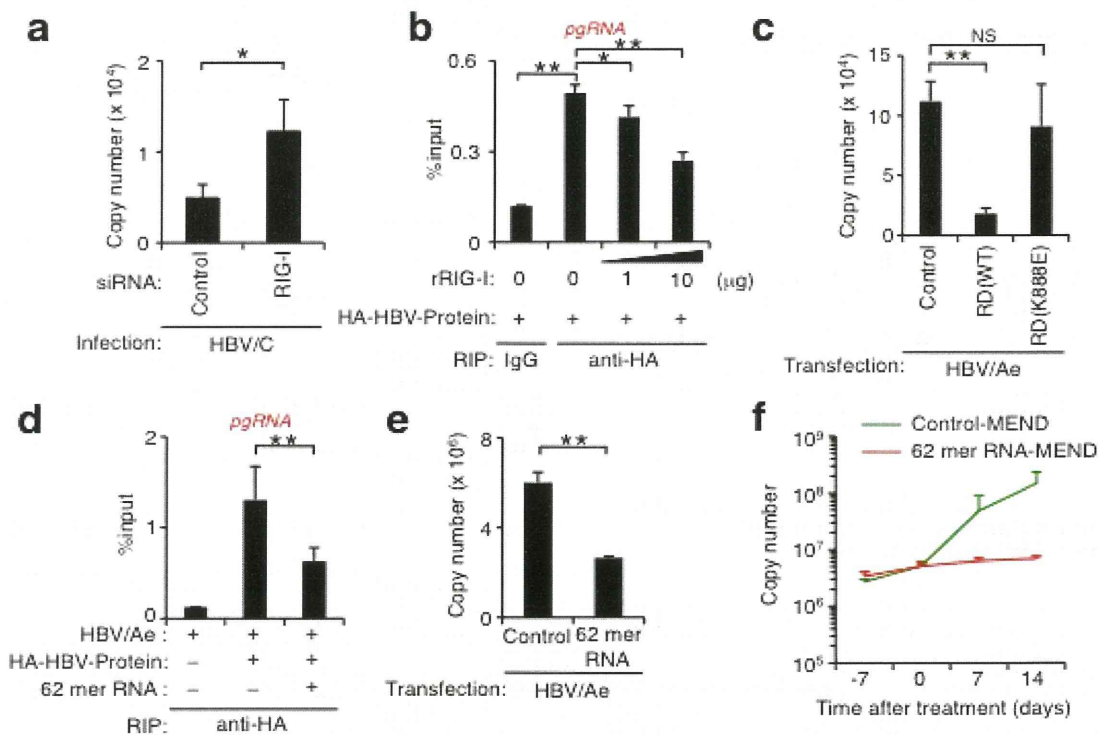


図3: RIG-Iおよび62 mer RNAによる抗HBV効果

(a)PHHにRIG-Iに対するsiRNAまたはコントロールsiRNAを導入し、HBV感染を行った。感染10日後encapsidated HBV DNAをQ-PCRにて定量した。(b) HEK293T細胞にHA-タグのHBV protein (HA-HBV-Protein)とpgRNAを共発現させ、RIG-I精製タンパク質存在下でHAタグ抗体を使用して、RIP assayを行った。共沈降したpgRNAをqRT-PCRで検出した。(c) Huh-7.5細胞にRIG-I RD WTまたはRD (K888E)を発現させ、72時間後encapsidated HBV DNAを定量した。(d) Huh-7.5細胞における62 mer RNAによるHBV proteinとpgRNAの相互作用の阻害効果をRIP assayにより解析した。(e) Huh-7.5細胞における62 mer RNAによるHBV複製効果をcと同様の方法で解析した。(f) HBVを感染させたキメラマウスに62 mer RNA-MENDもしくは、Control-MENDを2日おきに投与し、血清中のHBV DNAコピーナンバーをqPCRで解析した。

然免疫シグナルを広範に抑制する分子を同定しており、この分子の機能解析を詳細に行うことで、HBV の効率的な持続感染モデルの構築を試みることも計画している。このように、免疫回避の解析や樹状細胞などの免疫担当細胞を含めた形で、HBV 感染における自然免疫活性化機構の解析を進め、自然免疫による HBV 感染制御機構を包括的に解明することを目指していきたい。

E. 結論

以上より、本年度において、HBV 感染において、RIG-I が pgRNA の 62 mer RNA を認識し、自然免疫応答を引き起こしていることが示唆される結果を得た。さらに RIG-I の新しい機能として HBV protein の 62 mer RNA 領域への結合を阻害させる分子であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Dual function of RIG-I as an innate antiviral mediator against hepatitis B virus., Seiichi Sato, Kai Li, Takeshi Kameyama, Takaya Hayashi, Yuji Ishida, Shuko Murakami, Tsunamasa Watanabe, Sayuki Iijima, Yu Sakurai, Susumu Tsutsumi, Yusuke Sato, Hidetaka Akita, Charles M. Rice, Hideyoshi Harashima, Michinori Kohara, Yasuhito Tanaka & Akinori Takaoka. 投稿中

2. 学会発表

- Interferon induction by hepatitis B virus., Seiichi Sato, Kai Li and Akinori Takaoka, 第78回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会、第21回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (2013年5月、東京、都市センターホテル、ポスター発表)
- Interferon induction by hepatitis B virus., Kai Li, Seiichi Sato and Akinori Takaoka, 日本ウイルス学会北海道支部 第47回夏期シンポジウム (2013

年7月、北海道空知郡奈井江町、新ないえ温泉、ホテル北の湯、口頭発表)

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

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：石川哲也 名古屋大学 大学院医学系研究科 教授

研究協力者：湯川 博 名古屋大学 革新ナノデバイス研究センター 特任講師

分担研究課題：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

研究要旨：蛍光ラベルで可視化したHBs粒子の細胞への取込みを蛍光顕微鏡下で観察、細胞内取込み効率を各種培養細胞間で比較し、さらに取込み機構について解析した。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ものの、ヒト肝癌細胞（HepG2、Huh-7）、ラット肝癌細胞（MH1C1）での取込み効率は低かった。また、マウス線維芽細胞（MEF）では比較的効率よく取込まれていた。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、エンドサイトーシス経路のうち、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。HBVレセプターの候補であるNTCP（Na⁺/タウロコール酸共輸送ポリペプチド）及びアジアロ糖タンパクレセプター（ASGPR）に対する阻害剤を用いた取込み阻害実験などの結果から、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ASGPRが関与することが示唆された。

A. 研究目的

HBVの細胞内侵入機構、細胞内での局在、存在形態、複製機構についての詳細は未だに明らかにされていない。HBVの可視化技術を用いて、これらHBVの生活環を明らかにし、培養細胞評価系の確立とともに新たな創薬の方向性を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

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）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。さらにヒト肝癌細胞（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）においても同様の実験を行った。HBs粒子の細胞内取込みについて、エンドサイトーシス経路の関与を解析するため、HuS-E/2を用い、低温環境下（4℃）、あるいはsodium azid + 2-deoxy-D-glucose、chlorpromazine（CPZ）、filipinIII、amiloride、cytocharasin Dなど、エンドサイトーシス阻害剤の添加がHBs粒子の取込み効率に与える影響を検討した。また、cyclosporine A、propranolol、ursodeoxycholic acidなどのNTCP阻害剤、EDTA、suramin、thyroglobulinなどのASGPR阻害剤のHBs粒子取込みへの影響についても検討した。

C. 研究結果

HBs粒子の取込みはHuS-E/2において最も効率

がよく、HBs 粒子感作後 10 分以内には取込みが観察され、取込みは 24h 後まで経時的に増加した。HepG2、Huh-7、MH1C1 では、HBs 粒子感作後 24h で軽度の取込みを認めるのみであった。MEF では、早期の取込みは HuS-E/2 に及ばないものの、24h での取込みは HuS-E/2 のそれと同程度まで増加した。低温環境下、各種阻害剤添加による検討より、HBs 粒子の取込みにはエンドサイトーシスが関与し、さらにエンドサイトーシス経路のうち、ダイナミン依存的経路（クラスリン介在性、カベオラ介在性）、マクロピノサイトーシスが主要な経路であることが示唆された。NTCP-HEK293 では HBs 粒子の特異的取込みがほとんど確認されなかったが、HuS-E/2 においては NTCP 阻害剤、ASGPR 阻害剤ともに HBs 粒子の抑制に作用することにより、NTCP、ASGPR ともに HBs 粒子の取込みに関与することが示唆された。

D. 考察

今回、用いた HBs 粒子蛍光ラベル法は、ウイルス粒子を用いた場合にも感染性に影響することなく、高感度にウイルスの細胞内局在を検出することが可能である。今回の検討より、HBs 粒子の取込みはエンドサイトーシスにより媒介されるが、その経路は単一ではなく、ダイナミン依存的経路、マクロピノサイトーシスなど、複数のエンドサイトーシス経路が関与することが示唆された。また、HBV レセプターの候補である NTCP、ASGPR をともに発現する HuS-E/2 では、それぞれの阻害剤により HBs 粒子の取込みは抑制されたが、ASGPR 発現の確認されていない HEK293 細胞では NTCP 発現の有無は HBs 粒子の取込みに影響を与えなかった。これより、NTCP は主に HBs 粒子の細胞表面への吸着に関与し、実際の細胞内への取込みは ASGPR を介して起こる可能性が示唆された。ただし、MEF で比較的効率よい HBs 粒子

の取込みがみられたことより、細胞ごとに取込み機構が異なる可能性についても検討が必要と考えられる。すなわち、MEF 及び各細胞での HBs 粒子の取込み経路の解析、NTCP、ASGPR 発現の有無、他のレセプターが存在する可能性について検討を進める必要があると思われる。

今後、HBV の細胞内侵入機構のさらに詳細な解析、複製機構の可視化など、HBV の生活環についての解析を進め、さらに、HBV 粒子の蛍光ラベル法と生体イメージング技術を組み合わせることにより、HBV の生体内での動態、それにより惹起される免疫応答についての解析を行う予定である（大阪大学大学院医学系研究科 石井優教授との共同研究）。

E. 結論

HBV 粒子の蛍光ラベル法により HBV の細胞内侵入機構の解析が可能となった。HBs 粒子は複数のエンドサイトーシス経路により細胞内に取込まれ、NTCP、ASGPR がともに細胞内取込みに関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. Inhibition of IDO expression enhances the induction of HBsAg specific CTLs. (Submitted)
- 2) Komori Y, Arisawa A, Takai M, Yokoyama K, Honda M, Hayashi K, Ishigami M, Katano Y, Goto H, Ueyama J, Ishikawa T, Wakusawa Y. Ursodeoxycholic acid inhibits overexpression of P-glycoprotein induced by doxorubicin in HepG2 cells. *Eur J Pharmacol* 724: 161-167, 2014.

2. 学会発表

- 1) 伊藤弘康、安藤達也、石川哲也、清島満. イ

インドールアミン酸素添加酵素の発現抑制を用いた HBV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導効果の検討. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸, 2013.

2) 山田達也、中川伸吾、吉住寧真、加納由貴、加納綾乃、石川哲也. ヒト肝癌細胞株間での各種炎症刺激に対するケモカイン産生能の比較. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸, 2013.

3) 伊藤弘康、大瀧博文、安藤達也、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島満. マウス B 型急性肝炎モデルにおけるインドールアミン酸素添加酵素の解析. 第 49 回日本肝臓学会総会. 東京, 2013.

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：石井 優 大阪大学 大学院医学系研究科 教授

分担研究課題：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

研究要旨：当該研究分担者は、生体イメージング技術を駆使してB型肝炎ウイルスの肝細胞への感染、および抗ウイルス免疫機構を可視化して解析し、これにより新しい創薬ターゲットとの開発、および新規薬剤の評価系の確立を目指しているが、平成25年度には、肝臓の生体イメージング系を確立し、肝臓内での肝細胞・血流・免疫細胞動態を明瞭に可視化することに成功した。さらには標識した人為ウイルス様粒子（BNC）の肝臓内での動態可視化系を確立し、肝臓内での感染細胞やそれに対する免疫細胞機能、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。

A. 研究目的

HBV のヒト肝細胞への感染様式、および感染細胞に対する免疫応答については不明な点が多い。本分担研究では、ヒト肝細胞キメラマウスに蛍光標識した HBV 粒子を感染させ、当該研究分担者が世界的にも高い技術を有する生体多光子励起イメージングを駆使することで、HBV の感染様式、抗 HBV 感染免疫の作動様式の解明を目指す。これにより、HBV 感染の *in vivo* での病態解明と、新規の治療ターゲットの創出および薬剤スクリーニング法の開発につながることを期待される。

B. 研究方法

生体における HBV 感染経路・抗ウイルス免疫の作動様式を動的に解析するために、肝臓の生体多光子励起イメージング系の開発を行っている。実験動物を生かしたままの状態、麻酔下で肝臓の表面部位を開腹してガラスチェンバーを装着することで経時的な観察が可能な系を確立する。平成 24 年度の確立していた基本的な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。

C. 研究結果

平成 25 年度には、HBV 感染経路・抗ウイルス免疫の作動様式の解析のための、肝組織の生体多光子励起イメージング系の開発を行った。血管構造を可視化するために FITC-デキストラン（緑色蛍光）を、および肝細胞の核を効率よく染色するために Hoechst33342（青色蛍光）を、それぞれ腸間膜動脈より注射し、その一定時間後に肝表面を露出しカバーガラスで被覆することでイメージング装置にセットした。これにより、生体肝組織の構造をリアルタイムで再現性よく観察する系を確立した。さらに、HBV 粒子のモデルとして BNC (bionano capsule) を、脂質膜に親和性のある PKH26（赤色蛍光）で染色し、観察の 1 日前に経静脈的に投与を行うことで、肝組織内での BNC 感染（取り込み）細胞を標識することに成功

した (図1)。

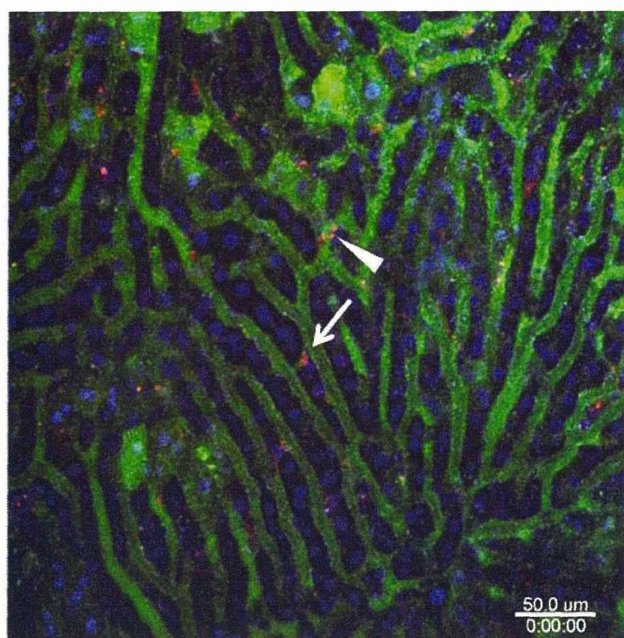


図1. 生体多光子励起イメージングによる肝臓の動的可視化. 肝細胞の核を青 (Hoechst33342) で、類洞内の血管を緑 (FITC デキストラン) で、BNC 感染細胞を赤 (BNC-PKH26) で、それぞれ標識し、生体2光子励起イメージングにより可視化している. スケールバー: 50 μm

D. 考察

今後は本システムを活用することで、本分担研究者が確立し活用する LysM-EGFP や CD11c-EYFP リポーターシステムと組み合わせることにより、ウイルス粒子感染細胞に対する免疫応答を可視化することを計画している。また、ヒト肝細胞キメラマウスを利用することで、実際のHBV粒子を標識し、その感染様式と誘導される免疫機構を解析することが可能となる。本分担研究者が開発したこの新しいシステムを活用することで、HBV粒子感染肝細胞、およびその排除に働く自然免疫応答のタイムコースを解析することで、新しい創薬作用点の同定や、現在ある薬剤候補の新規スクリーニング系の開発につながることを期待される。

E. 結論

本年度の研究成果として、肝臓の生体イメージ

ング系の基本システムの確立を行った。肝細胞・類洞・HBVモデル粒子をそれぞれ効率よく標識し、2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内での感染細胞の動態を生きた個体内で可視化することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G-H, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. (2013) Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.*, 123(2): 866-873.
- 2) Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.*, 16(5):543-51.
- 3) Wienert S, Heim D, Kotani M, Lindequist B, Stenzinger A, Ishii M, Hufnagl P, Beil M, Dietel M, Denkert C, Klauschen F (2013) CognitionMaster: An Object-Based Image Analysis Framework. *Diagn. Pathol.*, 8:34.
- 4) Kikuta J, Kawamura S, Okiji F, Shirazaki M, Sakai S, Saito H, Ishii M* (2013) S1P-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antihypertensive action of active vitamin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(17): 7009-13.
- 5) Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang A, Lee J-B, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. (2014) Dynamic analysis of histamine-mediated attenuation of acetylcholine-induced sweating via GSK3 β activation. *J. Invest. Dermatol.*, 134(2): 326-34.

6) Rattanapak T, Birchall J, Young K, Ishii M, Meglinski I, Rades T, Hook S. (2013) Transcutaneous immunization using microneedles and cubosomes: Mechanistic investigations using optical coherence tomography and two-photon microscopy. *J. Control. Release*, 172(3):894-903.

7) Nakamura T, Hamuro J, Takaishi M, Simmons S, Maruyama K, Zaffalon A, Bentley AJ, Kawasaki S, Nagata-Takaoka M, Fullwood N, Itami S, Sano S, Ishii M, Barrandon Y, Kinoshita S. (2014) Lrig1 controls corneal maintenance through the Stat3-dependent inflammatory pathway. *J. Clin. Invest*, 124(1):385-97.

8) Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori M, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, Ishii M*. (2013) Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLoS One*, 8(12): e83629.

9) Nishikawa K, Iwamoto Y, Ishii M. (2013) Development of an in vitro culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Metab.*, ePub.

10) Cuia G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, Kitano S, Ishii M, Tani-ichi S, Ikuta K. (2014) Characterization of the Interleukin-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(5):1915-20.

11) David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, Ottewell P, Mima F, Leblanc R, Bonnelye E,

Ribeiro J, Holen I, Lopez Vales R, Jurdic P, Chun J, Clézardin P, Ishii M, Peyruchaud O. (2014) Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J. Biol. Chem.*, in press.

12) Ito K, Morimoto J, Kihara A, Matsui Y, Kurotaki D, Kanayama M, Simmons S, Ishii M, Sheppard D, Takaoka A, Uede T. (2014) Integrin $\alpha 9$ on lymphatic endothelial cell regulates lymphocyte egress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

13) Matsumoto S, Fujii S, Sato A, Ibuka S, Kagawa Y, Ishii M, Kikuchi A. (2014) A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J.*, in press.

14) Rattanapak T, Birchall JC, Young K, Kubo A, Fujimori S, Ishii M, Hook S. (2014) Dynamic visualization of dendritic cell-antigen interactions in the skin following transcutaneous immunization. *PLoS One*, in press.

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

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：坂本 直哉 北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野 教授
分担研究課題：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

研究要旨：高効率な感染増殖に関連するHBV遺伝子・アミノ酸構造決定：HBX蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を目的として分担研究を遂行し、以下の結果を得た。
(1) HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍長 HBV 感染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することを確認した。(2) 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。(3) HBX 蛋白の Interferon-alpha (IFN) を介した抗ウイルス応答に与える影響を解析したところ、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を見いだした。次年度以降も引き続き、HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を遂行する。

A. 研究目的

現在の核酸アナログ薬を主体とした抗ウイルス療法には以下の問題がある。即ち(1)薬物の標的が HBV-DNA ポリメラーゼの同一ドメインであり、ウイルスの薬剤耐性変異は複数の薬剤に交差耐性を獲得する、(2)作用が感染性ウイルス粒子の産生抑制であるため作用発現が遅く重症急性発症例に対する効果が限定的である、さらに(3)ウイルスの産生母体である感染細胞核内の環状二重鎖 DNA (cccDNA) を排除する効果がないため、継続的に使用され多剤耐性ウイルスの出現、医療経済学上の問題となる。

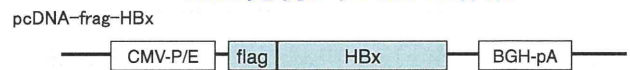
ヒト HBV ゲノムにコードされる HBX 蛋白は感染宿主細胞に作用しウイルス蛋白産生を亢進させることが知られており、HBX 蛋白の機能を阻害する化合物が新たな抗ウイルス薬となり得る。しかし、ヒト X 蛋白の機能とその特異的阻害薬開発に特化した研究は十分になされていない。本研究で我々はウイルス蛋白発現亢進に働く HBX 蛋白の詳細な機能解析を行う。

B. 研究方法

HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、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を構築した。さらに、

各ゲノタイプの HBX 蛋白強制発現プラスミドを構築し、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した。

HBx発現プラスミドの作成



HBx mutationの作成

MAARLCCQLDPARDVLCRLRPVGAESRGRPVSGPFGTLSSPSSSAVPADHGAHLSL
RGLPVCFAFSSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQVLPKVLKRTLGLSAMSTDL
EAYFKDCLFKDWEEELGEEIRLKIIFVLGGCRHKLVCSAPACNFFPFA*



5アミノ酸ずつアラニン置換を実施
X蛋白 mutationを30個作成

- 1: MAA-AAAA-LDPARDVLC.....
- 2: MAARLCCQ-AAAA-DVLCRLPVGAESRGRPVSGF.....
- 3: MAARLCCQLDPAR-AAAA-RPVGAESRGRPVSGPFGT.....
- ⋮
- 29: GEEIRLKIIFVLGGCRHKLV-AAAA-CNFFPFA*
- 30: GEEIRLKIIFVLGGCRHKLVCSAP-AAAA-SA*

C. 研究結果

(1) HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍

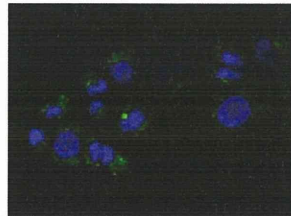
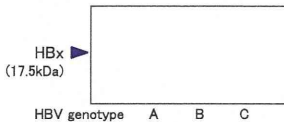
長 HBV 感染プラスミドを構築し、Huh7 細胞に遺伝子導入したところ、HBX 野生株に比べ増殖能が著明に低下することを確認した。

(2) 野生型 X 蛋白発現プラスミド、および全長にわたりアミノ酸を 4 個ずつ網羅的にアラニンに置換した X 蛋白発現系を構築し、培養細胞での発現を確認した。

HBx プラスミド 遺伝子導入による HBX 蛋白発現

Western blotting

Immunocytochemistry

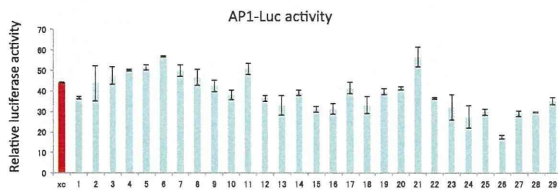


Anti-FLAG-Alexa 488 / DAPI

網羅的にアラニン置換を導入した変異 X 蛋白による AP1 転写活性化能を解析したところ、HBX 蛋白の C 末端側への変異導入によりその転写活性化能がブロックされることが確認され、X 蛋白側の転写活性化ドメインが C 末端よりに存在することを確認した。

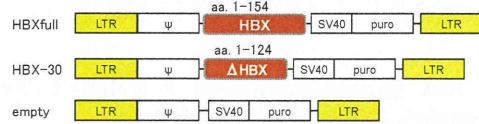
変異 HBx 蛋白による AP1 活性化能の解析

HBx aa. MAA	RLCCQ	LDPAR	DVLCI	RPVGA	ESRGR	PVSGP	FGTLS
1	2	3	4	5	6	7	
8	9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29		

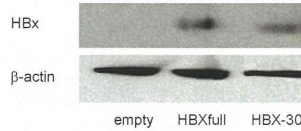


HBX 蛋白の Interferon-alpha (IFN) を介した抗ウイルス応答に与える影響を解析するため、lentivirus vector を用いて全長および C 末端を欠失した HBX 蛋白を恒常発現する HepG2 細胞を樹立した。

C 末端欠損 HBX 蛋白恒常発現 HepG2 細胞の樹立

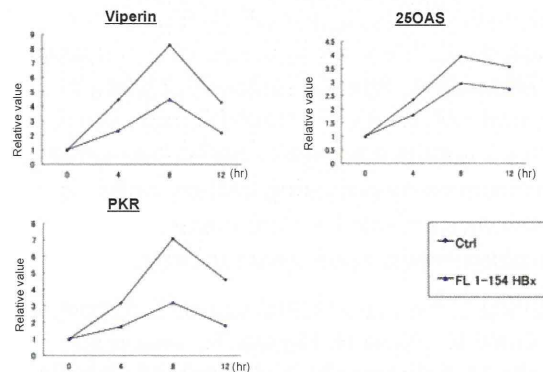


Western blotting



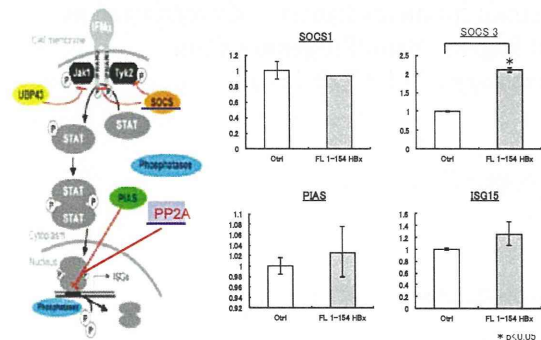
樹立した HBX 蛋白発現 HepG2 細胞における IFN 誘導遺伝子、Viperin, 2-50AS、および PKR の発現を解析したところ、いずれの ISG も HBX 発現細胞では IFN による誘導が抑制された。

HBX 恒常発現細胞への X 欠損 HBV ゲノムの導入と IFN 感受性の解析: 結果



さらに IFN シグナルの suppressor である SOCS1/3、PIAS、ISG15 の発現レベルを定量したところ、HBX 発現細胞では baseline における SOCS3 および PIAS の発現レベルが優位に上昇していた。以上より、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。

HBX 発現細胞における IFN suppressor 蛋白の発現レベル



D. 結論

平成 26 年度以降も引き続き、HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を遂行する。

(1) 変異 HBX 蛋白発現プラスミドを用いての細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する。

(2) 化合物ライブラリーを用いて、HBX 標的化合物スクリーニング系による阻害活性物質探索を行う。

(3) ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスより単離した初代肝細胞株を用いて HBV 増殖能、HBX 蛋白の効果を検証する。本研究の成果により、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatakaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S: Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*; *Epub ahead of print*.
2. Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H: Hypoxia-inducible Factors Activate CD133 Promoter through ETS Family Transcription Factors. *Plos One* 2013;8(6):e66255.
3. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, and Watanabe M. Wnt5a Signaling Mediates Biliary Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Hepatology* 2013;57(6):2502-2513.

2. 学会発表

なし

F. 知的所得権の所得状況

該当なし

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：池田 正徳 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 准教授

分担研究課題：HBV 増殖に関わる肝細胞環境因子の同定

研究要旨：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増殖について検討した。細胞外ではいずれの細胞の上清においても $10^5 \sim 10^7$ (copies/ml)のHBV DNAを認めたが、HBsAgはHuH-7およびHep3Bで高く他の細胞株では低かった。細胞内のHBV DNAはいずれの細胞でも 10^6 (copies/ ng total DNA)のであった。pgRNAはHepG2で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。

A. 研究目的

HBV に対する抗 HBV 剤のスクリーニングを実施する際、効率の良い HBV 増殖培養細胞が必要である。現状では HBV の産生には HepG2. 2. 15 細胞が、HBV の感染には HepaRG あるいはヒトキメラマウス由来の初代肝細胞が用いられている。このことは、粒子産生のステップと感染のステップを細胞毎に使い分けなければいけないことを示しており、ウイルスのライフサイクルを同一の細胞株を用いて検討するためにはさらに効率の良い細胞株を樹立する必要がある。本研究では、既存の培養細胞株を用いて HBV のライフサイクルの検討が可能な培養細胞を開発し、抗 HBV 剤のスクリーニングを行うことを目的とする。

B. 研究方法

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 増殖について検討した。各細胞に HBV プラスミド（pUC19/C₁JPNAT）を導入して HBV 増殖について評価した。細胞内の HBV 増殖の指標として、リアルタイム PCR により HBV DNA を、CLIA 法と

ウエスタンブロットにより HBsAg を検討した。細胞内では、リアルタイム PCR による HBV DNA およびウエスタンブロットによる HBsAg を検討した。また、細胞内の pgRNA をリアルタイム PCR により検討した。

昨年度に培養細胞における HBV 受容体である NTCP の発現を検討したところ HuH-6 細胞でわずかに発現が認められたが、他の検討した培養細胞では発現が認められなかった。このことより、培養細胞で HBV を感染させるためには NTCP を導入して発現させる必要があると考え、HepG2. 2. 15 細胞に NTCP を強制発現させて HBV 増殖能について検討した。

（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。

C. 研究結果

細胞内の HBV DNA はいずれの細胞でも 10^6 (copies/ ng total DNA)であった。細胞外ではいずれの細胞の上清においても $10^5 \sim 10^7$ (copies/ml)の HBV DNA を認めたが、HBsAg は HuH-7 および Hep3B 細胞で高く他の細胞株では低かった。pgRNA は HepG2 細胞で高く他の細胞では低い傾向がみられた。

NTCP を HepG2. 2. 15 細胞に導入した細胞を作製した。NTCP 導入細胞とコントロール細胞の細胞増殖はほぼ同等であった。HBV 導入後の細胞内および上清中の HBV DNA を定量して比較したところ、コントロール細胞に比べて NTCP 導入細胞では 6 日目から高値を示した。また、12 日目の pgRNA はコントロール細胞に比べて NTCP 導入細胞で高値を示した。このことは、HepG2. 1. 15 細胞に NTCP を発現させることにより、産生された HBV 粒子が感染し HBV DNA 増殖に寄与している可能性を示唆しているものと思われる。

D. 考察

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 増殖について検討したところ、HuH-7、HepG2、Hep3B 細胞で HBV 複製が比較的高いことがわかった。Li23、PH5CH8、NKNT3 細胞では HBV DNA の複製能は低いことがわかった。Li23 細胞については複数のサブクローン細胞株を樹立しているので今後これらの細胞株における HBV 複製を検討する。Hep3B 細胞では HBV 導入細胞以外に、親株でも細胞内 HBV DNA が検出された。このことは、Hep3B 細胞では内在性の HBV 遺伝子が発現しており評価する際には注意を要するものと思われる。

現在、HBV 産生細胞として用いられている HepG2. 2. 15 細胞には NTCP が発現していないため、

産生された HBV が HepG2. 2. 15 細胞に新たに感染することはできない。本研究では、HepG2. 2. 15 細胞に NTCP を導入することで産生された HBV が再び HepG2. 2. 15 細胞において HBV 増殖能がさらに高まるのかどうか検討した。HBV を導入した NTCP 導入細胞ではコントロール細胞に比べて細胞内および上清中の HBV DNA が 6 日目以降に増加した。また、pgRNA も NTCP 導入細胞ではコントロール細胞に比べて高値を示したことから HepG2. 2. 15 細胞に NTCP を導入することで、産生された HBV が新たに感染し HBV 増殖能の改善に寄与していることが示唆された。

E. 結論

HuH-7, HepG2, Hep3B 細胞で HBV 複製能が比較的高いことがわかった。HepG2. 2. 15 細胞に NTCP を導入することで HBV 増殖能を改善することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

(1) 奥村暢章、池田正徳、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、東京、2013年

(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

(3) 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総会、神戸、2013年

(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 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

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：土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題：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

研究要旨：独自に樹立したヒト肝細胞由来の二種類の培養細胞を用いて、B型肝炎ウイルス（HBV）の感染増殖を高効率で再現することが可能な培養細胞システムの構築を目指し、研究をすすめた。まずヒト不死化肝細胞、HuS-E/2細胞については1.24倍長のHBVゲノムを含むプラスミドを導入したところ、平面培養した場合も立体培養した場合でも、プラスミド導入後12日間まで培養上清にHBV DNAが検出された。このことからこの細胞において効率良くHBVゲノムが複製維持され、HBV粒子が産生されることが示唆された。また、この細胞は三次元培養によってHBV受容体分子NTCPのmRNA発現量が、発現誘導されることがわかった。また、最近我々が樹立した肝幹細胞様細胞HMY1細胞を肝分化させて同様の実験をおこなったところ、同様にHBV複製を許容する結果を得た。さらにHYM1細胞を肝分化条件で平面培養、あるいは立体培養し、組換え体HBVを感染させたところ、HBV感染を示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

我々がこれまで独自に樹立したヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞とヒト肝幹細胞様細胞 HMY1 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する新たな細胞培養系を構築することを第一の目的とした。また、これら HBV 培養系を用いて、その感染増殖機構を解明することにより、このウイルスの感染増殖に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HBV 薬候補として同定し、また HBV 薬評価することを目的とした。

B. 研究方法

1) HuS-E/2 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をおこなった。まず、この細胞に 1.24 倍長

の genotype C の HBV ゲノムを含むプラスミドを導入し、通常の平面培養法を用いて 2 日間培養し、培養上清を回収した。その後、この細胞をマルチウェルプレートに継代し、さらに 10 日間培養した。継代培養後 3 日、5 日、7 日、10 日後にそれぞれ培養上清を回収した。回収した培養上清から DNA を回収し、定量 PCR によって、HBV DNA のコピー数を測定した。

2) 1)同様のプラスミドを導入した HuS-E/2 細胞をメビオールゲル中で一週間立体培養し、シスト様構造を形成させた。その後、そのシスト様構造をとった HuS-E/2 細胞を親水性コートプレートであるマルチウェルマイクロセルプレートに移し、シスト様構造を維持したまま、5 日間継代培養した。マイクロセルプレートに移した後、1 日、3

日、5日後にそれぞれ培養上清と細胞を回収した。回収した培養上清から DNA を、細胞からは HBV RNA を回収し、それぞれ定量 PCR および定量 RT-PCR によって、HBV DNA および HBV RNA のコピー数を測定した。

3) HuS-E/2細胞をメビオールゲル中で一週間立体培養し、シスト様構造を形成させた後、その細胞から RNA を抽出した。その RNA を鋳型に用いて、RT-PCR 法によって NTCP mRNA の発現量を平面培養のものと比較した。

4) 未分化状態の HYM1 細胞を HuS-E/2 細胞の代わりに用いて、1)同様の実験をおこなった。ただし、プラスミド導入後、この細胞は肝細胞分化誘導条件で平面培養法を用いて培養した。また培養上清と細胞をプラスミド導入後 2 日、5 日、8 日後に回収した。

5) HepG2.2.15.7 細胞培養上清を PEG 沈殿によって濃縮し、組換え体 HBV 溶液を作成した。一ヶ月以上、肝細胞分化誘導条件で平面培養した HYM1 細胞に、この組換え体 HBV を感染させた。感染後、1 日、3 日、6 日、9 日後に細胞を回収した。回収した細胞から HBV RNA を回収し、定量 RT-PCR によって、HBV RNA のコピー数を測定した。

6) HYM1 を一ヶ月間以上、無血清肝細胞用培地で培養し、肝分化誘導させた後、Cell-Able を用いて立体培養した。この細胞に 5)同様に組換え体 HBV を感染させ、感染後、1 日、3 日、6 日、9 日、12 日後に細胞を回収した。回収した細胞から HBV RNA を回収し、定量 RT-PCR によって、HBV RNA のコピー数を測定した。

C. 研究結果

1) 前年度 HuS-E/2 細胞に HepG2.2.15.7 細胞培養

上清の組換え体 HBV を感染させてその HBV 感染感受性を検討したが、既に報告されている結果とはことなり、有意な感染は認められなかった。そこで今年度は、まず HuS-E/2 細胞において HBV ゲノム複製が可能であるか否かについて検討した。その結果、遺伝子型 C の 1.24 倍長の HBV ゲノムを挿入したプラスミドを細胞に導入することによって 10 日にわたって 10^7 copy 以上の HBV DNA が培養上清に産生されることがわかった。

2) 1)と同様に HuS-E/2 細胞に遺伝子型 C の 1.24 倍長の HBV ゲノムを挿入したプラスミドを導入した後、メビオールを用いて一週間立体培養した場合、プラスミド導入から 2 週間まで培養上清中に 10^8 copy 以上の HBV DNA が培養上清に産生された。また、細胞中の HBV RNA 量もその間増加する事がわかった。

3) HuS-E/2 細胞は通常の平面培養下では HBV 受容体分子 NTCP の mRNA 発現量は低レベルであったが、メビオールゲルを用いた立体培養をおこなうと、その発現が誘導され、NTCP mRNA が検出された。

4) 1)とほぼ同様の実験を HMY1 細胞をもちいて、行くと HuS-E/2 細胞同様に 8 日にわたって 10^9 copy 以上の HBV DNA が培養上清に産生されることがわかった。また、細胞内にも 10^5 copy 以上の HBV RNA が維持されることがわかった。

5) 肝分化誘導させ平面培養した HMY1 細胞に、組換え体 HBV を感染させると、その細胞内で HBV RNA が感染後 9 日間、total RNA 当たり 10^5 コピー以上存在することがわかった。

6) Cell-Able を用いて立体培養した肝分化誘導 HYM1 細胞に、組み換え体 HBV を感染させると、その細胞内で HBV RNA が感染後 12 日間、total RNA 当たり 10^5 コピー以上存在することがわか

った。

D. 考察

これまで HuS-E/2 細胞は HBV 感染の効率が非常に低いことを示す結果が得られていたが、今年度の結果から、平面培養や立体培養によって HBV ゲノム複製や粒子産生は許容することが分かった。また粒子産生量は立体培養によって上昇する可能性が考えられた。

前年度の結果から HBV 受容体 NTCP の発現は肝分化誘導によって上昇することがわかっていたが、今回、HuS-E/2 細胞の肝分化状態を上昇させることが分かっている立体培養によって、HuS-E/2 細胞においても NTCP mRNA 発現が誘導され、検出された。

このことから HuS-E/2 細胞を立体培養することにより HBV が効率良く感染するようになることが期待された。また NTCP を発現する HuS-E/2 細胞を作成することにより、新たな HBV 感染系を構築することができる可能性が考えられた。

HYM1 細胞は HuS-E/2 細胞と同様に HBV ゲノム複製や粒子産生は許容することが分かった。肝分化誘導させることで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。このことは前年度明らかになったように HBV 受容体 NTCP の発現が肝分化誘導によって上昇することと一致した。

E. 結論

HuS-E/2 細胞は HBV ゲノム複製や粒子産生が可能であることから、本来のヒト肝細胞に近い細胞における HBV ゲノム複製や粒子産生機構の解析に用いる事が可能である事がわかった。このことは、また、これまでの培養系ではみることの出来なかつた薬剤のスクリーニングに用いることができる可能性を示している。また HYM1 細胞に関しては培養条件を検討することで、HBV 感染増殖に至適な培養条件を見出す事が可能になる

ことが考えられた。またそのような新たな HBV 感染系を用いることで、簡便に抗 HBV 薬剤のスクリーニングが可能になると期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijkata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE 2014, in press.

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

なし

3. その他

1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、膝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

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：渡士 幸一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

分担研究課題：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

研究要旨：HBV感染許容細胞株を樹立するためにNTCP遺伝子を安定的に発現するHepG2細胞を樹立した。得られた細胞クローンのうちの1つ（HepG2-hNTCP-C4細胞）はHBV感染後にHBs抗原、HBe抗原、HBV DNA、cccDNA、HBcタンパク質発現を認め、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した。ノックダウン実験より、この細胞におけるHBV感染はNTCPを介していることが示唆された。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。HepG2-hNTCP-C4細胞におけるHBV感染において小規模な化合物スクリーニングをおこなったところ、酸化ステロールがHBV感染を阻害することが示された。

A. 研究目的

これまでHBV感染許容性細胞としてはヒト初代肝細胞(PHH)、ツパイ初代肝細胞(PTH)、HepaRG細胞などが知られている。しかしながらこれらの細胞は、ロット間での再現性が必ずしも高くなく、樹立に時間およびコストを要すること、遺伝子導入効率が高くないこと等の問題を有することから、さらに簡便なHBV感染許容性細胞株を樹立することが求められてきた。本研究では新たなHBV感染許容性細胞株を樹立し、またこれを用いてHBV感染機構を解析することを目的とした。

B. 研究方法

HepG2細胞にhNTCP遺伝子をコードするプラスミドを導入し、48時間後からG418を含む培養液で培養した。約3週間後にコロニーとなった細胞クローンをトリプシン処理し、96 well plateに播種、さらにスケールアップしながら継代を継続し各細胞クローンを得た。各細胞株のNTCPおよ

びGAPDH mRNAはRT-PCR法により検出した。

またHBV感染は、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おこない、洗浄後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。

siRNAは終濃度40 nMをlipofectamine RNAMaxを用いて感染48時間前に導入した。

C. 研究結果

1) 単一細胞クローニング

hNTCP遺伝子をコードするプラスミドを導入後、11のHepG2細胞クローンを得た。これらの細胞中のNTCP mRNAを検出したところ、発現量がさまざまであるものの9クローンでNTCP mRNAが発現していることを確認した。またHepG2-hNTCP-C4