

201321015A

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

革新的な動物モデルや培養技術の  
開発を通じたHBV排除への創薬研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 26 年 (2014 年) 4 月

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

革新的な動物モデルや培養技術の  
開発を通じたHBV排除への創薬研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 26 年 (2014 年) 年 4 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究 .....1  
茶山 一彰

## II. 分担研究報告

1. 免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる .....9  
マウスモデルの作製に関する研究  
瀬谷 司
2. B型肝炎ウイルスの持続感染時における自然免疫応答回避メカニズムの .....12  
解明に関する研究  
加藤 博己
3. キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学的および遺伝子 .....16  
タンパク質発現解析・新規モデルの作製  
立野 知世
4. TALEを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発 .....23  
山本 卓
5. 次世代シーケンスを用いたB型肝炎血中体液マイクロRNAの網羅的解析 .....26  
田原 栄俊
6. 抗HBV免疫応答を惹起する新規肝炎モデルマウスの開発 .....30  
*in vitro* HBV感染系の樹立  
丸澤 宏之
7. The discovery of host restriction factors required for HBV entry .....36  
(infection) into mouse cells  
Hussein H Aly
8. B型肝炎ウイルス蛋白質の抗インターフェロン活性およびウイルス粒子形成にお  
ける役割 .....40  
坂口 剛正

9. 肝炎モデルの改良と新規 HBV 感染モデルマウスの作製	44
阿部 弘美	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷り	59



# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究補助金（B型肝炎創薬実用化用化等研究事業）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
平成25年度総括報告書

研究代表者 茶山一彰 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨：NOG-SCIDを背景としたマウスにヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスにB型肝炎ウイルスを感染させB型肝炎キャリアモデルを作製した。感染成立後にヒト免疫細胞を移植し、慢性B型肝炎モデルを作製した。従来のuPA/SCIDマウス背景のB型肝炎ウイルスキャリアモデルおよび肝炎モデルに比較して、NOG-SCID背景のマウスの方がヒトアルブミン産生量は低く、ヒト肝細胞への置換率が低かったが、置換率が低くてもHBVの感染効率はuPA-SCIDと同等であった。統計学的な有意差はなかったがNOG-SCID背景のマウスの方が死亡率も低かった。どちらのマウスもヒト免疫細胞の投与により肝炎が発症した。uPA-SCIDマウスは劇症肝炎用の肝炎を発症し、ヒト肝細胞が急速消失した。この肝炎の主な炎症起因細胞はNK細胞であることが見いだされた。これに対して、TK-NOG背景のマウスでは劇症型ではなく緩やかな肝炎が起り、ヒトアルブミン値の低下、血清中HBV DNAの低下を認め、発症機序としてはCTLを介した反応であることが示唆された。また、HBVを産生するトランスジェニックマウスを3系統樹立した。さらにヒトiPS細胞より成熟肝細胞を誘導しHBV感染が引き起こされるかどうか検討を行った。iPS細胞由来の成熟肝細胞は肝特異的遺伝子であるAFPの発現やアルブミンの産生が認められた。昨年HBVレセプターの候補としてsodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が報告された。NTCPを恒常的に発現するNTCP-HepG2細胞株を樹立し、in vitroでのHBV感染系を作製した。cccDNA排除に向けた研究では、HBV coreを標的としたCRISPR/Casシステムを用いるとHBV複製中間体は1/5まで減少することを認めた。HBVの各蛋白をそれぞれ細胞に発現させたところPolymerase蛋白が細胞の蛋白合成全般を抑制することを見出した。

[研究分担者]	瀬谷 司	北海道大学大学院	教授
	加藤 博己	京都大学ウイルス研究所	准教授
	立野 知世	(株)フェニックスバイオ	取締役研究開発部長
	山本 卓	広島大学大学院	教授
	田原 栄俊	広島大学大学院	教授
	丸澤 宏之	京都大学大学院	講師

Hussein H Aly  
坂口 剛正  
阿部 弘美

国立感染症研究所  
広島大学大学院  
広島大学大学院

主任研究官  
教授  
准教授

## A. 研究目的

我々は、ヒトの免疫細胞とヒトの肝細胞をもちいて B 型肝炎のマウスモデルおよびヒト肝細胞による HBV の完全なライフサイクルを再現する継代培養系を構築した。これにより HBV の持続感染メカニズムと免疫反応に関する広範な研究が可能となった。昨年 HBV のエントリーレセプターとして NTCP が見出されたことにより NTCP 安定発現株を用いて新規の *in vitro* HBV 感染培養系も構築された。本研究ではこれらのモデル動物、細胞培養系を用いて肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究、HBV 感染マウスと新規培養系を用いた創薬研究、cccDNA の排除、転写制御に関する研究を中心に行う。

## B. 研究方法

### 肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究

従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスを NOG-scid, NOD-scid を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎モデルを作製し、ヒトの B 型肝炎発症を再現するモデルを作製する。また、移植するヒト肝細胞をヒト iPS 細胞から誘導した成熟肝細胞も用いてヒト肝細胞キメラマウス

を作製し HBV 感染モデルとして利用可能か検討する。また、Cre-loxP システムを利用した肝細胞特異的に HBs 抗原蛋白を発現しヒトの肝炎を模倣するモデルマウスを作製する。さらに HBV を産生するトランスジェニックマウスの作製を行う。これらのモデルを用いて肝炎の発症機序、HBV 感染細胞内での自然免疫応答、HBV 粒子形成機構を詳細に検討する。

### HBV 感染マウスと新規 HBV 培養系を用いた創薬研究

HBV のエントリーレセプターとして NTCP が報告された。この膜蛋白質 NTCP を恒常的に発現する新規の細胞株 NTCP-HepG2 細胞、既存の初代培養肝細胞を用いて *in vitro* HBV 感染系を構築する。HBV 感染マウス、*in vitro* HBV 感染系を用いて新規の HBV レセプター、細胞質内 HBV センサーを含む HBV の肝細胞への接着から細胞外への放出までに必須の宿主因子のスクリーニングを行う。スクリーニング方法としては次世代シーケンサーによる発現解析、microRNA の網羅的解析を行う。スクリーニングの結果候補としてあがってきた遺伝子を標的とした TALEN を作製し *in vitro* の系で候補遺伝子のノックダウンによる HBV ライフサイクルへの影響を評価する。

### cccDNA の排除、転写制御に関する研究

cccDNA に結合し得る TALEN を設計しその効果を検討する。また CRISPR/Cas システムによる cccDNA への影響も検討を行う。さらに、cccDNA 持続を支持する宿主因子を探索し、その制御による cccDNA の減少、排除を検討する。

### C. 研究成果

#### 肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究

NOG-scid を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎モデルを作製した。NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスは従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスに比べるとヒトアルブミンの産生量は uPA/SCID の方が高いが、NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスの方がヒト肝細胞への置換率が低くても HBV 感染効率が良好で、死亡率も低かった(Kosaka et al., BBRC, 2013)。ヒト免疫細胞を HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに移植するとヒトアルブミン値の低下、血清中 HBV DNA の低下が認められ、既存の uPA/SCID を背景としたヒト肝細胞マウスを用いた劇症肝炎モデルとは肝炎の発症機序が異なる CTL を介した炎症反応が比較的緩やかな肝炎モデルを作製することができた(阿部班員、茶山班長)。また、ヒト iPS 細胞由来のヒト肝細胞を SCID マウス

への移植する肝細胞として使用可能かどうか検討を行った結果、ヒト成熟肝細胞へ誘導した細胞の 20-50%の細胞で肝特異的遺伝子であるアルブミン、 $\alpha$ フェトプロテインの発現が認められ、HBV を接種した結果、ヒト iPS 細胞由来の肝細胞内で HBV 複製中間体が検出された。このことからヒト iPS 細胞由来の肝細胞でも HBV 感染は可能であることが示唆された(阿部班員、茶山班長)。また、uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスでは長期飼育を行った場合、uPA 遺伝子の欠失が起こることが知られていた。HBV 感染による慢性肝炎モデルの作製に向けて uPA 遺伝子の欠失が起こらないシステムにするため cDNA-uPA/SCID マウスを作製し、ヒト肝細胞を移植してヒト肝細胞キメラマウスを作製したところ 20 週間の長期飼育が可能となった(立野班員)。この HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの長期飼育により HBV 感染させなかったヒト肝細胞キメラマウス HBV 感染マウスに比較してアポトーシス関連の遺伝子の発現の上昇、細胞増殖に関連する遺伝子の発現低下、細胞の肥大化が認められた(立野班員)。また、HBV を産生する 1.4 倍長の HBV ゲノムを組込んだ HBV トランスジェニックマウスを作製し 3 系統を樹立した。このうち 2 系統 #31, #84 は血清中 HBV DNA 量は、いずれも 5 log copy/ml 以上であったが HBs 抗原量はいずれも 0.3-0.5IU/ml、HBe 抗原量は 10-20IU/ml と低値であった。反



対に、残りの 1 系統#K では血清中 HBV DNA は 4-5 log copy/ml と低値であったが HBs 抗原量は 12 IU/ml、HBe 抗原量は 110 IU/ml と高値であった。HBV の core 蛋白の発現を調べたところ#31 では肝臓でのみ core 蛋白は発現し、#K では肝臓、腎臓で core 蛋白が発現していた。これら 3 系統について受精卵を保存した（阿部班員、茶山班長）。HBV エントリーレセプターとして NTCP が報告されたことを受け、ヒト NTCP 発現トランスジェニックマウスの作製を開始した。この動物実験は大臣確認実験と定められているため現在大臣確認申請中である（加藤班員）。

#### HBV 感染マウスと新規 HBV 培養系を用いた創薬研究

HBV のエントリーレセプターとして報告されたヒト NTCP を恒常的に発現する NTCP-HepG2 細胞を樹立した。NTCP の発現は蛋白レベルで検出可能であったが感染が成立しない細胞（Hussein 班員）感染効率が低い細胞（加藤班員）があり感染効率を上昇させる工夫が必要である。また、NTCP-HepG2 を用いて siRNA ライブラリーによる HBV 感染に関わる宿主因子のスクリーニングを進行中である。さらに HBV のライフサイクルに関係する宿主因子として 500 個あるキナーゼのスクリーニングを行った結果現在までに HBV の複製に関係するキナーゼとして 4 遺伝子、HBV の増殖抑制に関わる遺伝子として 5 遺伝子を見出した。これら 5 遺伝子のう

ちのひとつである TSSK2 はインターフェロン非依存性に働くことを確認した（Hussein 班員）。宿主側の解析では、マウスへ HBV 発現プラスミドを hydrodynamics 法により導入した実験系で ISG20 が HBV の複製を阻害していることを証明した。ISG20 の発現誘導機序としては、HBV 感染を感知した分子が細胞質内の IPS-1, TICAM-1 の両者を介して IRF3 を活性化し type I インターフェロンを誘導させ IFNAR を介して ISG20 の発現が誘導されることが証明された（瀬谷班員）。一方、ウイルス側の検討では、HBV は感染性のウイルス粒子である Dane 粒子を細胞外へ放出するが Dane 粒子だけでなく粒子内に HBV ゲノムを持たない外側蛋白のみの中空の粒子を大量に放出することが知られている。HBV 粒子の細胞外への放出機構を詳細に調べるために細胞に preS1-preS2-S, preS2-S, S, preCore-Core, Core, HBe をそれぞれ単独で導入するとすべての蛋白が培養上清中に分泌された。Core 蛋白の C 末端にはアルギニンに富んだ領域が存在するがアルギニンの数を削っていくと Core 蛋白の培養上清中への分泌がなくなることから Core 蛋白の分泌には C 末端のアルギニンが重要であることが明らかになった。また HBV の各蛋白質のインターフェロニンシグナル伝達への影響を調べるために HBV 蛋白と IFNB, IRF3, IFN stimulation responsive element (ISRE) のレポータープラスミドを共

発現させセリダイウイルス Cantell 株を感染させてレポーター遺伝子の転写活性への影響を調べた。その結果 Polymerase 蛋白は対照の海シイタケルシフェラーゼ活性も強く抑制し、転写プロモーターを変えても抑制効果は変わらなかったことから Polymerase 蛋白は細胞の蛋白合成全体を抑制していることが示唆された（坂口班員）。さらに Polymerase 蛋白をドメイン毎に分けて発現させると逆転写酵素（RT）ドメインに強力な蛋白質合成抑制作用があることが見出された。また、①HBV 感染からの肝臓癌への進行症例、②HCV 感染からの肝臓癌への進行症例、③ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例の 3 グループでそれぞれ非癌部、癌部組織から microRNA を調製し次世代シーケンサーライフテクノロジーズ Ion PGM を用いた網羅的発現解析を行った結果、非癌部と比較して発現が上昇している microRNA として①HBV 感染からの肝臓癌への進行症例では 41 個、②HCV 感染からの肝臓癌への進行症例では 10 個、③ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例では 29 個、非癌部と比較して発現が減少している microRNA として①HBV 感染からの肝臓癌への進行症例では 21 個、②HCV 感染からの肝臓癌への進行症例では 11 個、③ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例では 23 個の microRNA が認められ 3 グループに共通して非癌部と比較して発現が上昇する microRNA として miR-221 を含

め 3 個が同定された（田原班員）。

#### cccDNA の排除、転写制御に関する研究

HBV core プロモーター領域の転写因子 FIF、HNF4 の結合領域を標的とした TALE を用いて HBV の転写阻害について検討した結果、対照のスクランブル TALE と比較してほぼ影響が見られなかった。一方、CRISPR/Cas システムを用いた系では HBV 複製中間体が 1/5 まで減少した（山本班員）。

#### D. 考察

NOG-scid マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスにヒト免疫細胞を投与することによって HBV に対する免疫応答を引き起こす肝炎モデルを作製することができた。肝炎の発症機序としては CTL を介した反応で比較的緩やかな炎症を惹起していることが示された。

#### E. 結論

肝炎モデルの改良、HBV Tg マウス、iPS 細胞由来肝細胞移植マウス、cDNA-uPA/SCID マウスを宿主としたヒト肝細胞キメラマウス、in vitro HBV 感染培養系の構築が進み、HBV の各ライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となった。さらに、新規のゲノム編集技術 CRISPR/Cas システムを用いることで cccDNA の排除による HBV 完全排除に向けた創薬研究が可能となった。

#### F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 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;441:230-235
- 2). Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic shepatitis B. *J Med Virol.*2013;85:789-798.
- 3). Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol.* 2013 ;48:1188-1204.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究補助金（B型肝炎創薬実用化用化等研究事業）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
分担研究報告書(平成25年度)

免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる  
マウスモデルの作製に関する研究

研究分担者 瀬谷 司 北海道大学医学部 教授

研究要旨：自然免疫特にインターフェロン誘導系の活性化によるB型肝炎ウイルス（HBV）排除の機構に関与する因子を探索する。IFN誘導性遺伝子の網羅的解析からHBV感受性を高めるIRF-3下流遺伝子を同定し、機能解析を施行している。

#### A. 研究目的

HBVはMAVS(IPS-1)RNA認識経路でなく、STING-TBK1経路でI型インターフェロン(IFN)を誘導し、肝実質細胞のHBV感受性を下げる(Leong et al., submitted)。持続性B型肝炎もIFNの誘導性と関連する可能性がある。本研究はHBV感染から複製に至るHBVライフサイクルを肝細胞において阻害するIFN誘導経路の分子を同定することを目的とした。HBVの自然免疫に関する報告は乏しいので、申請分担者らは2つの系でHBV自然免疫系の解析を行う。1. ヒト肝細胞HBV培養系を使ってHBV複製阻害に関与するIFN誘導分子を同定しその基本機能を調べる。2. 核酸認識経路のKOマウスとその肝細胞株を使ってHBVの制御に関連する自然免疫因子のin vivo活性を同定する。

#### B. 研究方法

Hydrodynamics実験により、各種KOマウスのうち、IRF-3/7-/-、IFNAR-/-のKOマウスがHBV複製を助長した。この系でIFN誘導因子のど

れがHBV複製阻害に直接関与するかを検討した。ヒト肝細胞株HepG2とその持続感染株は茶山研より恵を受けた。この系で各種IFN誘導因子をKDまたは強制発現し、HBV複製効率を査定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

#### C. 研究結果

HBV plasmidのマウス肝細胞株へのtransfection、マウス個体を用いたhydrodynamicsの両方でISG20がHBVの複製阻害に働くことが証明できた。

一方、ISG20はIPS-1、TICAM-1のどちらでも発現上昇し、IRF-3依存性であったが、HBV複製阻害はこれらに依存せずIFNARによるISG20発現上昇に依存した。感染阻害作用は強く見られ、ヒト臨床の関節報告と一致した。

DNA transfectionの際type I IFNが誘導されるが、大部分はSTING-TBK1の経路に依存した。この際のIFN誘導因子は未報告の



因子であった。この分子をヒト肝細胞でKD, 強制発現するとHBVは期待通り複製上昇と抑制がそれぞれ見られた。

以上からIFNARがHBV感染阻害の鍵経路であるのはISG20を誘導するためと判明した。これとは別にHBVが肝細胞で複製すればDNA依存性に別のIFN誘導因子が誘導され、それがHBV複製阻害を誘起して感染防御に働くことが示唆された。

#### D. 考察

本研究でHBV感染は2つのエフェクター因子をIFN誘導に関連して誘導し、これらがHBV鎮静に機能することが示唆された。一つはIFNAR活性化による複製阻害で、これはISG20によって起動することが証明された。一方、DNAで起きるIFN誘導因子の中にもHBV抑制に働く因子があることが判明した。この因子のHBV阻害機構を現在調べている。本研究の成果はDNAウイルスでありながらRNAのphaseもとるHBVについて既報のウイルス抑制経路以外が複製抑制のエフェクターを起動することを細胞レベルで初めて明らかにした。

In vivo の hydrodynamics の系でもこのことが証明できた。従って、ヒト培養系の知見はマウスモデルでも妥当な知見となることが予測された。次年度に向けてこれらエフェクターによるHBV阻害機構を解明する予定である。

#### E. 結論

HBV複製阻害の実行因子としてDNA認識のIFN誘導経路と、IFNAR経路

からそれぞれ新規のHBV複製阻害因子を同定した。In vivoマウス肝細胞でも同様の知見を得た。これらの分子のウイルス抑制機能を同定している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]

2. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.

3. Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639.

4. Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Dec 3;110(49):19908-13.

5. Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T.

- MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014 Feb;57(2):100-10.
6. Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4740-7.
7. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
8. Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10900-3.
9. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8169-78.
10. Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun*. 2013;4:1833.
11. Seya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 May;17(5):533-44.
12. Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Apr;61(2):127-38.
13. Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):764-73.

G. 知的所有権の出願・取得状況

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）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
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時における自然免疫応答回避メカニズムの解明に関する研究

研究分担者 加藤 博己 京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学分野 准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)が自然免疫機構を回避するそのメカニズムの解明を目的として研究を行っている。今年度は、*in vitro*においてHBV感染を可能にするNTCP安定発現株を樹立することができた。現在、自然免疫応答に関与する分子群の発現を誘導もしくは抑制し、HBV感染価に与える影響を検討している。また、*in vivo*においてHBV感染をモニターするために、HBVレセプターであるヒトNTCPを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスの作製に着手している。これらの実験系の確立により、B型肝炎ウイルスと自然免疫機構の相互関係を詳細に解析できることが期待される。

#### A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)が持続感染する際、自然免疫応答を回避していると考えられるが、そのメカニズムは明らかではない。我々は、非自己のRNAを認識し抗ウイルスインターフェロン応答を惹起する細胞内RNAヘリケースRIG-I-like receptors (RLRs)に着目し、B型肝炎ウイルスが特にRLRsの認識を回避もしくはそのシグナル伝達を阻害しているかを検討する。また、最近明らかとなってきたcGAS依存的dsDNA認識経路に関しても、B型肝炎ウイルス感染との関係を検討する。

#### B. 研究方法

上記研究目的をもとに、下記1～3のような実験を中心に研究を行っている（今後も行っていく）。

1 HBV受容体であるヒトNTCPを安定的発現する細胞株を樹立する（作製済み）。さらに、RLRやcGAS依存的シグナル伝達に関与する分子群の発現を誘導もしくは抑制した時のHBV感染価を検討する（検討中）。

2 ヒトNTCPを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製する。（大臣確認を申請中およびDNAコンストラクトを作製中）。

3 作製したトランスジェニックマウスを用いてHBV感染をモニターする。また、自然免疫応答に関わる分子のノックアウトマウスと掛け合わせを行い、それら分子のHBV感染における役割を検討する。

（倫理面への配慮）

培養細胞を用いた研究に関して倫理面での問題はない。マウスの作製にあたっては、大臣確認を申請中である。

#### C. 研究結果

研究方法1に関して、細胞株は樹立できており、HBVが感染し複製することが確認できている。現在、その感染価を上げる条件を検討している段階である。また、樹立した細胞株においてsiRNAによる発現抑制の条件も検討中である。

研究方法2に関しては、肝臓特異的トランスジェニックマウスを作製するためのアルブミンプ

ロモーター存在下でヒトNTCPを発現するコンストラクトを作製した。大臣確認が得られてから、以降の実験を進めていく予定である。研究方法3に関しては、トランスジェニックマウスの作製待ちである。

#### D. 考察

作製したヒト NTCP 安定発現細胞株において、*in vitro* における HBV 感染が可能となった。しかし、感染レベルは依然低いレベルである。免疫応答等をモニターするためには、高い感染価が必要だと予想され、DMSO や PEG 存在下の条件など感染条件の検討が必要である。

#### E. 結論

作製した細胞株やマウスを用いて、HBV 感染をモニターできる系のセットアップが必要である。マテリアルの作製に関しては、今のところ順調に進んでいると考えられる。

#### G. 研究発表

1) Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, and Fujita T Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5. *Immunity* 2014 Feb;40. 1-14

2) Ng CS, Jogi M, Yoo JS, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *J Virol.* 2013 Sep;87(17):9511-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
分担研究報告書（平成25年度）

免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる  
マウスモデルの作製に関する研究

研究分担者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 自然免疫特にインターフェロン誘導系の活性化による B 型肝炎ウイルス (HBV) 排除の機構に関与する因子を探索する。IFN 誘導性遺伝子の網羅的解析から HBV 感受性を高める IRF-3 下流遺伝子を同定し、機能解析を施行している。

### A. 研究目的

HBV は MAVS (IPS-1) RNA 認識経路でなく、STING-TBK1 経路で I 型インターフェロン (IFN) を誘導し、肝実質細胞の HBV 感受性を下げる (Leong et al., submitted)。持続性 B 型肝炎も IFN の誘導性と関連する可能性がある。本研究は HBV 感染から複製に至る HBV ライフサイクルを肝細胞において阻害する IFN 誘導経路の分子を同定することを目的とした。HBV の自然免疫に関する報告は乏しいので、申請分担者らは 2 つの系で HBV 自然免疫系の解析を行う。1. ヒト肝細胞 HBV 培養系を使って HBV 複製阻害に関与する IFN 誘導因子を同定しその基本機能を調べる。2. 核酸認識経路の KO マウスとその肝細胞株を使って HBV の制御に関連する自然免疫因子の in vivo 活性を同定する。

### B. 研究方法

Hydrodynamics 実験により、各種 KO マウスのうち、IRF-3/7-/-、IFNAR-/- の KO マウスが HBV 複製を助長した。この系で IFN 誘導因子のどれが HBV 複製阻害に直接関与するかを検討した。ヒト肝細胞株 HepG2 とその持続感染株は茶山研より恵与を受けた。この系で各種 IFN 誘導因子を KD または強制発現し、HBV 複製効率を査定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

### C. 研究結果

HBV plasmid のマウス肝細胞株への transfection、マウス個体を用いた hydrodynamics の両方で ISG20 が HBV の複製阻害に働くことが証明できた。

一方、ISG20 は IPS-1、TICAM-1 のどちらでも発現上昇し、IRF-3 依存性であったが、HBV 複製阻害はこれらに依存せず IFNAR による ISG20 発現上昇に依存した。感染阻害作用は強く見られ、ヒト臨床の関節報告と一致した。

DNA transfection の際 type I IFN が誘導されるが、大部分は STING-TBK1 の経路に依存した。この際の IFN 誘導因子は未報告の因子であった。この分子をヒト肝細胞で KD、強制発現すると HBV は期待通り複製上昇と抑制がそれぞれ見られた。

以上から IFNAR が HBV 感染阻害の鍵経路であるのは ISG20 を誘導するためと判明した。これとは別に HBV が肝細胞で複製すれば DNA 依存性に別の IFN 誘導因子が誘導され、それが HBV 複製阻害を誘起して感染防御に働くことが示唆された。



## D. 考察

本研究でHBV感染は2つのエフェクター因子をIFN誘導に関連して誘導し、これらがHBV鎮静に機能することが示唆された。一つはIFNAR活性化による複製阻害で、これはISG20によって起動することが証明された。一方、DNAで起きるIFN誘導因子の中にもHBV抑制に働く因子があることが判明した。この因子のHBV阻害機構を現在調べている。本研究の成果はDNAウイルスでありながらRNAのphaseもとるHBVについて既報のウイルス抑制経路以外が複製抑制のエフェクターを起動することを細胞レベルで初めて明らかにした。

In vivoのhydrodynamicsの系でもこのことが証明できた。従って、ヒト培養系の知見はマウスモデルでも妥当な知見となることが予測された。次年度に向けてこれらエフェクターによるHBV阻害機構を解明する予定である。

## E. 結論

HBV複製阻害の実行因子としてDNA認識のIFN誘導経路と、IFNAR経路からそれぞれ新規のHBV複製阻害因子を同定した。In vivoマウス肝細胞でも同様の知見を得た。これらの分子のウイルス抑制機能を同定している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.
3. Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639.
4. Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor

molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Dec 3;110(49):19908-13.

5. Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014 Feb;57(2):100-10.
6. Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4740-7.
7. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
8. Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10900-3.
9. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8169-78.
10. Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun*. 2013;4:1833.
11. Seya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 May;17(5):533-44.
12. Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Apr;61(2):127-38.
13. Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):764-73.

## G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 実用新案登録 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）  
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究  
分担研究報告書（平成25年度）

キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学のおよび  
遺伝子・タンパク質発現解析・新規モデルの作製

研究分担者 立野（向谷）知世 株式会社フェニックスバイオ  
取締役研究開発部長  
研究協力者 石田雄二 株式会社フェニックスバイオ  
大下宏樹 株式会社フェニックスバイオ  
吉実康美 株式会社フェニックスバイオ  
小川裕子 株式会社フェニックスバイオ

研究要旨 昨年度、新たに作製した uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID homozygote マウスをホストマウスとしたキメラマウス（cDNA-uPA/SCID ホモキメラマウス）に HBV を 14 週間感染させ、感染、非感染で、病理組織観察、TUNEL 陽性細胞の割合、線維化の程度を比較したところ、顕著な差は見られなかった。今年度、HBV 感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現を調べたところ、炎症や線維化に関与するマウス遺伝子発現（ $\alpha$ -SMA, mCD14, mHGF, mTNF $\alpha$ , mTLR4, mProcollagen type1, mTGFB $\beta$ 1）に差は見られなかったが、Apoptosis に関与するヒト遺伝子発現（hTNFRSF10C, hFAS）の増加傾向、および増殖に関与するヒト遺伝子発現（hPBK, hRRM2, hNCAPG）の低下傾向が見られた。また、HBV 感染キメラマウス肝細胞は非感染に比べて肥大していた。さらに、HBV 感染、非感染キメラマウスの肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が検出された。今年度はさらに長期間の感染飼育が可能と思われる、cDNA-uPA/SCID hemizygote マウスを用いたキメラマウス（cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウス）を作製し、HBV を接種し長期飼育観察（20 週）を行った。来年度は、cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスの遺伝子発現、病理組織学的解析を行う。

#### A. 研究目的

これまでのヒト肝細胞キメラマウス（uPA/SCIDキメラマウス）は、導入uPAゲノム遺伝子の欠失が起るため、長期飼育により正常マウス肝細胞の結節状の増殖が観察される。それに伴い、ヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへのHBV長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、新たに作製したuPA遺伝子欠失

の見られないcDNA-uPA/SCIDホモおよびヘミマウスをホストマウスとしたキメラマウス（cDNA-uPA/SCIDホモおよびヘミキメラマウス）の性状解析を行うと共に、HBV長期感染における病理学的、遺伝子・タンパク質発現の解析を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

ヒト肝細胞ヘミキメラマウスの作出  
3週令のcDNA-uPA/SCID hemizygote にドナーヒト肝細胞（2YF:2才、女兒、