

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