

201423036A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業  
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)

**B型肝炎の新規治療薬を開発するための  
宿主の自然免疫系の解析に関する研究**

H26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤田 尚志

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業  
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)

**B型肝炎の新規治療薬を開発するための  
宿主の自然免疫系の解析に関する研究**

H26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤田 尚志

平成 27 (2015) 年 5 月

## 目次

I. 総括研究報告書	
B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究 藤田尚志	1
II. 分担研究報告書	
抗ウイルス自然免疫応答促進によるHBV増殖制御 藤田尚志	5
HBV感染増殖によるインターフェロンシステム攪乱機構の解析 加藤宣之	7
HBV感染複製細胞を用いたヒト肝細胞における自然免疫系の解析 土方 誠	15
B型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響 松浦 善治	19
<i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> HBV感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答に関する研究 柘植 雅貴	23
HBVジェノタイプ別IFNシグナル阻害効果の検討 渡邊 綱正	31
自然免疫を用いたHBV感染細胞の排除に関する研究 水腰英四郎	37
HBVに対する自然免疫応答の解析 竹原 徹郎	41
HBV感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給 斎藤 泉	45
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・別冊（別添）	55

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
総括研究報告書

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

研究代表者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：新規治療薬開発を目指した HBV と宿主の自然免疫応答に関する研究報告である。それぞれの分担者は in vitro あるいは in vivo の HBV の増殖系を確立し、それらを用いて解析を開始している。HBV 感染によって自然免疫応答が誘導され、λ型を含むインターフェロン、ケモカインの誘導、インターフェロン誘導遺伝子群の誘導が起きることが示されてきている。今後はNK細胞、DC細胞の機能を含む、自然免疫系の活性化の強化、さらにはHBVがどのようにして自然免疫を逃れて増殖するのかについて解析を進める必要がある。また、斎藤のグループによる遺伝子治療用の新世代アデノウイルスベクターが利用可能になり、in vitro あるいは in vivo での有効性の検証が今後の課題である。

研究分担者

藤田 尚志 京大ウイルス研・教授  
加藤 宣之 岡山大・教授  
土方 誠 京大ウイルス研・准教授  
松浦 善治 阪大微研・教授  
柘植 雅貴 広大・助教  
渡邊 綱正 名古屋市大・研究員  
水腰英四郎 金沢大・准教授  
竹原 徹郎 阪大・教授  
斎藤 泉 東大医科研・教授

以上の現状に鑑み、以下の目標を設定し、研究を開始した。

- (1) 自然免疫は細胞に備わるウイルス増殖抑制機構であり、その活性化はウイルスの感染排除に重要と考えられるがHBVに対する自然免疫機構は解明が進んでおらず、その解明を行う。
- (2) HBVによる免疫系の阻害機構を解明し、新たな治療法の開発の基盤とする。
- (3) 複数のストラテジーによってHBV感染の治療法の糸口を開発することにより、新たな薬剤の開発、遺伝子治療法の開発へつなげる。

A. 研究目的

- (1) HBVは持続感染となった場合、完治させる治療法がなく、肝硬変、肝臓がんの原因となっており、新たな治療法の開発が期待されている。
- (2) HBVはヒトの肝臓で増殖するが、感染の実験系が確立しておらず、抗ウイルス薬剤の効果を的確に検討する系の確立は重要である。
- (3) ウイルスは免疫系を阻害することによりその存在を隠しているが、その機構の解明はHBVに対する新たな治療法の開発に必須である。

B. 研究方法

- 9つのグループによって研究を分担し、複数のストラテジーによるHBV治療法の開発を行う。
- ・ 研究代表者(藤田尚志)
  - (1) HBV感染の受容体分子として報告されたヒトNTCPを肝細胞株に強制発現し、ウイルス粒子からの感染系を作り、HBV増殖と自然免疫の関連を解析する。
  - (2) ヒトNTCPを肝臓で発現するトランスジェニックマウスを作製し、動物レベルでのHBV感染系の確立を目

指す。

・研究分担者(加藤宣之)

(1)培養細胞でのHBV増殖に対するcGASおよびSTINGの影響を検討した。

(2)Li23/NTCP-myc細胞のサブクローニングを行いそれぞれのHBV増殖維持能とcGASの発現量の相関を検討する。

・研究分担者(土方誠)

(1)ヒト不死化肝細胞HuS-E/2細胞にhNTCP発現した細胞を用いてHBV感染実験を行う。

(2)HepG2.2.15.7細胞に薬剤ライブラリーを処理してHBVの増殖を検討する。

・研究分担者(松浦善治)

(1)培養細胞でのHBV感染実験を行い、誘導される遺伝子を解析する。

(2)マウスの肝臓にハイドロダイナミック法によってHBV遺伝子を導入し、その増殖、サイトカイン、毛もカインの誘導を検討する。

・研究分担者(柘植雅貴)

(1)HBV genotype C感染患者血清をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、HBV持続感染マウスを作製する系を用いてHBVによる宿主遺伝子発現への影響を次世代シークエンサーを用いて解析する。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1)ヒト肝臓置換キメラマウスおよび初代ヒト肝細胞にHBVを感染させ、その増殖、サイトカイン/似寄るウイルス増殖抑制を検討する。

・研究分担者(水腰英四郎)

(1)HBV感染患者から樹状細胞(DC)をplasmacytoid DCとmyeloid DCに分離して分画し、各種遺伝子発現を検討する。対照として非感染健常者の同分画を用いて比較を行う。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1)NK細胞のサブセット分類とその機能解析を行う。HBV感染者と非感染者でNK細胞表面マーカー、ウイルスDNA量、抗ウイルス剤、インターフェロン治療応答性の関連を検討する。

・研究分担者(斎藤泉)

(1)HBVに対するshRNAを発現するアデノウイルスベクターを作成し、そのウイルス増殖抑制効果を検討する。発現ベクターの構築を行なう。

(2)VARNAを発現しないアデノウイルスベクターを作成し、その有用性を検討する。

(倫理面への配慮に関しては各分担研究の報告書に記載)

## C. 研究結果

・研究代表者(藤田尚志)

(1)HBVの受容体として報告されたヒトNTCPをHepG2細胞に発現させた。この細胞はHBV粒子からの感染が可能であった。この細胞で細胞質ウイルスRNAセンサーであるRLRの機能を阻害するとHBV増殖が高率に増加した。以上よりHBVはRNAセンサーによって感知され、増殖が制御されていると考えられた。

(2)ヒトNTCPを肝臓で発現するトランスジェニックマウス系統を樹立した。

・研究分担者(加藤宣之)

(1)cGASの発現量とHBVの増殖は逆相関しており、このセンサーがHBVを感知して免疫応答を起こしていることが示唆された。

・研究分担者(土方誠)

(1)HuS-E/2細胞にNTCPを発現させた細胞はHBVを増殖させることができるが、その効率は株ごとに異なり、なんらかの制御機構が働いていることが示唆された。

(2)薬剤ライブラリースクリーニングの結果、HBVの増殖を上昇させる物が同定され、宿主の免疫応答が標的となっていることが示唆された。

・研究分担者(松浦善治)

(1) 培養細胞にHBVを感染させ、宿主の遺伝子発現の変動を検討した結果、ケモカインの発現誘導が顕著であることが観察された。マウスでの実験位置いてもケモカインの発現誘導が観察され、これらの感染病態への関与が示唆された。

・研究分担者(柘植雅貴)

(1) ヒト肝キメラマウスを用いた感染実験で、遺伝子発現プロファイルを解析した所、感染後8週で大きな発現変化が観察され、解析の結果、これらの遺伝子の制御領域の解析を行った。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1) ヒト肝キメラマウスより分離した初代(ヒト)肝細胞にHBVを感染させると、IFN- $\lambda$ が強く誘導されることを見出した。しかしながら抗HBV効果はIFN- $\alpha$ 、- $\gamma$ で差がなかった。

・研究分担者(水腰英四郎)

(1) 樹状細胞(DC)の遺伝子発現のパターン解析により、病態に関連した遺伝子群を同定することができた。これらからHBV感染による免疫抑制の指標となるものを探し出し、治療効果の判定に用いる可能性が示唆された。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1) HBV感染者のNK細胞の解析により、高ウイルス群ではNK細胞の低下が見られた。HBV感染によって増加すると考えられるNK亜型を同定し、それらが細胞傷害性が高いことより、肝傷害との関連が示唆された。一方、同亜型はIFN治療によって増加することから、治療効果との関連も示唆された。

・研究分担者(斎藤泉)

(1) HBVに対する複数のshRNAを発現することによってHBV増殖抑制効果が明らかとなった。VAを欠損する新規アデノウイルスベクターは宿主遺伝子発現を大きく変動することがなく、治療目的に有用であることが示唆された。

D. 考察

各分担研究者によってHBV感染・複製のための系が樹立されている。HBV感染と自然免疫応答の誘導、その機構の解明が今後の課題である。HBV感染は自然免疫応答を誘導しながら増殖していることが示唆されており、HBVがどのように免疫応答を乗り越えているのか今後の課題である。

E. 結論

各研究グループで研究の基礎の系が確立し、実際にHBV感染実験結果が得られてきている。着実に研究が進行していると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照。

2. 学会発表

分担者の学会発表リストを参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

分担者の特許リストを参照。

2. 実用新案登録

分担者の登録リストを参照。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
分担研究報告書

抗ウイルス自然免疫応答促進による HBV 増殖制御

分担研究者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：HBV と宿主の自然免疫応答に注目し、免疫の誘導とウイルスによる阻害を標的とした治療法を開発することを目的とした。肝培養細胞に HBV の感染受容体 NTCP を発現させることによって HBV 粒子からの感染を再現することができた。NTCP を肝臓で発現するトランスジェニックマウスを作成し、HBV 感染実験を開始した。

A. 研究目的

HBV の治療効果向上を目的とする。本研究では特に感染初期に稼働する宿主の自然免疫応答に焦点を当てた。宿主の免疫の誘導とウイルスによる阻害を標的とした治療法を開発する。ウイルスは宿主と共に進化を遂げ、野外株ウイルスは免疫機構を回避する方法を獲得してその存在を保全している。HBV の免疫回避機構を明らかにすることは、ウイルスの増殖を制御して治療する上で必須である。

B. 研究方法

HBV の誘導する自然免疫応答および主要な免疫阻害機構を明らかにすることを目指し、細胞培養系を用いたシステムを構築した。マウスに天然二重鎖 RNA を投与して、自然免疫応答を検討した。HBV の吸着、侵入のための受容体として報告された、ヒト Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を発現する細胞を作製し、そこでの HBV 粒子からの感染、増殖を検討した。ヒト NTCP を肝臓で発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。

C. 研究結果

- (1) ヒト自然免疫マイクロアレイによるウイルス感染による遺伝子活性化モニター法を確立した。
- (2) 天然二重鎖 RNA をマウスに経口投与し、各種組

織でインターフェロン系を活性化し、EMCV ウイルスによる致死率が減少する事を確認した。マウスを用いた HBV 感染予防・治療への応用が可能である。

(3) HBV の受容体として報告されたヒト NTCP を HepG2 細胞に発現させた。この細胞は HBV 粒子からの感染が可能であった。この細胞で細胞質ウイルス RNA センサーである RLR の機能を阻害すると HBV 増殖が高率に増加した。以上より HBV は RNA センサーによって感知され、増殖が制御されていると考えられた。

(4) ヒト NTCP を肝臓で発現するトランスジェニックマウス系統を樹立した。

D. 考察

HBV 粒子からの感染増殖系を培養細胞で立ち上げることができた。自然免疫の制御因子のノックアウトで HBV の増殖が増加したことは HBV が自然免疫応答を誘導し、それにより増殖制御を受けていることを示している。自然免疫応答の強化によりウイルスの人為的な制御の可能性が示唆される。培養細胞を用いた実験結果からは NTCP を肝臓で発現するマウスが HBV 感染動物モデルとして有用である可能性が示唆される。また自然免疫応答の不全なノックアウトマウスとの掛け合わせにより HBV の増殖する動物モデルの作成の可能性が示唆される。

## E. 結論

HBV の増殖を培養細胞レベルで再現する系を立ち上げることが出来、動物感染モデルの作成が進行中である。次段階としては細胞培養系での HBV 持続感染系の確立とマウスを用いた HBV 粒子からの感染系の確立を目指して検討を続ける。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Yao, W-L., Kaname, Y., Ikeda, S., Kato, H. and Fujita, T.:  
Innate Immune Responses Against Hepatitis B Virus in  
ES2. 2014 9. 3-6 2014 International Meeting on Molecular  
Mechanism of Hepatitis B Viruses, UCLA, USA

## 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  
肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
分担研究報告書（平成26年度）

HBV感染増殖によるインターフェロンシステム攪乱機構の解析

研究分担者 加藤 宣之 岡山大学 教授  
研究協力者 團迫 浩方 岡山大学 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の感染増殖により宿主の自然免疫機構、特にインターフェロン（IFN）応答性やIFNの産生システムがどのような影響を受けるかを明らかにすることを目的とした。今年度は、細胞内二本鎖DNAを認識する宿主因子として報告されているcyclic GMP-AMP synthase（cGAS）がHBVの感染増殖制御において、どのような役割を担っているかを明らかにすることを試み、以下に示すような成果を得た。（1）HepG2.2.15細胞において、cGASはHBVの複製中間体を認識し、細胞内のHBV RNAや細胞外のHBV DNA量を減少させた。（2）HepG2/NTCPmyc細胞において、cGASはHBV感染を認識している可能性が示唆された。（3）Li23/NTCPmyc細胞のサブクローン化細胞では、内在性のcGAS発現量とHBV感染受容性が逆相関していた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）による感染症は患者数も多く、慢性肝炎、肝硬変及び肝癌などの重篤な病態の原因になっている。C型肝炎ではインターフェロン（IFN）治療が直接作用型抗ウイルス剤（DAA）の登場により大幅に改良され、治療率も90%以上になることが期待されている。しかし、B型肝炎でのIFN治療の成績は30%程度に留まっており、HBVはIFN治療に抵抗性を示す。また、ラミブジンやエンテカビルなどの核酸アナログ製剤は、HBVの増殖を抑えて肝炎を沈静化させることができる。しかし、薬剤を中止するとほとんどの症例で肝炎が再

燃するため、HBVの完全排除ができない状況にある。そのため、B型肝炎での新たな治療法や薬剤の開発が求められている。

本研究はHBVが宿主の自然免疫機構、特にIFN応答性やIFN産生システムにどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的としている。この目的を達成するために、宿主の自然免疫機構において、HBVの感染増殖制御に関わる宿主因子について解析した。前年度、細胞内二本鎖DNAを認識する宿主因子cyclic GMP-AMP synthase（cGAS）がヒトがん由来のLi23細胞やヒト不死化肝NKNT-3細胞で高発現しており、2種類の人工二本鎖DNA；poly(dA:dT)及び

poly(dG:dC)の両方に応答することを見出した。また、Li23 細胞は cGAS を介して、HBV のゲノム配列を持つ人工二本鎖 DNA にも応答性を示すことを明らかにした。これらの結果は、cGAS が HBV の感染増殖制御に関わる宿主因子の一つである可能性を示唆した。そこで、今年度は HepG2.2.15 細胞 (HepG2 細胞由来であり、HBV の細胞内複製が確認されている) や HBV レセプターである sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を恒常的に過剰発現させた HepG2 細胞 (HepG2/NTCP-myc 細胞) を用いた HBV 感染増殖系での cGAS の影響について検討した。また、NTCP を恒常的に過剰発現させた Li23 細胞 (Li23/NTCP-myc 細胞) から、cGAS 発現量の異なる細胞クローンを限界希釈法により選択単離し、細胞株として樹立した。これらのサブクローン化細胞株における HBV 感染増殖能を比較した。これらの解析により、HBV 感染増殖制御における cGAS の役割を明らかにし、HBV 感染症に対する新たな治療法や薬剤の開発を目指す。

## B. 研究方法

(1) HepG2.2.15 細胞での cGAS 及び STING の強制発現による影響.

HepG2.2.15 細胞における cGAS 及び STING の発現量を定量的 RT-PCR 法により調べた。cGAS 及び STING を恒常的に過剰発現させた HepG2.2.15 細胞 (HepG2.2.15/HA-cGAS/myc-STING 細胞) を作成し、ISG56 の発現誘導量を定量的 RT-PCR 法により、ISG15 の発現誘導

をウエスタンブロット法により調べた。また、cGAS 活性を欠失している変異体 (cGAS GSAA) と STING を恒常的に過剰発現させた HepG2.2.15 細胞 (HepG2.2.15/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞) をコントロール細胞として作成し、同様に ISG56 や ISG15 の発現誘導量を調べた。HepG2.2.15/HA-cGAS/myc-STING 細胞や HepG2.2.15/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞での細胞内 HBV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により調べた。これらの細胞の培養上清から DNA を抽出し、培養上清中の HBV DNA 量を定量的 PCR 法により調べた。

(2) cGAS 及び STING を恒常的に過剰発現させた HepG2/NTCP-myc 細胞での HBV 感染受容性.

前年度、HepG2 細胞における cGAS の発現量を定量的 RT-PCR 法により調べたところ、cGAS はほとんど発現していなかった。一方、HepG2 細胞における STING の発現量は Li23 細胞に比べて約半分だった。そこで、cGAS と STING を恒常的に過剰発現させた HepG2/NTCP-myc 細胞 (HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS/myc-STING 細胞) を作成し、HBV 感染受容性を調べた。コントロール細胞として、HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞も同様に作成し、HBV 感染受容性を調べた。

HBV 感染に用いる接種源は、HepG2.2.15 細胞の培養上清中に含まれる感染性ウイルス粒子をポリエチレングリコール 8000 (PEG8000) を用いて濃縮することにより調製した。HBV 感染は

2% DMSO 及び 4% PEG8000 存在下で、細胞あたり 1000 ゲノムに相当する HBV 量を接種することにより行った。HBV 感染 5 日、9 日及び 13 日後の細胞から全 RNA を調製し、細胞内の HBV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により測定した。

(3) 限界希釈法による Li23/NTCP-myc 細胞のサブクローニングと HBV 感染受容性。

親株である Li23/NTCP-myc 細胞を限界希釈法によるサブクローニングに供した。増殖性の高い順に得られた細胞クローンに番号を付け、それぞれ増殖させた後、サブクローン化細胞として実験に使用した。個々の細胞クローンから全 RNA を調製し、cGAS 発現量をそれぞれ定量的 RT-PCR 法により測定した。親株より高い、あるいは親株より低い cGAS 発現量を示す代表的細胞クローンを選抜し、HBV 感染受容性を検討した。

HBV 感染は 2% DMSO 及び 4% PEG8000 存在下で、細胞あたり 1000 ゲノムに相当する HBV 量を接種することにより行った。HBV 感染 5 日、9 日及び 13 日後の細胞から全 RNA を調製し、細胞内の HBV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により測定した。

(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。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸

気滅菌を施した後に廃棄した。

### C. 研究結果

(1) HepG2.2.15 細胞での cGAS 及び STING の強制発現による影響。

最初に、HepG2.2.15 細胞における cGAS の発現量を定量的 RT-PCR 法により調べた。その結果、親株である HepG2 細胞と同様に、cGAS はほとんど発現していないことが分かった。一方、HepG2.2.15 細胞における STING の発現量は HepG2 細胞とほとんど同じレベルであった。そこで、HepG2.2.15 細胞に cGAS 及び STING を強制発現させ、恒常的に cGAS と STING の発現レベルが高い細胞 (HepG2.2.15/HA-cGAS/myc-STING 細胞) を作成した。この細胞では、ISG56 や ISG15 の発現誘導が確認された。一方、HepG2/HA-cGAS/myc-STING 細胞や HepG2.2.15/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞においては、ISG56 や ISG15 の発現誘導は起こらなかった。これらの結果より、HepG2.2.15 細胞において、HBV の複製中間体が cGAS により認識され、ISG56 や ISG15 の発現誘導が起こっている可能性が示唆された。

次に、HepG2.2.15/HA-cGAS/myc-STING 細胞での HBV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により調べた。その結果、HBV RNA 量は有意に減少していることが分かった。一方、HepG2.2.15/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞では、HBV RNA の減少は認められなかった。培養上清中の HBV DNA も HepG2.2.15/HA-cGAS/myc-STING 細胞では減少していた。しかし、HepG2.2.15/HA-cGAS GSAA/

myc-STING 細胞での HBV DNA の減少は認められなかった。これらの結果より、cGAS により引き起こされた ISG15 や ISG56 の発現誘導などの自然免疫応答が細胞内の HBV RNA や細胞外の HBV DNA の減少を引き起こしている可能性が示唆された。

(2) cGAS 及び STING を恒常的に過剰発現させた HepG2/NTCP-myc 細胞での HBV 感染受容性。

前年度、HepG2 細胞では cGAS はほとんど発現しておらず、STING の発現量も Li23 細胞に比べて約半分であることを示した。そこで、今年度 HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS/myc-STING 細胞を作成し、HBV 感染受容性を調べた。コントロール細胞として作成した HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞と比較したところ、HBV 感染 5 日後の HBV RNA レベルは、有為差は認められなかったものの、低下していることが分かった。この結果より、HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS/myc-STING 細胞では、cGAS が HBV 感染を認識し、細胞内の HBV RNA の減少を引き起こしている可能性が示唆された。

(3) 限界希釈法による Li23/NTCP-myc 細胞のサブクローニングと HBV 感染受容性。

親株である Li23/NTCP-myc 細胞を用いて限界希釈法によるサブクローニングを行い、64 個の細胞クローンを得た。これらの細胞クローンの一部 (25 細胞クローン) から全 RNA を調製し、定量的

RT-PCR 法により cGAS の発現量を調べた。親株と比較して cGAS の発現量が一番高い細胞クローン(A7)と一番低い細胞クローン(A8)の HBV 感染受容性を調べた。その結果、A7 細胞の HBV 感染受容性は親株より低く、逆に A8 細胞では高いことが分かった。これらの結果より、Li23 細胞において、内在性の cGAS が HBV 感染を認識し、細胞内の HBV RNA の減少を引き起こしている可能性が示唆された。

#### D. 考察

(1) HepG2.2.15 細胞での cGAS 及び STING の強制発現による影響。

HepG2.2.15 細胞に cGAS 及び STING を恒常的に過剰発現させたところ (HepG2.2.15/HA-cGAS/myc-STING 細胞)、ISG56 や ISG15 の発現誘導が確認された。HepG2.2.15 細胞は HBV の細胞内複製が確認されている細胞株であることから、HBV 複製中間体が cGAS により認識され、ISG56 や ISG15 の発現誘導などの自然免疫応答を引き起こしているものと考えられる。これまでの報告や前年度の解析結果から、cGAS は二本鎖 RNA ではなく、二本鎖 DNA を認識していることが示唆される。HBV の生活環において、不完全二本鎖 DNA と閉環二本鎖 DNA が存在するが、cGAS はどちらの型の DNA (あるいは両方とも)を認識しているかは今後の検討課題である。

cGAS は細胞質に局在し、細胞質内の二本鎖 DNA を認識すると考えられている。HBV DNA は核内及び細胞質内に存在し、細胞質内の HBV DNA はカプシド内部に存在すると考えられている。cGAS はカプ

シド内部の HBV DNA を認識するのか、それとも、その他の場所に局在する HBV DNA を認識するのかは今後の検討課題である。HBV の生活環において、cGAS がどのステップを認識しているかを今後明らかにする必要がある。

(2) cGAS 及び STING を恒常的に過剰発現させた HepG2/NTCP-myc 細胞での HBV 感染受容性。

HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS/myc-STING 細胞に HBV を感染させたところ、HepG2/NTCP-myc/HA-cGAS GSAA/myc-STING 細胞と比較して HBV 感染後の HBV RNA の複製レベルが少し低いことが分かった。この結果は、HepG2 細胞において、cGAS が HBV 感染を認識し細胞内の HBV RNA の減少を引き起こしている可能性を示唆するものである。今後、細胞内の HBV DNA 量や培養上清中の HBV DNA 量を調べる予定である。これらの実験により、HBV の生活環において、cGAS を介した自然免疫応答がどのステップを制御しているのかを明らかにすることができるのではないと思われる。

(3) 限界希釈法による Li23/NTCP-myc 細胞のサブクローニングと HBV 感染受容性。

これまでの解析により Li23 細胞では HepG2 細胞とは異なり cGAS が十分発現していることを明らかにしている。今年度の解析により cGAS の発現量が低い Li23/NTCP-myc のサブクローン化細胞では、HBV 感染受容性が上昇することが分かった。この結果からも、cGAS が HBV

感染を認識している可能性が示唆された。

cGAS は、単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスといった DNA ウイルスの感染認識に関与していることが報告されている。HBV もこれらのウイルスと同じ DNA ウイルスに属していることから、cGAS が HBV の感染増殖制御に関わっているものと思われる。今後は、cGAS の発現量と HBV 感染受容性との逆相関の関係が例外なく成立するかどうかをさらに詳細に解析する予定である。今年度の解析により、親細胞株のサブクローニングにより HBV の感染受容性の高い細胞クローンが得られることが分かったので、細胞のクローン化を進めることにより、HBV の感染増殖効率の良い細胞クローンの選択が可能となった。今後は、この方面の検討も合わせて行う予定である。

## E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。

(1) HepG2.2.15 細胞において、cGAS は HBV の複製中間体を認識し、細胞内の HBV RNA や細胞外の HBV DNA 量を減少させた。(2) HepG2/NTCP-myc 細胞において、cGAS は HBV 感染を認識している可能性が示唆された。(3) Li23/NTCP-myc 細胞のサブクローン化細胞では、内在性の cGAS 発現量と HBV 感染受容性が逆相関していた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okumura N, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, Sugiyama M, Mizokami M, Kato N. Negative regulation of hepatitis B virus replication by forkhead box protein A in human hepatoma cells. FEBS Letters, in press (2015).
- 2) Satoh S, Mori K, Ueda Y, Hiroe Sejima H, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Establishment of hepatitis C virus RNA-replicating cell lines possessing ribavirin-resistant phenotypes. PLoS ONE, 10(2) e118313 (2015).
- 3) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. J Immunol, 192(6): 2770-2777 (2014).
- 4) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. Biochem Biophys Res Commun, 447, 341-345 (2014).
- 5) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. Virology, 462-463, 166-174

(2014).

- 6) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. Amer J Pathol, 184(11):3026-3039 (2014).
- 7) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive 1 entry of hepatitis C virus. J Gen Virol, 95(12): 2658-2667 (2014).

### 2. 学会発表

- 1) 桑代 卓也、岩崎 岩太、岩根 紳治、井手 康史、大塚 大河、江口 有一郎、水田 敏彦、池田 正徳、加藤 宣之、安西 慶三. 細胞外マトリックスはインターフェロンシグナルを抑制する。第 50 回 日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月。
- 2) 團迫 浩方、佐藤 伸哉、溝上 雅史、池田 正徳、加藤 宣之. B 型肝炎ウイルスの細胞内複製を認識する宿主因子の探索。第 29 回 中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月。
- 3) 奥村 暢章、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之. FOXA メンバーによる HBV 複製の抑制。第 29 回 中国四国ウイルス研究会、

- 山口、2014年6月.
- 4) Okumura N, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, Mizokami M, Kato N. Negative regulation of hepatitis B virus replication by FOXA members in human hepatoma cells. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Virus. UCLA, USA, 2014年9月.
  - 5) 奥村 暢章、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之. FOXAによるHBV複製制御機構の解明. 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2014年10月.
  - 6) 團迫 浩方、佐藤 伸哉、溝上 雅史、池田 正徳、加藤 宣之. B型肝炎ウイルスの細胞内複製に重要なシグナル経路の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月.
  - 7) 奥村 暢章、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之. FOXAメンバーによるHBV複製機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月.

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業(B型肝炎創薬実用化等研究事業)  
分担研究報告書(平成26年度)

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

分担研究者：土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題：HBV感染複製細胞を用いたヒト肝細胞における自然免疫系の解析

研究要旨：抗HBV作用を有する宿主因子の同定を目指し、非癌細胞を用いたB型肝炎ウイルス(HBV)の感染増殖系を用いてHBV感染後の細胞における抗HBV作用を見出すこと計画した。これまでに立体培養することで、HBVゲノム複製が観察されている不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞に、HBV受容体分子を恒常的に発現させた細胞を樹立した。まず、通常の平面培養下で組換え体HBVやヒト肝細胞キメラマウスで増殖させたHBVを感染させたところ、感染1日後にプレゲノムRNAを検出した。感染後5日までその量は低下したが、それ以降維持された。この感染5日までのpgRNA産生の抑制は、種々の培養細胞系でも観察されているため、何らかの抗HBV作用が働いている可能性が考えられた。また、この非癌細胞はHBV感染を再現し、HBVとの相互作用を解析することが可能な新しい培養細胞系になる可能性が考えられた。この他に、HBV感染性粒子を持続的に産生するHepG2.2.15.7細胞と薬剤ライブラリーを用いて、HBVの増殖を活性化する効果を有する宿主因子阻害薬、そしてHBVの増殖を抑制する宿主因子に対する活性化薬剤のスクリーニングをおこなった。その結果、細胞毒性を示さないそれぞれ数種類の薬剤を見出した。これらの薬剤は、本来HBV増殖を抑制する宿主因子を標的とした新たな抗HBV薬の候補と考えられた。

A. 研究目的

これまで B 型肝炎ウイルス(HBV)の感染増殖の研究に用いられていた細胞はヒトの肝癌由来の細胞であり、正常なヒト肝細胞に類似した細胞を用いたものは極一部に留まる。その中には初代培養ヒト肝細胞やヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養肝細胞があるが、それぞれ非常に高価であり、また、用いることに出来る研究方法も限られている。そこで、われわれは独自に樹立したヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞やヒト肝幹細胞様細胞 HMY1 細胞を用いて

開発した新たな HBV 培養系を用いて、HBV 感染増殖によって修飾され、これを抑制する機能を有する宿主因子を同定することを第一の目的とした。また、この宿主因子の詳細を明らかにし、これを効果的に制御する薬剤を抗 HBV 薬候補として同定し、また HBV 薬評価することを第二の目的とした。また、同時に、薬剤ライブラリーをスクリーニングすることにより、上記同様に HBV の感染増殖を抑制する宿主因子を活性化する薬剤を同定することを第三の目的とした。



## B. 研究方法

1) HBV 受容体分子である hNTCP に tGFP を融合させた hNTCP-tGFP を恒常的に発現させた HuS-E/2 細胞 (HuS-E/2 hNTCP-tGFP細胞)を用いて感染実験をおこなった。HBV はヒト肝細胞キメラマウスで増殖させた HBV (キメラマウス血清)あるいは HBV ゲノムが染色体に挿入されており、恒常的に組換え体 HBV を産生している HepG2.2.15.7 細胞の培養上清を用いた。GEq8000 程度で HBV を感染させた細胞は、経時的にその Total RNA を回収し、定量 PCR によって、HBV プレゲノム RNA(pgRNA)のコピー数を測定した。NTCP 依存的な HBV 感染を解析するために、野性型 HBV preS 合成ペプチドと変異型ペプチドを感染実験時に培地に添加した。

2) HepG2.2.15.7 細胞に薬剤ライブラリーを 1 microM の濃度で 3 日間処理をおこなうことでスクリーニングした。処理後、培養上清を回収し、HBV DNA を単離し、定量 PCR によって、HBV DNA のコピー数を測定した。加えた薬剤の代わりに DMSO を加えて得た結果を対照として用いて、HBV DNA を上昇させる薬剤を選択し、その作用機序の解析を行った。また、薬剤の細胞への毒性については XTT assay により細胞数の変動を解析し、検討した。

3) 2)で用いた薬剤ライブラリーの中から宿主因子の活性化をおこなう薬剤について選択し、その薬剤処理で培養上清中の HBV DNA 量が低下するものを検索した。

## C. 研究結果

1) 複数の株の HuS-E/2 hNTCP-tGFP 細胞に

ヒト肝細胞キメラマウス由来の HBV あるいは組換え体 HBV を感染させた場合、すべての株で感染一日後に高い HBV pgRNA 量を検出した。この HBV pgRNA 検出は感染時にヘパリンを共存させると全く検出されなかった。このことから、加えた HBV は細胞に感染し、そのゲノムは核内に輸送され、遺伝子が転写された可能性が考えられた。しかしながら、経時的に HBV pgRNA 量の変動を観察したところ、ほとんどの株で感染 7 日までに低下していくことが認められた。しかしながら、株 222 細胞だけは低下が感染 5 日後に停止し、7 日以降まで HBV pgRNA が維持された。同様の実験を国立感染症研究所の渡士博士、脇田博士から供与された HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて、行ったところ、やはり感染 1 日目に上記 HuS-E/2-hNTCP-tGFP 細胞の場合とほぼ同量の HBV pgRNA が検出された。この HBV pgRNA は同様に感染 5 日後まで減少していったが、感染 7 日以降、そのコピー数は急激に上昇することがわかった。

2) 組換え体 HBV を恒常的に産生している HepG2.2.15.7 細胞を用いて薬剤ライブラリーのスクリーニングを行った。この細胞の培養液中に 1 microM の濃度で各種薬剤を添加し、3 日間培養した後、その培地に存在する HBV DNA 量を定量し、有意に HBV DNA が増加する薬剤を選択した。8 種類の薬剤を候補薬剤として選択した。また薬剤ライブラリーの中から宿主因子の活性化をおこなう薬剤について選択し、その薬剤処理で培養上清中の HBV DNA 量が低下するものを検索したところ、1 つの薬剤を見出した。この薬剤による HBV DNA 産生抑制

効果は用量依存性が認められ、0.3 microM で3日間処理する事で、DMSOを用いた対照実験に比較して、30%までHBV DNA量を低下させた。

#### D. 考察

当研究室で樹立したHBV受容体NTCP発現HuS-E/2細胞を用いた組換え体HBVやヒト肝細胞キメラマウス血清由来HBVの感染実験では、平面培養下において細胞内への侵入の可能性が考えられたが、HBVゲノム複製を認めることはなかった。これまでに同様のHBVに対する感染感受性が確認されているHepG2-hNTCP-C4細胞との比較では、感染5日目まではHBV pgRNA量の変化はほぼ同様であった。しかしながら、感染7日後以降、HepG2-hNTCP-C4細胞で認められたHBV pgRNAの増加が、HuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞では観察されず、維持されるのに留まった。HuS-E/2細胞は立体培養することで、より本来の肝細胞に類似した細胞へと変化することがわかっているため、今後はHBV感染後に立体培養するなど、培養条件の最適化が必要になるものと考えられる。このHBV pgRNAの産生上昇がHuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞において抑制されていると考える事もできる。しかしながら、HepG2-hNTCP-C4細胞と同様にヒト肝細胞キメラマウス由来の初代肝細胞に同様のHBVを感染させた場合でも、感染7日目以降に細胞外への粒子産生などが観察されていることから、HuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞で見られた現象は細胞による抑制効果とは異なるものと考えられる。しかしながら、いずれの細胞においても、感染後5日目までpgRNA産生の上昇が認められないことは、この間に細胞による何らかのHBV転写等の抑制が働いている可能性が考えられた。今後、

HuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞等を用いてこの間の細胞側の各種変化について検討する必要があると思われる。

宿主因子を標的とした抗HBV薬剤のスクリーニングから、いくつかの候補が見出された。現在、宿主因子の一つに対する活性化薬が効率良くHBVの粒子産生を抑制していることを見出している。このことはこの宿主因子が細胞内在性の抗HBV因子である可能性もあり、この点について明らかにする必要があり、また薬剤としての効果についてもさらに解析を進める必要があると考えられた。

#### E. 結論

HuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞はHBVの感染を許容するが、ゲノムの複製や粒子産生などを維持する能力は十分ではない細胞であると推定された。この細胞、特に細胞株#222を立体培養することでHBVゲノム複製や粒子産生が可能なる可能性が考えられた。同時に進めていた抗HBV薬剤のスクリーニングにより、いくつかの候補薬剤が得られ、本来抗HBV効果を有する宿主因子を活性化する新たな抗HBV薬剤の開発が可能になると期待された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

Akahori Y., Kato H., Fujita T., K. Watashi K., Wakita, Hijikata M.: Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na<sup>+</sup>

/taurocholate cotransporting polypeptide. 2014  
International meeting on the molecular biology  
of hepatitis B viruses, Los Angeles, USA Sept.  
4-6, 2014

赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡士幸一、  
脇田隆宇、土方 誠：ヒト NTCP 恒常発  
現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイ  
ルス培養細胞感染系の構築、第 62 回日本ウ  
イルス学会学術集会。横浜 2014 年 11 月  
10-12 日

岡村 瞳、赤堀祐一、田中靖人、土方 誠：  
不死化ヒト肝細胞を用いた HBV 培養細胞  
系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術  
集会。横浜 2014 年 11 月 10-12 日

#### H. 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  
特許申請  
土方 誠、阿部雄一、山口達哉、内胚葉  
性幹細胞の製造方法、特願 2014-121780  
号、登録日：平成 26 年 6 月 12 日

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

分担研究報告書

**B型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響**

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

**研究要旨：**成人におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染は高率に急性肝炎を引き起こし、慢性化の頻度は高くないことから、HBV感染における自然免疫応答は重要であるが、劇症型の急性肝炎である劇症肝炎は致死的事から、HBV感染における自然免疫応答の役割を解析することは急務である。そこで、初代肝細胞に対するHBV感染に伴い誘導される免疫関連因子をマイクロアレイにより解析した。1型および2型インターフェロンにより誘導される遺伝子群には変動が認められなかったが、CCLやCXCLといったケモカインの発現が強く誘導されていることが明らかになった。また、様々なウイルス感染のセンサーをノックダウンしたHepG2/NTCP細胞にHBVを感染させたが、その感染性に変化が認められなかった。次に、*in vivo*でHBV感染に伴う自然免疫応答を検討した。NTCPトランスジェニックマウス由来の初代肝細胞はHBV感染を許容できなかったため、代わりにHBVゲノムをハイドロダイナミック法にて肝臓に導入するモデルを用いた。HBVの複製に伴い、インターフェロン誘導遺伝子の発現に変化は認められなかったが、*in vitro*と同様にケモカインの誘導が認められた。以上のことから、HBV感染に伴う自然免疫応答にはケモカインが関与している可能性があり、今後は、ケモカインに着目して、さらなる検討を行う。

**A. 研究目的**

B型肝炎ウイルス（HBV）の慢性感染は致死的な肝硬変や肝癌を引き起こす。一方で、成人における感染では主に、急性肝炎を引き起こし、致死的な劇症肝炎に至る事がある。また、慢性肝炎患者において、免疫抑制状態になることによって、高率に急性転化することも知られており、HBV感染における自然免疫応答の解明は急務である。これまで、HBV感染モデルの確立が不十分であったため、HBV感染に伴う自然免疫応答に関しては不明な点が多かったが、HBVゲノムのハイドロダイナミック法によるマウス肝臓への導入のモデルや、感染受容体としてNTCPが報告され、様々な実験系が確立してきたため、詳細な解析が可能になってきた。本研究では、*In vitro*および*In vivo*のHBV感染系を用いて、HBV感染に伴う自然免疫応答の機構を明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

HepAD38細胞の上清より感染性HBVを得て、初代肝細胞または、NTCPを安定的に発現したHepG2細胞に感染させた。HBVの感染性はカプシド内に存在するHBVゲノムの定量、HBc蛋白質の定量を行い、HBV感染性粒子の産生性はHepG2/NTCP細胞に再感染させることで検討した。安定ノックダウン細胞はレトロウイルスベクターを用いて樹立した。

*In vivo*モデルとして10 $\mu$ gの1.28倍長のHBVゲノムを含むプラスミドをハイドロダイナミック法にて8週令のマウスに導入し、1週間後に肝臓および血清を採取し、肝障害マーカーとしてALT、血清中のHBV-DNAを測定した。また、肝臓中のプレゲノムRNA量および、自然免疫関連遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により