

201423040A

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
(H24-B創-肝炎-一般-013)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
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 ……	1
(名古屋市立大学 大学院医学研究科 田中 靖人)	
II. 分担研究報告書	
1. 日本人由来肝細胞の継代と HBV 持続感染モデルの確立 ……	21
(九州大学 消化器・総合外科 調 憲)	
2. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた HBV 感染評価系の開発 ……	23
(大阪大学大学院薬学研究科 水口 裕之)	
3. キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV 長期感染系の検討 ……	29
(株式会社フェニックスバイオ 研究開発部 石田 雄二)	
4. 肝機能維持に最適な 3 次元培養法の構築 ……	35
(東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 棟方 翼)	
5. 3 次元培養における HBV 感染と持続感染培養系の開発、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞 を用いた HBV 感染評価系の開発 ……	38
(名古屋市立大学 大学院薬学研究科 松永 民秀)	
6. HBV の細胞内ライフサイクルに及ぼす miRNA 機能の解析 ……	46
(国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 落谷 孝広)	
7. 検体からの脂質調製とリポドミクス解析・多変量解析 ……	49
(秋田大学 生体情報研究センター 中西 広樹)	
8. 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 ……	52
(国立感染症研究所 細胞化学部 深澤 征義)	
9. 自然免疫認識機構の制御による HBV 複製への影響 ……	56
(北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 高岡 晃教)	
10. 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 ……	62
(名古屋大学 大学院医学系研究科 石川 哲也)	

11. 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……………65 (大阪大学 大学院医学系研究科 石井 優)	
12. HBV 複製肝細胞より産生される因子の免疫細胞に与える影響 ……………68 (東北大学病院 消化器内科 近藤 泰輝)	
13. 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 ……………71 (北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野 坂本 直哉)	
14. HBV 増殖に関わる肝細胞環境因子の同定 ……………74 (鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 池田 正徳)	
15. 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 ……………77 (京都大学ウイルス研究所 土方 誠)	
16. HBV 感染阻害剤の同定および作用機序の解析 ……………82 (国立感染症研究所 ウイルス第二部 渡士 幸一)	
17. GPGPU 型スーパーコンピューターを用いた B 型肝炎に対する理論計算創薬 ……………88 (長崎大学 先端計算研究センター 濱田 剛)	
III. 研究成果の刊行一覧 ……………91	
IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……………99	
V. 参考資料 ……………247	

I. 総括研究報告書

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（平成26年度）

研究課題：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

研究代表者：田中 靖人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授

研究要旨：HBV 感染感受性キメラマウス由来肝細胞や HepG2-NTCP 細胞を用いた HBV 持続感染培養系をほぼ完成させ、各種薬剤スクリーニングを開始した。富山化学や満屋班との共同研究として、新規薬剤の探索、評価、キメラマウスを用いた前臨床試験を進めることができた。今後も、最適なヒト肝細胞の選択及び新規培養システムの構築により、さらに簡便かつ効率的な HBV 持続感染培養系を開発し、ハイスループットスクリーニング系の確立を目指す。

今年度の主な成果として、①HBVの mRNA を標的にした siRNA により、HBV 関連蛋白及びウイルス産生の効果的抑制に成功した。②新規 HBV 治療薬の候補となる可能性のある miRNA を複数同定。③22(S)-hydroxycholesterol、cyclosporin A、proanthocyanidine を HBV 感染阻害化合物として同定した。④RIG-I が pgRNA の ϵ を認識し、自然免疫応答を惹起。さらに RIG-I の新しい機能として HBV P protein の ϵ 構造への結合を阻害した。⑤GPGPU 型スーパーコンピュータによるインシリコ理論計算創薬の基盤整備、SphK1 を標的としたインシリコスクリーニングによる 1,000 化合物の抽出、SphK1 酵素活性測定システムの構築。候補化合物の合成展開、薬効評価を開始した。⑥HBV 感染阻害が見られる多価不飽和脂肪酸(DHA)により増加が抑制される脂質分子(PIP2)を同定した。⑦蛍光標識したHBV、BNC、及びHuS-E/2などのヒト肝細胞の性質が保存された細胞株を用いることにより、HBV の細胞内侵入機構の解析が可能となり、さらに2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内の免疫細胞の動態、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。また感染経路、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながる事が強く期待される。

A. 研究目的

チンパンジーやキメラマウス等を用いずに薬剤の評価ができる方法としては、これまでに透過性を有する中空系の内腔に充填されたヒト肝由来細胞に、肝炎ウイルスを感染させて培養する方法等が報告されている。しかしこの方法においては少量の細胞で多種の試験を行うのが困難であり、

より簡便で高い効率で肝炎ウイルスを感染・増殖できる系が望まれている。本研究班では、B型肝炎ウイルス(HBV)根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等

を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することが重要である。すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1) 最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2) 新規培養システムの構築(3次元培養)、(3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、トランスポーター、免疫反応)、(4) HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)により、できるだけ早期にHBV持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B型肝炎創薬実用化研究の推進を目指す。また、(5) 生体多光子励起イメージングを駆使して、in vitro/in vivoにおけるHBVウイルス動態を可視化し、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながる事が強く期待される。

B. 研究方法

(田中) a) 組換えDNA実験に関する大臣申請用の書類を作成・分担者へ配布。b) 1.2倍長のHBV plasmid (HBV genotype A~C)及び肝細胞株を各分担施設に分配 (MTA提携)。c) 大量調製したHBV感染感受性キメラマウス由来の初代肝細胞やNTCP発現HepG2細胞を用いたHBV持続感染培養系を構築し、HBV感染防御試験や薬剤感受性試験を実施。他班(満屋班、小嶋班)との共同研究を展開し、新規薬剤の探索、評価、前臨床試験を実施。複数の候補化合物の抗HBV活性を確認(投稿中)。d) 富山化学の化合物ライブラリー約6,400化合物について、HepG2-NTCP細胞を用いて抗HBV活性の評価を実施し、ヒット化合物を複数取得した(検証中)。

最適なヒト肝細胞の選択

(水口)ヒト人工多能性幹細胞 iPS 細胞由来肝細胞

(iPS-Hepa)へ分化誘導し、HBV 感染実験を実施。(石田)特異抗体によりマウス細胞を除去したPXB-cellsと通常のPXB-cellsに対してHBVを感染させ、その感染効率と感染拡大について比較。(調)九州大学の倫理委員会で承認され、同意書を得た日本人生体肝移植ドナーよりコラゲナーゼ灌流法で肝細胞を採取。uPA/SCID マウスに移植し、キメラマウスを作成、HBV 感染実験を実施。

新規培養システム(3次元培養)の構築

(棟方)保存性の高いHBV プレゲノム RNA の3領域を標的とした siRNA を設計し、HBV 持続感染培養系及びヒト肝細胞キメラマウスを用いて pH 応答性 MEND/siRNAmix の HBV 増殖と抗原量抑制効果を評価。Illumina (Genome analyzer GAIIX)を用いた RNA-Seq により、HBV に感染したヒト肝臓キメラマウスの肝臓において発現変動した遺伝子を探索。(松永)B型肝炎ウイルス (HBV) 感染モデル構築のため、ヒト肝細胞に代わる材料としてヒト iPS 細胞に注目し、肝細胞への分化誘導法の検討を行った。また、感染効率を向上させる目的でナトリウムタウロコール酸共輸送ポリペプチド(NTCP)過剰発現の影響について検討。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

(落谷)HBV 感染モデル細胞を対象にマイクロレイおよび miRNA ライブラリーを用いた解析: HepG2-NTCP 細胞株に対して、HBV 感染後にヒト miRNA 約 2,000 種類の mimic ライブラリーを導入し抗 HBV 活性を検討した。(中西)上記と同様のサンプルより脂質を抽出し、脂質解析はトリプル四重極型質量分析計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。(深

澤)NTCP 発現 HepG2 細胞を用いた HBV 感染培養系を導入・改良し、HBV 感染に伴う脂質(代謝)変動、および HBV 産生に対する宿主脂質関連化合物等の影響について解析。(石川)ヒト肝細胞キメラマウス血清由来 HBV 及び酵母由来 HBs 粒子(BNC)を蛍光ラベルによって可視化し、ヒト不死化肝細胞株(HuS-E/2 細胞)、ヒト肝癌細胞株など、種々の細胞株での細胞内侵入効率について検討。(石井)HBV 粒子(ZZ-BNC- α ASGPR)を赤色蛍光色素(PKH26GL)で標識し、LysM-EGFP マウスに静脈内投与する。24 時間後、すでに確立した in vivo イメージング技術を用いて、生体肝組織内を観察し、HBV 粒子と免疫細胞の相互作用を検討する。(高岡)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各種解析を進めた。(近藤)HBV ジェノタイプ A、B、C 発現プラスミドとベクタープラスミドを Huh7 及び HepG2 細胞にトランスフェクトし mRNA を抽出しリアルタイム PCR array にて網羅的にケモカイン関連遺伝子発現を解析した。

HBV 感染感受性環境の構築

(渡士)HBV 感染許容性細胞株 HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて新たな HBV 感染阻害化合物のスクリーニングを継続。得られた化合物の作用機序解明。

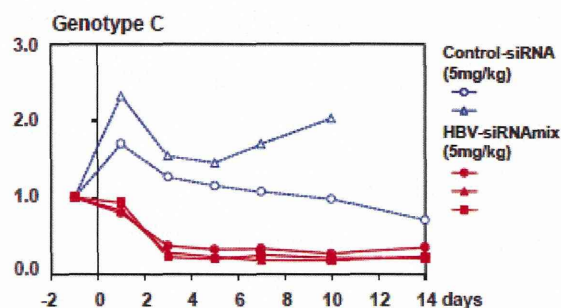
(土方)培養条件が安価、簡便であり、安定しているヒト不死化肝細胞、HuS-E/2 細胞を主に用いて、HBV の感染増殖を高効率で再現することが可能な非癌培養細胞システムの構築を進めた。(池田)FOXA1、FOXA2 および FOXA3 の HBV 増殖に対する影響を検討するために、Tet-On システムによる強制発現系と siRNA による遺伝子発現抑制系を開発した。(坂本)1.2 倍長 HBV 発現プラス

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及び各ゲノタイプの HBX 蛋白強制発現プラスミドを構築。薬物の標的となる部位を網羅的に探索・特定する。

C. 研究結果

(田中)キメラマウス由来の肝細胞を用いた HBV 持続感染系を構築した(文献5,6)。ビームゲン(genotype C)由来のモノクローナル抗体により、genotype A や ワクチンエスケープ変異株の HBV 感染を防御可能であることを報告(文献6)。富山化学との共同研究により、96穴plateを用いたハイスループット薬剤感受性試験を開始。新規化合物の薬効評価:ヒット化合物を4個取得した。ヒット4化合物のうち3化合物はエンテカビル耐性ウイルスに対しても野生株と同程度の阻害活性を示した。microRNAライブラリー(mimic, inhibitor)を用いた抗HBV活性を有するmiRNAの同定とその作用機序を検討した。

主要な成果:①HBVの mRNA を標的にした 3 種類の siRNA により、HBV 関連蛋白及びウイルス産生の効果的抑制に成功(棟方)。



②新規 HBV 治療薬の候補となる可能性のある miRNA を複数同定。③22(S)-hydroxycholesterol、cyclosporin A(文献 1)、proanthocyanidine を HBV 感染阻害化合物として同定(渡士)。④HBV による自然免疫活性化メカニズムの解明および decoy 核酸による抗 HBV ウイルス効果を発見(文献 4)

(高岡)。⑤GPGPU 型スーパーコンピューターによるインシリコ理論計算創薬の基盤整備、SphK1 を標的としたインシリコスクリーニングによる 1,000 化合物の抽出、SphK1 酵素活性測定システムの構築(濱田)。候補化合物の合成展開、薬効評価を開始。⑥HBV 感染阻害が見られる多価不飽和脂肪酸(DHA)により増加が抑制される脂質分子(PIP2)を同定(中西、深澤)。

最適なヒト肝細胞の選択

(水口)iPS-Hepa では HepG2-NTCP 細胞(NTCP を安定発現する HepG2 細胞)と同様に、培養上清中において HBV ゲノムが検出され、増加傾向が見られた。iPS-Hepa は HepG2-NTCP 細胞と比較して同程度またはそれ以上の HBV-RNA、HBsAg、HBcrAg が検出され、HBV 感染が証明された。(石田)マウス細胞の有無により HBV 感染細胞の分布パターンは変化するが、感染効率と感染拡大には影響しない事が明らかになった。また、ハイスループットスクリーニングへの応用を目指して、96/384 ウェルプレートでの HBV 感染実験を行った。ウェルあたりの細胞数をスケールダウンしても HBV 感染成立。(調)十分な細胞数と生着率の得られた 27 歳ドナーからの肝細胞を用いて、高置換ヒト肝細胞キメラマウスを作成に成功。HBV 持続感染も証明された。

新規培養システム(3次元培養)の構築

(棟方)HBV 感染した肝細胞で起きる免疫寛容に関与する因子を探索した結果、HBV 感染依存に IL-7 の発現量が低下することを見出した。MEND/siRNA で HBV を抑制すると IL-7 の発現が回復したこと、また IL-7 投与により HBV 感染動物モデルで免疫細胞が再活性化された。(松永)ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化において、バルプロ酸を添加することにより分化効率及び成熟化が促進

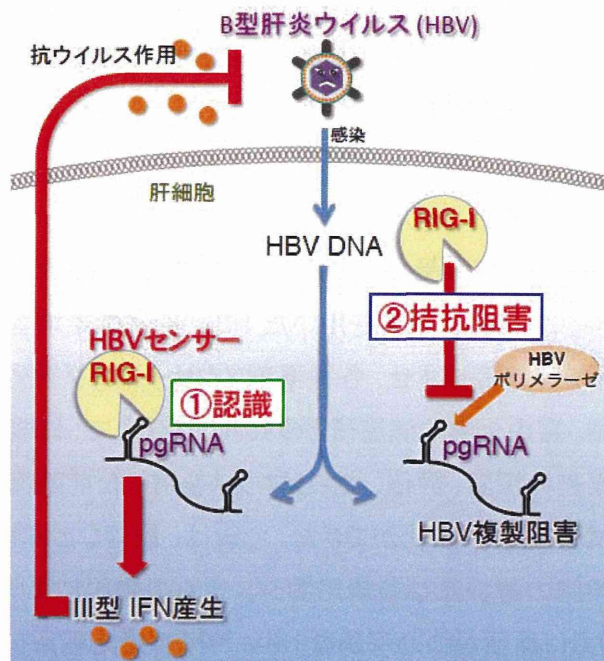
することが明らかとなった。これは、バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害作用によるものであることが示唆された。ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞に HBV の感染が確認されたが、NTCP を過剰発現させることにより感染効率が向上した。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

(落谷)miR-221/222 の mimic 処理により、細胞内の HBV DNA コピー数の低下が認められた。一方、miRNA mimic ライブラリーを用いた検討では、33 種類の miRNA mimic で、培養上清中 HBV DNA コピー数の低下が認められた。(中西)HBV 持続感染時にリゾリン脂質(LysoPC、LysoPE)やイノシールリン脂質群(PIPs)が増加することを見出した。しかしながら、HBV 産生を阻害することが分かった高度不飽和脂肪酸(特に DHA)添加により増加の抑制が確認されたのは PIP2 のみであった。

(深澤)HBV 感染により、1)コレステリルエステルの上昇、2)トリグリセリドの上昇、3)セラミド生成の上昇、4)スフィンゴミエリン・グルコシルセラミド生成の低下、5)ホスファチジルエタノールアミンからホスファチジルコリンへの変換低下等が見出された。これまでに見出した高度不飽和脂肪酸、特に DHA が HBV 産生を有意に抑制することも再現。(石川)ラベル化 HBV 及び BNC は同程度に効率よく HuS-E/2 細胞に取込まれたが、HBV レセプターとされる NTCP を発現した HepG2-hNTCP での取込み効率は比較的低かった。種々の細胞株において、BNC の取込み効率と、NTCP 及び HBV の細胞接着に関与するとされるアジア糖蛋白レセプター(ASGPR)の発現との関連を検討したが、BNC 取込み効率と両分子の発現の程度との間には関連は認めなかった。(石井)HBV と免疫細胞の相互作用の可視化: 蛍光標識 HBV 粒子を投与した LysM-EGFP マウスの生体肝組織内を二光子

励起顕微鏡で観察した結果、LysM 陽性細胞が蛍光標識 HBV 粒子を取り込んだ肝細胞と相互作用する様子を可視化し解析することに成功した。(高岡)①HBV は RIG-I を介して III 型 IFNs を誘導。②HBV 由来の RNA、特に pre-genomic RNA (pgRNA)が RIG-I のリガンドであった。③RIG-I は、 ϵ RNA を認識し下流の IRF-3 のリン酸化を引き起こし、自然免疫応答を活性化するのみならず、Pタンパク質を阻害した。④ ϵ RNA-MEND を作成し、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた in vivo 感染実験を実施した結果、抗 HBV 効果が得られた(文献 4)。



(近藤)HBV ジェノタイプにより発現が異なるものに CX3CL1 を見出した。このケモカインは CX3CR1 陽性の NK 細胞と CTL の遊走を起こさせるが、CX3CR1 陽性 NK 細胞の活性化は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌と病態が進展するにつれて抑制されることを見出した。

HBV 感染感受性環境の構築

(渡士)スクリーニングの結果、proanthocyanidin (PAC)が用量依存的に HBV 感染を阻害すること

が明らかとなった。PAC は HBV 複製にはほとんど影響することなく、HBV の宿主細胞への吸着を有意に低下させた。PAC は宿主細胞ではなく、むしろ HBV 粒子(preS1 領域)を標的として、HBV の細胞への感染を阻害することが示唆された。(土方)①HuS-E/2 細胞に 1.24 倍長の HBV ゲノムを含むプラスミドを導入し、メビオールゲルを用いて立体培養すると、HBV ゲノム複製依存的にゲル上に重層した培養液中に HBV DNA が検出された。②HuS-E/2 細胞に tGFP を融合させた HBV 受容体分子 NTCP を発現させた培養細胞を樹立。③HepG2.2.15.7 細胞を用いた薬剤のスクリーニングを行った結果、細胞毒性を示さずに HBV 感染性粒子産生を阻害する数種類の薬剤を見出した。(池田)FOXA の過剰発現により HBV 複製が抑制されることを明らかにした。FOXA1、FOXA2 は HNF4 α など、HBV 複製に関与する肝臓特異的転写因子群の発現を変動させたことから、これらの因子を介して間接的に HBV 複製に寄与する可能性が明らかとなった。(坂本)HBX 蛋白を選択的に欠損したところ、HBX 野生株に比べ増殖能が著明に低下。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。

D. 考察

今年度までに、HBV 感染感受性キメラマウス由来肝細胞や HepG2-NTCP 細胞を用いた HBV 持続感染培養系をほぼ完成させ、各種薬剤スクリーニングを開始した。今後の展開としては、①富山化学の化合物ライブラリーから抗 HBV 活性を有する化合物を複数得ており、再現性の確認と作用機序を解明する。②満屋班との共同研究により有望な化合物を得て論文化した。引き続き、新規

薬剤の探索、評価、キメラマウスを用いた前臨床試験を進める。③最適なヒト肝細胞の選択(ヒト初代肝細胞、iPS 細胞由来肝細胞、NTCP 発現細胞)及び新規培養システム(3次元培養)の構築により、さらに簡便かつ効率的な HBV 持続感染培養系の開発を継続する。④ハイスループットスクリーニング系の最適化。

ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子を解明するために、①HBV が感染可能な細胞株 HepG2-NTCP を用いた miRNA ライブラリーによるスクリーニング系を確立し、HBV 複製を制御する複数の miRNA を同定した。②細胞増殖、分化、運動、老化、死といった幅広い生命現象に關与する PIP2 が HBV 複製に寄与することがわかり、革新的な医薬の有望な作用点として期待できる。③HBV 感染を制御するスフィンゴ脂質経路(合成酵素)を標的として、インシリコスクリーニングにより上位 1,000 化合物を抽出したので、今後は候補化合物の合成最適化を行い、抗 HBV 活性を検討する。④MEND/HBV-siRNA は in vivo において単回投与で効果的に HBV 蛋白質を低下させることができ、今後は免疫を再賦活化することによる HBV 排除の可能性を探る。⑤HBV 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“ ε 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する。⑥CX3CL1 は HBV 免疫病態において重要な役割を果たしている可能性が示された。⑦蛍光ラベルしたウイルス粒子や BNC を用いた実験により、NTCP、ASGPR 以外の第 3 のレセプターの存在を視野に入れた検討が必要と考えられた。⑧肝臓の二光子励起イメージング技術を確立し、HBV 粒子に対する免疫細胞の反応を可視化し解析を行うことが可能となった。今後は、HBV が感染・複製可能なヒト肝臓キメラ

マウスを用いて検討する。

HBV 感染感受性環境の構築として、①PAC は HBV 粒子上 LHBs タンパク質の preS1 領域を介した細胞への吸着を阻害。また PAC は HBV 粒子へ作用し、その感染能を低下させた。②メビオールゲルを用いた HuS-E/2 細胞の立体培養や NTCP 発現 HuS-E/2 細胞を用いた HBV 増殖抑制薬剤のスクリーニングおよび評価が可能となった。③HuH-7 を用いて FOXA3 を含む FOXA ファミリーが HBV 増殖を負に制御することを明らかにした。NTCP 発現 HepG2 細胞で HBV の増殖を負に制御する FOXA をノックダウンすることで、より HBV の感染・増殖に適した細胞株を樹立できる。④HBX 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。

E. 結論

HBV 感染感受性キメラマウス由来肝細胞や HepG2-NTCP 細胞を用いた HBV 持続感染培養系をほぼ完成させ、各種薬剤スクリーニングを開始。富山化学や満屋班との共同研究として、新規薬剤の探索、評価、キメラマウスを用いた前臨床試験を進めることができた。今後は、最適なヒト肝細胞の選択及び新規培養システムの構築により、さらに簡便かつ効率的な HBV 持続感染培養系を開発し、ハイスループットスクリーニング系の確立を目指す。

今年度の主な成果として、①HBV の mRNA を標的にした siRNA により、HBV 関連蛋白及びウイルス産生の効果的抑制に成功した。②新規 HBV 治療薬の候補となる可能性のある miRNA を複数同定。③22(S)-hydroxycholesterol、cyclosporin A、proanthocyanidine を HBV 感染阻害化合物として同定。④RIG-I が pgRNA の ε を認識し、自然免疫

応答を惹起。さらに RIG-I の新しい機能として HBV P protein の ϵ 構造への結合を阻害した。

⑤GPGPU 型スーパーコンピュータによるインシリコ理論計算創薬の基盤整備、SphK1 を標的としたインシリコスクリーニングによる 1,000 化合物の抽出、SphK1 酵素活性測定システムの構築。候補化合物の合成展開、薬効評価を開始した。

⑥ HBV 感染阻害が見られる多価不飽和脂肪酸 (DHA) により増加が抑制される脂質分子 (PIP2) を同定した。

⑦蛍光標識した HBV、BNC、及び HuS-E/2 などのヒト肝細胞の性質が保存された細胞株を用いることにより、HBV の細胞内侵入機構の解析が可能。さらに、2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内の免疫細胞の動態、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。今後、HBV 特異的免疫応答の制御メカニズムの解明において強力なツールになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, **Tanaka Y**, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology*. 2014;59(5):1726-1737.
2. Wong DK, Kopaniszen M, Omagari K, **Tanaka Y**, Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF. Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response. *J Infect Dis*. 2014;210(5):701-707.
3. Isogawa M, **Tanaka Y**. Immunobiology of hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 2015;45(2):179-189.
4. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, **Tanaka Y**, Takaoka A. The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity*. 2015;42(1):123-132.
5. Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, **Tanaka Y**. Postexposure Prophylactic Effect of Hepatitis B Virus (HBV)-Active Antiretroviral Therapy against HBV Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):1292-1298.
6. Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, **Tanaka Y**. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118062.
7. Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of Retinoic Acid Receptor

- Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. *J Biol Chem.* 2015;290(9):5673-5684.
8. Matsumoto A, Yatsunami H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E. Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleoside/nucleotide analog treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 2015 in press.
 9. Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S. Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy. *Int J Hematol.* 2015;101(4):398-404.
 10. Ifuku H, Kusumoto S, Tanaka Y, Totani H, Ishida T, Okada M, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Iida S. Fatal reactivation of hepatitis B virus infection in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res.* 2015 in press.
- ## 2. 学会発表
1. Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon AT, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and its application to drug development. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
 2. Takaoka A, Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Rice C, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y. Host sensing mechanism for the activation of antiviral innate responses to HBV infection. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
 3. Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y, Chisari F. Endogenous antigen presentation by hepatocytes plays an essential role in the induction of HBV-specific CD8⁺ T cell responses. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
 4. Hayashi S, Khan A, Simons B, Jones C, Homan C, McMahon B, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Carcinogenic potential of hepatitis B virus genotype F is associated with accumulation of novel core mutations. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
 5. Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S,

- Iijima S, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, **Tanaka Y**. Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
6. Sugiyama M, **Tanaka Y**, Nakanishi M, Mizokami M. Association of sphingolipid biosynthesis pathway as a novel therapeutic target for HBV replication. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6,2014. Los Angeles.
7. Inoue T, Shinkai N, Ohne K, Murakami S, Tsutsumi S, Tajiri K, Kishi H, Ogawa S, Isogawa M, Watanabe T, **Tanaka Y**. The Neutralizing Activity of Monoclonal HBs Antibodies Separated from Hepatitis B Vaccinated Recipients and the Influence of the titers by Different Measurement Methods. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11,2014. Boston.
8. Inoue T, Ohne K, Ochi N, Shinkai N, Murakami S, Iijima S, Ogawa S, Watanabe T, **Tanaka Y**. A Newly Developed High-Sensitive HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay is a Precise Application as a pre-Transfusion Screening Test to Detect Occult HBV. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11,2014. Boston.
9. Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Shinkai N, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Murakami S, Omagari K, Isogawa M, Sugiura W, **Tanaka Y**. Pre- and Post-Exposure Prophylaxis against Hepatitis B Virus Infection by HBV-active Antiretroviral Therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11,2014. Boston.
10. Shinkai N, Iio E, Watanabe T, Matsuura K, Fujiwara K, Nojiri S, **Tanaka Y**. High alpha-fetoprotein is risk factor of hepatocellular carcinoma in hepatitis B patients with good efficacy of nucleoside analogues therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11,2014. Boston.
11. Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, **Tanaka Y**. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21,2014. Hiroshima.
12. Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, **Tanaka Y**, Chisari FV. Cross-Presentation by Bone Marrow Derived Cells is Required, but not Sufficient, for the Induction of HBV-specific CD8+ T Cell Responses. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21,2014. Hiroshima.

13. Matsui T, Kang JH, Tanaka K, Nagai K, Tomonari A, Maguchi H, **Tanaka Y**. Quantified HBV ccc DNA in liver predicts changes in HBV markers during pegylated interferon α 2a treatment for chronic hepatitis B. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21,2014. Hiroshima.
14. Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, **Tanaka Y**. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21,2014. Hiroshima.
15. 松居剛志, 姜貞憲, **田中靖人**. B型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法の治療効果に関連する遺伝要因. 第100回日本消化器病学会総会. 平成26年4月23日~26日. 東京.
16. **田中靖人**. <B型肝炎治療ガイドライン> HBV マーカー. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
17. 新海登, 松浦健太郎, **田中靖人**. B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ著効例における肝発癌リスクの検討. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
18. 杉山真也, **田中靖人**, 溝上雅史. 宿主因子を標的とした新規抗B型肝炎ウイルス製剤の開発と作用機序の解析. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
19. 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, **田中靖人**. 大量調整可能なヒト肝細胞を用いたHBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
20. 五十川正記, 村田泰洋, **田中靖人**. HBV 特異的エフェクターCD8+T細胞応答誘導における樹状細胞の役割. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
21. **田中靖人**, 渡邊綱正, 五十川正記. 肝炎ウイルス感染と生体応答~C型肝炎の克服とB型肝炎の再興. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 平成26年6月19日~20日. 札幌.
22. **田中靖人**. わが国におけるB型肝炎再活性化の現状との方策. 第21回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム. 平成26年10月18日. 松山.
23. 新海登, 飯尾悦子, **田中靖人**. HBe抗原陰性キャリアにおける肝発癌リスクの検討. 第18回日本肝臓学会大会. 平成26年10月23日~24日. 神戸.
24. 松居剛志, 姜貞憲, 永井一正, 辻邦彦, 真口宏介, 新海登, 藤原圭, 野尻俊輔, **田中靖人**. B型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法の治療終了時HBV DNA量と治療早期IP10との関連性. 第18回日本肝臓学会大会. 平成26年10月23日~24日. 神戸.
25. 林佐奈衣, 五十川正記, 村上周子, 飯島沙幸, 堤進, 尾曲克己, 渡邊綱正, **田中靖人**. B型肝炎ウイルス Genotype Fにおける肝細胞癌関連因子の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日~12日. 横浜.
26. 五十川正記, 村田泰洋, **田中靖人**. HBV 特異的CD8+T細胞の増殖と細胞傷害能は肝細胞による内因性抗原提示に依存する. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日~12日. 横浜.
27. 松波加代子, 新海登, **田中靖人**. 当院におけるB型慢性肝炎に対する治療戦略~テノホビル(TDF)の有用性. 第40回日本肝臓学会東部会. 平成26年11月27日~28日. 東京.

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

HBV感染(培養)評価系～薬剤スクリーニング

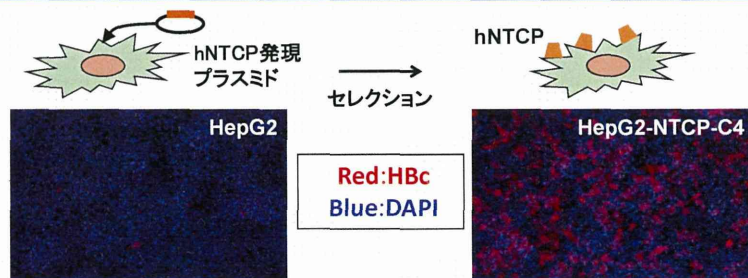
1. HepG2-NTCP-C4細胞(DMSO処理)

- ① HBV持続感染実験から薬剤スクリーニング系の構築
- ② エントリー阻害剤の導出
- ③ miRNAライブラリースクリーニング系の構築
- ④ 脂質代謝とHBV感染 ⑤ 製薬企業との連携・共同研究

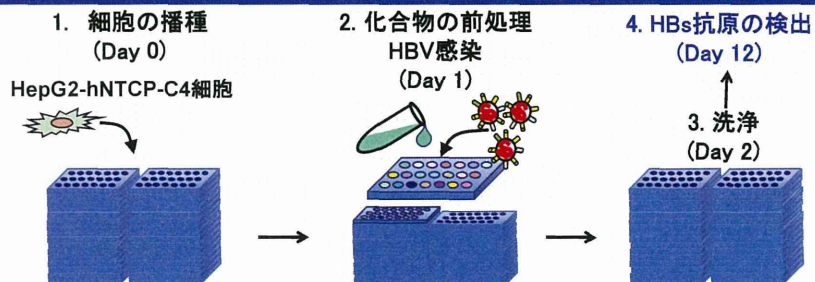
2. キメラマウス肝細胞を用いたHBV持続感染モデル

- ① 核酸アナログの有効性（感染拡大防止）
- ② siRNAによる阻害～MENDを用いたin vivo試験

HBV感染許容性細胞株の樹立

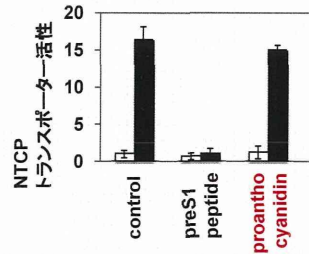


HepG2-hNTCP細胞を用いたHBV阻害剤のスクリーニング

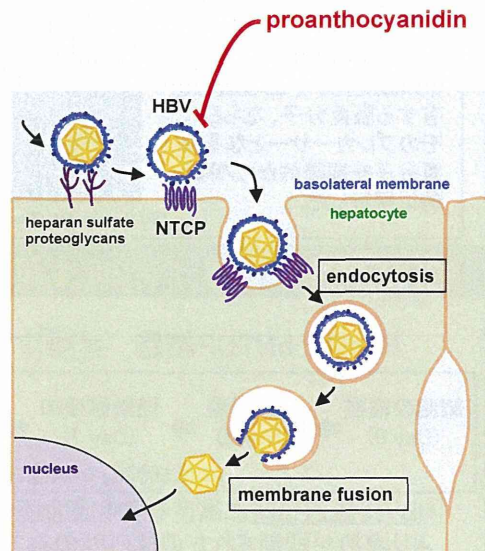
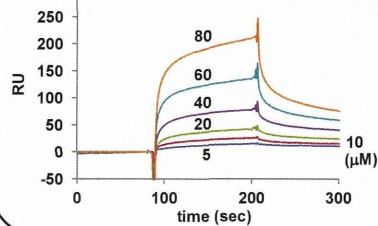


Proanthocyanidin: largeS抗原を標的とし、HBV侵入を阻害する
(プロアンソサイアニジン)

proanthocyanidinはNTCPに作用しない



proanthocyanidinとpreS1領域の結合



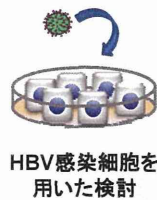
miRNAを標的としたHBVの持続感染を阻害する創薬候補スクリーニングの戦略

HBV感染 2日目、5日目で発現が変化するmiRNA

miRNA library(約2000)によるスクリーニング系を用いた解析

各miRNAに特異的なMimicおよびLNAの作製

In vitro、In vivoモデルを用いた検証実験



HBVの持続感染を阻害するmiRNA創薬の候補となる標的の同定

リポミクスによる網羅的解析

キメラマウス由来ヒト肝細胞

HepG2-hNTCP細胞 (中西)

↓ HBV感染

↓ HBV感染

二台の高感度質量分析装置(MS)を用い、生理活性を有する脂質分子、ならびにそのプレカーサーとなる脂質分子を網羅的かつ特異的に解析した。



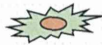
TSQ Vantage AM (Thermo Fisher Scientific)



LCMS8040 (SHIMADZU)

抗HBV戦略として、PIP2産生抑制・PI代謝系の酵素を阻害する

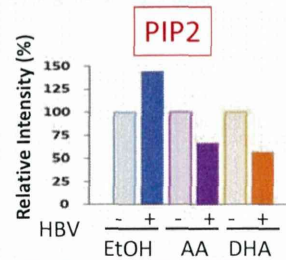
HepG2-hNTCP細胞



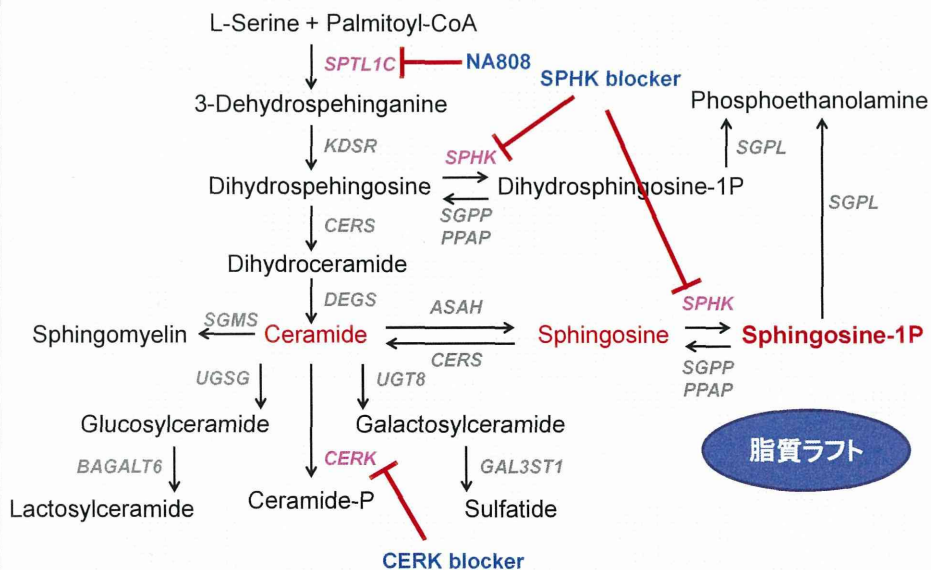
(深澤・中西)

細胞の播種 (Day 0) → HBV感染 (Day 2) → 脂肪酸添加 (Day 7) → 細胞回収
リポミクス
AAは6時間、DHAは24時間

HBV持続感染時に高度不飽和脂肪酸の添加により増加が抑制されたのはPIP2のみであった。



スフィンゴ脂質合成酵素の阻害による抗HBV効果

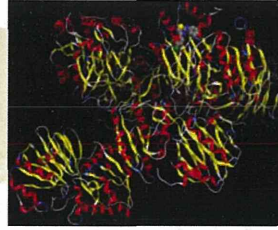


創薬に特化したスーパーコンピューターによる インシリコスクリーニング(長崎大学・創薬基盤ネットワーク)

スフィンゴ脂質合成経路

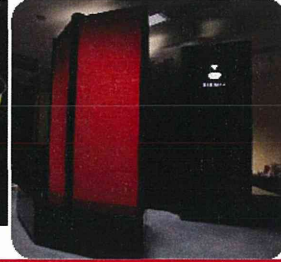


Target: SphK1/Inhibitor

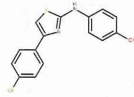


(濱田)

DEGIMA-2



S1PはHBVの複製を亢進



SphK1 inhibitor

IC₅₀算出



最適化合物(メディシナルケミストリー)

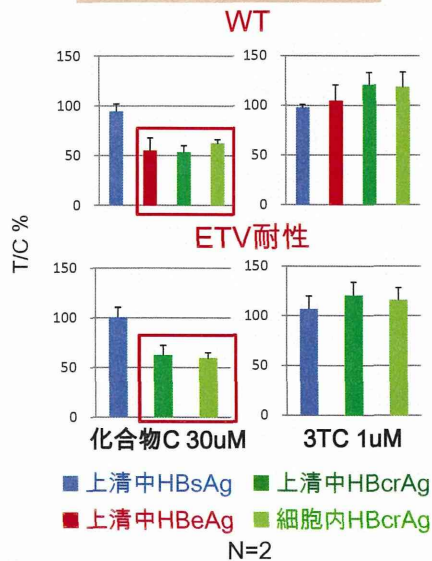


抗HBV活性

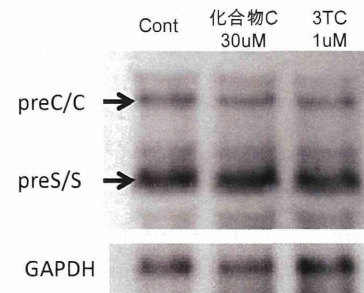
- ・培養系
- ・キメラマウス

化合物Cの作用機序解析

Huh7 HBV各種抗原量測定



Huh7 HBV-RNA ノーザンブロット

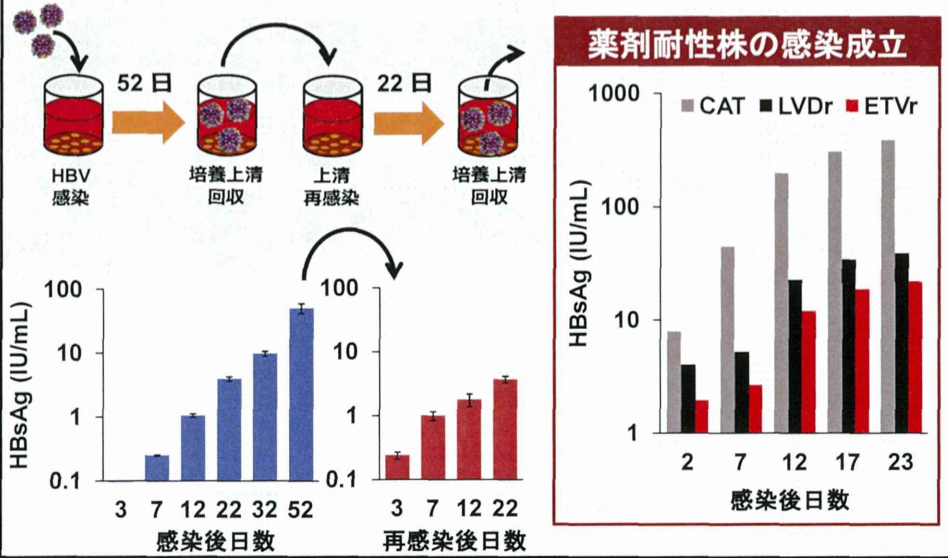


化合物Cは
 ✓e抗原、コア関連抗原の低下
 作用を示した
 ✓RNA量への影響はなかった

TOYAMA CHEMICAL CO., LTD.
FUJIFILM FUJIFILM Group

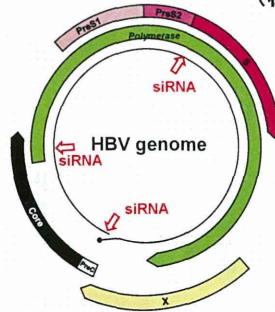
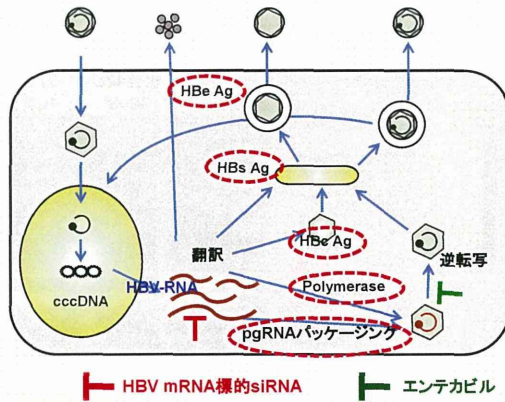
HBV 感染 PHH 細胞が産生するウイルス粒子は感染能をもつ

HBV(耐性株含む)長期感染状態における薬剤感受性試験



HBV持続感染培養系を用いたHBV-mRNA標的siRNAのウイルス抗原抑制効果の評価

(棟方)



目的: HBV抗原を抑制することで免疫を賦活する。
→ HBV mRNAsを標的とすることでHBV-DNAと共に抗原も低下させる。

