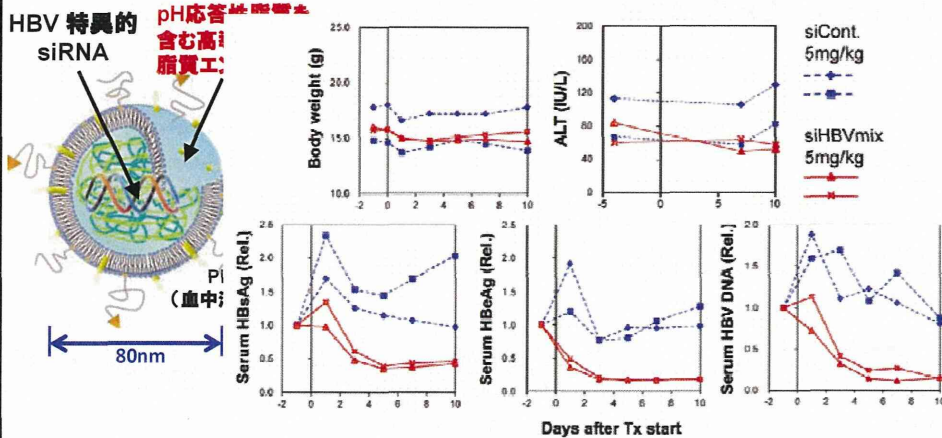


**MEND/siRNAmixはHBV持続感染キメラマウス  
血中ウイルス抗原量とDNA量を低下させる**

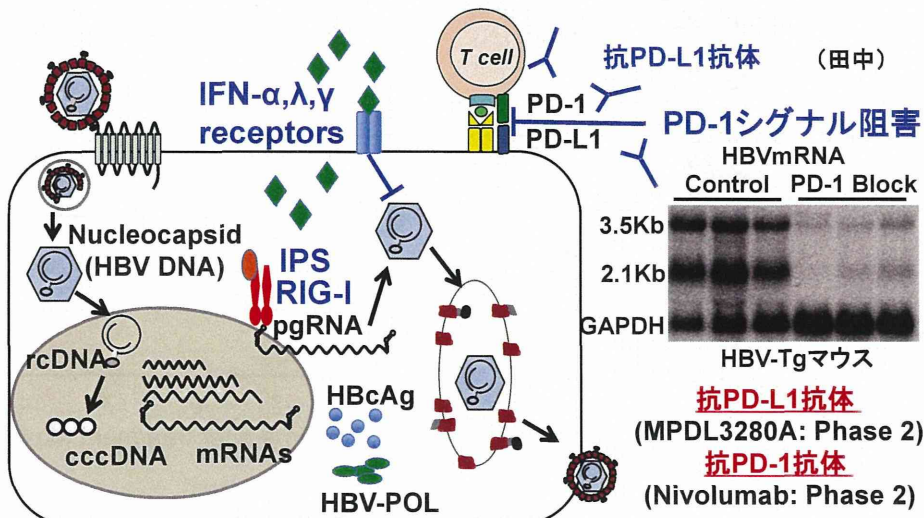
多機能性エンベロープ型ナノ構造体  
Multifunctional envelope-type  
nano device (MEND)

効率の良いDDSの無いことが  
siRNAの臨床応用を阻んでいた



**創薬にむけた宿主免疫応答の理解と応用**

- HBV感染に対する自然免疫応答誘導機序の解明
- PD-1シグナル阻害による免疫寛容の克服



Immunity 1月号に掲載 **RIG-I Dual Function**

**The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus**

Seiichi Sato,<sup>1,2,10</sup> Kai Li,<sup>1,2,10</sup> Takeshi Kameyama,<sup>1,2,10</sup> Takaya Hayashi,<sup>3,10</sup> Yuji Ishida,<sup>4</sup> Shuko Murakami,<sup>5</sup> Tsunamasa Watanabe,<sup>6</sup> Sayuki Iijima,<sup>6</sup> Yu Sakurai,<sup>6</sup> Koichi Watashi,<sup>7</sup> Susumu Tsutsumi,<sup>8</sup> Yusuke Sato,<sup>6</sup> Hidetaka Akita,<sup>6</sup> Takaji Wakita,<sup>7</sup> Charles M. Rice,<sup>9</sup> Hideyoshi Harashima,<sup>9</sup> Michinori Kohara,<sup>9</sup> Yasuhito Tanaka,<sup>9</sup> and Akinori Takaoka<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Signaling in Cancer and Immunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0815, Japan  
<sup>2</sup>Molecular Medical Biochemistry Unit, Biological Chemistry and Engineering Course, Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0815, Japan  
<sup>3</sup>Research Center for Infection-Associated Cancer, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0815, Japan  
<sup>4</sup>PhoenixBio Co., Ltd., Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan  
<sup>5</sup>Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Aichi 467-8601, Japan  
<sup>6</sup>Laboratory of Innovative Nanomedicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan  
<sup>7</sup>Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan  
<sup>8</sup>Laboratory of Virology and Infectious Disease, The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA  
<sup>9</sup>Department of Microbiology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan  
<sup>10</sup>Co-first author

\*Correspondence: takaoka@igm.hokudai.ac.jp  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.016>

免疫応答

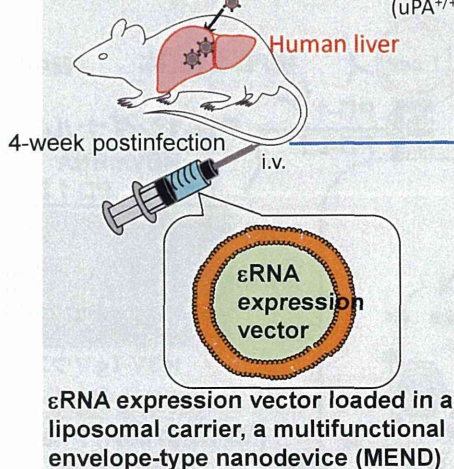
(Sato et al., Immunity 2015)

**補足図: B型肝炎ウイルス (HBV) に対する自然免疫感染防御での RIG-I の 2 つの役割**

① RIG-I が、ヒト肝細胞において HBV のセンサー分子として、ウイルス複製途中に出現する特定のウイルス RNA (pgRNA) を認識し III 型インターフェロン発現誘導を通して抗ウイルス作用を発揮。② RIG-I がウイルスの複製に関わる HBV ポリメラーゼが pgRNA に結合するのを競合的に阻害する、直接的な抗ウイルス作用

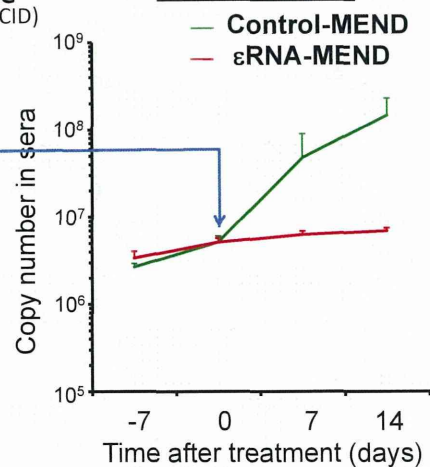
**The εRNA restricts HBV replication in human hepatocyte-chimeric mice**

HBV(C) infection model of human hepatocyte-chimeric mice (uPA<sup>+/+</sup>/SCID)

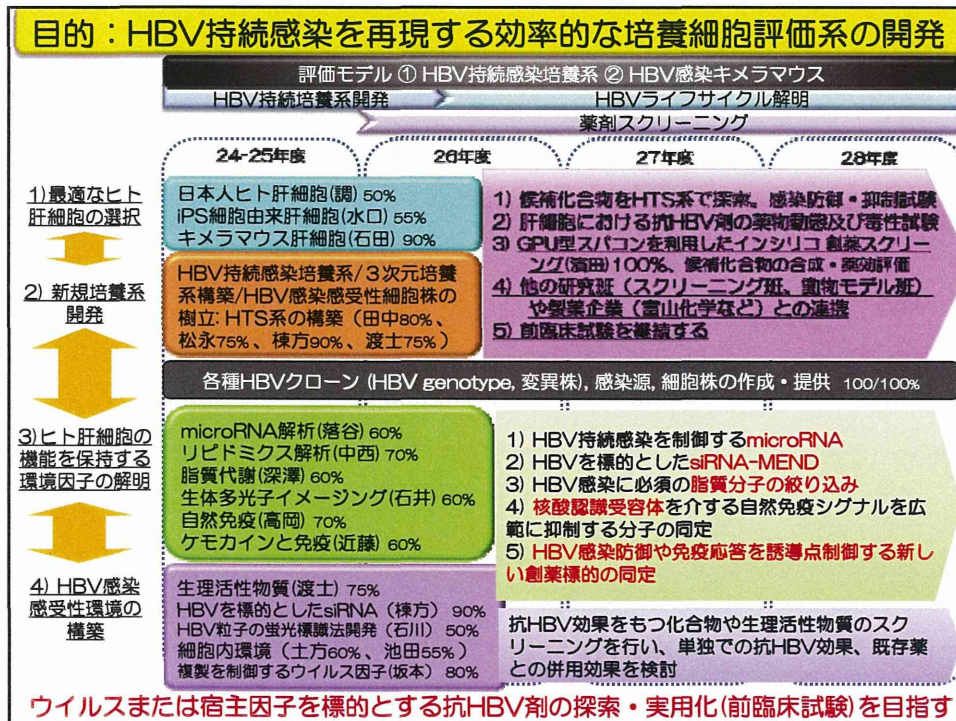
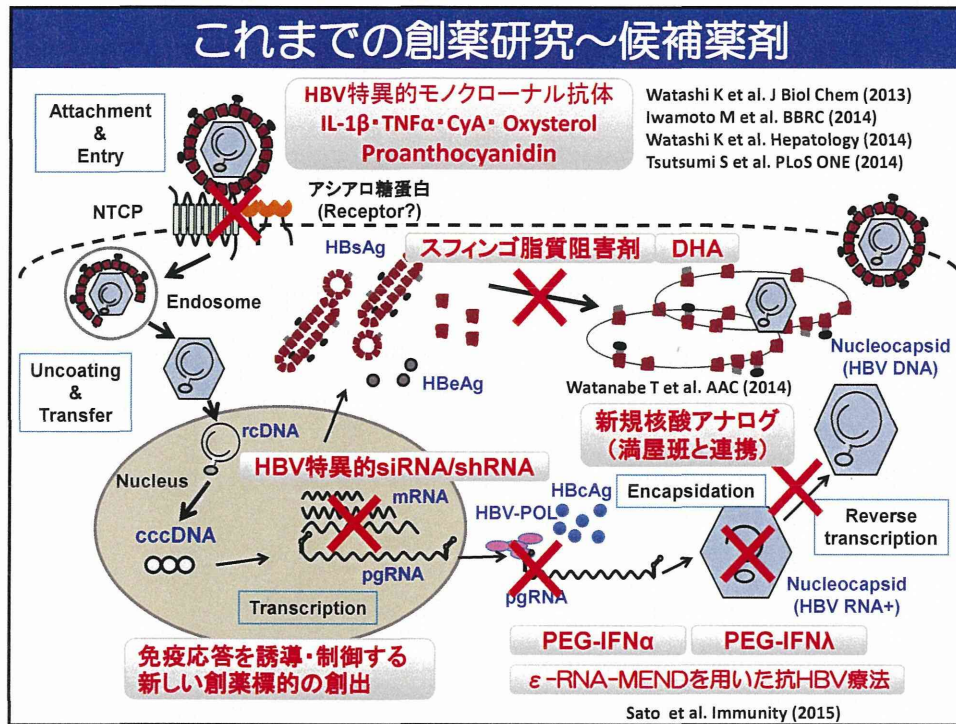


(Chimeric mice)

Q-PCR analysis



Collaboration with Dr. Y. Tanaka (Nagoya City Univ.), Dr. H. Harashima (Hokkaido Univ.) and Dr. Y. Ishida (PhoenixBio Co., Ltd.)



## II. 分担研究報告書

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)  
分担研究報告書(平成26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

分担研究者：調 憲 九州大学 消化器・総合外科 准教授

分担研究課題：日本人由来肝細胞の継代と HBV 持続感染モデルの確立

研究要旨：われわれの目標は PXB マウスを用いて日本人由来の正常肝細胞株を樹立し、B 型肝炎感染モデルを確立することである。現在までに生体肝移植ドナーの移植に使用しなかった肝臓を用いて3回のハーベストを行った。PXB マウス：免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID) にヒトの肝細胞を移植し、マウス肝臓の70%~90%以上が正常ヒト肝細胞に置き換えられたキメラマウスである。7歳男性よりヒト肝細胞を採取、肝細胞分離し、PXB マウスに日本人肝細胞を播種し、生着が確認できた。採取した肝細胞を uPA/SCID マウスへ移植し、5匹中1匹に良好な生着を認め、約100倍に増殖した肝細胞を回収した。キメラマウス由来肝細胞においては、HepG2 に比べて NTCP・CYP 遺伝子の発現が高く、肝細胞マーカーおよび脂質代謝系遺伝子の発現が低値であった。ヒト肝細胞に置換したキメラマウスにおいて、血清中 HBs 抗原、HBV DNA の上昇を認め、持続的な HBV 感染の成立を確認し得た。

#### A. 研究目的

生体肝移植ドナーの協力を得て、ドナーの P BMC をキメラマウスにうった上で B 型肝炎ウイルスを感染させ、肝炎の発生状況を検討し、生体への感染、肝炎の成立の機序を明らかにし、感染防止に関する創薬に向けて情報を提供する。とくに感染防御系が成立している HBc 抗体陽性の既往感染症例がドナーの場合を検討することを目指す。

#### B. 研究方法

生体肝移植ドナーの移植に使用されない肝組織からコラゲナーゼ還流法を用い、肝細胞を分離し、PXB マウス：免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID) にヒトの肝細胞を移植する。ヒト肝細胞に置換されるのを待って、肝細胞をハーベストし、さらに同系マウスに継代する。このマウスに HBV を投与し、末梢血中の HBV を検査することで日本人の肝細胞を用いた B 型肝炎の感染系の成立を確認する。

#### C. 研究結果

3 回のドナーからの肝細胞ハーベスト実験を行った。当初2回は十分な viability を有した肝細胞を提供できなかったため、コラゲナーゼ還流スピードの設定、温度管理などに工夫を加え、10月8日に27歳男性より採取、肝細胞分離しフェニックスバイオ社に viability 約 60%、フラスコ1枚あたり生細胞数  $1.6 \times 10^7$  cells/20 mL を播種し、送付することができた。

採取した肝細胞を uPA/SCID マウスへ移植し、5匹中1匹に良好な生着を認め、約100倍に増殖した肝細胞を回収した。キメラマウス由来肝細胞においては、HepG2 に比べて NTCP・CYP 遺伝子の発現が高く、肝細胞マーカーおよび脂質代謝系遺伝子の発現が低値であった。ヒト肝細胞に置換したキメラマウスにおいて、血清中 HBs 抗原、HBV DNA の上昇を認め、持続的な HBV 感染を成立を確認し得た。

## D. 考察

コラゲナーゼ還流スピードの設定、温度管理などに工夫を加えることで、安定した肝細胞の採取が可能となった。今後は、日本人由来の正常肝細胞を確立し、安定した供給状況となった上で、細胞の characterization を行う。

さらに日本人由来の正常肝細胞を用いた B 型肝炎感染モデルを確立する。ついで、ドナーの協力を得て、ドナーの P BMC をキメラマウスにうった上で B 型肝炎ウイルスを感染させ、肝炎の発生状況を検討し、生体への感染、肝炎の成立の機序を明らかにし、感染防止に関する創薬に向けて情報を提供する。

## E. 結論

日本人由来の肝細胞を用いた HBV 感染モデルは確立可能であった。今後さらに安定したモデルが提供できるよう、若年者の正常肝細胞を用いた肝細胞培養系を確立する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Bae SK, Shimoda S, Ikegami T, Yoshizumi T, Harimoto N, Itoh S, Soejima Y, Uchiyama H, Shirabe K, Maehara Y. Risk factors for hepatitis B virus recurrence after living donor liver transplantation: A 17-year experience at a single center. *Hepatol Res.* 2015 Jan 15. doi: 10.1111/hepr.12489. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

なし

## 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

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

分担研究者：水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科 教授

分担研究課題：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

研究要旨：現在、新規抗 B 型肝炎治療薬の開発に向けた最重要課題は、B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus; HBV) の生活環を再現可能で、簡便な in vitro 培養細胞系の開発である。一方で、以前より我々は、ヒト ES/iPS 細胞から高効率に機能的な肝細胞への分化培養方法を確立してきた。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に対し HBV が感染・増殖可能か検討することとした。本研究によりヒト iPS 細胞由来肝細胞に HBV が感染・増殖可能となれば、抗 HBV 薬の評価などを通して新規抗 HBV 薬開発に大きく貢献できるとともに、HBV の感染・増殖機構の解明に向けて極めて有用な実験ツールになるものと期待される。本年度は、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞へ HBV 粒子を作用させ、その感染レベルを解析した。

研究協力者

櫻井 文教 大阪大学院薬学研究科  
准教授  
高山 和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
長基 康人 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
山本 達郎 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
岡本 小百合 大阪大学大学院薬学研究科  
実験補助員  
脇田 隆字 国立感染症研究所  
ウイルス第二部 部長  
渡士 幸一 国立感染症研究所  
ウイルス第二部 主任研究官

A. 研究目的

新規 B 型肝炎治療薬開発ならびに B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus; HBV) の感染・増殖機構の解明に向けては、ヒト初代肝細胞と同等の性質を有するとともに、HBV の感染・増殖が可能で汎用性の高い細胞の開発が急務である。一方で、ヒト iPS 細胞は種々の細胞に分化誘導可能であることから、再生医療における重要な細胞供給源であるだけでなく、ヒト iPS 細胞より分化誘導した細胞は、創薬研究や細胞の分化発生などの基礎研究においても極めて重要な実験材料となりつつある。我々は以前より、薬物の代謝毒性評価に資するヒト iPS 細胞由来肝細胞の分化培養法の確立に取り組んでおり、既に初代ヒト肝細胞に匹敵す

る薬物代謝酵素やトランスポーターを発現するヒト iPS 細胞由来肝細胞を分化誘導することに成功している。また、このヒト iPS 細胞由来肝細胞に対し C 型肝炎ウイルスのレプリコンゲノムを導入したところ、レプリコンゲノムが維持されることを明らかにしている。そこで本研究では、我々が分化誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞に HBV が感染・増殖可能か検討することとした。本研究により、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HBV が感染・増殖可能であることが明らかとなれば、初代ヒト肝細胞に代わる in vitro HBV 感染増殖系となり、抗 HBV 薬の創製や HBV の感染増殖機構の解明に向けて極めて有用な実験材料になるものと期待される。さらには様々な遺伝的バックグラウンドを持つヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HBV 感染増殖評価系が構築可能になるものと考えられる。

本年度は、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞へ HBV 粒子を作用させることにより、HBV が感染・増殖可能か検討することとした。

## B. 研究方法

### B.1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (iPS-Hepa) の分化誘導

ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から肝細胞への分化誘導は、申請者が過去に報告したアデノウイルス (Ad) ベクターを用いた FOXA2、HNF1 $\alpha$  遺伝子導入法 (Takayama K.,

Mizuguchi H., et al. J Hepatol. 2012) を改良した方法で行った。

### B.2. 細胞培養

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞および HBV の感染受容体である Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) の安定発現細胞株である HepG2-NTCP 細胞、HBV 粒子 (genotype D) を産生する HE p G2. 2. 15. 7 細胞は、10%Fetal calf serum を含む Dulbecco' s modified Eagle Medium を用いて培養した。

### B.3. HBV 粒子の調製

本実験で用いた HBV 粒子は Genotype D の HBV 粒子を恒常発現する HepG2. 2. 15. 7 細胞の培養上清より回収した。具体的には、HepG2. 2. 15. 7 細胞を 3 日間培養した培養上清を回収した。回収した培養上清を 3, 500 g で 15 分間遠心を行い、遠心後の上清を 0. 45  $\mu$ m のフィルターに通した。フィルターを通した上清に対して終濃度 8%(w/v) となるようにポリエチレングリコール 6, 000 を添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。翌日、上清を 600 g で 45 分間遠心を行い、上清を除去した。残存したペレットを 300 $\mu$ L の PBS に溶解し-80 $^{\circ}$ C で保存した。なお、HBV 粒子のタイターは、ウイルス液より Total DNA の回収を行った後、定量的リアルタイム PCR により定量することで決定した。

### B.4. iPS-Hepa への HBV 感染

iPS-Hepa は分化開始 25 日目の 12 well



plate へ播種された細胞を用いた。一方、HepG2細胞ならびにHepG2-NTCP細胞については12 well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、24時間後の細胞を用いた。HBV粒子の作用手順について以下に記す。

12 well plate へ播種された iPS-Hepa、HepG2細胞、HepG2-NTCP細胞より培地を除去した。次に、調製したHBV粒子を5,000 virus genome/cell (vg/cell)となるように調製したウイルス液を500  $\mu$ L/well添加した。なおこのウイルス液には、ポリエチレングリコール6,000を終濃度が4%(w/v)となるように添加した。その後、37°C・飽和蒸気圧・5% CO<sub>2</sub>存在下で24時間培養した。HBV粒子作用開始から24時間後に、ウイルス液を除去し1 mL/wellのPBSで5回洗浄した。その後、新しい抗生物質含有の培地に加え、37°C・飽和蒸気圧・5% CO<sub>2</sub>存在下で培養を続けた。また、HBV粒子作用開始から2日目・3日目にも同様に培地の除去、1 mL/wellのPBSによる洗浄を5回行った後、新しい抗生物質含有の培地に加え、37°C・飽和蒸気圧・5% CO<sub>2</sub>存在下で培養を続けた。更にHBV粒子作用開始から5日目・7日目・10日目・12日目・14日目には培地の交換を行った。

#### B. 5. 培養上清中 HBV ゲノム量の定量

HBVを作用させた iPS-Hepaの培養上清を回収し、2,000 rpmで5分間遠心を行った。

上清を回収し、DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてTotal DNAを回収した。HBVゲノムDNA量は、定量的PCRにより検討した。

#### B. 6. iPS-HepaにおけるHBV由来RNAの定量

ISOGENを用いて、HBVを作用させた iPS-Hepaよりtotal RNAを回収した。各total RNAをRNase-free DNase Iで処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kitを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。SYBR Green gene expression assaysを用いた定量的リアルタイムRT-PCRを行い、Pre-genomic RNAおよびHBV RNAs (HBVゲノムが発現する全てのRNA)を定量した。

#### B. 7. 培養上清中 HBV 抗原の定量

HBVを作用させた iPS-Hepaより、培養上清を回収した。上清中に含まれるHBs抗原ならびにHBcr抗原は、化学発光免疫測定法 (chemiluminescence enzyme immunoassay; CLEIA)によって計測・定量した。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

### C. 研究成果

C. 1. iPS-Hepa への HBV 感染に関する検討  
HepG2. 2. 15. 7 細胞の培養上清より調製したHBV粒子を iPS-Hepaに作用させたのち、

HBV 粒子が iPS-Hepa に感染しているか検討した。その結果、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 ゲノムが検出された。加えて、iPS-Hepa では HBV 作用開始から日を経るにしたがって、HBV ゲノム量の増加傾向を見られた。

次に、定量的リアルタイム RT-PCR 法によって HBV の pre-genome RNA と HBV RNAs についてそのコピー数を定量的 RT-PCR にて検討したところ、いずれのタイムポイントにおいても iPS-Hepa は HepG2-NTCP 細胞と比較して同程度またはそれ以上の RNA 量が検出された。

さらに、HBs 抗原量ならびに HBcr 抗原量を化学発光免疫測定法によって測定したところ、HBV を作用させた iPS-Hepa では両抗原が検出された。これは同様に処理した HepG2-NTCP 細胞と比較すると、HBV 感染開始後 7 日目において HBs 抗原量、HBcr 抗原量共に約 50%程度、10 日目において HBs 抗原量が約 50%程度、HBcr 抗原量が約 30%程度であった。また、iPS-Hepa ならびに HepG2 細胞について両抗原量は 10 日目に最大を迎え、14 日目は両抗原量とも減少した。以上の結果より、iPS-Hepa に HBV が感染可能であることが示された。

なお、HBV を作用させた HepG2 細胞において、上清中 HBV ゲノムや pre-genome RNA、HBV RNAs は検出されなかった。

#### D. 考察

本年度は、iPS-Hepa へ HBV 粒子を作用さ

せた後、HBV 粒子の感染・増幅が起こるか検討した。その結果、iPS-Hepa は HepG2-NTCP 細胞と遜色なく HBV が感染・増殖することが示唆された。前年度までの結果より、iPS-Hepa は HBV ゲノムの発現・複製が可能な細胞であることが示唆された。また、iPS-Hepa はヒト初代培養肝細胞と同程度の HBV 感染受容体である NTCP を発現していた。これら 2 点より、iPS-Hepa に対して HBV 粒子の感染・増幅が可能であったと考えられる。しかしながら、NTCP を発現しない HepG2 細胞についても HBs 抗原、HBcr 抗原の測定において有意な値が検出された。一方で、pre-genome RNA や HBV RNAs については検出されなかったことから、HepG2 細胞への HBV の非特異的な吸着が起こったことや HepG2 細胞へ HBV を作用させた後の PBS による HBV の wash out が不十分であったことが要因として考えられた。

来年度は今年度の結果を踏まえ、他の Genotype の HBV が iPS-Hepa に感染可能であるか、また既存の抗 HBV 薬によって iPS-Hepa における HBV の感染が抑制可能か検討する予定である。

#### E. 結論

本年度の検討により、iPS-Hepa に HBV が感染可能であることが示された。今後は iPS-Hepa の HBV 感染評価系の有用性を明らかにするため、iPS-Hepa における HBV 感染

プロフィールについて更に詳細に検討を進める予定である。

## F. 健康危険情報

該当事項無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A., 2014; 111:16772-16777.
- 2) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. Cell Transplant., in press.
- 3) Higuchi M, Mizuguchi H. Hepatic

differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro. Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application, the Springer publishing, 147-158, 2014, In: M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki (eds.)

### 2. 学会発表

- 1) 水口裕之; 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術の現状と今後の課題・可能性、第 41 回日本毒性学会学術集会、神戸、2014 年 7 月
- 2) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之; iPS 細胞由来分化誘導肝細胞への B 型肝炎ウイルスの感染に関する検討。第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 10 月
- 3) 水口裕之、高山和雄; 再生医療、創薬応用を目指した多能性幹細胞由来肝細胞の創出、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
- 4) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、飯島沙幸、田中靖人、渡士幸一、脇田隆字、立花雅史、水口裕之; ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウ

ウイルス感染評価系の開発. 第 62 回日本  
ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年  
11 月

- 5) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花  
雅史、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、  
田中靖人、水口裕之 ; ヒト iPS 細胞由  
来分化誘導肝細胞の B 型肝炎ウイルス  
感染評価系への応用. 日本薬学会第 135  
年会、神戸、2015 年 3 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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  
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

分担研究者：石田 雄二	株式会社フェニックスバイオ	研究開発部	課長
研究協力者：立野 知世	株式会社フェニックスバイオ	研究開発部	部長
山崎 ちひろ	株式会社フェニックスバイオ	研究開発部	
吉実 康美	株式会社フェニックスバイオ	研究開発部	
柳 愛美	株式会社フェニックスバイオ	研究開発部	

分担研究課題：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

研究要旨：我々はこれまでに、キメラマウス由来の新鮮ヒト肝細胞(PXB-cells)に対して、HBVの長期感染が成立する事を示してきた。本年度はまず、PXB-cellsへのHBV感染に対するマウス細胞の関与について検討した。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を行った。その結果、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。また次に、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ウエルプレートでのHBV感染実験を行った。ウエルあたりの細胞数をスケールダウンしてもHBV感染は成立しており、上清中のHBV DNA量は $10^4$  copies/mL前後を示した事から、十分薬効評価が可能な実験系である事が分かった。以上の結果から、PXB-cellsを用いた抗HBV薬剤のハイスループットスクリーニングが実現可能であると考えられた。

#### A. 研究目的

昨年度までの成果より、キメラマウス由来の新鮮ヒト肝細胞(PXB-cells)は、HBVの全てのライフサイクル(感染・複製・粒子産生・再感染)を培養下で再現可能であり、新規の薬剤スクリーニングや基礎研究の分野で有用であることを示した。

PXB-cellsの場合は、市販のヒト肝細胞とは違い5-10%程度のマウス細胞(肝細胞及び非実質細胞)が混入している。そこで今年度は、まずマウス細胞の混入がPXB-cellsへのHBV感染に与える影響について検討を行った。次に、ハイスループッ

トスクリーニングへの応用を念頭に、96及び384ウエルプレートでのHBV感染実験を行い、薬効評価が可能なレベルの感染が成立するか、既存の抗HBV薬であるラミブジンを用いて検証した。

#### B. 研究方法

—キメラマウスの作製及びコラゲナーゼ灌流によるPXB-cellsの分離—

—昨年報告書に記載した方法に従って実施した。移植にはHispanic、2才、女兒由来の凍結ヒト肝細胞を用いた。

—PXB-cellsの培養およびHBVの接種及び上清

### 中の HBV DNA 量の定量—

昨年 の 報告書 に 記載 し た 方法 に 従っ て 培養 ・ 接種 (5 genome equivalents /cell, 4% PEG 8000) 及び HBV DNA 量 の 定量 を 行っ た。Cell-able (東洋合成工業) を 用い た PXB-cells の スフェロイド 培養 の 条件 に つい て は 表 1 に まとめ た。培地 の 組成 など の 其 他 の 内容 は、平 面 培 養 と 同 じ 条件 と し た。一 部 の ウェル に 関 し て は、HBV 接 種 か ら 培 養 終 了 ま で 持 続 的 に ラミ ブ ジン (同 仁 化学) を 250 nM で 添 加 し た。

	96 well plate		384 well plate
	2D	3D	3D
Wellあたりの細胞数	6.8x10 <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>4</sup>	8.0x10 <sup>3</sup>
1plateあたりの細胞数	6.5 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>6</sup>	3.0x10 <sup>6</sup>
1plateあたりの感染源 5 GEq/cellの場合(copies)	3.3x10 <sup>7</sup>	9.6x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>7</sup>
wellあたりの培地量	85 uL	85 uL	40 uL

表 1 各種プレートでの培養条件

### —PXB-cells からのマウス細胞の除去—

メーカーのプロトコールに従って、抗マウス抗体 (特殊免疫研究所) を磁気ビーズ (Dynabeads; Life Technologies) で標識し、分離直後の PXB-cells に対して反応させた (1x10<sup>7</sup> cells に対して、ビーズ標識した抗体を 5 µg、氷上、30 分)。その後、磁気ビーズ標識された抗体と反応した細胞を、磁石を用いて除去する操作を 2 回繰り返してマウス細胞を除去した。抗体処理ありとなしの PXB-cells に対して、昨年度と同じ方法で HBV を接種し培養した。

### —免疫染色—

昨年 の 報告書 に 記載 し た 方法 に 従っ て、HBsAg の 免疫染色 を 行っ た。

## C. 研究結果

通常 の PXB-cells と、磁気ビーズ処理によりマウス細胞を除去した PXB-cells をそれぞれ調製し、HBV を接種した。接種後 12 日目と 32 日目に細胞を固定し、HBsAg に対する抗体を用いて、免疫染色を行った (図 1)。

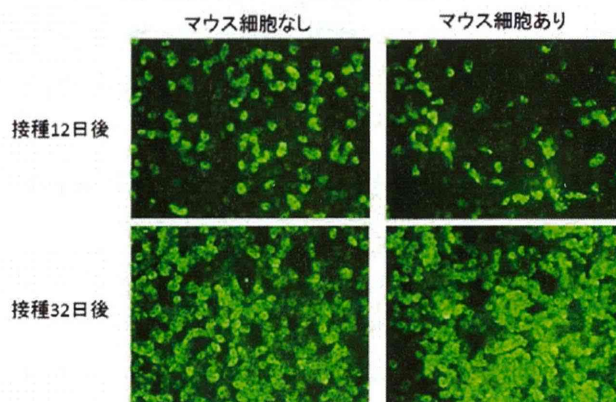


図 1 HBsAg (緑) 免疫染色の結果。上段が培養 12 日目、下段は 32 日目。

マウス細胞の有無で明らかに細胞の状態は異なっており、明視野の観察でもマウス細胞なしの方が均一に接着していたのに対して、マウス細胞ありの場合は細胞が密に凝集しているスポットが多数観察された (データ非掲載)。HBV 接種後 12 日目の免疫染色の結果から、マウス細胞を除去すると HBsAg 陽性細胞はほぼ均一に点在している様子が確認された。これに対して、マウス細胞ありの場合では、HBsAg 陽性細胞は細胞が凝集している領域に局在していた。HBV 接種後 32 日目の時点でも、マウス細胞ありとなしの両条件において、これらの傾向は観察されたが、HBsAg 陽性細胞の数はいずれのケースでも増加しており、水平感染が拡大している様子が確認された。

次に 96 及び 384 ウエルプレートでの PXB-cells への HBV 感染実験の免疫染色の結果を図 2 に示した。いずれの培養条件でも、接種 12 日目の時点で HBsAg 陽性が観察され、HBV の感染が成立している事が確認された。接種後 12 日目の培養上清中の HBV DNA 量を定量性 PCR で解析したところ、いずれの条件においても  $10^6$  HBV DNA copies/mL 前後の値を示した。接種から培養終了までラミブジン処理を行ったところ、いずれの条件でも 1 log 以上の HBV DNA の低下が見られ、ラミブジンの抗 HBV 効果が確認された。

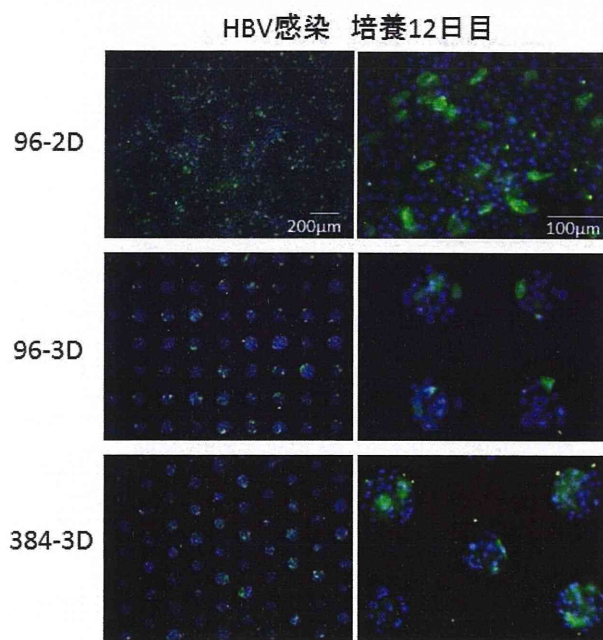


図 2 緑：HBsAg、青：ヘキスト。96-2D：96 ウエルプレート-平面培養。96-3D：96 ウエルプレート-スフェロイド培養。384-3D：384 ウエルプレート-スフェロイド培養。

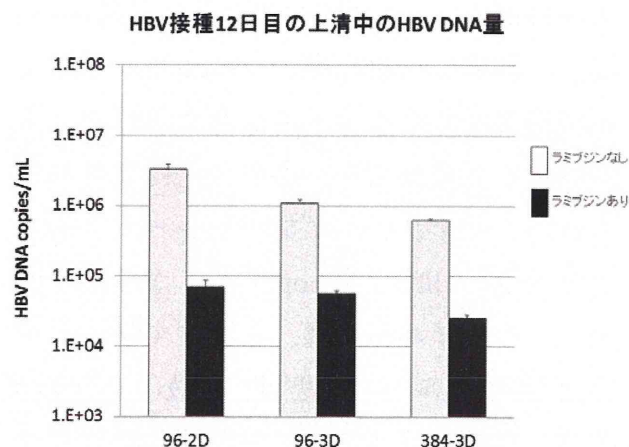


図 3 接種後 12 日目の培養上清中の HBV DNA 濃度。縦軸は Log 表示。バーは標準偏差。(n=3)

#### D. 考察

PXB-cells には 5-10% 程度のマウス細胞が含まれており、その内の約半分がマウス肝細胞であることを確認している（データ非掲載）。毎回含まれるマウス細胞の割合には多少のバラつきがあり、混入しているマウス細胞が PXB-cells の HBV に対する感染にどのように影響するかは、これまで不明であった。今回の結果から、マウス細胞の有無によって明らかに PXB-cells の培養状態に違いは見られたものの、HBV の感染効率には大きく影響しない事が明らかになった。また長期間培養を行った場合、いずれの条件でも HBV の感染拡大が起きていたことから、マウス細胞の有無によって、HBV の複製効率や感染粒子の産生能、ウイルス感染能などが大きく変化する事もないと推測された。

ハイスループットスクリーニングには、96 や 384 といったマルチウエルプレートの利用が必須である。しかしながら、HBV の感染モデルをスケールダウンすると、感染

効率の低下や、測定サンプル量の問題から、薬効の評価が可能な高いウイルスレベルを維持出来なくなるケースが考えられた。今回検討した条件では、多少の差は見られたものの、いずれのタイプのプレートでもおよそ  $1 \times 10^6$  HBV DNA copies/mL が検出された。このウイルス量は、これまで使用していた 24 ウェルでの値と同等であり、既存の抗 HBV 薬であるラミブジンの薬効評価が十分可能なレベルであった。またスケールダウンしてもウェル間の誤差は小さく、薬効を評価する上で結果の再現性も十分であると考えられた。スケールダウンする事で、1つの薬剤を評価するのに必要な細胞数と感染源の両方を減らす事が可能であるため、今回の結果は今後のスクリーニング効率を考える上で非常に重要であると考えられる。

## E. 結論

以上の結果から、PXB-cells に混入しているマウス細胞は、HBV 感染には大きく影響しない事と、PXB-cells への HBV 感染は 96 または 384 ウェルへのスケールダウンが可能である事が示された。本感染モデルは、大規模スクリーニング等に応用可能であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.: Chimeric Mice with Hepatocyte-humanized Liver as an Appropriate Model to Study Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$  *Toxicol Pathol.* (in press)

- 2) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol.* (in press)
- 3) 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 Jan 20;42(1):123-32.

### 2. 学会発表

- 1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Watashi K, Abe H, Wakita T, Chayama K, Tateno C: Hepatitis B Virus Spread in Primary-cultured Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver. 2014 TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (2014. 4, Taipei, Taiwan)
- 2) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、山尾美香留、阿部弘美、茶山一彰、立野知世: キメラマウスから分離した初代培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染. 第 50 回 日本肝臓学会 (2014. 5, 東京)
- 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Tateno C: In vitro evaluation of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). 第 87 回 組織培養学会 (2014. 5, 東京)



- 4) 山崎ちひろ、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由美子、加国雅和、石田雄二、立野知世: ヒト ALT-1 特異的 ELISA を用いたヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性の検出. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京)
- 5) 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるヒト EpCAM の発現. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京)
- 6) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、山尾美香留、阿部弘美、茶山一彰、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来の新鮮培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染第 10 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (2014. 7, 広島)
- 7) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C: Characterization and proliferation assessment of hCK19- and hEpCAM-positive cells in bile duct-ligated chimeric mice with humanized livers. 2014 FASEB Summer Research Conference (2014. 7, Keystone, CO)
- 8) 内田宅郎、平賀伸彦、今村道雄、柘植雅貴、阿部弘美、相方浩、石田雄二、立野知世、茶山一彰: cDNA-uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製および肝炎ウイルス感染. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014. 10, 神戸)
- 9) 平賀伸彦、今村道雄、内田宅郎、柘植雅貴、阿部弘美、相方浩、石田雄二、立野知世、茶山一彰: 超免疫不全 TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014. 10, 神戸)
- 10) Nelson CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K: Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decrease with cell density in primary cultured hepatocytes. 65<sup>th</sup> AASLD (2014. 11, Boston)
- 11) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Murakami K, Chayama K: A novel humanized cDNA-iPA/SCID mouse for the study of HBV and HCV infections. 65<sup>th</sup> AASLD (2014. 11, Boston)
- 12) Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K: A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infection. 65<sup>th</sup> AASLD (2014. 11, Boston)
- 13) Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga N, Canini L, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Dahari H, Chayama K: HBV infection in humanized chimeric mice has multiphasic viral kinetics from inoculation to steady state and an HBV half-life of 1 hr. 65<sup>th</sup> AASLD (2014. 11, Boston)
- 14) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C: In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®) transplanted using cells from three different donors. 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting (2014. 10, San Francisco, CA)
- 15) 土居茜、佐能正剛、山崎ちひろ、石田雄二、加国雅和、立野知世、太田茂: ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた CYP2D6 基質のヒト体内動態予測. 第 53 回日本薬学会中

国四国支部学術大会 (2014. 11, 広島)

- 16) 山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、景山豊、  
岩崎由美子、石田雄二、立野知世：ヒト肝  
細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞  
“PXB-cells”の性状解析. 細胞アッセイ  
研究会シンポジウム (2015. 1, 東京)
- 17) 高橋美和、立野知世、石田雄二、井上薫、  
吉田緑：ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マ  
ウス) における卵胞発育不全. 第 31 回日  
本毒性病理学会 (2015. 1, 東京)

## G. 知的所得権の所得状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

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)

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

分担研究者：棟方 翼 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 主席研究員

分担研究課題：肝機能維持に最適な3次元培養法の構築

研究要旨：HBVが持続感染して、抗ウイルス薬のハイスループット解析へ応用可能な肝細胞培養系の構築に成功した為、逆転写酵素阻害薬以外のHBV感染治療薬の開発を試みた。本研究では、ウイルス増殖と共にHBV蛋白質を減少させ免疫を再賦活化する事でHBVの効果的な排除につなげることを目的とする。肝臓特異的DDSであるMENDにHBVを標的としたsiRNAmixを封入したMEND/siRNAを用いると、HBV持続感染培養系及びHBV持続感染ヒト肝臓キメラマウスにおいて、単回投与で14日間にわたって培地中と細胞内或いは血中のHBsAg、HBeAg量及びHBV-DNA量を90%以上低下させた。ウイルス蛋白質の発現抑制効果は逆転写酵素阻害剤では見られず、この手法の優位な点である。更に、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。IL-7は慢性感染における抗ウイルス反応の制御因子の一つである。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ことから、HBV感染時の免疫応答の新しい制御を発見したと考えている。

#### A. 研究目的

HBVが持続感染して、抗ウイルス薬のハイスループット解析へ応用可能な肝細胞培養系の構築に成功した為、逆転写酵素阻害薬以外のHBV感染治療薬の開発を試みた。現在治療に用いられている逆転写酵素阻害薬では蛋白質産生抑制とcccDNA排除効果は不十分である。本研究では、ウイルス増殖と共にHBV蛋白質を減少させ免疫を再賦活化する事でHBVの効果的な排除につなげることを目的とする。

#### B. 研究方法

##### HBV制御を目的としたsiRNAの評価

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、変異による効果減弱を防ぐためこれらを混合し(siRNAmix)、肝細胞への効率的なDDSである多機能性エンベロップ型ナノ構造体のpH応答性MENDに包含した。pH応答性MENDとは、脂質エンベロップを構成する脂質にpH応答性脂質が含まれており、エンドソームの低pHに応答して、細胞質にsiRNAを速やかに放出するDDSである。HBV持続感染培養系及びヒト肝臓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した。

## HBV DNA と HBV 蛋白質の検出

TaqMan の定量 PCR により HBV DNA の量的解析を行った。プライマーとプローブは遺伝子型 A, B, C で保存された領域に設定した。HBsAg, HBeAg の蛋白質量の解析は (株) SRL に外注した。

## HBV 感染肝細胞の免疫応答解析

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した。CD4, CD8 細胞の活性化の解析は、HBV-Tg マウスを用いて FACS で行った。

## C. 研究結果

遺伝子型 A, B または C の HBV が持続感染した初代ヒト肝臓キメラマウス肝培養細胞に、肝臓特異的 DDS である MEND に siRNAmix を封入した MEND/siRNA またはエンテカビル (ETV) を投与した。MEND/siRNA 投与後、ウイルス蛋白 (HBsAg, HBeAg) 量、HBV-DNA 量を 14 日間継続的に定量し、その阻害効果を検討した。さらに、in vivo 試験として HBV 持続感染ヒト肝臓キメラマウスに MEND/siRNA または ETV を投与し、その阻害効果を検討した。HBV 持続感染培養系及び HBV 持続感染ヒト肝臓キメラマウスにおいて、MEND/siRNA は単回投与で 14 日間にあたって培地中と細胞内或いは血中の HBsAg, HBeAg 量及び HBV-DNA 量を 90% 以上低下させた (図 1)。一方で、ETV の連日投与は血清中 HBV-DNA 量を低下させたが、HBV 蛋白質量は減少しなかった (図 1)。

HBV 感染は免疫寛容を引き起こし慢性感

染に至るが、HBV が感染する肝細胞自身の免疫寛容に与える影響に関してはほとんど知られていない。そこで我々はまず RNA-seq を用いて肝細胞の HBV に対する免疫反応を解析し、免疫寛容につながる因子の同定を試みた。その結果、HBV 感染は肝細胞由来の IL-7 の低下を誘導することを発見した。ヒト肝臓キメラマウスで MEND/siRNA により HBV を抑制すると IL-7 の発現が回復した。また、IL-7 投与により HBV 感染動物モデルで CD4, CD8 細胞が再活性化された。

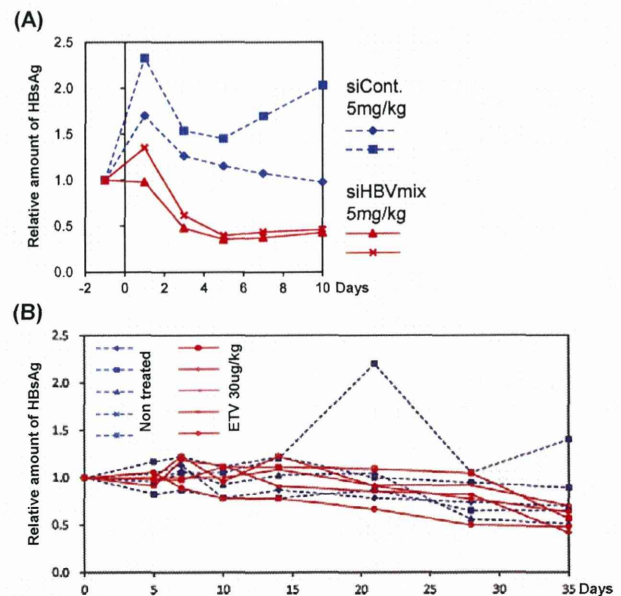


図 1. MEND/siRNA による血中ウイルス抗原量の低下

(A) MEND/siRNA の単回投与後の HBsAg 量の変化。

(B) ETV の 35 日間連日投与による HBsAg 量の変化。

## D. 考察

MEND/HBV-siRNA は in vivo において単回投与で効果的に HBV 蛋白質を低下させ続けることができ、免疫を再賦活化することに