

よる HBV 持続感染治療に有用であると考えられる。免疫寛容のメカニズムは、ウイルス抗原の持続的な刺激が T cell exhaustion を起こす、PD-1 の過剰発現などが報告されているが、今回の解析で、HBV 感染においては肝細胞由来の IL-7 の低下が免疫寛容に関与することが明らかとなった。

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

E. 結論

「肝機能維持に最適な 3 次元培養法の構築」の研究を進めたことで、HBV 感染の新規治療法を開発しただけでなく、HBV の免疫寛容のメカニズムに踏み込んだ解析を行うことが出来た。今後の展開として、まず構築した *in vitro* 培養系をハイスループット解析に適応化する。具体的には、384 穴プレートでの培養条件の検討と微量多検体からの HBV 感染増殖阻害活性定量系の構築を行う。また、MEND/HBV-siRNA は *in vivo* においても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よる HBV 持続感染治療解析に有用であると考えられ、治療ワクチンとの併用効果を検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
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

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：	松永 民秀	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	教授
研究協力者：	中村 克徳	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	准教授
研究協力者：	岩尾 岳洋	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	講師
研究協力者：	近藤 祐樹	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	研究員
研究協力者：	中野 靖久	名古屋市立大学	薬学部 薬学科	5年生
研究協力者：	山下 綾	名古屋市立大学	薬学部 薬学科	4年生
研究協力者：	山田 果奈	名古屋市立大学	薬学部 薬学科	4年生
研究協力者：	山野上 舞	名古屋市立大学	薬学部 薬学科	4年生

分担研究課題：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

研究要旨：本研究は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人工多能性幹細胞（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した。その結果、ヒトiPS細胞の肝細胞への分化において、サイトカイン類に加え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。また、肝細胞分化及び成熟化の促進作用は、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。これらの結果は、NTCP過剰発現のヒトiPS細胞由来肝細胞様細胞はHBV感染モデルとして有用な材料と成り得ることが示唆された。

A. 研究目的

ヒトB型肝炎ウイルス（HBV）感染による肝炎が社会的な問題になっているが、その有効な治療法は確立していない。その理由の1つとして、医薬品開発に欠かせない維持感染のモデル系がないことがあげられる。近年、HBVの肝細胞内への取り込みには肝臓血管側で発現するナトリウムタウロ

コール酸共輸送ポリペプチド（NTCP）が重要であるとされている。そこで、NTCP安定発現HepG2細胞（HepG2-NTCP）が作成され、HBV維持感染系として有用であることが近年明らかになった。また、免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植して作成されるヒト化マウス由来の初代肝細胞もHBV維持感染可能であることが明らかとなった。

しかし、どちらも限られたドナー由来であるのが問題である。

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、4つの遺伝子、OCT3/4、SOX2、KLF4、*c*-MYCを導入することによって樹立された¹⁾。ヒト iPS 細胞は体細胞から樹立することが出来るため、免疫拒絶のない再生医療や細胞治療などの材料として注目されている。しかし、ヒト iPS 細胞をある特定の細胞に分化させることにより、医学研究や創薬研究における材料として利用することも期待されている^{2,3)}。近年、樹立法も大いに改善され、血液など低侵襲によって得られる細胞からの樹立も多く報告されている。したがって、日本人由来の細胞も容易に入手可能である。

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導は早くから行われており、その多くは増殖因子等のサイトカイン類を肝臓の発生を模して添加することで行われている。しかし、サイトカイン類は不安定であるため管理が難しく、ロット間差が有り、極めて高価であるうえに、得られた細胞の成熟度及び機能が低いことが大きな課題となっている。近年、ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化を促進するいくつかの低分子化合物が報告された⁴⁻⁶⁾。一般的に、低分子化合物は大量かつ安定的に、高純度で合成することが可能であり、組換えタンパク質やウイルスベクター、共培養用細胞を用いる方法よりもリスクやコストが低く、ロット間差が少ないため、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に用いる分化誘導因子として有益であると考えられる。しかしながら、肝分化を促進

する低分子化合物に関する知見は乏しく、どのような効果を持った化合物が肝分化に有用であるかということはよく分かっていない。そこで本研究では、HBV 感染モデル系の構築のために、低分子化合物を用いたヒト iPS 細胞の肝細胞の分化誘導法を確立するとともに、HBV 感染に対する NTCP 過剰発現の効果について検討した。

B. 研究方法

試薬

HepG2-NTCP は渡士ら (国立感染症研究所) より、Swiss 3T3 細胞は Riken BRC (東京) より、マウス線維芽細胞 (MEF) はオリエンタル酵母 (東京) より入手した。Cell-able プレート及び、Cosmedium 004 はコスモ・バイオ (東京) より、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、DMEM 及び Ham's nutrient mixture F-12、oncostatin M、dexamethasone、non-essential amino acids、L-glutamine 及び DAPI solution は 和光純薬工業 (大阪) より、SMITEST DNA extraction kit は G&G life science (福島) より、牛胎児血清 (FBS) は Biowest SAS (Nuaille、フランス) より、SYBR Premix ExTaq II はタカラバイオ (大阪) より、Knockout Serum Replacement、Knockout DMEM、RPMI + GlutaMax medium、GlutaMax solution は Life Technologies (東京) より、L-proline は (MP Biomedicals, LLC、Santa Ana、CA、米国) より、Superscript II Reverse Transcriptase、Alexa Fluor 488 (goat-anti mouse IgM 及び rabbit IgG) 及び Alexa Fluor 568 (goat-anti mouse IgG 及び rabbit IgG) は Invitrogen Life Science (Carlsbad、CA、米国) より、Basic fibroblast growth factor、activin A 及び hepatocyte growth factor は Pepro Tech

(Rocky Hill, NJ, 米国) より、RNeasy Mini Kit は Qiagen (Valencia, CA, 米国) より、The Bio-Rad Protein Assay kit は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, 米国) より購入した。その他試薬は特級を使用した。

Cell-able プレートでの培養

Cell-able プレートに Swiss 3T3 細胞 (4×10^4 cells/well/24-well plate or 8×10^3 cells/well/96-well plate) を播種、48 時間後にヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞を 7.5×10^4 cells/well/24-well plate あるいは 7.5×10^3 cells/well/96-well plate になるように播種した。その後、細胞は dHCGM 培地⁷⁾にて培養した。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞は梅澤ら (国立成育医療研究センター研究所) より入手した。ヒト iPS 細胞は mitomycin C 処理した MEF をフィーダー細胞とし、20% Knockout Serum Replacement、2 mM L-glutamine、0.08 mM MEM nonessential amino acids、0.1 mM 2-mercaptoethanol 及び 5 ng/mL basic fibroblast growth factor 含有 DMEM and Ham's nutrient mixture F-12 medium にて培養した。

iPS 細胞から肝細胞への分化誘導方法は我々の研究室の方法に従った⁸⁾。すなわち、ヒト iPS 細胞 (Windy) を 100 ng/mL activin A にて 5 日間培養することで内胚様に、1% DMSO 含有培地にて 7 日間培養することで肝芽細胞に分化誘導した。さらに、細胞を 10 ng/mL hepatocyte growth factor、20 ng/mL oncostatin M 及び 100 nM dexamethasone 共

存下にて 8 日間培養することで肝細胞へと誘導した。こうして得られた肝細胞は前述の方法で Cell-able プレートに播種、培養した。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に及ぼすバルプロ酸の影響に関する検討

分化の際に低分子化合物であり、抗てんかん薬として使用されているバルプロ酸を 2 mM となるように用時培地に添加 (分化後 18 日目から 72 時間、分化後 12 日目から 168 時間もしくは分化後 12 日目から 312 時間処理) し、肝細胞への分化に与える影響について検討した。

肝細胞への HBV の感染

HBV の感染は、肝細胞を播種後 6 日目に行った。HBV 感染濃度が 1,000 virus particles/cells になるように、細胞にウイルス液を添加した。感染翌日及び翌々日に細胞を洗浄した。2 回目の洗浄を終えた日を day 0 とした。その後、細胞は 37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した。Day 4、8、12、16 に培地上清を回収し、その後培地は新鮮な培地に交換した。培地上清は HBV-DNA 回収のために使用した。

C. 研究結果

バルプロ酸を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化⁹⁾

バルプロ酸の添加時期について検討を行った。バルプロ酸を分化後 12 日目から 168 時間添加し、25 日間分化誘導した細胞において、成熟肝細胞に特徴的な多核の細胞が認められた (Fig. 1)。バルプロ酸を分化後

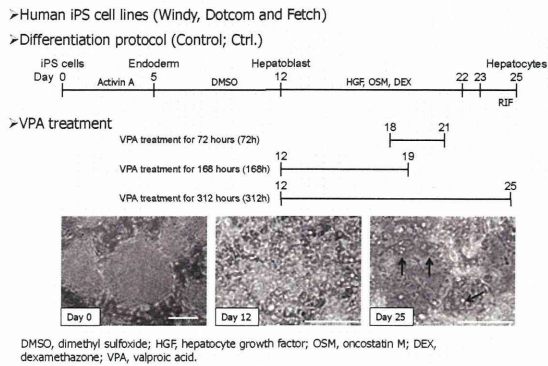


Fig. 1 ヒトiPS細胞の肝細胞への分化プロトコールと細胞形態変化

18日目から72時間添加すると、肝細胞マーカーであるアルブミン (ALB) では約7倍、チロシンアミノ基転移酵素 (TAT) で約1.5倍、肝の主要な薬物代謝酵素 CYP3A4 の誘導に関わる核内受容体プレグナンX受容体 (PXR) では約1.7倍の mRNA 発現の増加が認められた (Fig. 2)。また、バルプロ酸を分化後12日目から168時間添加すると、分化後の細胞において ALB では約32倍、TAT では約4倍、PXR では約5倍の mRNA 発現の増加が認められた。一方で、バルプロ酸を分化後12日目から312時間添加すると、ALB の mRNA 発現は約8倍に増加したものの、TAT では約1/4、PXR で約1/5に mRNA 発現は低下した。CYP3A4 については、バルプロ酸を72時間添加することにより約6倍、168時間添加すること

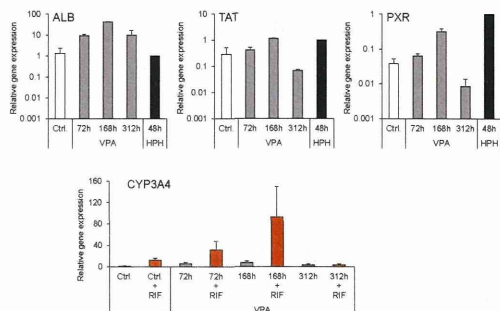


Fig. 2 ヒトiPS細胞の肝細胞の分化に対するバルプロ酸添加の影響

mean \pm S.D. ($n = 2-3$)
 Ctrl, control; HPH 48h, human primary hepatocytes cultured for 48 hours; ALB, albumin; TAT, tyrosine aminotransferase; PXR, pregnane X receptor; RIF, rifampicin.

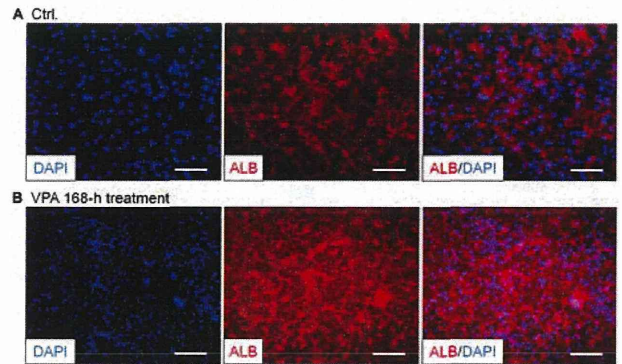


Fig. 3 ヒトiPS細胞由来肝細胞のアルブミン免疫染色

により約8倍の mRNA 発現の増加が認められた。さらに、CYP3A4 の誘導剤であるリファンピシン (RIF) の処理を行ったところ、バルプロ酸を72時間添加することで約6倍、168時間添加することで約12倍に CYP3A4 の発現が誘導された (Fig. 2)。しかし、バルプロ酸を312時間添加した群では RIF で CYP3A4 の誘導は認められなかった。ALB の免疫蛍光染色において、バルプロ酸を168時間処理して分化させた肝細胞様細胞はほとんど全てで陽性を示し、バルプロ酸非添加のコントロールと比較して染色される細胞の割合及びその強度が顕著に増加していた (Fig. 3)。また、バルプロ酸の分化促進効果は複数のヒト iPS 細胞株において認められた (data not shown)。これらの結果は、バルプロ酸の添加時期及び期間がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進するために重要であることが示唆され、バルプロ酸の添加時期は分化後12日目から168時間の処理が最も適していることが明らかとなった。さらに、バルプロ酸は成熟化に加え、肝細胞への分化効率も促進することが示唆された。

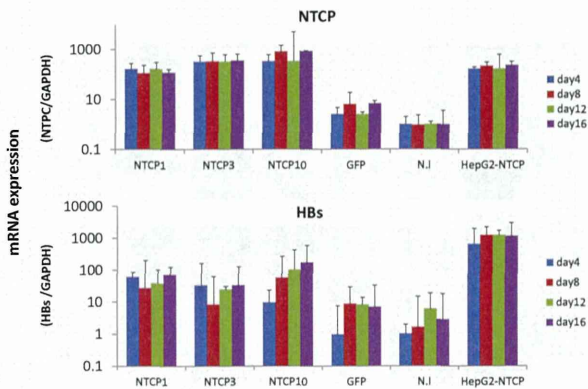


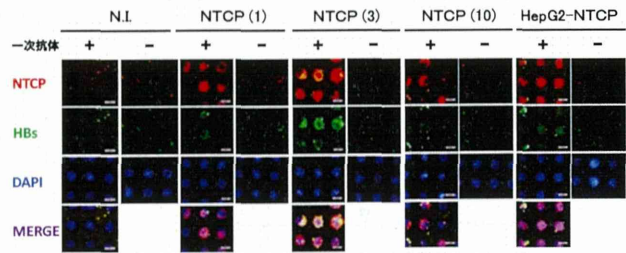
Fig. 4 ヒトiPS細胞由来肝細胞へのHBV感染におけるNTCP過剰発現の細胞内HBs mRNA量に対する影響

バルプロ酸は γ -アミノ酪酸 (GABA) トランスアミナーゼ阻害作用やイオンチャネル遮断作用、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用など、様々な薬理作用を有する低分子化合物である。そこで、バルプロ酸の持つ作用がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進効果を示すかを明らかにするために、それらの作用と同じ作用を持つ複数の化合物で検討した。その結果、HDAC 阻害作用を有する化合物を用いて分化させた細胞においてのみ ALB の mRNA 発現の増加が認められた (data not shown)。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞への HBV 感染と NTCP 過剰発現の影響

上記の結果より、バルプロ酸を分化後 12 日目から 168 時間添加した分化法により作成された肝細胞様細胞を用いて HBV 感染を行った。

ヒト iPS 細胞分化 20 日目に Cell-able プレートに播種 (8×10^4 cells/well of 24-well plate) し、その 2 日後に NTCP 発現アデノウイルスを 1, 3 あるいは 10 copies/cell (multiplicity of infection, MOI) 感染させた。感染 24 時間後に洗浄し、48 時間後 HBV を 1,000 MOI 感染させた。HBV 感染後 24 時



免疫染色: Ad-NTCP感染8日後 (HBV感染6日後)

Fig. 5 NTCP過剰発現したヒトiPS細胞由来肝細胞肝細胞のHBV感染後のHBs抗原免疫染色

間ごとに 2 回洗浄した。洗浄後、4、8、12 及び 16 日後回収した細胞については NTCP 及び HBs mRNA を、培地については HBV DNA の定量を行った。

NTCP 発現アデノウイルスをヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞に 1, 3 あるいは 10 MOI 感染させた。ウイルス非感染 (N.I.) 及び GFP 発現アデノウイルスを 3 MOI 感染 (GFP) させたものを対照群とした。NTCP 発現アデノウイルス感染により、用量依存性は認められなかったが、NTCP mRNA の発現が N.I. あるいは GFP 群の 100~800 倍と顕著に増加した (Fig. 4)。NTCP 過剰発現ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞に HBV を 1,000 MOI 感染させたところ、N.I. 及び GFP 発現群と比較して、HBs mRNA の発現が増加し、特に NTCP 発現アデノウイルスを 10 MOI 感染させた群 (NTCP10) においては 10~200 倍増加した。しかし、NTCP 発現量がほぼ同程度の HepG2-NTCP と比較して NTCP 過剰発現ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の HBs mRNA 発現は低かった (Fig. 4)。

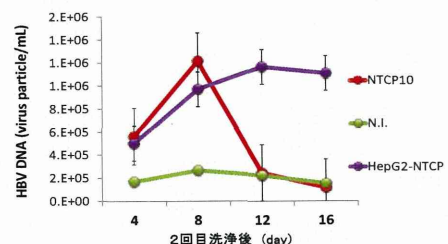


Fig. 6 ヒトiPS細胞由来肝細胞のHBV感染に対するNTCP過剰発現の効果
HBV感染24時間ごとに2回洗浄

NTCP 発現アデノウイルス感染 8 日後 (HBV 感染 6 日後) の NTCP 及び HBs のタンパク質発現について細胞免疫蛍光染色を行ったところ、両タンパク質とも検出された (Fig. 5)。一方、培地中の HBV DNA 量を測定したところ、洗浄後 8 日においては HepG2-NTCP よりも高い HBV DNA が検出されたが、12 日後には N.I. と同程度まで減少した (Fig. 6)。

D. 考察

本研究においてヒト iPS 細胞から分化した肝細胞様細胞は肝細胞マーカーを発現し、肝細胞の形態学的特徴である多核の形態を示した。また、これらの細胞は肝細胞の主要な機能の一つである薬物代謝酵素の発現も認められた。これらの結果は、ヒト iPS 細胞が機能的な肝細胞様細胞へ分化したことを示唆するものである。また、バルプロ酸の添加によってヒト iPS 細胞から分化した肝細胞様細胞は、バルプロ酸の添加時間に応じて異なる分化のパターンを示した。ALB や PXR、TAT の mRNA 発現量は、VPA を 72 時間及び 168 時間添加することで増加した。このことから、バルプロ酸はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進することが示唆された。

バルプロ酸は GABA トランスアミナーゼ阻害作用やイオンチャネル遮断作用、HDAC 阻害作用など、様々な薬理作用を有するが、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に対する分化促進作用は、HDAC 阻害作用に依存することが示唆された。

バルプロ酸を分化後 12 日目から 168 時間添加した分化法により作成された肝細胞様

細胞を用いて HBV 感染を行ったところ、感染は認められたが HepG2-NTCP と比較して顕著に低いものであった。

バルプロ酸の持つどの作用がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進効果を示すかを明らかにするために、それらの作用と同じ作用を持つ複数の化合物で検討した。その結果、HDAC 阻害作用を有する化合物を用いて分化させた細胞においてのみ ALB の mRNA 発現の増加が認められた。実際に、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞は HDAC 活性を示し、バルプロ酸はその活性を阻害した (data not shown)。以上のことから、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に対する VPA の分化促進作用は、HDAC 阻害作用に依存することが示唆された。

HBV 感染後 HBs mRNA 及びタンパク質の発現が検出されたことから、HBV がヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞に感染し、HBV の転写・翻訳が行われていることが明らかとなった。しかし、NTCP10 においては、NTCP3 と比較して染色される細胞が少なかったことから、細胞が Cell-able プレートから剥離した様子が伺えた。この結果より、HBV DNA が NTCP 発現アデノウイルスを 10 MOI 感染させた場合、12 日目に急激に低下した理由として、細胞の減少が原因の 1 つとして考えられた。また、細胞内の HBs mRNA 発現の増加は認められていることから、転写後のパッケージングあるいは細胞外排泄など、機能が低い可能性が考えられた。

E. 結論

本研究では、ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導にバルプロ酸が有効であることを

明らかにした。本法で得られたヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞に NTCP を過剰発現させることにより HBV 感染が認められた。培地中の HBV DNA の含量が培養期間中に急激に減少した。その理由として、三次元培養容器からの脱落あるいはウイルス転写後の過程の機能低下が原因と考えられた。今後、これらの問題を解決することにより、HBV 感染モデルとして有用な材料となることが示唆された。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 29:237-243, 2014.
- 2) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Katsunori Nakamura K, Matsunaga T: Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One.* 9(8):e104010, 2014.

2.学会発表

- 1) 中野靖久、佐藤大介、宮野百合香、阿武志保、田中靖人、村上周子、中村克徳、松永民秀. HBV 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. 医療薬学フォーラム 2014/第 22 回 クリニカルファーマシーシンポジウム. 2014 年 6 月 (東京)
- 2) Tamihide Matsunaga, Yuki Kondo, Takahiro Iwao, Katsunori Nakamura. Utility of iPS Cells for Drug Metabolizing Enzyme Expression: Histone deacetylase inhibitor promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting. San Francisco, California, USA. Oct. 23, 2014.

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

引用文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**:861–872, 2007.
- 2) Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, **79**:65–73, 2010.
- 3) Hannoun Z, Filippi C, Sullivan G, Hay DC, Iredale JP. Hepatic endoderm differentiation from human embryonic stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **5**:233–244, 2010.
- 4) Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, Schreiber SL, Melton DA. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, **4**:348–358, 2009.
- 5) Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, Sharifi-Zarchi A, Aghdami N, Baharvand H. Treatment of human embryonic stem cells with different combinations of priming and inducing factors toward definitive endoderm. *Stem Cells Dev.*, **22**:1419–1432, 2013.
- 6) Shan J, Schwartz RE, Ross NT, Logan DJ, Thomas D, Duncan SA, North TE, Goessling W, Carpenter AE, Bhatia SN. Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation. *Nat. Chem. Biol.*, **9**:514–520, 2013.
- 7) Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, Ohnishi C, Kataya S, Kohashi T, Hino H, Marusawa H, Asahara T, Yoshizato K. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. *Journal of Hepatology*, **44**:749–757, 2006.
- 8) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet.*, **29**:237–243, 2014.
- 9) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Katsunori Nakamura K, Matsunaga T: Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*, **9**(8):e104010, 2014.

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：落谷 孝広 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 主任分野長
研究協力者：内藤 寛 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 特別研究員

分担研究課題：HBVの細胞内ライフサイクルに及ぼすmiRNA機能の解析

研究要旨：ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)持続感染の治療標的として有用なmicroRNA(miRNA)候補を同定することを目的として、HBV感染モデル細胞を対象にマイクロアレイおよびmiRNAライブラリーを用いた解析を行った。マイクロアレイによる解析の結果、HBV感染後5日目に発現が亢進するmiRNAとしてmiR-221/222、発現が低下するmiRNAとしてmiR-210を同定した。これらmiRNAのmimic、inhibitorを用いた検討の結果、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。

A. 研究目的

ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染者は、世界で約240万人にのぼり、本邦においてもHBV持続感染者は約130万と推測されている。HBVの持続感染は慢性肝不全や肝癌などのリスク因子であることから、HBV持続感染に対する安定した治療法の確立が求められている。しかし、現在の治療法であるインターフェロンや核酸アナログの慢性感染者に対する治療効果は不十分である。したがって、HBV持続感染に対する新規治療法の確立が急務であると考えられる。

microRNA(miRNA)は、約20塩基程の短鎖non-coding RNAの一つであり、様々なヒト疾患に関わることが知られている。以前より、HBV感染によるmiRNAの異常発現が指摘されており、HBV感染や細胞内のHBVライフサイクルにmiRNAが深く関わっている

と考えられる。しかし、その詳細は未だ明らかとなっていない。

そこで本分担研究では、HBV持続感染の治療標的として有用なmiRNA候補を探索することを目的として、HBVの感染ならびにライフサイクルに関与するmiRNAの同定とその詳細な機能解析を行った。

B. 研究方法

(a) マイクロアレイを用いたmiRNAのピックアップ

ヒト化肝臓マウス(PXBマウス)由来肝臓細胞に対し、HBVを感染後、0~12日間後のRNAを回収し、マイクロアレイによる網羅的miRNA発現解析を行った。得られた発現プロファイルから、HBV非感染細胞と比較してHBV感染細胞で発現値が2倍以上高

い、または低い miRNA をリストアップした。リストアップされた miRNA に関しては、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) によるアレイデータの検証を行った。

(b) miRNA ライブラリーを用いた miRNA のピックアップ

HBV 感染モデルである HepG2-NTCP 細胞株に対し、HBV 感染後 3 日目にヒト miRNA 約 2,000 種類の mimic を搭載した miRNA mimic ライブラリーを導入した。ライブラリー処理後 4 日目の培養上清から、DNA を抽出し、qRT-PCR によるウイルスコピー数変化を検討した。

(c) 候補 miRNA の mimic および inhibitor を用いた細胞内外の HBV コピー数の検討

PXB 由来肝臓細胞ならびに慢性感染モデルである HepG2.2.15.7 細胞株に対し、(a) の結果から得られた miRNA 候補の mimic、inhibitor を導入した。培養 0~5 日後の培養上清および細胞から DNA を回収後、qRT-PCR によりウイルスコピー数変化を検討した。

なお、(a) (b) (c)における細胞への HBV 感染処理、感染 12 日目に得られた miRNA 候補の検討、miRNA ライブラリーの検討は、研究代表者である名古屋市立大学の田中靖人先生の研究室で行って頂いた。PXB マウス細胞、および HBV 慢性感染モデルである HepG2.2.15.7 細胞株は、それぞれ分担研究者であるフェニックスバイオ株式会社の石田雄二先生、国立感染症研究所の渡士幸一先生より分与頂いた。

C. 研究結果

マイクロアレイによる網羅的な miRNA 発現解析結果から、HBV の感染により発現が変化する miRNA を複数同定した。感染後 12 日後の条件において、HBV の感染により発現が上昇する miRNA として miR-3649、低下する miRNA として miR-30c が同定された。一方、感染後 5 日目の条件においては、HBV 感染により miR-221/222 の発現上昇、miR-210 の発現低下が認められた。次に、HBV 感染後の PXB マウス肝細胞に対し、mimic/inhibitor を用いた miR-3649、miR-30c の強制発および発現抑制を行った。しかしながら、両 miRNA の発現変化に伴う HBV 感染抑制効果は認められなかった。一方、感染後 5 日目の PXB マウス肝細胞において、miR-221/222 の発現変化に伴い、標的遺伝子である PTEN、p27、PPP2R2A の発現が低下していた。そこで、miR-221/222 の mimic、inhibitor を HepG2.2.15.7 細胞株に導入し、HBV ウイルスコピー数を検討した。その結果、miR-221/222 の mimic 処理により、細胞内のウイルスコピー数が低下することが確認された。

miRNA ライブラリーを用いた検討では、ネガティブコントロール処理細胞と比較して、mimic 処理により培養上清中の HBV コピー数が 50%以上低下した 33 種類の miRNA を同定した。現在、ライブラリー上の 480 種類の miRNA mimic について解析が完了している。今後、残りの miRNA mimic について引き続き解析を継続すると同時に、ピックアップされた 33 種類の miRNA について再現性の検討を行う予定である。

D. 考察

HBV 感染 5 日目の条件で発現が亢進した miRNA の mimic を処理することで、細胞内 HBV コピー数の増加が、一方 inhibitor の処理により細胞内 HBV のコピー数低下が予想されたが、結果は miR-221 および miR-222 の mimic 処理により HBV のコピー数が低下した。このことから、これら miRNA は HBV のライフサイクルを補助するというよりは、細胞の HBV に対する防御機構として働いている可能性が考えられた。また、HBV に感染した PXB マウス肝臓細胞内では、これら miRNA の標的として報告されている複数の遺伝子 (PPP2AR2、PTEN、p27) の発現が低下しており、miR-221/222 の標的遺伝子が HBV 感染と関連している可能性がある。一方、HBV 感染 12 日目で発現変化が見られた miR-30c および miR-3649 については、mimic、inhibitor 処理による HBV コピー数への影響は見られなかった。これら miRNA は単独では機能できないか、もしくは発現変化するものの HBV のライフサイクルには関与していないことが推測されるが、HBV の治療標的としては適切ではないと考えられた。

E. 結論

HBV 感染モデルを対象に行ったマイクロアレイならびに miRNA ライブラリーの結果から、新規 HBV 治療薬の候補となる可能性のある miRNA が複数同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T. The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

for acute liver disease. *Methods Mol Biol*, 1213:57-67, 2014

2. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses. In: Babashah S (ed), *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Switzerland, Springer, pp 155-182, 2014

2. 学会発表

落谷孝広 マイクロ RNA による肝疾患の新しい理解と治療戦略、第 8 回東京肝疾患研究会 講演・東京・平成 26 年 6 月 14 日

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：中西 広樹 秋田大学 生体情報研究センター 助教
研究協力者：上野 紀子 秋田大学 生体情報研究センター 博士研究員

分担研究課題：検体からの脂質調製とリポドミクス解析・多変量解析

研究要旨：HBVウイルスを感染させたキメラマウス由来ヒト肝細胞ならびにHepG2-hNTCP-C4細胞から抽出した脂溶性代謝物を特異的かつ網羅的に解析することでHBVの複製・分泌に関わる分子の同定を目指した。前処理時に物性の異なる脂溶性代謝物を分画し、トリプル四重極型質量分析装置により各画分の高感度分析を行った。その結果、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。その中で、ホスファチジルイノシトール二リン酸(PIP2)のみが、HBV感染阻害が見られる多価不飽和脂肪酸(特にDHA)添加により増加抑制されることを明らかにした。

A. 研究目的

HBV感染後の脂質変動を経時的に分析し、HBVの複製・分泌に関わる脂質分子の探索・同定を目的とする。さらに、その特異的な脂質分子が創薬に応用できるかどうかを検証する。

B. 研究方法

・検体

- (1) キメラマウス由来ヒト肝細胞(HBV接種2日後、5日後)
- (2) HepG2-hNTCP-C4細胞(HBV接種5日後±高度不飽和脂肪酸添加)

・脂質抽出

Bligh & Dyer法による総脂質の抽出後、その一部を残し、陰イオン交換カラムによる分画を行った。各リン脂質極性部位の

イオン交換能の違いによって徐々に分離・溶出し、中性脂質群、塩基性脂質群、酸性脂質群に分画した。

・分析と解析

脂質解析はトリプル四重極型質量分析装置を用いて生体微量脂質成分を高感度・特異的に測定した。

C. 研究結果

キメラマウス由来ヒト肝細胞の脂質解析結果については昨年度の再現性がとれ、持続感染時にリゾリン脂質(LysoPC, LysoPE)やホスファチジルイノシトール二リン酸(PIP2)、セラミドの増加が確認された(図1)。さらに、HepG2-hNTCP-C4細胞を用いたHBV感染実験においても上記脂質分子の増加は確認された。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（図 2）。

図1. リピドミクスによる網羅的解析

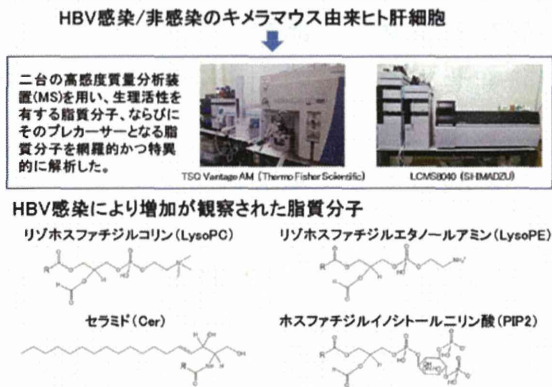
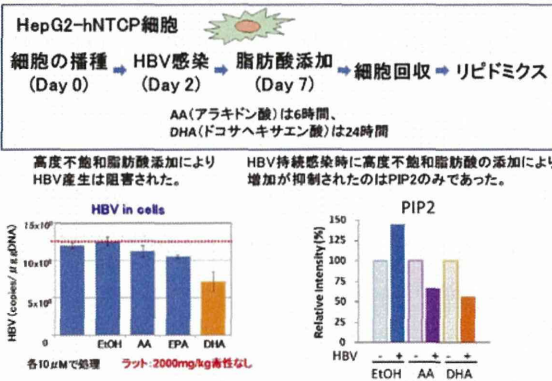


図2. 高度不飽和脂肪酸添加による影響

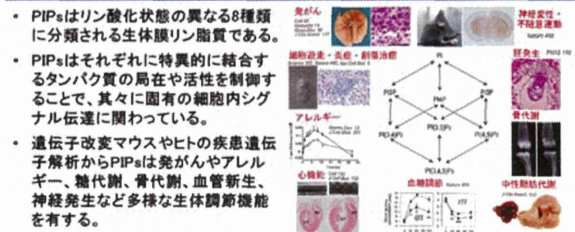


D. 考察

PIP2 を含むイノシトールリン脂質群 (PIPs) の代謝系は増殖、分化、運動、老化、死といった幅広い生命現象に関与する。また、このような細胞応答を支える、転写因子の活性化につながるシグナル伝達、細胞骨格制御、物質取り込みや分泌、オートファジーといった素過程における役割が明らかになりつつある。近年、遺伝子改変マウスやヒトの疾患遺伝子解析から発がんやアレルギー、糖代謝、骨代謝、血管新生、

神経発生など多様な生体調節機能を有することが明らかとなっているが、HBV との関連についてはほとんどわかっていないのが現状である（図 3）。深澤班員が行った上記 HepG2-hNTCP-C4 細胞実験のアレイ解析の結果からも PIPs 代謝酵素の一部増減が明らかになったことから PIP2 は革新的な医薬の有望な作用点として期待できる。

図3. イノシトールリン脂質 (PIPs) とは？



PI3-Kinase/Aktシグナル経路はHBV複製を制御する

Regulation of Hepatitis B Virus Replication by the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signal Transduction Pathway

Hailun Qian,¹ Tingting Zhang,¹ Dong Jiang,¹ Jianhua Cao,¹ Guang-Hui Xiao,¹ Timothy M. Block,² and Ai-Tao Guo^{1*}

Daniel Institute for Microbiology and Virology Research, Department of Microbiology and Immunology, Daniel University College of Medicine, Danbury, Connecticut, United States and ²Flow Research, Department of Immunology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, United States

2007;81:10072-10080

HBVとPIPs(PI3K/Aktシグナル)との関連については数報あるが、よく理解されていないのが現状である。

E. 結論

これまでの解析で創薬標的候補に挙げられた PIP2 を中心とした生理活性脂質分子の代謝関連分子のゲノム・タンパク質解析ならびに、それらの阻害などによる HBV 感染の影響を検証する必要がある。また、HBV で増加が確認された脂質分子が NASH や肝癌など他の肝疾患で変動しているかどうかヒト検体を用いて解析する必要があると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 佐々木 雄彦、中西 広樹. ホスホイノシタイド代謝系-新技術による新展開-. 医学のあゆみ Vol.248 生命を

支える脂質-最新の研究と-臨床.
1039-1049. 2014.

2. 学会発表

特にございません

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

特にございません

2. 実用新案登録

特にございません

3. その他

特にございません

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：深澤 征義 国立感染症研究所 細胞化学部 室長

分担研究課題：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

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)慢性感染に対する新たな治療法が強く求められている。そのためには、HBV持続感染を再現する簡便でウイルス産生能の高い培養細胞評価系の確立が重要である。昨年度、我々はNTCP発現HepG2細胞を用いたHBV感染培養系を導入・改良し、従来より10倍以上ウイルス量が少ない感染条件でのHBV感染培養系を確立できることを報告した。今回、本感染系においてウイルスの再感染が見られることも観察し、ウイルスライフサイクルすべてが再現されることを確認した。また、本系を用いて、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の解析も行った。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)セラミド生合成の上昇、4)スフィンゴミエリン・グルコシルセラミド生合成の低下、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。また、本系においても、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された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)感染による慢性肝炎、それに伴う肝硬変・肝がん発症は我が国においても大きな健康上の問題である。既存の薬剤療法では完全なウイルスの排除は難しい場合が多く、新たな薬剤の開発・実用化が強く求められている。効率的な抗HBV創薬研究を行うためには、HBV持続感染を再現する簡便でウイルス産生能の高い培養細胞評価系が必須であるが、汎用性の観点から未だ十分に確立されているとは言えない状況である。そこで、1)当該培養細胞評価系の確立に資する知見を得ること、さらには、2)これまでに確立された系を用いて抗HBV阻害剤候補を可能な限り検索

することを目的としている。当班の中で我々は主に脂質(代謝)に着目した観点から研究に取り組んでいる。

具体的には、本年度はNTCP発現肝細胞株を用いHBV感染に伴う脂質(代謝)変動、及びHBV産生に対する宿主脂質代謝関連化合物等の影響を検討した。

B. 研究方法

HBV産生による宿主細胞における脂質代謝変動の解析

HBVの感染培養系は、昨年度報告したように、Biochem. Biophys. Res. Commun. 443, 808-813 (2014)の改良法であり、感染源としてHep2.2.15.7細胞の濃縮上清、宿主細

胞として HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いた。

脂質量の定量は、感染後 13 日目に行った。各リン脂質量はリンの絶対定量により行い、コレステロール・コレステリルエステル、及びトリグリセリドは酵素法により行った。

代謝標識法による脂質代謝系の解析は感染 3 日後に行った。放射性標識脂質（前駆体）を培地に添加し、各時間培養後、細胞画分から Bligh & Dyer 法により脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィー法により各脂質を分離後、イメージアナライザー（Typhoon FLA-7000）により、各脂質の定量解析を行った。

HBV 産生に対する脂質関連化合物の影響の解析

宿主細胞として HepG2-hNTCP-C4 細胞、感染源として Hep2. 2. 15. 7 細胞の濃縮上清を用いた点を除いては、昨年度と同様に行った。脂質関連化合物の添加は、感染前、感染時、感染後に行い、感染後は、3 日おきに培地を交換した。感染 13 日後に培養上清及び細胞を回収し、DNA を含む画分を精製し、定量 PCR により含有 HBV-DNA 量を測定した。各脂質による細胞毒性の検討は、XTT アッセイにより行った。

C. 研究結果

改良した HBV の感染培養系を用いた解析

昨年度報告した NTCP 発現 HepG2 細胞（HepG2-hNTCP-C4 細胞）を用いた HBV 感染系について、さらに検討を行った。HBV 感染 13 日後の培養上清を濃縮し、再度 HepG2-hNTCP-C4 細胞に添加すると、経時的に HBV-DNA の上昇が観察された。即ち、再感染が見られることが分かった。また、本

系は、既知の阻害剤である、Lamivudine や Cyclosporin A 等で有意に HBV 産生が阻害されたことから、通常の HBV 感染を再現していることも確認された。

本系を用い、HBV 感染・非感染における遺伝子発現解析を DNA microarray を用いて解析した。その結果、多数の遺伝子発現変動が見られたが、特に脂質関連経路に注目すると、スフィンゴリン脂質代謝、ガングリオシド・グロボシド代謝、脂肪酸合成、エストロゲン代謝に変動が見られた。

HBV 産生による宿主細胞における脂質（代謝）変動の解析

感染後 13 日目に、各種脂質定量を行った結果、主要リン脂質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン）量については HBV 感染により有意な変動は見られなかった。一方、中性脂質の定量では、全コレステロール・コレステリルエステルの HBV 感染による有意な上昇、トリグリセリドの HBV 感染による有意な上昇が観察された。

脂質代謝前駆体を用いた代謝標識実験により HBV 感染に伴う脂質代謝変動の解析も行った。

本研究班の中西らのリピドーム解析による結果から、HBV 感染によるセラミド量の上昇が観察されたことから、当該感染系を用いて、スフィンゴ脂質代謝について検討を行った。¹⁴C-Serine を用いた代謝標識実験の結果、セラミド合成の有意な上昇と、（セラミドの下流に存在する）スフィンゴ

ミエリンおよびグルコシルセラミドの生合成低下が観察された。

一方、¹⁴C-Serine 代謝標識によるリン脂質代謝を観察した結果、HBV 感染により、ホスファチジルエタノールアミン生合成の上昇とホスファチジルコリンの生合成低下が見られた。

¹⁴C-Choline 標識によるリン脂質代謝変動を解析した結果、HBV 感染により、ホスファチジルコリン及びスフィンゴミエリン生合成の低下、リゾホスファチジルコリン生合成の上昇が観察された。

HBV 産生に対する脂質関連化合物の影響の解析

HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いた HBV 感染系において、これまでに見出してきた HBV 産生に影響を与える脂質関連化合物等の効果を検証した。まず、HBV 侵入阻害活性が報告されている Taurocholate (100 μM) については有意に HBV 産生を阻害した。一昨年度報告した Hexadimetrine についても、感染時以降に共存させることで、強く HBV 産生を阻害した。コレステロール代謝産物である Lathosterol も感染時に共存させることで、HBV 産生を有意に抑制した。DHA および DHA-E についても HBV 産生を抑制する活性を示し、薬剤処理は、感染後からでも十分効果を示した。このことから、少なくとも複製以降を阻害する活性を有している可能性が考えられた。

D. 考察

宿主細胞として HepG2-hNTCP-C4 細胞、感染源として Hep2. 2. 15. 7 細胞の濃縮上清を用いた改良 HBV 培養系において、再感染性

を含めてウイルスライフサイクルがすべて再現できることが確認された。この系を用いることで、感染性粒子の放出についても評価できることになり有用と考えられた。

HBV 感染による脂質量の変動解析から、コレステリルエステル、トリグリセリドの有意な上昇が観察された。別の HBV 感染系を用いたこれまでの解析から、コレステロール生合成の上昇や、脂肪酸のトリグリセリドへの取り込み変動が観察されており、本系においても、さらに詳細な代謝標識実験を行うとともに、これらの代謝系の阻害剤について、HBV 産生への影響を検討していきたい。

スフィンゴ脂質代謝変動を検討した結果、セラミド生合成の上昇とスフィンゴミエリン・グルコシルセラミドの低下が観察された。これは、脂質メタボローム解析および DNA マイクロアレイ解析の結果と合うものであった。HBV 感染により、セラミドの下流への代謝が滞っている可能性があり、さらに詳細な検討を行う必要がある。スフィンゴ脂質生合成阻害剤による HBV 産生阻害 (J. Med. Virol. 2011) との関連も強く示唆される。

¹⁴C-Serine 標識により、ホスファチジルエタノールアミン生合成の上昇とホスファチジルコリンの生合成低下が見られたことから、今後は、ホスファチジルセリンの脱炭酸活性、ホスファチジルエタノールアミンのメチル化活性について検討する必要があるだろう。ホスファチジルエタノールアミン生合成の上昇は、リピドーム解析で見られたリゾホスファチジルエタノールアミンの上昇との関連も示唆される。

¹⁴C-Choline 標識の結果からは、HBV 感染により、コリンのホスファチジルコリンへの取り込み、スフィンゴミエリン合成酵素

活性、ホスホリパーゼ A₂ 活性が大きく変動している可能性があり、これらについても今後検討していく必要があるだろう。

E. 結論

宿主細胞として HepG2-hNTCP-C4 細胞、感染源として Hep2.2.15.7 細胞の濃縮上清を用いた HBV 感染システムによる検討から、HBV 感染により、以下の変動が見られた。1) 中性脂質(トリグリセリド・コレステロールエステル) 量の有意な上昇が見られた。2) セラミドの蓄積とスフィンゴミエリン・糖脂質生合成量の低下が見られた(セリンラベル)。3) ホスファチジルエタノールアミンの蓄積およびホスファチジルコリンの低下が見られた(セリンラベル)。4) choline の蓄積、ホスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンの合成量低下、リゾホスファチジルコリンの蓄積が見られた(コリンラベル)。

さらなる脂質代謝変動の解析は必要であるが、HBV 感染による脂質(代謝)変動の結果を、さらに効率的な HBV 感染培養系の構築や抗 HBV 薬候補の探索研究に生かしていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogawa M, Fukasawa M, Satoh M, Hanada K, Saijo M, Uchiyama T, Ando S: Infection with the obligate intracellular pathogen *Orientia tsutsugamushi*, the fibroblast cells. *Microbe Infect.* (2014) 16, 962-966.

2. 学会発表

1) 岩本 将士、渡士 幸一、九十田 千子、Hussein Hassan Aly、深澤 征義、藤本 陽、鈴木 亮介、相崎 英樹、小祝 修、楠原 洋之、脇田 隆字、ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス(HBV)感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析、第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014.5.31

2) 深澤 征義、清水 芳実、白砂 圭崇、岩本 将士、渡士 幸一、田中 靖人、脇田 隆字、近藤 昌夫、八木 清仁、花田 賢太郎、効率的な HBV 感染培養細胞系の構築に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.10-12

3) Masayoshi Fukasawa, Yoshimi Shimizu, Yoshitaka Shirasago, Masashi Iwamoto, Koichi Watashi, Yasuhito Tanaka, Takaji Wakita, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, and Kentaro Hanada. Efficient HBV infection system in cultured cells. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA, 2014.9.3-6.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

(発明者) 近藤 昌夫、深澤 征義、八木 清仁 「抗体、フラグメント、分子及び抗 HCV 治療剤」

特願 2015- 41198 (H.27.3.3 出願)

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：高岡 晃教 北海道大学遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 教授
研究協力者：

佐藤 精一 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 助教
李 凱 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 博士課程2年
亀山 武志 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 助教
林 隆也 北海道大学 遺伝子病制御研究所 感染癌研究センター 特任助教
原島 秀吉 北海道大学 薬学部 薬剤分子設計学研究室 教授
秋田 英万 北海道大学 薬学部 薬剤分子設計学研究室 特任准教授
櫻井 遊 北海道大学 薬学部 薬剤分子設計学研究室 特任助教
小原 道法 東京都医学総合研究所 プロジェクトリーダー
脇田 隆宇 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

分担研究課題：自然免疫認識機構の制御によるHBV複製への影響

研究要旨：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解析を進めた結果、HBVはRIG-Iを介してIII型IFNs誘導を軽度に取り起こすことが示された。また、HBV感染後に産生されるIII型IFNは実際の抗ウイルスを発揮する結果を得ており、さらにHBV由来のRNA、特にpre-genomic RNA (pgRNA)がRIG-Iのリガンドであることが示され、中でもHBVのポリメラーゼであるPタンパク質が認識し、複製開始に関わることが知られている ϵ と呼ばれるヘアピン領域(ϵ RNA)を認識していることが明らかとなった。さらに検討を進め、RIG-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タンパク質を阻害するという直接的な抗ウイルス因子としての新しい役割を担っていることも見出した。これらの結果に基づいて、他班と連携いただき、リポゾームにloadさせた ϵ RNA-MENDを作成し、ヒト肝細胞のキメラマウスを用いたin vivoの実験を遂行させ、 ϵ RNAの治療応用の可能性を証明する事ができた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)により活性化される自然免疫機構の解析により、HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開

発へ貢献するため、昨年度に引き続き、以下の2つの課題に取り組んだ。(1)HBV感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定。(2)HBVによる自然免疫活性化メカニズムの