

同定および応用を平成 26 年度の研究内容とした。

B. 研究方法

試料: プラスミド pUC19-HBV-Ae, Bj, C ならびに Ae-N (HBV 由来 RNA は発現するもののタンパク質は発現しない変異体) は田中靖人教授 (名古屋市立大学) より分与して頂いた。RNAiMAX lipofectamine reagent および Lipofectamine 2000 は Invitrogen 社および Fugene HD は、Promega 社より購入したものを使用した。本研究に使用した siRNA、Primer は、Sigma 社において合成したものを使用した。ε RNA は T7 promoter with MEGAscript (Ambion) を使用して Cap 存在下で *in vitro* 転写させたものを使用した。RNA の quality は電気泳動で確かめ、Capping の効率は m7G-cap antibody による Gel shift assay に確かめたものを使用した。

細胞培養: Vero 細胞および肝癌細胞である HepG2, Huh-7 細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地 (ニッスイ) に 10% 牛胎児血清、4 mM グルタミンを添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。HepG2-hNTCP-C4 細胞は、国立感染症研究所の脇田、渡士博士より分与して頂いた。初代ヒト肝細胞 (PHH) はフェニックスバイオより購入した。HepG2 でのプラスミド発現系においては、Fugene HD (Promega) をを使用した。siRNA のトランスフェクションにおいては、RNAiMAX lipofectamine reagent を使用し、共に添付マニュアルに従いトランスフェクションした。

HBV 感染: PHH、HepG2-hNTCP-C4 細胞に対しての HBV 感染は 4% PEG8000 存在下でそれぞれ 10 genome、100 genome /細胞で感染させた。

RNA 抽出、定量的-RT-PCR: PHH、HepG2、HepG2-hNTCP-C4 細胞を PBS にて一度洗浄し、Isogen (日本ジーン社) を用いて、RNA を抽出した。常法に従い、DNase I (Invitrogen 社) および ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO 社) を使用し cDNA を合成後、既知の IFNs やサイトカイン、ISG の転写変動をプライマー、SYBR Premix Ex Taq (TAKARA 社)、Real time PCR (Step One Plus: Applied Biosystems) を用いて解析した。

IFN-λ1 による抗ウイルス作用の解析: 1.24 倍長の HBV ゲノムを Transfection し 72 時間後の培養上清を Vero 細胞に 24 時間 pre-treatment した後、VSV を 100 pfu /well で感染させ、2.4% のメチルセルロースを含むダルベッコ変法イーグル培地を重層し Plaque assay を行った。IFN-λ1 の中和試験に関しては、IL-29/IFN-lambda1 抗体 (R&D) を 1 μg/ml の濃度で使用した。Lamivudine は Sigma より購入した。

εRNA による RIG-I を介した IRF-3 のリン酸化の解析: T7 promoter with MEGAscript を使用して *In vitro* 転写させた εRNA を HepG2 に Transfection した。細胞をバッファー (0.5% SDS, 1 mM Na₃V0₄, 10 mM NaF, PBS) で可溶化した。細胞抽出液を SDS-PAGE を行い、抗 phospho-IRF-3 抗体 (Cell

Signaling 社)または抗 IRF-3 抗体(Santa Cruz Biotechnology 社)にて、Immunoblot を行った。

Encapsidated HBV DNA の定量: 感染後の PHH をバッファー (50 mM Tris (pH7.4), 1 mM EDTA, 1% NP-40) で可溶化した後、6 mM になるように、MgOAc を加え、DNase I ならびに RNase A 処理を行った。反応 3 時間後、10 mM EDTA を加え、65°C 15 min の反応で失活させ、Proteinase K 処理後、フェノールクロロホルムを使用し、HBV DNA を精製した。その後 Q-PCR にて Encapsidated HBV DNA の定量を行った。

C. 研究結果

HBV 感染による IFN 応答: HBV 感染による自然免疫応答の解析を行うため、昨年度までに 1.24 倍 HBV ゲノム導入や感染の系を用いて、肝癌細胞 Huh7 や HepG2、PHH において、I 型 IFN の誘導は見られなかったが、III 型 IFN の誘導は軽度誘導されることを見出していた。今年度は、HepG2-hNTCP-C4(HBV の受容体が定常的に発現した細胞)を使用して、HBV 感染により同様の結果が得られるかどうか解析した。HepG2-hNTCP-C4 に HBV 感染させ、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間後の、インターフェロン IFN-β、IFN-λ1、ISG である OAS2 や RSAD2 の mRNA の発現を解析した。その結果、I 型 IFN である IFN-β の誘導は見られなかったが、III 型 IFN の IFN-λ1 や ISG 誘導は軽度誘導されることがわかった (図1)。さらに、HBV 感染により産生される IFN-λ1 が VSV や HBV に対して抗ウイルス

活性を持っていることを確認することができた (図2)。

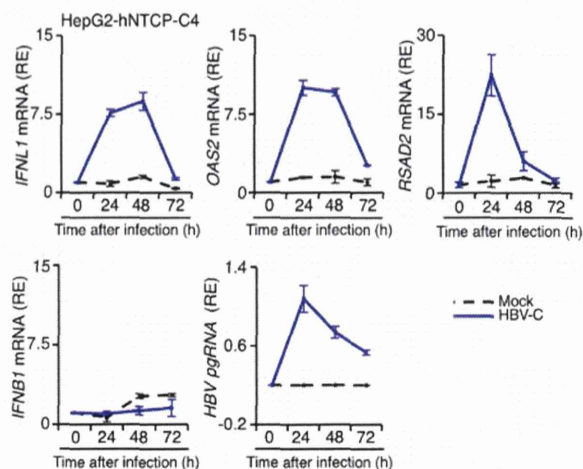


図1: HepG2-hNTCP-C4 細胞におけるHBV感染によるIFN-λ1誘導
HepG2-hNTCP-C4細胞をHBV感染させた後のIFN-λ1、IFN-β、OAS2、RSAD2の mRNAおよびHBV pgRNAの発現を定量的PCR法により検出した。

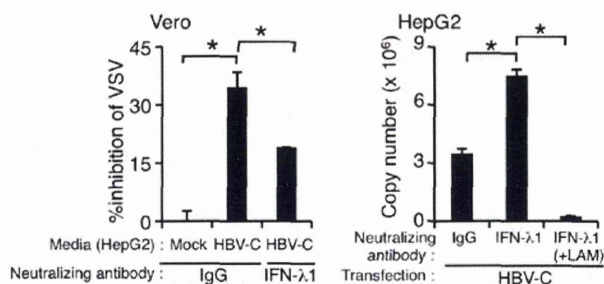


図2: HBV感染により産生されるIFN-λ1による抗ウイルス効果
HBV感染を行ったHepG2細胞の培養上清をIFN-λ1に対する中和抗体存在下でVSVの複製をplaqueアッセイにより測定した(左図)。HBV感染させたHepG2の培養上清にIFN-λ1または、Lamivudineを加え、encapsidated HBV DNAをQ-PCRにて定量した(右図)。

HBV 感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定

HBV 感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定を行うため、retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)、gamma-interferon-inducible protein 16 (IFI16)、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) といった既知の核酸センサーの HBV ゲノム導入による IFN-λ1誘導に対する効果を調べた。HepG2 細胞に各種 siRNA を導入し、その後、HBV 1.24 倍長ゲノム C を導入後、IFN-λ1誘

導を解析した。siRNA により RIG-I を発現抑制した場合、IFN-λ1誘導は有意に阻害され、その他、IFI16、cGAS に対する siRNA は有意な変化は示さなかった(昨年度までの結果)。さらに、PHH や HepG2-hNTCP-C4 にて ウイルス感染においても評価を行ったところ、HBV 感染による IFN-λ1誘導は RIG-I を介している結果が得られた(図3ならびに昨年度までの結果)。以上のことより、HBV 感染により、RIG-I 依存的に IFN-λ1 の発現誘導を導くことが示された。

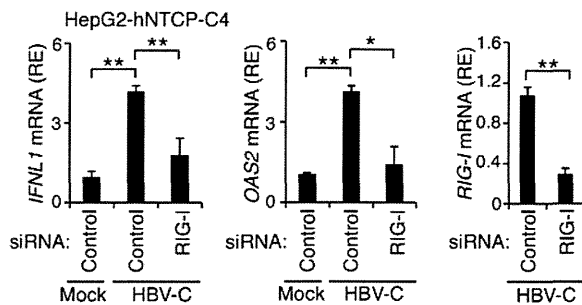


図3: HepG2-hNTCP-C4細胞におけるHBV感染によるRIG-I依存的なIFN-λ1誘導
各種siRNAを処理したHepG2-hNTCP-C4細胞にHBV感染後のIFN-λ1およびOAS2またはRIG-IのmRNAの発現を定量的PCR法により検出した。

RIG-I による抗 HBV メカニズムの解析:次に、我々は RIG-I の抗 HBV 効果を解析するために、siRNA により発現抑制させた PHH に HBV 感染させ、HBV の複製に与える効果を解析した。RIG-I の発現抑制は HBV のコピー数を上昇させた (図 4)。これらの結果は RIG-I が HBV 感染において抗ウイルス活性を活性化させる因子であることが示された。

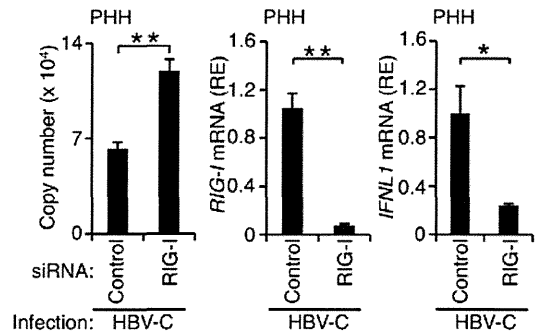


図4: RIG-Iによる抗HBV効果

PHHにRIG-Iに対するsiRNAまたはコントロールsiRNAを導入し、HBV感染を行った。感染10日後encapsidated HBV DNAをQ-PCRにて定量した。RIG-Iのノックダウン効果ならびに、IFNλ1のmRNAの発現を定量的PCR法により検出した。

RIG-I は RNA のみならず DNA 認識との関連性も報告されており、HBV 由来のどの核酸が RIG-I 活性化を誘導するのか詳細を明らかにするため、HBV 由来 RNA に対する siRNA による効果を解析した。HBV 由来 RNA に対する siRNA を導入したところ、HBV Ae 導入による IFN-λ1 の発現誘導の減少が認められた。また、HBV 由来の RNAs を HEK293T に発現させると pgRNA の発現により IFN-λ1 の発現誘導を導くことが示された (昨年度の報告書参照)。さらに、欠失変異体を用いた解析により、5' に存在しているε構造が IFN-λ1 の発現誘導を導くことが示された。実際、in vitro 転写させた RNA を導入する実験系においても、RIG-I を仲介して IRF-3 のリン酸化の促進が引き起こされる結果が得られた(図 5)。以上の結果より、P protein と相互作用する HBV の pgRNA のε構造が RIG-I のリガンドとがなることが示された。

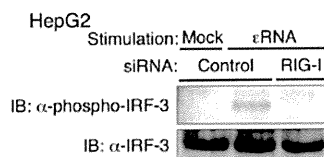


図5: εRNAによるRIG-Iを介したIRF-3のリン酸化の解析
HepG2にεRNAをTransfectionし、刺激後12時間後の細胞抽出液をSDS-PAGEしIRF-3のリン酸化をImmunoblot法により解析した。

さらに一方で、5' εはHBVの複製において重要な逆転写反応を導くP proteinが結合する部位であることが明らかにされていた。これらの結果に基づき、我々はRIG-IがP proteinのε構造への結合を阻害させるのではないかと仮説を立てた。実際、*in vitro*の系においてRIG-Iを存在させると量依存的にP proteinとpgRNAの相互作用が阻害された。さらに我々は、RIG-IのRDドメインをHuh-7.5細胞に発現させると、HBVの複製が阻害され、興味深いことに、RNA結合能が無い変異体ではその能力を失っていた。以上の結果に基づいて、我々はεRNAの治療応用の可能性について解析を行った。εRNAは*in vitro*において、P proteinとpgRNAの相互作用を阻害し、HBV複製を阻害させた。リポゾームにloadさせたεRNA-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、εRNA-MENDを投与したマウス群においてコントロール群に比べて、血清中のHBVコピー数の減少や、肝臓組織でのcoreタンパク質の発現量の減少を導いた(昨年度の結果)。

D. 考察

本研究により、HBVの感染におけるセンサータンパク質の同定やその認識機構の一端が明らかになった。さらにデコイ核酸によ

るウイルスの抑制の可能性を示唆する結果も得られたことから、今後は、HBVの治療において新たな視点からの創薬の展開が期待される。具体的には、3年間で得られたHBV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“εRNA”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していきたいと考えている。具体的には、核酸に対する各種パターン認識受容体を介する自然免疫シグナルを広範に抑制する分子を同定しており、この分子の機能解析を詳細に行うことで、HBVの効率的な持続感染モデルの構築を試みることも計画している。また、なぜ、I型IFNが抑制されているのか、そのメカニズムを同定することで、HBV感染に対して応用を進め、自然免疫によるHBV感染制御機構を包括的に解明することを目指していきたい。

E. 結論

以上より、HBV感染によりI型IFN誘導は引き起こさないものの、III型IFN誘導を軽度引き起こすことがわかった。さらに、RIG-IがpgRNAのεを認識し、自然免疫応答を引き起こしていることが示唆される結果を得た。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させる抗ウイルス因子であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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*, 42, 123-132, 2015.

2. 学会発表

・高岡晃教他 「ヒト肝細胞によるB型肝炎ウイルス感染の自然免疫認識機構」 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会（2014年6月、札幌、口頭発表）

・高岡晃教他 「Host sensing mechanism for the activation of antiviral innate responses to HBV infection」 HBV International Meeting 2014（2014年9月、ロサンゼルス、ポスター発表）

G. 知的所得権の所得状況

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

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：石川 哲也 名古屋大学 大学院医学系研究科 教授
研究協力者：湯川 博 名古屋大学 革新ナノバイオデバイス研究センター

分担研究課題：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

研究要旨：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した。共焦点レーザー顕微鏡での観察では、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を発現したヒト肝癌細胞株、HepG2-hNTCPでの取込み効率は比較的低かった。両細胞におけるHBV感染時のHBV複製効率を、感染1日後のプレゲノムRNAの定量で評価したところ、HuS-E/2細胞において、より効率よく複製が起こっていることが示唆された。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ロ糖蛋白レセプター（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。HBVの細胞内侵入には複数の経路、機構が存在する可能性が示された。

A. 研究目的

HBVの細胞内侵入機構、細胞内での局在、存在形態、複製機構についての詳細は未だに明らかにされていない。HBVの可視化技術を用いて、これらHBVの生活環を明らかにし、培養細胞評価系の確立とともに新たな創薬の方向性を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

蛍光ラベル（赤色蛍光、Ex.:551nm, Em.:567nm）したHBV（HBVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスの血清由来HBV）、HBs粒子（酵母由来、脂質二重膜上にpreS1蛋白を発現させた中空ナノ粒子、以下BNC）を、それぞれ、不死化ヒト肝細胞（HuS-E/2）、

あるいはNTCPを遺伝子導入されたHepG2細胞（HepG2-hNTCP）に感作し、1～24時間後の細胞内取込みを、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて観察した。また、蛍光標識HBV感作24時間後の細胞を回収し、細胞内のHBVプレゲノムRNA（pgRNA）をリアルタイムPCRにより定量した。

HuS-E/2、HepG2-hNTCP、HepG2、Huh-7、HEK293（ヒト腎癌細胞）、HEK293-NTCP（NTCP発現HEK293）、MH1C1（ラット肝癌細胞）、MEF（マウス線維芽細胞）において、蛍光標識BNCの細胞内取込み効率を、蛍光顕微鏡及びフローサイトメーターを用いて評価し、それぞれの細胞におけるNTCP及びアジアロ糖蛋白レセプター（ASGPR）発現との関連

を解析した。さらに、HuS-E/2 において si-RNA を用いて、NTCP、ASGPR の発現を抑制し、BNC 取込み効率の変化を確認した。

C. 研究結果

蛍光標識した HBV 及び BNC はともに、HepG2-hNTCP よりも HuS-E/2 において、より効率よく細胞内に取り込まれていることが CLSM による観察で確認された。蛍光標識 HBV を感作した HuS-E/2、HepG2-hNTCP を 24 時間後に回収し、細胞内の HBV pgRNA をリアルタイム PCR により定量したところ、HepG2-hNTCP よりも HuS-E/2 においてコピー数が多く、CLSM による観察結果と一致する結果が得られた。また、HuS-E/2、HepG2-hNTCP の両細胞において、蛍光標識 HBV と BNC の細胞内取込みがほぼ同様の傾向を示したことから、HBV の細胞内取込み効率の評価は、BNC を用いることで再現可能であることが示された。

各種細胞株における蛍光標識 BNC の取込み効率の比較では、HuS-E/2 が最も高く、Huh-7 がそれに続いていた。HepG2-hNTCP では、HepG2 に比較し、若干、取込み効率が高かったものの、前二者には及ばなかった。その他の細胞株においても、HuS-E/2、Huh-7 を上回る取込みを示すものはなかった。これらの細胞株における NTCP、ASGPR 発現をリアルタイム PCR で定量したところ、NTCP 発現は遺伝子導入株 (HepG2-hNTCP、HEK293-NTCP) で著明に高値であり、ASGPR 発現は肝癌細胞株 (HepG2、HepG2-hNTCP、Huh-7) で高かったが、HuS-E/2 では NTCP、ASGPR とともに発現量が低いことが明らかと

なった。

HuS-E/2 において、si-RNA を用いて NTCP、ASGPR 発現を抑制したが、蛍光標識 BNC の取込みは両分子の発現低下の影響を受けなかった。

D. 考察

蛍光標識 HBV 感作細胞 (HuS-E/2、HepG2-hNTCP) において、可視化により確認された HBV 取込み量と HBV 複製量 (pgRNA 量) とが同様の傾向を示したことから (ともに HuS-E/2 > HepG2-hNTCP)、我々が用いたシステムにおいて、HBV の細胞内侵入というウイルス生活環の一部が適切に可視化されていることが示唆された。

また、HBV と BNC の細胞内取込みがほぼ同様の傾向を示したことから、HBV の細胞内侵入機構の解析は BNC を用いた実験系での代用が可能であることが示唆された。HBV の細胞内侵入阻害剤のスクリーニング系なども、BNC で代用することで、感染源を用いることによる危険性、煩雑さを解消し、より汎用性の高い簡略化された実験系の確立が可能と考えられた。

近年、NTCP、ASGPR が HBV のレセプター、あるいは接着に関与する分子であるとの報告がなされているが、今回、最も効率よく HBV を取込んだ HuS-E/2 における両分子の発現は低く、さらに si-RNA による発現抑制によっても HBV 取込み効率の変化はみられなかった。最もヒト肝細胞の性質が保存されていると想定される細胞株での結果であることを考慮すれば、NTCP、ASGPR 以外にも HBV の細胞内侵入に関わる分子が存在す

ることを示唆する結果と考えられた。HBVの細胞内侵入機構の解明のためにも、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。

E. 結論

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考えられた。HBVの侵入には、NTCP、ASGPR以外の第3のレセプターが関与している可能性もあり、さらに詳細な解析が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M.

Induction of hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated by the inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology* 142: 614-623, 2014.

2) Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.

Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis. *Biochimica Biophysica Acta* 1842:1464-1471, 2014.

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

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：石井 優 大阪大学 大学院医学研究科/生命機能研究科 教授

分担研究課題：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

研究要旨：生体内におけるB型肝炎ウイルス(HBV)の動態と抗ウイルス免疫を理解するためには、個体を生かしたまま“生きた”肝臓内の生きた“細胞”を観察する必要がある。本研究では、二光子励起顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたままで肝臓組織内の細胞動態をリアルタイムで観察する*in vivo*イメージング系を確立する。さらに、確立した技術を用いて、HBV感染肝細胞およびHBVの排除に必要な不可欠な細胞障害性T細胞の動態を*in vivo*で可視化し、生体肝臓内においてHBVに対する特異的免疫応答がどのような機序で制御されているかを明らかにする。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の排除には自然免疫および獲得免疫の両方が必要であることが知られている。特に、細胞障害性T細胞がHBV感染肝細胞の排除に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。しかしながら、生体内においてHBVに対する特異的免疫応答がどのような機序で制御されているか、その実態に関しては不明な点が多い。

本研究では、生体内におけるHBVの動態と抗ウイルス免疫を*in vivo*で解明するために、組織深部の観察が可能な“二光子励起顕微鏡”を駆使して、個体を生かしたままで“生きた”肝臓組織内の“生きた”免疫細胞をリアルタイムで観察する*in vivo*イメージング系を確立する。さらに、本年度は、確立したイメージング技術を用いて、名古屋大学の石川らによって開発されたHBV粒子(ZZ-BNC- α ASGPR)を*in vivo*で可視化することにより、生体肝臓内におけ

るHBVと免疫細胞の相互作用を検討する。次年度以降は、ライブイメージング技術をさらに発展させ、生体肝臓内におけるHBV感染肝細胞およびHBV抗原特異的細胞障害性T細胞の動態を可視化することにより、免疫細胞がどのようにしてHBV感染肝細胞を認識し排除するのか、抗ウイルス免疫の制御機構を*in vivo*で詳細に明らかにする。

B. 研究方法

(1) 肝臓の*in vivo*イメージング系の確立

本研究では、LysM遺伝子のプロモーターの下流にEGFPを発現させたマウス(LysM-EGFPマウス)を使用する。イソフルランにてマウスを麻酔後、腹部を剃毛し、剣状突起下2~3cm、皮膚および腹膜を切開する。その後、肝臓を体外に露出させ、自作の固定台上に置き、生体用ボンド

で固定する。肝組織内の細胞核および血管は、それぞれ Hoechst33342、eFluor650NC を静脈内投与することにより染色する。染色後、生体肝組織の内部を二光子励起顕微鏡で経時的に観察する。

(2) HBV と免疫細胞の相互作用の可視化

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、上記で確立した *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。

C. 研究結果

(1) 肝臓の *in vivo* イメージング系の確立

二光子励起顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたままで肝臓組織内をリアルタイムで観察する *in vivo* イメージング系を確立した。さらに、確立したイメージング技術を用いて、LysM-EGFP マウスの生体肝組織内を観察した結果、豊富な循環血流を維持したまま、生体肝臓内における免疫細胞の動態および類洞血管構造を高解像度で可視化することに成功した。

(2) 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 マウスの生体肝臓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。

D. 考察

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。

HBV はヒトの肝細胞にしか感染しないため、今回のマウスモデルを用いた実験では、マウス肝細胞に取り込まれるように改変された HBV 粒子を使用した。しかしながら、HBV 粒子は、マウス肝細胞以外の細胞 (例えば血管内皮細胞) にも非特異的に取り込まれる点や、肝細胞内で DNA の複製が行われない点などから、本来の HBV の動態を反映しているとは言い難い。今後、ヒト肝細胞キメラマウスなどを用いて、生体肝臓内における HBV そのものの動態を *in vivo* で可視化し解析することが必要である。

E. 結論

二光子励起顕微鏡を用いて、マウスを生かしたままで肝臓組織内の細胞動態を観察できるイメージング系を確立した。さらに、確立したイメージング技術を用いて、HBV と免疫細胞の相互作用を解析することが可能となった。本イメージング技術は、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

Maeda S, Wada H, Naito Y, Nagano H, Simmons S, Kagawa Y, Naito A, Kikuta J, Ishii T, Tomimaru Y, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Eguchi H, Umeshita K, Ishii H, Doki Y, Mori M, Ishii M. Interferon- α Acts on the S/G2/M Phases to Induce Apoptosis in the G1 Phase of an IFNAR2-Expressing Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *J Biol Chem*, 289(34):23786-95, 2014

2. 学会発表

Matsumoto S, Maeda S, Kikuta J, **Ishii M**. Visualization of hepatocytes and immune cells in the liver by intravital multiphoton microscopy. The 18th International Microscopy Congress, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic, September 10-11th, 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

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：近藤 泰輝 東北大学病院 消化器内科 助教

分担研究課題：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

研究要旨：HBV複製により様々な液性因子（ストレス関連蛋白、ケモカイン、エキソソーム等）が放出され、免疫細胞に影響を与えていることが想定される。そこで、各種HBVジェノタイプにより、これらの放出因子が異なり、結果として免疫反応の差異が生まれるかを検討した。まず、ケモカインを網羅的に解析した。結果、HBV複製により増加するケモカインを同定した。その中で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。

A. 研究目的

HBV 複製により様々な液性因子(ストレス関連蛋白、ケモカイン、エキソソーム等)が放出され、免疫細胞に影響を与えていることが想定される。そこで、各種 HBV ジェノタイプにより、これらの放出因子が異なり、結果として免疫反応の差異を生み出している可能性がある。よって、これらの液性因子を網羅的に調べることにより、免疫病態に関わる因子を同定し、治療開発へ結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

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 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。次に HepG2 細胞に

ても同様に HBV 発現プラスミドをトランスフェクトし Huh7 で同定したケモカイン関連遺伝子の発現をジェノタイプ間で比較した。遺伝子発現のみならず、培養上清を用いてケモカインの測定を ELISA にて施行した。

次に各種免疫細胞を分離して遊走試験を施行した。また、CX3CL1 の中和抗体にて処理した後に同様の試験を施行した。

各種免疫細胞の CX3CR1 発現について FACS 解析を行った。また、各種病態間においてNK細胞表面のNKG2DとNKG2Aの発現強度を解析した。更に PD-1^{high}CX3CR1⁺CD8⁺T細胞頻度の解析を施行した。

次に NOG マウスに肝臓に HBV 発現 Huh7 細胞と HepG2 細胞を移植して尾静脈より PBMC を移植して肝細胞癌に遊走浸潤して

いる免疫細胞の比較を行った。

C. 研究結果

HBV 感染により発現が増加し HBV ジェノタイプにより発現レベルが有意に異なるケモカインの中に CX3CL1 が存在することが分かった。また、この発現の相違は Huh7 細胞のみならず、HepG2 細胞でも同様であった。また、培養上清の CX3CL1 も有意に異なっていた (C>B>A)。免疫遊走浸潤試験の結果、NK 細胞と CD8⁺T 細胞の遊走浸潤能がジェノタイプ間で有意に異なっており (C>B>A)、また、この変化は CX3CL1 の中和抗体にて打ち消された。次に、CX3CL1 のレセプターである CX3CR1 陽性の免疫細胞の機能について解析を加えた。NK 細胞表面の NKG2D と NKG2A の発現を FACS にて解析した結果、NKG2D は CH-C より CH-B 症例で CH-B 症例より HBV 関連肝細胞癌患者において有意に低下していた。NKG2A は病態間で発現に差を認めなかった。次に疲弊した CD8⁺T 細胞である PD-1^{high}CX3CR1⁺CD8⁺T 細胞頻度を解析した。結果、CH-C より CH-B、CH-B より HBV 関連肝細胞癌患者において有意に高値であった。更に、NOG マウスを用いた検討を行った結果、肝癌細胞株に HBV を発現させたものを移植したマウスにおいて有意に高い頻度で CX3CR1⁺NK 細胞と CX3CR1⁺CD3⁺T 細胞の腫瘍内浸潤を認めた。

D. 考察

HBV 発現により肝細胞より産生されるケモカインを同定した。その中で、ジェノタイプにより有意に異なるケモカインに CX3CL1 を同定した。このケモカインにより

誘導される免疫細胞は病態により活性化の程度が異なることが分かった。このことより CX3CL1 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。ケモカイン以外にもエキソソーム内 miRNA や HBV-RNA の免疫細胞への伝播にも着目しており、次年度の研究にて明らかとする予定である。

E. 結論

HBV により肝細胞より放出される CX3CL1 は HBV の免疫病態に重要な役割を果たしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura O, **Kondo Y**, Kogure T, Kakazu E, Ninomiya M, Iwata T, Morosawa T, Shimosegawa T. Expression of EpCAM increases in the hepatitis B related and the treatment-resistant hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014 172913 (2014)

2. Ninomiya M, **Kondo Y**, Niihori T, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Sequential analysis of amino acid substitutions with hepatitis B virus in association with nucleoside/nucleotide analog treatment detected by deep sequencing. *Hepatol Res.* Jun;44(6) 678-84 (2014)

3. **Kondo Y** and Shimosegawa T. Significant roles of regulatory T cells and myeloid derived suppressor cells in hepatitis B virus persistent infection and hepatitis B virus-related HCCs. *Int J Mol Sci.* Feb 3;16(2) 3307-3322 (2015)

2. 学会発表

1. DDW2014 5月3日-5月6日 -シカゴ-
Hepatoma with HBV replication could

attract CX3CR1+ NKG2Dlow NK cells and CX3CR1+PD-1+ CD8+ T cells

Yasuteru Kondo, Osamu Kimura, Tomoaki Iwata, Tatsuki Morosawa, Masashi Ninomiya, Eiji Kakazu, Takayuki Kogure, Yasuhito Tanaka, Tooru Shimosegawa

2. 日本肝臓学会総会 5月29日-5月30日 -東京-

CX3CL1-CX3CR1 axis は B 型肝炎、肝癌の免疫病態に影響を与える

近藤泰輝、木村修、岩田朋晃、二宮匡史、諸沢樹、小暮高之、藤坂泰之、新妻宏文、中込悠、下瀬川徹

3. HBV International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 9月3日-6日 -Los Angeles-

Adaptive Immune Response (Oral presentation) HBcAg-specific IL10 production might be an important predictor for the responsiveness to Entercavir-Interferon sequential therapy in chronic hepatitis B patients

Yasuteru Kondo, Osamu Kimura, Tomoaki Iwata, Tomoo Kobayashi, Yu Nakagome, Tatsuki Morosawa, Takayuki Kogure, Jun Inoue, Yasuhito Tanaka, Tooru Shimosegawa

4. JDDW2014 10月23日-25日 -神戸市-
B型肝炎の進展、発癌、ETV-IFN Sequential 療法効果に影響を与える因子の同定

近藤泰輝、木村修、中込悠、新妻宏文、二宮匡史、小暮高之、岩田朋晃、諸沢樹、藤坂泰之、渡辺大亮、小林智夫、下瀬川徹

5. The 11th JSH Single Topic Conference (11th JSH STC) 11月20日-21日 -広島市-

シンポジウム9 The frequency of HBV-specific IL10 production and MDSCs might predict the responsiveness of Entercavir-Interferon sequential

therapy in chronic hepatitis B patients
Yasuteru Kondo, Osamu Kimura, Tomoaki Iwata, Tatsuki Morosawa, Yasuyuki Fujisaka, Takayuki Kogure, Yu Nakagome, Tooru Shimosegawa

6. 第40回日本肝臓学会東部会 11月27日-28日 -東京-

パネルディスカッション2 B型肝炎の新展開 慢性肝炎の進展、ETV-IFN 療法効果に寄与するウイルス因子と宿主因子の関係

近藤泰輝、木村修、下瀬川徹

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

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：坂本 直哉 北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野 教授

分担研究課題：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

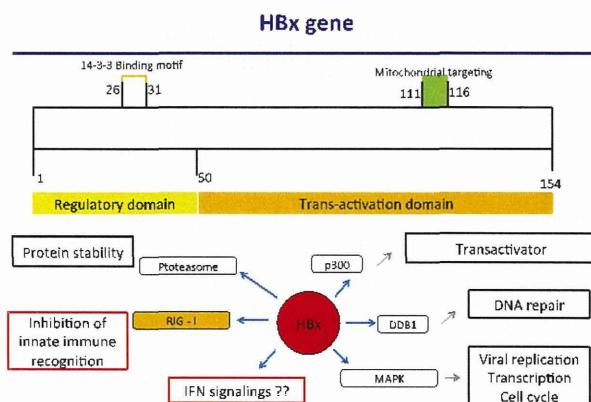
研究要旨：高効率な感染増殖に関連するHBV 遺伝子・アミノ酸構造決定：HBX蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発を目的として分担研究を遂行し、以下の結果を得た。
(1) HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、HBX 蛋白を選択的に欠損する 1.2 倍長 HBV 感染プラスミドを構築し、Huh7 細胞に遺伝子導入したところ、HBX 野生株に比べ増殖能が著明に低下することを確認した。(2) 全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換した X 蛋白発現系を構築し、培養細胞での発現を確認した。(3) HBX 蛋白の Interferon-alpha (IFN) を介した抗ウイルス応答に与える影響を解析したところ、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を見いだした。次年度以降も引き続き、HBX 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。

A. 研究目的

現在の核酸アナログ薬を主体とした抗ウイルス療法には以下の問題がある。即ち(1)薬物の標的が HBV-DNA ポリメラーゼの同一ドメインであり、ウイルスの薬剤耐性変異は複数の薬剤に交差耐性を獲得する、(2)作用が感染性ウイルス粒子の産生抑制であるため作用発現が遅く重症急性発症例に対する効果が限定的である、さらに(3)ウイルスの産生母体である感染細胞核内の環状二重鎖 DNA (cccDNA) を排除する効果がないため、継続的に使用され多剤耐性ウイルスの出現、医療経済学上の問題となる。

ヒト HBV ゲノムにコードされる HBX 蛋白は感染宿主細胞に作用しウイルス蛋白産生を亢進させることが知られており、HBX 蛋白の機能を阻害する化合物が新たな抗ウイルス薬となり得る。しかし、ヒト X 蛋白の機能とその特異的阻害薬開発に特化した研究は十分になされていない。本研究で我々はウイルス感染ライフサイクルにおける HBX 蛋白の詳細な機能解析を下記のごとくおこなう。

1. 高効率な HBV 増殖に関連する HBx 蛋白の機能エピトープの探索と機能解析
2. HBx 蛋白の Type-I interferon 応答シグナルに与える影響の検討
3. HBx が肝発癌/癌肝細胞に与える影響の検討



Neuwirt C. Journal of Hepatology Volume 57, Issue 4 2010 594 – 604

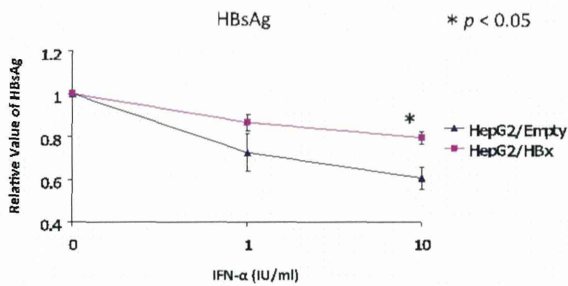
B. 研究方法

HBV 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、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を構築した。さらに、各ゲノタイプの HBX 蛋白強制発現プラスミドを構築し、エピトープ欠失 X 蛋白、全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換した X 蛋白発現系を用いて、薬物の標的となる部位を網羅的に探索した。

C. 研究結果

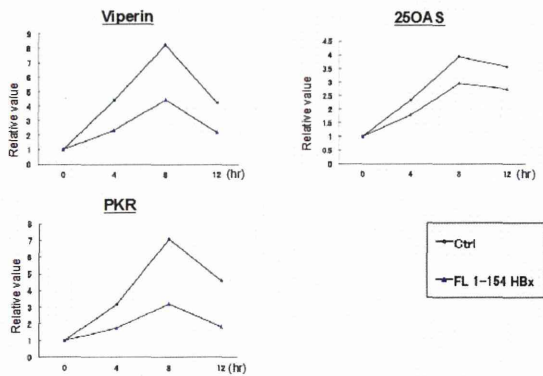
樹立した HBX 蛋白発現 HepG2 細胞に 1.2 倍長 HBV-DNA を遺伝子導入し IFN- α によるウイルス蛋白抑制能を検討したところ、HepG2/HBX においてはコントロール細胞に比べ IFN に抵抗性であった。

HBV in HepG2/HBx have resistance to IFN treatment

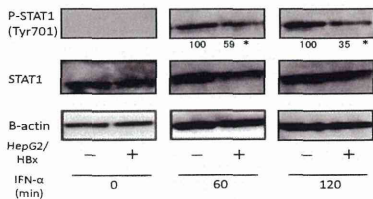


さらに HepG2, HepG2/HBX における IFN シグナル応答を解析した。IFN 誘導遺伝子、Viperin, 2-50AS、および PKR の発現を解析したところ、いずれの ISG も HBX 発現細胞では IFN による誘導が抑制された。

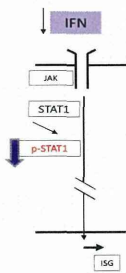
HBX 恒常発現細胞への X 欠損 HBV ゲノムの導入と IFN 感受性の解析: 結果



HepG2/HBx reduced IFN-induced p-STAT1



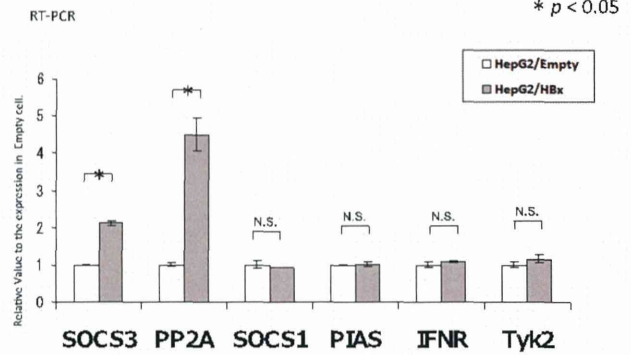
* The intensity of each band was measured by densitometry analysis. Relative value to HepG2 empty as 100



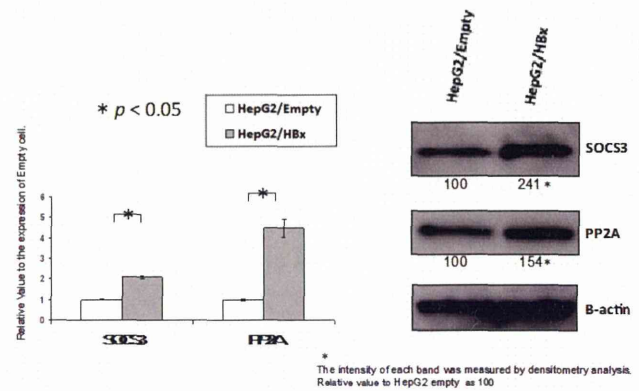
さらに IFN シグナルの suppressor である SOCS1/3、PIAS、ISG15 の発現レベルを定量し

たところ、HBX 発現細胞では baseline における SOCS3 および PIAS の発現レベルが優位に上昇していた。

HepG2/HBx shows increased SOCS3 and PP2A expression



HepG2/HBx shows increased SOCS3 and PP2A expression



* The intensity of each band was measured by densitometry analysis. Relative value to HepG2 empty as 100

D. 考察

今回得られた結果より、HBX 蛋白は SOCS3, PP2A の発現上昇を介し、STAT1/2 のりん酸化抑制、脱りん酸化促進により IFN 感受性を低下させることが示された。

平成 27 年度以降も引き続き下記の、HBX 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。

1. 網羅的変異導入 HBx プラスミドを用いた HBV 増殖関連エピトープの絞り込み
2. 臨床検体を用いた HBx 発現と SOCS3 / PP2A の関連の検討
3. IFN 治療成績との関連の検討

本研究の成果により、現在の B 型肝炎治療を補完し、ウイルスの完全排除を達成する新規クラスの抗ウイルス薬物治療法の創出を目指す。

E. 結論

HBX 蛋白は SOCS3, PP2A の発現上昇を介し、STAT1/2 のりん酸化抑制、脱りん酸化促進により IFN 感受性を低下させることが示された。

F. 研究発表

1. 英文原著

1. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuizaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N: Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. Abdom Imaging 2015; .: Epub ahead of print.
2. Chuma M, Terashita K, Sakamoto N: New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. Hepatol Res 2014; Epub ahead of print.

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

該当なし

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：池田 正徳 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 教授

分担研究課題：HBV 増殖に関わる肝細胞環境因子の同定

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)のライフサイクルを再現できる培養細胞系の現状には問題点があり開発、改良が求められている。本研究では、培養細胞内で低レベルのHBV増殖しかおこらない原因を探求するため、肝臓特異的な転写因子群のHBV増殖に及ぼす影響について検討した。本年度は、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な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。また、HBV受容体であるNTCPを複数の肝細胞株で過剰発現させ感染実験を実施した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)が持続的かつ効率よく増殖することが可能な培養細胞系は現在開発されておらず、このことがHBVライフサイクルの解明及び、抗HBV剤の開発を困難にしている原因と考えられている。HBVの受容体として同定されたNTCPは培養細胞株ではほとんど発現していない。また、肝臓特異的な転写因子の発現も培養細胞では正常の肝臓とは発現パターンが変わってしまっている。本研究では、これらの肝臓特異的な転写因子のHBV増殖への効果を検討する。また、HBVの増殖に適した肝臓特異的な転写因子の発現を制御することで効率のよいHBV増殖が可能な培養細胞系の開発を目的とする。

B. 研究方法

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。強制発現系ではヒト肝癌細胞株HuH-7に1.24倍長のHBV plasmidを導入し同時にdox添加することでFOXAの発現を誘導した。4日後にサンプルを回収してHBV DNA定量、Southern blot解析、Northern blot解析、precore RNA定量、pregenomic RNA定量を行った。遺伝子発現抑制系ではsiRNAをHuH-7に添加下24時間後に1.24倍長のHBV plasmidを導入し4日後にサンプルを回収して強制発現系と同様の解析を実施した。各FOXAを強制発現させた時のHNF4 α 、HNF1 α 、HNF1 β 、RXR α 、及びPPAR α の遺伝子発現について

変動を解析した。

HBV の受容体である NTCP の強制発現系を複数の肝細胞株 (HepG2, Hep3B, HuH-7, RSc, Li23, NKNK-3) で作製し、HBV 感染を検討した。

C. 研究結果

肝細胞株 HuH-7 で HBV 複製に関与する肝臓特異的転写因子群を、強制発現系を用いて検討したところ、FOXA2 (HNF3 β) と C/EBP α 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。また FOXA について、そのメンバーである FOXA1、FOXA2、FOXA3 の HBV 複製における役割を、各 FOXA メンバーの遺伝子発現抑制系や強制発現系を用いて詳細に検討したところ、すべての FOXA メンバーが HBV 複製を転写レベルで抑制的に制御す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。一方、FOXA3 ではこれらの遺伝子発現に変化は見られなかった。

NTCP を過剰発現させた複数の肝細胞株の中で HepG2/NTCP で最も HBV 感染・複製能が高かった。

D. 考察

HBV のすべてのプロモーター、エンハンサーには FOXA 結合配列が存在する。しかしながら、FOXA による HBV 増殖制御については不明な点が多い。これまでに、FOXA1 および FOXA2 についてはヒトの肝細胞以外の細胞や、HBV トランスジェニックマウスを用い

て検討がなされているが、HBV の本来の増殖の場であるヒト肝細胞での検討はなされていない。また、FOXA ファミリーの中で FOXA3 の HBV 増殖に於ける役割についても不明である。本研究ではヒト肝細胞株の HuH-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。FOXA1 および 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。一方、FOXA3 では肝臓特異的転写因子群の変動を認めなかったことより、FOXA3 は FOXA1 および FOXA2 とは異なる機構で HBV 増殖を制御していることが示唆された。

検討したヒト肝癌細胞株に HBV の受容体の NTCP を導入して HBV の感染効率を検討すると HepG2 細胞で最も高い感染効率が認められた。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ものと思われる。

E. 結論

ヒト肝細胞で FOXA ファミリーが HBV の増殖を負に制御すること明らかにした。HBV 増殖の制御は FOXA ファミリーで異なっていた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

(1) 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

(2) 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、神戸、2014 年 10 月

(3) Negative regulation of hepatitis B virus

replication by FOXA members in human

hepatoma cells. Okumura N, Ikeda M, Satoh S,

Dansako H, Mizokami M, Kato N. 2014

International Meeting on Molecular Biology of

Hepatitis B Viruses, Las Angels, USA, 2014,

Sep.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし