

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型肝炎ウイルス感染に対する自然免疫応答の影響に関する研究

研究分担者 加藤 博己 京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学分野 准教授

研究要旨 : B型肝炎ウイルス(HBV)感染時における自然免疫応答の役割の解明を目的とし研究を行っている。今年度は、RIG-I様受容体からのシグナルが顕著に減弱している IPS-1ノックダウン NTCP 安定発現株を樹立した。この細胞株に HBV 感染を行った場合、NTCP 安定発現親株と比べ HBc および HBs mRNA 量や HBc タンパク質量が顕著に上昇することが明らかとなった。このことは、RIG-I 様受容体による認識が HBV 感染を抑制することを強く示唆している。現在までのところ HBV 感染が認められていないヒト NTCP トランスジェニックマウスを、IPS-1 欠損マウスと掛け合わせることにより、HBV 感染が成立することが期待される。

A . 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)が持続感染する際、まず自然免疫応答を回避し感染を樹立させていると考えられるが、そのメカニズムは明らかではない。我々は、ウイルス RNA を認識し抗ウイルスインターフェロン応答を惹起する細胞内 RNA ヘリケース RIG-I 様受容体に着目し、B型肝炎ウイルスが RIG-I 様受容体の認識をどのように回避もしくはそのシグナル伝達を阻害するか、その機構を明らかにしていきたい。さらに、RLR によるシグナル伝達が起こらない状況を利用することにより、細胞やマウスレベルにおいて HBV 感染系の樹立を目的とする。

B . 研究方法

上記研究目的をもとに、下記 1 ~ 3 のような実験を中心に研究している。

1 前年度樹立した HBV 受容体であるヒト NTCP を安定的に発現する HepG2 細胞株において、RIG-I 様受容体の必須アダプター分子である IPS-1 の発現を抑制した IPS-1 ノックダウン NTCP 安定発現株を作製する ( 作製済み )。HBV 感染価を検

討する ( 詳細に検討中 )。

2 IPS-1 欠損ヒト NTCP トランスジェニックマウスを作製する。 ( 現在マウスの掛け合わせ中 )  
3 作製した細胞株やトランスジェニックマウスを用いて高感度で HBV 感染をモニターする系を検討する。

( 倫理面への配慮 )

培養細胞を用いた研究に関して倫理面での問題は無い。マウスの作製にあたっては、大臣確認済である。

C . 研究結果

研究方法 1 に関して、IPS-1 ノックダウン NTCP 安定発現株は樹立できており、親株と比べ HBc および HBs mRNA 量や HBc タンパク質量が顕著に上昇することを確認できている。現在、cccDNA の検出を試みている段階である。

研究方法 2 に関しては、肝臓特異的アルブミンプロモーター存在下でヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウス

に種々の条件でHBV感染実験を行っているが、今のところ肝臓でのHBV複製は認められていない。そこで、IPS-1ノックアウトマウスとの掛け合わせを行っている。IPS-1遺伝子が欠損した条件下で、感染が認められるようになることを期待している。

研究方法3に関しては、FACSを用いて感染細胞におけるHBsやHBc量を検出することを試みている。現在、種々の抗体を用いて条件検討を行っている段階である。

#### D. 考察

作製したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株において高いHBV感染価が認められている。しかし、cccDNAが検出できる複製レベルであるどうかは未だ明らかではなく、今後の課題である。またIPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスが得られ、in vivoでのHBV感染が認められることが期待される。

#### E. 結論

作製した細胞株やマウスを用いて、HBV感染を高感度でモニターできるFACSなどの実験系のセットアップが必要である。マテリアルの作製に関しては、今のところ順調に進んでいると考えられ、IPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスにおけるHBV感染の樹立が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS Pathog.* 2014 Oct 23;10(10):e1004417. doi: 10.1371/journal.ppat.1004417. eCollection 2014 Oct.
2. Kato H and Fujita T Autoimmunity caused by

constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Aug 19

3. ○Yoo JS, Kato H, Fujita T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Jun 23;20C:131-138. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.011. [Epub ahead of print] Review.

#### 2. 学会発表

I) Symposium: The 62nd annual meeting of the Japanese society for virology

Location: Yokohama, Japan

Date: 2014/11/10-12

Title: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2

Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita

II) Symposium: The 62nd annual meeting of the Japanese society for virology

Location: Yokohama, Japan

Date: 2014/11/10-12

B型肝炎ウイルス(HBV)感染に対するI型インターフェロンの影響

池田宗太郎, 要祐喜, Yao Wan Ling, 覃勉, 大高木結媛, 加藤博己, 藤田尚志

III) Symposium: 2014 HBV international meeting

Location: UCLA, USA

Date: 2014/09/03-06

Title: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2

Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし