

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎の新規治療薬を開発するための
宿主の自然免疫系の解析に関する研究

H25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤田 尚志

平成26(2014)年5月

目次

・ 総括研究報告書	
B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究	1
藤田尚志	
・ 分担研究報告書	
抗ウイルス自然免疫応答促進による HBV 増殖制御	5
藤田尚志	
HBV 感染増殖によるインターフェロンシステム攪乱機構の解析	7
加藤 宣之	
HBV 感染複製細胞を用いたヒト肝細胞における自然免疫系の解析	13
土方 誠	
B型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響	17
松浦 善治	
<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> HBV 感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答の解析	21
柘植 雅貴	
HBV ジェノタイプ別 IFN シグナル阻害効果の検討	27
渡邊 綱正	
自然免疫を用いた HBV 感染細胞の排除に関する研究	33
水腰英四郎	
HBV に対する自然免疫応答の解析	37
竹原 徹郎	
HBV 感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給	41
斎藤 泉	
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	45
・ 研究成果の刊行物・別冊（別添）	49

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
総括研究報告書

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

研究代表者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：新規治療薬開発を目指した HBV と宿主の自然免疫応答に関する研究の初年度の研究報告である。それぞれの分担者は *in vitro* あるいは *in vivo* の HBV の増殖系を確立し、それらを用いて解析を開始している。HBV 感染によって自然免疫応答が誘導され、 α 型を含むインターフェロンの誘導、インターフェロン誘導遺伝子群の誘導が起きることが示されてきている。今後は自然免疫系の活性化の強化、さらには HBV がどのようにして自然免疫を逃れて増殖するのかについて解析を進める必要がある。また、斎藤のグループは shRNA を発現する遺伝子治療用の新世代アデノウイルスベクターを開発した。このベクターの *in vitro* あるいは *in vivo* での有効性の検証が今後の課題である。

研究分担者

藤田 尚志 京大ウイルス研・教授
加藤 宣之 岡山大・教授
土方 誠 京大ウイルス研・准教授
松浦 善治 阪大微研・教授
柘植 雅貴 広大・助教
渡邊 綱正 名古屋市大・講師
水腰英四郎 金沢大・准教授
竹原 徹郎 阪大・教授
斎藤 泉 東大医科研・教授

A．研究目的

(1)HBV は持続感染となった場合、完治させる治療法がなく、肝硬変、肝臓がんの原因となっており、新たな治療法の開発が期待されている。
(2)HBV はヒトの肝臓で増殖するが、感染の実験系が確立しておらず、抗ウイルス薬剤の効果を的確に検討する系の確立は重要である。
(3)ウイルスは免疫系を阻害することによりその存在を図っているが、その機構の解明は HBV に対する新たな治療法の開発に必須である。

以上の現状に鑑み、以下の目標を設定し、研究を開

始した。

(1)自然免疫は細胞に備わるウイルス増殖抑制機構であり、その活性化はウイルスの感染排除に重要と考えられるが HBV に対する自然免疫機構は解明が進んでおらず、その解明を行う。
(2)HBV による免疫系の阻害機構を解明し、新たな治療法の開発の基盤とする。
(3)複数のストラテジーによって HBV 感染の治療法の糸口を開発することにより、新たな薬剤の開発、遺伝子治療法の開発へつなげる。

B．研究方法

9つのグループによって研究を分担し、複数のストラテジーによるHBV治療法の開発を行う。

・研究代表者(藤田尚志)

(1)1.3 長 HBV ゲノムを肝細胞株に導入し、その増殖を再現する系を用い、HBV 増殖と自然免疫の関連を解析する。
(2)HBV 感染の受容体分子として報告されたヒト NTCP を肝細胞株に強制発現し、ウイルス粒子からの感染系を作り、HBV 増殖と自然免疫の関連を解析する。

・研究分担者(加藤宣之)

- (1)HBV 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養細胞を作製する。
- (2)インターフェロン産生に対する影響を解析できる HBV の細胞内増殖モデルの作成。

・研究分担者(土方誠)

- (1)ヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞を用いた HBV 感染系の立ち上げを行なう。
- (2)HBV 感受性の HuS-E/2 細胞を用いて HBV と自然免疫の関連を解析する。

・研究分担者(松浦善治)

- (1) HBV のコードする蛋白質によるインターフェロンの誘導の抑制の解析。
- (2) HBV コア蛋白質と相互作用する宿主因子の探索。
- (3) HBV による NK 細胞の活性を抑制の解析。

・研究分担者(柘植雅貴)

- (1)HBV genotype C 感染患者血清をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、HBV 持続感染マウスを作製する系を用いて HBV による宿主遺伝子発現への影響、特に免疫系の制御を行なう分子に注目して検討を行なう。

・研究分担者(渡邊綱正)

- (1)ヒト肝臓置換キメラマウスおよび初代ヒト肝細胞を用いて、HBV 遺伝子型ごとのウイルス複製効率の解析を行なう。
- (2)遺伝子型と病態の関連を解明する。

・研究分担者(水腰英四郎)

- (1)HBV 感染患者における樹状細胞 (DC) を plasmacytoid DC と myeloid DC に分離技術を確立して HBV 感染者と非感染者でその比較を行ない、慢性化の原因を解明する。

・研究分担者(竹原徹郎)

- (1) NK細胞のサブセット分類とその機能解析を行う。HBV感染者と非感染者でその比較を行ない慢性化の原因を解明し、それを基にした新たな治療法の

開発を行なう。

・研究分担者(斎藤泉)

- (1) HBV のコードする蛋白質を発現するアデノウイルスベクターの作製。自然免疫応答を増強するための、新規アデノウイルスベクターの開発を行なう。HBV 感染の遺伝子治療を目的とした shRNA 発現ベクターの構築を行なう。

(倫理面への配慮に関しては各分担研究の報告書に記載)

C . 研究結果

・研究代表者(藤田尚志)

- (1) 1.3 長 HBV ゲノムを肝細胞株に導入するとウイルス複製が起きることを確認した。ヒト NTCP を発現させた肝細胞では HBV 粒子を用いた感染が成立することを確認した。
- (2)上記の系で自然免疫応答に必要な分子をノックダウンするとウイルス増殖が増加すること、すなわちこれらの細胞では免疫応答が起きており、ウイルス増殖を抑制していることが強く示唆された。

・研究分担者(加藤宣之)

- (1)すでに作成している HBV 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養細胞を二重鎖 DNA で刺激をしたが、ウイルス蛋白質による刺激抑制は観察されなかった。

・研究分担者(土方誠)

- (1)ヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞は初代肝細胞と類似した性質を示すことが明らかとなった。
- (2)。HuS-E/2 細胞に NTCP を発現させた細胞は HBV 感染に有効であることが期待された。

・研究分担者(松浦善治)

- (1) HBV が複製している細胞の培養上清には NK 細胞の活性を抑制する液性因子が存在することが判明した。この因子はサイトカイン様の活性を示すことから今後新たな治療法の開発に関連させて研究を進めて行く。

・研究分担者(柘植雅貴)

(1)ヒト肝キメラマウスを用いた感染実験で、遺伝子発現プロファイルを解析した所、感染後8週で大きな発現変化が観察された。これらの発現とHBV複製の関連を今後解析して行く。

・研究分担者(渡邊綱正)

(1)ヒト肝キメラマウスより分離した初代(ヒト)肝細胞を用いてウイルス感染を行ない、ウイルス粒子からの感染、増殖を確認した。この系ではIFN-Iが誘導されること、その誘導の程度はウイルスの遺伝子型に依存することを見出した。

・研究分担者(水腰英四郎)

(1)HBV感染患者では樹状細胞(DC)の細胞表面マーカーの発現が異なることを見出した。この結果は細胞表面マーカーの発現を指標に治療のストラテジーが組める可能性を示している。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1)HBV感染者のNK細胞の解析により、高ウイルス群ではNK細胞の低下が見られた。またNK細胞が亜型に分類され、ウイルスDNA量との関連が見出されることが判明した。これらの機能とB型肝炎の慢性化の関連を今後、追求する。

・研究分担者(斎藤泉)

(1)HBVに対する有用性の高いshRNAを同定し、その発現ウイルスベクターを作成した。HBVゲノム複製検出系と組み合わせることによって今後これらの治療

への有用性を検証する。

D. 考察

各分担研究者によってHBV感染・複製のための系が樹立されている。HBV感染と自然免疫応答の誘導、その機構の解明が今後の課題である。HBV感染は自然免疫応答を誘導しながら増殖していることが示唆されており、HBVがどのように免疫応答を乗り越えているのか今後の課題である。

E. 結論

核研究グループで研究の基礎の系が確立し、実際にHBV感染実験結果が得られてきている。着実に研究が進行していると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照。

2. 学会発表

分担者の学会発表リストを参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

分担者の特許リストを参照。

2. 実用新案登録

分担者の登録リストを参照。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

抗ウイルス自然免疫応答促進によるHBV増殖制御

分担研究者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：HBVと宿主の自然免疫応答に注目し、免疫の誘導とウイルスによるその阻害を標的として治療法を開発することを目的とした。肝培養細胞にHBVゲノムを導入し、コア蛋白質の発現、cccDNAの形成が認められ、ウイルス複製が確認された。またHBV受容体として報告されたNTCPを強制発現することで肝細胞株でHBV感染および増殖が起きるようになることを確認した。これらの細胞では宿主の自然免疫応答が誘導され、ウイルスの増殖が一部抑制されていることが示唆された。

A．研究目的

HBVの治療効果向上を目的とする。本研究では特に感染初期に稼働する宿主の自然免疫応答に焦点を当てる。宿主の免疫の誘導とウイルスによる阻害を標的とした治療法を開発する。ウイルスは宿主と共に進化を遂げ、野外株ウイルスは免疫機構を回避する方法を獲得してその存在を保全している。HBVの免疫回避機構を明らかにすることは、ウイルスの増殖を制御して治療する上で必須である。

B．研究方法

H24-26年度においては、HBVの誘導する自然免疫応答および主要な免疫阻害機構を明らかにすることを目指した。細胞培養系を用いたシステムを構築した。このような実験は組換えHBVウイルスを産生する実験となるため、組換えDNAの大臣確認実験実施の認可を得た。1.3長HBVゲノムを安定に発現する肝細胞株でのHBV複製の確認を行なった。

HBVの吸着、侵入のための受容体として報告された、ヒトSodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)を発現する

細胞を作製し、そこでのHBV粒子からの感染、増殖を検討した。(倫理面への配慮)培養細胞を用いた研究であるため倫理面での問題はない。ヒトNTCPを肝臓で発現するトランスジェニックマウスを用いた感染実験を計画した。この実験のため、新たな組換えDNAの大臣確認実験実施の許可の申請を行なった。肝臓特異的なプロモーターの制御下でNTCPを発現する遺伝子の構築を終了した。

C．研究結果

1.3長HBVゲノムを安定に発現する肝細胞株ではコア蛋白質、cccDNAの検出に成功し、ウイルスの複製が起っていることが明らかとなった。また、この細胞で細胞質ウイルスRNAセンサーであるRIG-Iのシグナルに関与する分子をノックダウンするとウイルスの増殖が増加することが判明した。

NTCPの発現ベクターを肝培養細胞株に導入し、NTCPの発現を特異抗体ならびにGFPの蛍光によって確認した。GFP-NTCP融合蛋白質を安定に発現する培養細胞株を樹立、その細胞で患者血清由来のHBV粒子からの

感染、増殖を確認した。

D. 考察

HBV の増殖、ならびに粒子からの感染増殖系を培養細胞で立ち上げることができた。自然免疫の制御因子のノックアウトで HBV の増殖が増加したことは HBV が自然免疫応答を誘導し、それにより増殖制御を受けていることを示している。自然免疫応答の強化によりウイルスの人為的な制御の可能性が示唆される。培養細胞を用いた実験結果からは NTCP を肝臓で発現するマウスが HBV 感染動物モデルとして有用である可能性が示唆される。また自然免疫応答の不全なノックアウトマウスとの掛け合わせにより HBV の増殖する動物モデルの作成の可能性が示唆される。

E. 結論

HBV の増殖を培養細胞レベルで再現する系を立ち上げることが出来、動物感染モデルの作成が進行中である。従来明確でなかった、HBV と自然免疫応答の関連が明らかになりつつあり、次段階としては免疫の強化とウイルスによる障害機構の解明を通して新たな治療法の開発を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0089869

2. 学会発表

1) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において α 型および β 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸 2013 年

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（平成25年度）

HBV感染増殖によるインターフェロンシステム攪乱機構の解析

研究分担者 加藤 宣之 岡山大学 教授
研究協力者 團迫 浩方 岡山大学 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の感染増殖によりインターフェロン（IFN）応答性やIFNの産生システムがどのような影響を受けるかを明らかにすること、さらには、どのHBVタンパク質がどのような分子機序により免疫応答阻害を引き起こすかを明らかにすることを目的とした。今年度は、前年度に作成したHBVの細胞内増殖モデルシステムや各種HBVタンパク質を恒常的に発現する各種ヒト培養細胞を用いて、以下に示すような成果を得た。（1）細胞内二本鎖DNAの認識に関与する宿主因子として最近同定されたcyclic GMP-AMP synthase（cGAS）がHBVのゲノムDNAを認識することが示唆された。（2）遺伝子型Cの各HBVタンパク質に細胞内二本鎖DNAにより誘導されるIFN産生を抑制する活性は認められなかった。

A . 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) による感染症は、患者数も多く、慢性肝炎、肝硬変および肝癌などの重篤な病態の原因になっている。C型肝炎ではインターフェロン (IFN) 治療が改良され、治癒率も70%以上になることが期待されているものの、B型肝炎でのIFN治療の成績は30%程度に留まっており、HBVはIFN治療に抵抗性を示す。また、ラミブジンやエンテカビルなどの核酸アナログ製剤は、HBVの増殖を抑えて肝炎を沈静化させることができるが、薬を中止するとほとんどの症例で肝炎が再燃するため、HBVの完全排除ができない状況にある。

本研究はHBVが宿主の自然免疫応答、特にIFN応答性やIFN産生システムにどのような影響を与えているか明らかにすることを目的としている。この目的を達成するために、前年度にHBVの細胞内増殖モデルシステムや各種HBVタンパク質を恒常的に発現する各種ヒト培養細胞を作成した。今年度はこれらのモデルシステムを使うことによりHBVがIFNシステムにどのような影響を与えてIFN治療に抵抗性を示すかを明らかにすることを目的とした。また、研究期間内にヒト培養細胞を用いたHBV感染増殖システムが開発された場合には、そのシステムを使用して解析を行う。これらの解析により、HBV感染症に対する新たな治療法や薬剤の開発を目指す。

B . 研究方法

(1) 細胞内のHBVゲノムDNAの認識機構の解析.

前年度、初代ヒト肝細胞、ヒト不死化肝細胞や肝がん細胞株のいずれもが、HBVの複製中間体である二本鎖DNAを模しているpoly (dA:dT)に反応してIFNの産生を誘導することが分かった。そのため、このHBVの細胞内増殖モデルシステムはpoly (dA:dT)によるIFNの産生を抑制するHBVタンパク質の探索には有用であるものの、細胞内のHBVゲノムDNAの認識に関わる宿主因子の探索には労力を要することが予想される。そこで、本年度は、poly (dA:dT)とは配列や三次構造が異なる人工二本鎖DNA : poly (dG:dC)によるIFN産生誘導能を指標として、HBVゲノムDNAの認識に関わる宿主因子の探索に利用できる細胞をさらに絞り込むことを試みた。

ヒト不死化肝細胞であるPH5CH8細胞は二本鎖RNAの認識に重要なRIG-I経路やTLR3経路が機能しており、自然免疫応答が正常肝細胞に近いことが知られている。そこで、PH5CH8細胞に、poly (dG:dC)を導入し、IFN-betaやIFN誘導遺伝子群 (OAS1、IRF7、ISG15、ISG56およびIP-10)の発現誘導量を調べた。また、その他のヒト不死化肝細胞(NKNT-3とOUMS29)や肝がん細胞株 (HuH-7、Li23、HepG2、PLC/PRF/5、HT17およびHLE細胞)にも同様に、poly (dG:dC)を導入し、IFN産生能を調べた。さらに、HBVのゲノム配列を持つ二本鎖DNAも人工的に作成し、同様に細胞内に導入後、IFN産生能を調べた。poly (dG:dC)を含む人工二本鎖DNAの導入には、Lipofectamine2000を用い、細胞内に導入6時間後の細胞から、全RNAを抽出した。IFN-betaやISG56などのIFN誘導遺伝子群のmRNA量はリアルタイムPCR法により定量的に測定した。

上記の実験により、細胞間でpoly (dG:dC)に対するIFN産生能に違いが認められた場合には、当研究室の様々な肝由来の細胞株の遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイ解析したデータを用いて、poly (dG:dC)の認識に関与する宿主因子を比較し同定する。

(2) 二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する HBV の抑制機構の解析.

HBV のゲノム DNA 上には、S 抗原遺伝子 (preS1、preS2 と S 領域から成る)、C 抗原遺伝子 (preC と C 領域から成る)、X 抗原遺伝子及び P 抗原遺伝子に対応する 4 つの読み枠が存在する。S 抗原遺伝子からは 3 種類のウイルスタンパク質が産生される (preS1、preS2 と S 領域からは Large HBs タンパク質、preS2 と S 領域からは Middle HBs タンパク質、S 領域からは Small HBs タンパク質)。また、C 抗原遺伝子からは 2 種類のウイルスタンパク質が産生される (preC と C 領域からは HBe タンパク質、C 領域からは HBc タンパク質)。その他、X 抗原遺伝子から産生される HBx タンパク質と P 抗原遺伝子から産生される DNA ポリメラーゼを含め計 7 種類のウイルスタンパク質が最終的に翻訳される。前年度、作成した HBs タンパク質 (Small、Middle 及び Large)、HBe タンパク質、HBc タンパク質、HBx タンパク質あるいは DNA ポリメラーゼを恒常的に発現するヒト培養細胞を用いて、細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する HBV タンパク質が存在するかどうかを調べた。

各種 HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞に、人工二本鎖 DNA を導入後、IFN 産生能に対する影響を調べた。人工二本鎖 DNA の導入には、Lipofectamine2000 を用い、細胞内に導入 6 時間後の細胞から、全 RNA を抽出した。IFN-beta や ISG56 などの IFN 誘導遺伝子群の mRNA 量はリアルタイム PCR 法により定量的に測定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

(1) 細胞内の HBV ゲノム DNA の認識機構の解析.

最初に、poly (dA:dT) とは配列や高次構造が異なる poly (dG:dC) をトランスフェクションにより PH5CH8 細胞に導入した。しかしながら、IFN-beta や IFN 誘導遺伝子群 (OAS1、IRF7、ISG15、ISG56 および IP-10) の発現が誘導されなかった。そこで、その他のヒト不死化肝細胞 (NKNT-3 と OUMS29 細胞) や肝がん細胞株 (HuH-7、Li23、HepG2、PLC/PRF/5、HT17 及び HLE 細胞) に poly (dG:dC) を導入し同様に解析した。その結果、NKNT-3 と Li23 細胞でのみ ISG56 の発現が誘導されることが分かった。

このような現象の違いを引き起こす原因を探るために、次に、様々な肝由来の細胞株の遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイ解析したデータ (当該研究室独自で実施し保有しているデータ) を用いて、これまでに外来二本鎖 DNA の認識に関与すると報告されている宿主因子のシグナル強度を比較した。その結果、NKNT-3 と Li23 細胞でのみ、細胞内二本鎖 DNA を認識する宿主因子として最近同定された cGAS のシグナル強度が高いことが分かった。そこで、これらの細胞の cGAS の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により定量的に測定した。その結果、マイクロアレイ解析で得られた結果と

同様の結果が得られた。また、初代ヒト肝細胞やヒト肝臓から得られた全 RNA においても、cGAS の発現を確認できたことから、正常肝細胞でも cGAS は機能しているものと思われる。一方、cGAS をノックダウンした Li23 細胞では、poly(dG:dC)だけではなく、人工的に合成した HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA に対する応答性も抑制されていることが分かった。従って、cGAS が HBV のゲノム DNA も認識できると予想された。

(2) 二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する HBV の抑制機構の解析。

HBs タンパク質(Small、Middle 及び Large)、HBe タンパク質、HBc タンパク質、HBx タンパク質あるいは DNA ポリメラーゼを恒常的に発現する Li23 細胞を用いて、HBV タンパク質が細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する機能を有するかどうかを調べた。

これらの細胞に、Lipofectamine2000 を用いて、poly (dG:dC)を導入 6 時間後の細胞から、全 RNA を抽出し、ISG56 の mRNA 量を定量的に測定した。しかしながら、いずれの HBV タンパク質を発現している細胞においても poly(dG:dC)による ISG56 の誘導抑制は認められなかった。

D. 考察

(1) 細胞内の HBV ゲノム DNA の認識機構の解析。

今年度、当研究室が所有する様々な肝がん細胞株やヒト不死化肝細胞株に、poly (dA:dT)とは配列や高次構造が異なる人工二本鎖 DNA である poly (dG:dC)を導入したところ、Li23(肝がん細胞株)と NKNT-3(ヒト不死化肝細胞株)の 2 種類の岡山大学オリジナル細胞で IFN 応答性を示した。Li23 細胞は poly (dG:dC)だけでなく、HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA に対しても IFN 応答性を示したことから、最近、細胞内二本鎖 DNA の認識に関与する宿主因子として同定された cGAS が関与していることが示唆された。cGAS は、単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスといった DNA ウイルスの感染認識に関与していることが報告されている。HBV もこれらのウイルスと同じ DNA ウイルスに属していることから、今年度得られた実験結果は HBV の感染認識に cGAS が関与していることを示している。しかしながら、今年度、使用した HBV のゲノム配列を持つ二本鎖 DNA は人工的なものであるため、次年度は、Li23 細胞に感染性 HBV 粒子を感染させる実験系を用いる予定である。現在、使用可能な HBV 複製細胞は感染性 HBV 粒子の産生量が低いため、培養上清を濃縮し、HBV の感染実験に供する必要がある。また、ヒト培養細胞を用いたより効率の良い HBV 感染増殖システムが開発された場合には、そのシステムを使用して解析を行う予定である。

(2) 二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する HBV の抑制機構の解析。

今年度の実験においては、HBV タンパク質に細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する活性は認められなかった。しかしながら、今回使用した HBV タンパク質は、いずれも遺伝子型 C に属する特定のウイルス株由来の物であった。そのため、次年度は、別のウイルス株や遺伝子型 C 以外ウイルス株由来の各種 HBV タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞を作成してさらに検討を加える予定である。

また、HBV タンパク質単独では、細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する抑制効果を示さない可能性もある。そこで、次年度は、現在、当該研究室で使用可能な HBV 複製細胞株を用いて、細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生に対する抑制効果の有無を調べる予定である。

E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。(1)細胞内二本鎖 DNA の認識に関与する宿主因子として最近同定された cGAS が HBV のゲノム DNA を認識することが示唆された。(2)遺伝子型 C の各 HBV タンパク質に細胞内二本鎖 DNA により誘導される IFN 産生を抑制する活性は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. PLoS One. 9, e91156 (2014).
- 2) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. Biochem. Biophys. Res. Commun., in press (2014).
- 3) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. Hepatology, 58:1236-1244 (2013).
- 4) Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. PLoS Pathogens, 9, e1003345 (2013).

2. 学会発表

- 1) 團迫 浩方、佐藤 伸哉、溝上 雅史、池田 正徳、加藤 宣之. B 型肝炎ウイルスの自然免疫応答モデルの構築. 第 28 回 中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月.
- 2) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、佐藤 伸哉、團迫 浩方、加藤 宣之. 肝細胞株における HBV 複製能の評価. 第 28 回 中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月.
- 3) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、團迫 浩方、加藤 宣之. HBV 複製系の開発に向けた肝細胞株の選択. 第 17 回日本肝臓学会大会(JDDW)、東京、2013 年 10 月.
- 4) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之. ヒト肝細胞株における HBV 複製能の評価. 第 61 回 日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月.
- 5) 奥村 暢章、池田 正徳、武田 緑、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之. HBV 持続感染培養系の確立に向けたヒト肝細胞株の HBV 複製能の解析. 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

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（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

分担研究者：土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題：HBV感染複製細胞を用いたヒト肝細胞における自然免疫系の解析

研究要旨：ヒト肝細胞におけるHBVに対する自然免疫応答機構を明らかにし、これを利用したHBV感染増殖抑制方法を開発する目的で、本年度はHBV感染増殖を検出する事が可能であり、本来のヒト肝細胞に近い自然免疫機構を有する培養細胞を用いてHBVのインターフェロン（IFN）感受性の検討をおこなった。まず当研究室で独自に樹立した不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞のIFN誘導について検討した。近年ヒト肝細胞の自然免疫反応重要な役割を果たすことが報告されているIII型IFN（IFN- λ ）のウイルス感染初期の機能について解析し、以下の結果を得た。ヒト肝細胞ではRNAウイルスの感染によってI型IFNとIII型IFNが協調的に誘導され、長期的な誘導は主としてIII型IFNであることが明らかとなった。また、HuS-E/2細胞に遺伝子型CのHBV遺伝子を含むプラスミドを導入したところ、長期間、HBV遺伝子が複製し、培養上清にHBV粒子を産生することを示唆する結果を得た。この細胞をIFN- α あるいはIFN- λ で処理することで有意に培養上清中のHBV DNAが現象したことから、INF処理はヒト肝細胞で複製するHBVを直接抑制する可能性が考えられ、このIFNによる効果を高める事がHBV治療に有用であることが考えられた。

A. 研究目的

当研究室で独自に樹立し、初代培養ヒト肝細胞に類似した性質を有するヒト不死化肝細胞HuS-E/2細胞を用いて、B型肝炎ウイルス(HBV)の生活環を効率良く再現し、この培養細胞系を用いてHBV感染増殖を抑制する自然免疫機構を明らかにすることを第一の目的とした。第二の目的として、その自然免疫系を活性化することにより、HBV感染増殖を抑制する抗HBV薬候補を同定しすることを目的とした。

B. 研究方法

1) HBV感染の宿主細胞であるヒト肝細胞の自然免疫システムを包括的に解明するため、独自に樹立したヒト不死化肝細胞HuS-E/2細胞の自然免疫系について解析した。これまでに、初代培養ヒト肝細胞(PHH)とHuS-E/2細胞ではウイルス非感染状態でIRF7とIFN α 1が共通して発現していることを見出していたので、特にIFN α 1のウイルス感染に対する役割を解析した。ウイルス非感染

の HuS-E/2 細胞を IFN α 中和抗体あるいは IFN 受容体に対する中和抗体で前処理してセンダイウイルス等感染させ、感染後の自然免疫系の誘導ならびにウイルスの感染増殖を解析した。また、この時、誘導される IFN λ について、IFN α との相互作用について検討をおこなった。

2) IFN の HBV 増殖に対する効果を検証するため、遺伝子型 D の HBV ゲノムが恒常的にトランスフェクションされている HepG2.2.15.7 細胞ならびに 1.24 倍長の遺伝子型 C の HBV ゲノムを含むプラスミドを一過性にトランスフェクションした HuS-E/2 細胞を IFN α あるいは IFN λ で処理し、HuS-E/2 細胞における HBV 遺伝子複製の確認ならびに培養液中への HBV DNA 放出量の定量による HBV 増殖に対する IFN の効果を検討した。

3) HuS-E/2 細胞に恒常的に HBV 受容体分子、NTCP を発現させることを目的として、京都大学ウイルス研究所の藤田尚志教授より、NTCP-tGFP 発現プラスミドを供与していただき、このプラスミドを恒常的に導入した HuS-E/2 細胞の作成をおこなった。

(倫理面への配慮)

ヒト不死化肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1) ウイルス非感染の HuS-E/2 細胞を IFN α 中和抗体あるいは IFN 受容体に対する中和抗体で前処理することで恒常発現している IFN α 1 の効果を抑制することができた。その後、センダイウイルス等感染させると前処理しない細胞では、ウイルス感染によって、RIG-I や IRF7 などの遺伝子発現が誘導されるが、前処理によってその発現が抑制あるいは遅延することがわかった。また、ウイルスの増殖が前処理によって亢進されることも明らかになった。前処理無しの HuS-E/2 細胞において、ウイルス感染により I 型 IFN と III 型 IFN が誘導された。I 型 IFN と III 型 IFN はそれぞれ細胞膜上の受容体が異なることが知られているが、IFN 刺激により誘導される遺伝子群は共通するものが多いことが知られている。そこで III 型 IFN 受容体の発現を siRNA で抑制することで、ウイルス感染初期のヒト肝細胞における I 型 IFN と III 型 IFN の役割についても解析をおこなった。その結果、この細胞では I 型 IFN と III 型 IFN が協調して、抗ウイルス自然免疫効果を誘導していることがわかった。

2) HepG2.2.15.7 細胞を IFN α あるいは IFN λ で処理し、その培養上清中の HBV DNA 量の経時変化を測定したところ、IFN α は比較的高い力価による処理でもほとんど影響がなかった。IFN λ による処理もあまり効果的ではなかったが比較的高い処理力価の場合に培養上清中の HBV DNA の低下が認められた。一方、一過性に HBV ゲノムをトランスフェクションした HuS-E/2 細胞を同様

に処理した場合は、IFN α 処理でも IFN λ 処理でも処理後 3 日には培養上清中の HBV DNA が 10 分の 1 程度に低下することがわかった。

3) HuS-E/2 細胞に NTCP-tGFP 発現プラスミドを導入し、薬剤選択によりクローンを 23 クローン 得た。tGFP の蛍光を指標にして、発現が蛍光顕微鏡下で観察する事が可能なクローンを選択した。次にこれらのクローンにおけるタンパク質発現をイムノプロット法で検証した結果、おそらく糖鎖 修飾を受けた NTCP-tGFP タンパク質が強く発現している細胞 2 クローンを得た。

D. 考察

これまで HuS-E/2 細胞は PHH と非常に類似した遺伝子発現様式を示していることがわかってきた。そこでこの細胞は PHH 同様の抗ウイルス自然免疫機構を有し、PHH の代わりにウイルス感染と 宿主自然免疫系の解析に用いることが可能であると考えられた。PHH ならびに HuS-E/2 細胞では ウイルス非感染時に極低レベルの IFN α 1 の発現があるが、この活性を低下させることでウイルス感 染後の自然免疫系の低下や遅延を引き起こすことは、この恒常発現 IFN α 1 がヒト肝細胞における抗 ウイルス機能として役立っていることを示すものと考えられる。また、その時、効率的な抗ウイル ス効果を誘導するためには I 型 IFN と III 型 IFN の協調的な作用が機能している可能性が考えら れた。本研究結果から、HuS-E/2 細胞で複製し粒子を産生していると考えられる組換え体 HBV は、 I 型 IFN も III 型 IFN 処理でも有効に抑制されることから、これらの抗ウイルス効果は直接ウイル ス感染細胞に働き、少なくとも HBV 粒子の培地への産生を抑制する働きがあることがわかった。 今後、各 IFN が実際に HBV 増殖のどの過程を抑制するのか、またその効果を高めるためにはどの ような方法が最適であるかなど検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

HuS-E/2 細胞は、特に自然免疫系が PHH と比較的類似した細胞であることから、今後、HBV 感 染増殖によって誘導される自然免疫系の解析に有用である事がわかった。このことは、これまでの HBV 培養系ではみることの出来なかった自然免疫関連の薬剤のスクリーニングや評価に用いるこ とが可能であることを示している。現在得られている HBV 受容体因子 NTCP 発現 HuS-E/2 細胞は 今後の HBV 研究や抗 HBV 薬開発に有用であると期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0089869

2. 学会発表

- 2) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において 型および 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会 学術集会 平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸 2013 年

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

- 1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方 誠、肝炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日

2. 実用新案登録

3. その他

- 1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、膵臓由来体性幹細胞の製造方法、PCT/JP2013/074026、出願日 2013/09/06
- 2) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腎臓由来体性幹細胞の製造方法、PCT/JP2013/074028、出願日 2013/09/06
- 3) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腸上皮由来体性幹細胞の製造方法、PCT/JP2013/074032、出願日 2013/09/06

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
B 型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究
分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス複製に対する宿主免疫応答の影響

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨： Natural Killer (NK)細胞は自然免疫系において重要な働きを担っている。HBV 複製細胞株と健常人末梢血由来の NK 細胞を共培養し、HBV 感染によって NK 細胞の活性が樹状細胞を介さずに直接低下していることを明らかにした。さらに、HBV 感染細胞との共培養による NK 細胞の抑制は、IL12 の投与によって回復し、HBV に対する抗ウイルス活性も上昇した。今後、HBV 感染時に NK 活性を抑制する因子の同定を進め、これらの宿主因子を標的として、宿主免疫を賦活化させることで HBV を排除できる新しい創薬の可能性を検討する。

A. 研究目的

B 型肝炎に対するインターフェロン (IFN)治療の奏効率は低く、標準治療である逆転写酵素阻害剤は、核内に存在する cccDNA には効果が無く、さらに一生涯に渡って服用する

必要がある。そのため、HBV 感染を根治するには、免疫応答に関わる新たな宿主因子の同定と、その分子を標的とした創薬が重要である。本研究では、HBV 感染における NK 細胞の活性抑制機構を明らかにすることによって、新たな治療標的を同定することを目的とした。

B. 研究方法

健常人から採取した NK 細胞を HBV 複製細胞と共培養し、HBV-DNA の複製能に与える影響を検討した。また、NK 細胞と HepG2/Huh7 細胞、及び HBV 複製細胞株である HepG2.2.15/T23/YE12 細胞を共培養し、IFN γ 500U/ml で刺激後、上清中の IFN γ を ELISA 法で定量した。また、HBV 感染細胞と共培養する NK 細胞に IL12 を添加し、IFN γ の産生能と HBV-DNA の複製への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HBV 持続複製細胞である HepG2.2.15、および、1.28 倍長の HBV-DNA を導入した Huh7 細胞において、NK 細胞との共培養により、HBV DNA の複製は有意に抑制された。また、HepG2/Huh7 細胞と共培養した NK 細胞に比べ、HepG2.2.15/T23/YE12 細胞と共培養した NK 細胞は、IFN γ 産生能が低下していた。1.28 倍長 HBV DNA 導入後の HepG2 細胞においても同様の結果であったが、各ウイルス蛋白質だけを発現させた HepG2 細胞との共培養では、NK 細胞の活性低下は認められなかった。HepG2.2.15/T23/YE12 細胞の上清で NK 細胞を培養しても、同様に IFN γ 産生能の低下を認めた。以上のことから、HBV 感染細胞は NK 細胞のサイトカイン産生能を抑制することが示唆された。また、IL12 を添加し、共培養することによって、NK 細胞の IFN γ の産生能が回復し、HBV に対する抗ウイルス活性が増強した。

D. 考察

HBV 感染に伴って、NK 細胞の活性が直接抑制されている可能性が示唆された。さらに、IL12 の添加により、NK 細胞の活性は回復したことから、IL12 の投与が NK 細胞を介した新たな治療標的になる可能性が示唆された。今後はその抑制機構の解明を検討する予定である。

E. 結論

HBV 感染細胞は、NK 細胞の活性化能を直接抑制する。

F. 健康危険情報

特になし。

研究発表

1. 論文発表

- 1 Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. J. Virol., 2013, 87, 489-502.

- 2 Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS. Pathog.*, 2013 (doi: 10.1371/journal.ppat.1003589).
- 3 Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, and Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110, 12379-12384.
- 4 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2013, 57, 1705-1715
- 5 Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, and Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol.*, 2013, 87, 9997-10003.
- 6 Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J. Proteome Res.*, 2013, 12, 2537-2551.
- 7 Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, and Kobayashi R. Ca (2+) /S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 2013, 33, 1008-1018.
- 8 Takei F, Tani H, Matsuura Y, and Nakatani K. Detection of hepatitis C virus by single-step hairpin primer RT-PCR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013 (doi: 10.1016/j.bmcl.2013.10.021).

2. 学会発表

1. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
2. Toru Okamoto, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, *Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics*, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
3. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links” Marsala, Italy, October 20th-21st, 2013.
4. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, Infectious diseases in elderly symposium, Izmir, Turkey, October 25th-29st, 2013.
5. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, November 16th-17st, 2013
6. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関与する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、12月9日、2013
7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru

Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.

10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
11. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
12. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
13. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
14. 山本聡美、福原崇介、塩川 舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、B 型肝炎ウイルスの増殖に関する宿主因子の解析、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

分担研究報告書（平成 25 年度）

in vitro、*in vivo* HBV 感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答の解析

分担研究者：氏名 柘植 雅貴

所属 広島大学自然科学研究支援開発センター・助教

研究要旨：

本研究では、HBV がヒトの生体内で免疫寛容を誘導し、持続感染を成立させるメカニズムを解明するため、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV の直接的な作用によるヒト肝細胞内遺伝子発現の変化を解析する。HBV 感染 3 日後、10 日後、8 週後の HBV 感染キメラマウス肝よりヒト肝細胞を採取。採取したヒト肝細胞内の total RNA を抽出後、次世代シーケンサー（Illumina HiSeq™ 2000）にて遺伝子発現プロファイルを作成した。HBV 感染 8 週間後のヒト肝細胞内では、137 遺伝子の発現亢進と 18 遺伝子の発現抑制が確認された。パスウェイ解析では、免疫応答に関連する複数のパスウェイが抽出され、HBV 感染に伴い、ヒト肝細胞内で免疫応答が惹起されていることが示された。発現亢進した上位 20 遺

伝子について、cDNA マイクとアレイデータと比較したところ、発現情報の得られた 16 遺伝子中 15 遺伝子において、再現性が確認でき、次世代シーケンサーの再現性が高いことが示された。現在、発現変化の大きかった上位遺伝子について、HBV 感染との関連性を検討中であり、メカニズムの解明により、新たな HBV 治療薬の開発の手掛かりとなりうると考える。

A. 研究目的

マウスの肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発により、B 型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染マウスの作製が可能となり、*in vitro* HBV 複製系とともに、HBV の感染・増殖メカニズムを解明するための有用な *in vivo* モデルとして注目されている。このヒト肝細胞キメラマウスは、90%以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換されており、免疫不全マウス由来であることから、HBV 感染後も肝炎の発症はなく、HBV が感染・増殖することにより、直接的にヒト肝細胞に及ぼす影響を解析することが可能である。

本研究では、HBV が感染した後に起こる肝細胞内の遺伝子変化を次世代シーケンサーを用いて解析し、HBV が免疫寛容を獲得し、持続感染を生じるメカニズムを解析する。さらに、これらの解析結果を以前に当研究室で行った cDNA マイクロアレイデータと比較し、本研究の再現性を確認する。

B. 研究方法

検討 1：HBV 感染マウスの作製と次世代シーケンサー解析

昨年度報告したように、90%以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスに HBV genotype C 感染患者血清を接種し、HBV 感染マウスを作製 (各群 N=4)。非感染マウスおよび HBV 感染 3 日後、10 日後、8 週後の HBV 感染マウスを sacrifice し、マウス肝組織より、ヒト肝細胞採取し、total RNA を抽出した。その後、mRNA の網羅的解析を行うため、ペアエンド法を用いた次世代シーケンサー (HiSeq2000) によるシーケンス解析を施行した。

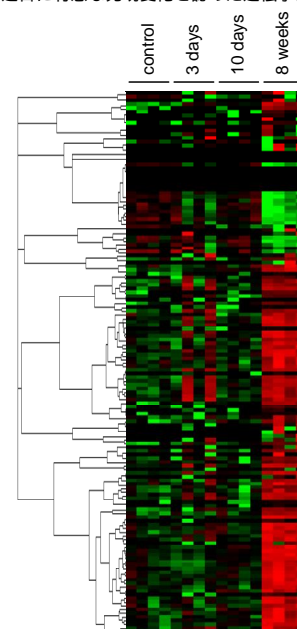
検討 2：次世代シーケンサーと cDNA マイクロアレイによる解析結果の比較

これまでに当研究室では、Agilent 社 Whole Human Genome 4x44K を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、HBV によるヒト肝細胞での遺伝子発現への影響について報告してきた。そこで、さらに高感度となった次世代シーケンサーによる解析結果との比較を行い、解析の再現性について検討した。

(倫理面への配慮)

患者血清の使用に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている。また、十分なインフォームドコンセントの後に患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。また、遺伝子組換え実験に関しては、当大学での機関承認実験 (24-137) および文部科学省での大臣確認実験 (23 受文科振第 2212 号、25 受文科振第

図1 . HBV感染8週目に有意な発現変化を認めた遺伝子によるクラスター解析



183号)として第二種使用等拡散防止措置確認を受け、研究を行っている。

C. 研究結果

検討1: HBV 感染マウスの作製と次世代シーケンサー解析

ヒト肝細胞キメラマウス 12 頭に対し、HBV 感染患者血清を接種したところ、感染 10 日後、8 週後のマウス血中 HBV DNA 量は、それぞれ 5 Log copies/ml、10 Log copies/ml 程度にまで上昇し、キメラマウスへの HBV 感染が確認された。そこで、これらのマウス肝組織より、ヒト肝細胞を採取し、次世代シーケンサーにて網羅的遺伝子発現プロファイルの作成を行った。68,818 遺伝子の発現プロファイルより、非感染マウスと HBV 感染 8 週後のマウスとの 2 群間で、有意に発現が変化した遺伝子を抽出したところ、HBV 感染により有意に発現制御された遺伝子として、155 遺伝子 (発現亢進: 137、発現抑制: 18) が抽出された。

図 1 に示すように、155 遺伝子のクラスター解析では、非感染マウス、感染 10 日目のマウスに比して、8 週目のマウスにおいて遺伝子発現量が大きく変化していることが考えられた。一方、感染 3 日目のマウスでは、個体差が大きく、特徴的な発現変化は認められなかった。

そこで、これら 155 遺伝子が関与するパスウェイについて検討を行ったところ、表 1 に示すように、Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)や Toll receptor signaling pathway (P00054)といった免疫応答に関与するパスウェイが強く制御

表2 . HBV感染8週目に発現上昇を認めた上位20遺伝子

表1 . HBV感染により影響を受けるPathwayの解析
(analyzed by PANTHER)

Pathway	Numbers of genes	Ratio
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	7	5.10%
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway (P06664)	5	3.70%
Apoptosis signaling pathway (P00006)	4	2.90%
Integrin signalling pathway (P00034)	4	2.90%
p53 pathway (P00059)	3	2.20%
Huntington disease (P00029)	2	1.50%
Toll receptor signaling pathway (P00054)	2	1.50%
T cell activation (P00053)	2	1.50%
Angiogenesis (P00005)	1	0.70%
Interleukin signaling pathway (P00036)	1	0.70%
Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	1	0.70%
Interferon-gamma signaling pathway (P00035)	1	0.70%
Nicotine degradation (P05914)	1	0.70%
Dopamine receptor mediated signaling pathway (P05912)	1	0.70%
p53 pathway by glucose deprivation (P04397)	1	0.70%
Parkinson disease (P00049)	1	0.70%
PDGF signaling pathway (P00047)	1	0.70%
Nicotine pharmacodynamics pathway (P06587)	1	0.70%
Notch signaling pathway (P00045)	1	0.70%
B cell activation (P00010)	1	0.70%
Fructose galactose metabolism (P02744)	1	0.70%
Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)	1	0.70%
Glycolysis (P00024)	1	0.70%
General transcription regulation (P00023)	1	0.70%
TGF-beta signaling pathway (P00052)	1	0.70%
Ascorbate degradation (P02729)	1	0.70%
TCA cycle (P00051)	1	0.70%

Total genes: 136 genes, Pathway hits: 48

Gene symbol	chr	Gene expression		Ratio (HBV_8w/Control)	マイクロアレイデータ
		control	HBV_8w		
Gene 1	chr4	0.15	69.99	439.59	Undet.
Gene 2	chr17	0.17	70.33	418.77	6.00
Gene 3	chr4	0.06	9.77	171.25	11.73
Gene 4	chr15	0.06	6.47	114.56	5.98
Gene 5	chr2	0.84	51.88	82.14	4.30
Gene 6	chr1	0.01	1.06	81.57	Undet.
Gene 7	chr11	0.67	28.15	57.28	4.49
Gene 8	chr1	0.02	2.10	33.82	Undet.
Gene 9	chr11	1.62	43.21	24.25	1.78
Gene 10	chr11	0.03	1.08	23.10	3.08
Gene 11	chr9	0.06	2.05	22.32	3.28
Gene 12	chr1	0.35	5.59	15.45	1.59
Gene 13	chr1	0.24	2.59	14.03	0.56
Gene 14	chr9	0.04	0.49	13.93	7.64
Gene 15	chr11	8.51	99.56	12.55	3.81
Gene 16	chr11	0.04	0.50	11.88	Undet.
Gene 17	chr14	0.19	2.30	11.16	2.63
Gene 18	chr5	0.28	3.06	10.56	1.53
Gene 19	chr8	0.17	1.73	10.20	8.98
Gene 20	chr19	2.31	22.81	10.06	4.76

されていることが示された。

検討2: 次世代シーケンサーと cDNA マイクロアレイによる解析結果の比較

以前、当研究室では、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV 感染に伴うヒト肝細胞内の遺伝子発現変化について報告した (Tsuge M, et al. Journal of Infectious Diseases, 2011)。そこで、本研究で施行した次世代シーケンサーの結果と cDNA マイクロアレイの結果を比較し、再現性を確認した。次世代シーケンサー解析にて発現亢進が認められた上位 20 遺伝子について、比較を行ったところ、発現プロファイルが確認可能であった 16 遺伝子中 15 遺伝子は cDNA マイクロアレイにおいても発現亢進が確認された (表 2)。

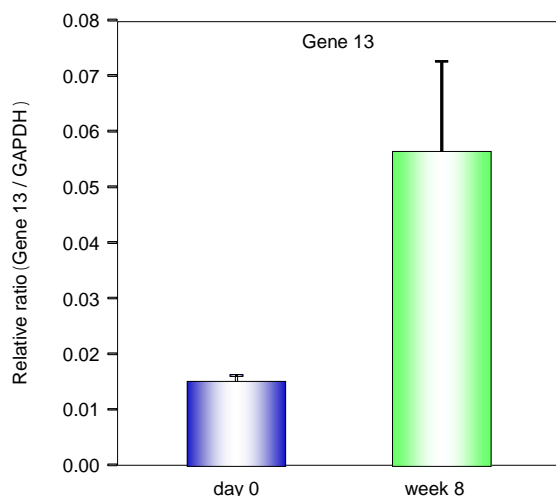
遺伝子 13 のみ、cDNA マイクロアレイによる再現性が確認できなかったため、リアルタ

イム PCR にて mRNA 発現を確認した結果、次世代シーケンサーの結果と同様、有意な発現亢進が確認された（図 2）。

D. 考察

本研究は、HBV 感染に伴うヒト肝細胞の遺伝子発現変化について、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて行った。ヒト肝細胞キメラマウスは、免疫不全マウス由来であることから、HBV 感染に伴う肝炎の発症はなく、肝細胞内の遺伝子発現変化を観察することにより、HBV 感染に伴う直接的なヒト肝細胞への影響を観察することが可能と考えられる。今回行った次世代シーケンサー解析の結果、ヒト肝細胞では、HBV 感染に伴い、155 の遺伝子が発現制御された。特に、パスウェイ解析の結果（表 1）に見られるように、ヒト肝細胞内では、Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)や Toll receptor signaling pathway (P00054)といった免疫応答に関与するパスウェイが強く影響を受けており、ヒト肝細胞内において複雑な免疫反応が生じていると考えられた。

図2 . real time PCRによるヒト肝細胞内の遺伝子発現確認



一方、次世代シーケンサーより得られた遺伝子発現プロファイル解析により、有意に発現亢進した上位 20 遺伝子について、cDNA マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現プロファイルと比較したところ、20 遺伝子中 15 遺伝子において、同様の発現亢進が確認された。一方で、4 遺伝子においては、cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現が確認できなかった。これらの遺伝子は、低発現量であるために cDNA マイクロアレイでは検出できなかった可能性もあり、次世代シーケンサーがより高感度に遺伝子発現変化を検出できる可能性を示しているものと考えられた。また、次世代シーケンサーと cDNA マイクロアレイの結果が相反した gene 13 においても、real time PCR の結果、次世代シーケンサーの結果を再現した結果であり、次世代シーケンサーの再現性の高さを示した結果となった。

現在、次世代シーケンサーにて抽出された遺伝子に関し、HBV 増殖との関連性を解析中であり、今後、HBV が肝細胞内での免疫応答を回避するメカニズムの解明を目指す予定である。

E. 結論

HBV 感染後、HBV の直接的な作用により、ヒト肝細胞内で多くの遺伝子、特に免疫応答に関与する遺伝子が発現制御されていることが示された。抽出された遺伝子の中には、HBV 感染との関連性が十分に明らかとなっていない遺伝子が多く含まれており、HBV 感染と遺伝子発現制御のメカニズムを解明することにより、新たな作用点からの HBV 治療の

開発が期待できる。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清およびマウス、培養細胞株を用いた検討であり、患者に健康被害を与える可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masaki K, Takaki S, Hyogo H, Kobayashi T, Fukuhara T, Naeshiro N, Honda Y, Nakahara T, Ohno A, Miyaki D, Murakami E, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Takahashi S, Arihiro K. and Chayama K, Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases. *Hepato Res*, 2013.
- 2) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H. and Chayama K, Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol*, 2013. 48(10): p. 1188-204.
- 3) Tsuge M and Chayama K, Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol*, 2013. 48(6): p. 779-80.
- 4) Naeshiro N, Kakizawa H, Aikata H, Kan H, Fujino H, Fukuhara T, Kobayashi T, Honda Y, Miyaki D, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Hyogo H, Ishikawa M, Awai K. and Chayama K, Percutaneous transvenous embolization for portosystemic shunts associated with encephalopathy: Long-term outcomes in 14 patients. *Hepato Res*, 2013.
- 5) Ohishi W, Cologne J.B, Fujiwara S, Suzuki G, Hayashi T, Niwa Y, Akahoshi M, Ueda K, Tsuge M and Chayama K, Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: A nested case-control study. *Int J Cancer*, 2013.
- 6) Arataki K, Hayes C.N, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W. and Chayama K, Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 2013. 85(5): p. 789-98.
- 7) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes C.N, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T. and Chayama K, A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013.
- 8) 柘植雅貴、茶山一彰「HBV の感染実験系」*Hepatology Practice* 第1巻 B型肝炎の診療を極める、文光堂、185-192、2013
- 9) 柘植雅貴、茶山一彰「B型肝炎、D型肝炎」カラー版 消化器病学、西村書店、1150-1155、2013

2. 学会発表

- 1) 占部綾子、柘植雅貴、茶山一彰「当院におけるB型急性肝炎の解析」第40回日本肝臓学会西部会 ワークショップ
- 2) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroyuki Ginba, Kazuhiro Matsuyama, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター

- 3) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ohno, Takashi Nakahara, Daiki Miki, Hiromi Abe, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama. Antiviral effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones and different susceptibility between HBV genotype A and C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 4) Nami Mori, Masataka Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Th1/2 ratio was associated with anti-viral effects of sequential therapy with lamivudine and interferon- α in HBe antigen-positive chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 5) 柘植 雅貴、村上英介、茶山一彰「薬剤耐性 HBV に対するテノホビルの抗ウイルス効果と genotype による相違」第 17 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション
- 6) 村上英介、柘植雅貴、菅 宏美、藤野初江、小林知樹、福原崇之、柁木慶一、大野敦司、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、占部綾子、横山聡栄、河岡友和、三木大樹、平賀伸彦、平松 憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における核酸アナログ製剤の治療効果の解析」第 17 回日本肝臓学会大会 ポスター
- 7) 柘植 雅貴、村上英介、平賀 伸彦、阿部弘美、今村 道雄、茶山 一彰「薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討と genotype による相違」第 9 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
- 8) 柘植雅貴、高橋祥一、茶山一彰「HBV 感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化」第 49 回日本肝臓学会総会 シンポジウム
- 9) 村上英介、柘植雅貴、平賀伸彦、阿部弘美、大野敦司、本田洋士、河岡友和、三木大樹、今村道雄、相方 浩、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰「薬剤耐性 B 型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果の検討」第 49 回日本肝臓学会総会 一般演題
- 10) 柘植雅貴、平賀伸彦、今村道雄、越智秀典、高橋祥一、茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV・HCV 感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子発現変化の解析」第 50 回日本臨床分子医学会 ポスター
- 11) 村上英介、柘植雅貴、大野敦司、本田洋士、河岡友和、三木大樹、平賀伸彦、今村道雄、相方 浩、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰「薬剤耐性 B 型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果と Genotype による相違の検討」第 99 回日本消化器病学会総会、一般演題
- 12) 柘植雅貴、森 奈美、村上英介、相坂康之、吉良臣介、河岡友和、高木慎太郎、平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「悪性腫瘍に対する化学療法施行により HBV 再活性化を来した 33 症例の検討」第 99 回日本消化器病学会総会、一般演題

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

分担研究者：渡邊綱正

分担研究課題：HBV ジェノタイプ別 IFN シグナル阻害効果の検討

研究要旨：我が国には従来存在するB型肝炎ウイルス(HBV)の主要な株である遺伝子型Bおよび遺伝子型Cに加えて最近増加傾向にある遺伝子型Aが存在する。HBV遺伝子型ごとに病態の違いや治療効果の差が報告されているが、昨年度、ヒト肝臓置換キメラマウスを用いた検討により *in vivo*における増殖能が遺伝子型によって異なることを明らかにした。本年度はこの差異を生じるメカニズムの1つとしてHBV感染により宿主肝細胞で誘導される自然免疫応答の差異に着目し検討を行った。HBVゲノム保有プラスミドを遺伝子導入する系と、初代ヒト肝細胞へHBVを感染させる系の2つの *in vitro*培養系を用いた検討から、HBV宿主肝細胞がインターフェロン 遺伝子発現を誘導すること、また誘導の強さはHBV遺伝子型によって異なることを明らかとした。

A. 研究目的

現在、我が国に存在する B 型肝炎ウイルス (HBV) は遺伝子型 B、遺伝子型 C のみではなく、若年者層を中心に遺伝子型 A も蔓延している。これまでに検討された HBV 遺伝子型による臨床的病態の差から、HBV 感染時の宿主応答も遺伝子型により異なることが予測される。昨年度までに、臨床サンプルから分離した異なる遺伝子型の HBV 全長配列 (遺伝子型 Ae、Bj、Ce、D) を発現するプラスミドを作成し、細胞培養を用いた評価系を確立した。本年度は、昨年度までの培養細胞系に加え、新たな細胞培養として初代ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系を使用し、HBV 遺伝子発現ならびに HBV 感染時における自然免疫応答の有無を明らかとし、感染ウイルスの遺伝子型に応じた治療法の開発を目的とした。

B. 研究方法

遺伝子導入: 遺伝子型 A、B、C、D をもとに作成した 1.24 倍長 HBV ゲノム保有プラスミド (pHBV/Ae-1.24, Bj-1.24, CAT-1.24, D60-1.24) を肝がん由来培養細胞株 HepG2 にトランスフェクションし、経時的に培養上清および細胞内 RNA を回収した。トランスフェクション試薬は Promega 社 FuGENE 6 を用いた。培養上清の HBs 抗原濃度を ELISA 法を用いて定量した。

初代ヒト肝細胞への HBV 感染: ヒト肝細胞置換キメラマウスから取得した初代ヒト肝細胞を 24-well マルチプレートで培養し、遺伝子型 C の HBV 含有血清を感染させた。感染条件は細胞あたり HBV ゲノム 5 コピーの感染源を 4% PEG8000 含有培地へ懸濁し、細胞へ 24 時間暴露させた。感染後培地で細胞を 3 回洗浄したのち経時的に培養上清および細胞内 RNA を回収し、上清中の HBs 抗原濃度を定量した。

HBV DNA、mRNA HBsAg の発現解析: 培養上清中の HBV DNA は G&E サイエンス社 SMITEST EX R&D を用いて抽出した。細胞内 RNA はニッポンジーン社 ISOGEN を用いて抽出した。DNA および RNA 量は定量 PCR 法 (TaqMan 法) により定量した。

サイトカイン遺伝子群の発現解析: 自然免疫関連サイトカインのうち各種インターフェロン (IFN) 遺伝子群 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ (1、2、3)、および炎症性サイトカイン IL-6、TNF の遺伝子発現を定量 PCR 法 (TaqMan 法) により測定した。同様に感染後経時的に各種インターフェロンおよび炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量 PCR 法により測定した。

なお、今回の検討ではインフォームドコンセントが取得された血液のみを取り扱い、使用にあたっては連結不可能匿名化を行うことで被験者のプライバシーは完全に保護した。本試験で結果を公表する際は、被験者・協力者を特定できる情報を含まないこととし、ヘルシンキ宣言の精神、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

C. 研究結果

HBV 遺伝子産物は HepG2 細胞の IFN- γ を誘導する

最初に、HBV 遺伝子産物が自然免疫応答を誘発するかどうか樹立肝がん細胞を用いて検討した。1.24 倍長 HBV ゲノム保有プラスミドを HepG2 細胞株へトランスフェクションすると、24 時間から 48 時間にかけて IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 遺伝子の発現が誘導された。誘導の強さは遺伝子型 B が最も強く、遺伝子型 A および C は中間的、遺伝子型 D が最も弱かった。一方 IFN- γ と TNF は弱く誘導されたが IFN- α や IL-6 は全く誘導を認めなかった。

初代ヒト肝細胞を利用した *in vitro* HBV 感染増殖系の検討

最近、ヒト肝細胞置換キメラマウスから取得した初代ヒト肝細胞をプレート上で培養する方法が確立された。最初に HBV 感染能とウイルス増殖の経時的推移について検討した。初代ヒト肝細胞を HBV 含有血清に暴露すると、24 時間後から暴露した細胞内で HBV mRNA が検出され、12 日目にかけて発現量が増大した。洗浄により感染源を除去した後に、培養上清中の HBsAg および HBV DNA レベルは徐々に上昇した。また、12 日目における蛍光免疫染色を行い、細胞内 HBsAg、HBcAg タンパクが検出され HBV 感染成立を確認した。さらに 12 日目の HBsAg および HBV DNA レベルは暴露したウイルス量を数倍上回っていることから、HBV が初代ヒト肝細胞内で複製していることが強く示唆された。一方、感染 52 日目に回収した培養上清を未処理の初代ヒト肝細胞に暴露すると同様に HBV 感染が成立することから、培養上清中に感染能を有するウイルス粒子 (Dane 粒子) が産生されていることが確認された。

次に初代ヒト肝細胞内における HBV の感染過程および複製過程について詳細に検討した。感染中和抗体である HBV 免疫ヒトグロブリン (HBIG) を感染源と混合した後細胞へ暴露すると、曝露後 52 日間にわたって培養上清中 HBsAg、HBV DNA とともに全く検出されず、初代ヒト肝細胞への HBV 感染は HBsAg を介することを確認した。HBV の複製は感染細胞の核内に存在する cccDNA から転写される鋳型 RNA (pgRNA) がコア粒子に取り込まれ、逆転写反応を経て rcDNA に変換する過程を含む。初代ヒト肝細胞に逆転写酵素阻害剤ラミブジンおよびテノホビルを添加すると、培養上清中 HBV DNA レベルは低下し、ウイルス粒子産生阻害を確認した。

以上の検討から、今回新たに応用した初代ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系は、ウイルス粒子の細胞への侵入、複製、感染性粒子形成を含む HBV 生活感を *in vitro* で再現できていることが示された。

HBV 感染は初代ヒト肝細胞の IFN- γ を誘導する

上述の初代ヒト肝細胞を用いて HBV 感染に伴う初期の細胞応答を検討した。HBV 遺伝子型 C の血清を感染させると、48 時間後に IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β の発現が誘導された。HepG2 細胞株の結果と同じく IFN- γ 、TNF の誘導は弱く IFN- α 、IL-6 はほとんど発現しなかった。

D. 考察

1.24 倍長 HBV ゲノムをトランスフェクションする方法により HepG2 細胞株で IFN- γ 遺伝子発現が誘導され IFN- α / β の誘導は弱いことを明らかとした。またヒト肝臓置換キメラマウスから取

得した初代ヒト肝細胞は HBV の特異的な細胞への侵入、逆転写過程を含むウイルス複製、感染性粒子形成までの HBV 生活感をすべて再現することを示した。さらに初代ヒト肝細胞においても HBV 感染が IFN- γ ではなく IFN- α を誘導することを明らかにした。

IFN 遺伝子誘導は感染細胞の Toll 様受容体群などの病原体センサーが HBV ゲノムから産生されるウイルス RNA あるいはタンパクを認識することによると考えられる。これらウイルス由来分子の産生量は遺伝子型により異なることをすでに我々は見いだしており、遺伝子型の違いによる IFN- α 応答の強弱に関連する可能性が示唆される。さらに、HBV に感染したヒト肝臓置換キメラマウスに対するペグインターフェロン (PEG-IFN) 投与の HBV 抑制効果は遺伝子型 A に比べて遺伝子型 C が強いことから、遺伝子型によってウイルス因子による IFN 応答阻害に差異がある可能性も示唆された。

今後、HBV 由来 RNA あるいはタンパクを認識する病原体センサーやそれらが認識するウイルス側の分子の同定、遺伝子型ごとの宿主肝細胞の IFN 応答の差異が HBV 由来因子の干渉に起因する可能性を探る。さらに宿主の自然免疫を修飾して HBV を制御する薬剤等の探索を目指す。

E. 結論

HBV 粒子産生プラスミドの遺伝子導入による細胞培養系、および初代ヒト肝細胞 *in vitro* 培養を用いて、HBV 感染により IFN- α が誘導されること、誘導の強さは HBV 遺伝子型によって異なることを明らかにした。

F. 研究発表

3. 論文発表

- 1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population. PLoS One. 2014. 9(1):e86007.
- 2) Watanabe T^{*}, Wong DK^{*}, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese. PLoS One, 2013. 8; e66920 (^{*}equal contributors)
- 3) Arata S, Nozaki A, Takizawa K, Kondo M, Morimoto M, Numata K, Hayashi S, Watanabe T, Tanaka Y, Tanaka K. Hepatic failure in pregnancy successfully treated by online hemodiafiltration: Chronic hepatitis B virus infection without viral genome mutation. Hepatol Res. 2013. 43(12):1356-60
- 4) Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. Journal of Viral Hepatitis. 2013. 20(4):e27-36

4. 学会発表

- 1) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Incomplete prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues using in vitro hepatitis B virus infection model. Mar. 12-15, Brisbane. 2014.
 - 2) Wong D, Watanabe T, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in the Chinese. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver. June 6-10, Singapore. 2013.
 - 3) 平嶋昇, 渡邊綱正, 岩瀬弘明. 当院における急性 B 型肝炎の臨床経過. 第40回日本肝臓学会西部会. 岐阜. 平成25年12月6日~7日.
 - 4) 飯尾悦子, 松居剛志, 狩野吉康, 村上周子, 新海登, 渡邊綱正, 城卓志, 田中靖人. 次世代シークエンサーを用いた B 型肝炎ウイルス Entecavir 耐性変異パターンの検討. 第40回日本肝臓学会西部会. 岐阜. 平成25年12月6日~7日.
 - 5) 戸塚雄一郎, 野崎昭人, 荒田慎寿, 羽尾義輝, 道端信貴, 石井寛裕, 近藤正晃, 福田浩之, 沼田和司, 田中克明, 渡邊綱正, 田中靖人, 前田慎. 妊娠を契機に重症化し, on-line hemodiafiltration により救命し得た B 型肝炎の1例. 第40回日本肝臓学会西部会. 岐阜. 平成25年12月6日~7日.
 - 6) 林佐奈衣, 村上周子, 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人. HBV Genotype F における肝細胞癌特異的ウイルス変異の同定. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 平成25年11月10日~12日.
4. 特許取得
 5. 実用新案登録
 6. その他

厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究平成25年度報告書

自然免疫を用いた HBV 感染細胞の排除に関する研究
-HBV 感染患者における樹状細胞の解析-

水腰英四郎 金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

研究要旨: B型肝炎ウイルス (HBV) 感染は、肝硬変・肝細胞癌などの重篤な病態の原因になっている点で、我が国の重要な感染症の1つである。HBV に対する治療薬としては、数種類の抗ウイルス薬が使用されているが、ウイルスの完全排除に至る確率は低く、新しい機序を持つ新薬の開発が必要である。HBV は宿主の免疫機構を回避する方法を獲得していることが報告されており、HBV の完全排除もしくは長期にわたる増殖抑制を目的とした治療法を開発するためには、そうした免疫抑制機構の基本的な動態を解明するとともに、そうした動態にある HBV に対して、どのような免疫が作

動しているかを明らかにして研究開発を行うことが必要である。本研究では、HBV 感染患者における樹状細胞の解析を行い、健常者と比較して低下している樹状細胞の遺伝子を同定する。また、こうした遺伝子の変化によって生じる樹状細胞の機能を明らかにするとともに、同機能を回復させることによる、新しい HBV 感染に対する治療方法の開発を行う。本年度はこれらの研究を遂行するために、健常者と HBV 感染患者の樹状細胞表面マーカーの測定と発現遺伝子解析を行った。

A. 研究目的

HBV 感染患者の樹状細胞(Dendritic cell; DC)において機能低下を来している分子を同定することにより、これらの分子の機能改善による HBV 感染症の新しい治療法を開発を行う。

B. 研究方法

はじめに、HBV 感染患者 58 例と健常者 19 例の末梢血単核球分画を採取し、フローサイトメーターを用いて樹状細胞の表面マーカーの発現レベルを測定した。樹状細胞の分離ははじめに SSC と FSC を用いた単核球分画を分離し、さらに Lineage 陰性・HLA-DR 陽性分画を抽出し、その後 CD123 陽性分画の plasmacytoid DC と CD11c 陽性分画の myeloid DC に分けて解析を行った。DC の細胞表面マーカーとしては各種抗体を用いて、CD80、CD83、CD86、CD40、CCR7 の発現レベルを測定した。

次に、58 例の HBV 感染患者の中から、肝機能が正常な HBV キャリアー 7 例、未治療の B 型慢性肝炎患者 6 例、核酸アナログ製剤による治療を受けている B 型慢性肝炎患者 12 例において、上記方法により DC を plasmacytoid DC と myeloid DC に分けて、それぞれソーティングし、分離した細胞から RNA の抽出を行った。抽出された RNA は cDNA に逆転写後、マイクロアレイ法にて発現遺伝子解析を行った。発現遺伝子解析

におけるチップには Affymetrix Human 133U Plus 2.0 を、解析ソフトには BRB-Array-Tool(NCBI)とパスウェイ解析には MetaCore™ (Thomson Reuters, NY, USA)を使用した。

また、樹状細胞機能を評価するためのツールとして、HBV 特異的 HLA-A24 拘束性細胞傷害性 T 細胞(CTL)エピトープの同定を試みた。具体的には HBV genotype C のアミノ酸配列を基に、コンピュータソフト(BIMAS)を用いて、エピトープの予測を行い、インターフェロン ELISPOT アッセイ法にて、HBV 感染患者末梢血リンパ球に高頻度に認識されるエピトープを同定した。最後に同エピトープに対する免疫反応と DC の表面マーカーの発現レベルとの関連性を検討した。

倫理面への配慮として、本研究では臨床研究・疫学研究・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守しており、本研究に関しては、研究施設内の倫理委員会として、医学倫理審査委員会の承認を取得した。

C. 研究結果

HBV 感染患者における DC の解析では、健常者と比べて、myeloid DC の数が減少していた。一方、plasmacytoid DC の数には有意な差は認められなかった。また、HBV 感染患者における DC では、健常者と比べて、myeloid DC における CD80、CD83、CD40、CCR7 の発現レベルが亢進していた。

各 DC サブセットにおける、発現遺伝子解析では、plasmacytoid DC、myeloid DC のいずれにおいても、各患者群の病態を全体の遺伝子を用いて群別することはできなかったが、 $p < 0.05$ でパスウェイ解析を行うことが可能であった。各患者群での発現遺伝子の差を検討したところ、未治療の B 型慢性肝炎患者では肝機能正常 HBV キャリアーと比較して、plasmacytoid DC で 3642 個の遺伝子、myeloid DC で 191 個の遺伝子の発現低下が認められた。同様に、核酸アナログ製剤による治療を受けている B 型慢性肝炎患者においても発現レベルが低下している遺伝子が検出されたが、一部の遺伝子では未治療群と比べ、その発現レベルの改善を認めた。

コンピュータにて予測された CTL エピトープのうち、large S 領域から 28 種類、pre-core/core 領域から 13 種類、HBx 領域から 4 種類、polymerase 領域から 44 種類のエピトープを、結合予測スコアが高い順に選択し、免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。これまでの結果では、93 種類の HBV 由来ペプチドのうち 47 種類において、少なくとも 1 人以上の患者において陽性反応を認めた。また、HBV 感染患者をこれらのペプチドに対する免疫応答が検出された群と検出されなかった群に分けて、DC の表面マーカーの発現との関連性を検討したところ、免疫応答が検出された群では、plasmacytoid DC における CD80、CD83、CD40、CCD7 と、myeloid DC における CD86 の発現レベルが高値であった。

D. 考察

本年度の研究結果からは、HBV 感染患者では健常者と比べ、DC における遺伝子発現が大きく変化しており、一部のものではその発現

が抑制されることによって、表面マーカーの変化や DC の機能低下を来していると考えられた。また、こうした DC 機能の変化が、HBV に対する CTL の反応にも影響を与えていることが示唆された。核酸アナログ製剤による治療には、こうした HBV による DC の遺伝子変化の一部を改善させる効果があると考えられた。

E. 結論

HBV 感染患者では健常者と比較し、DC 数や表面マーカーに変化が生じており、これらの変化は DC の各サブセットによって異なっていた。また、免疫関連遺伝子の発現は HBV 感染状態によって異なっており、未治療の慢性 B 型肝炎患者では発現低下を認める遺伝子が多く存在した。これらの結果から、HBV 感染患者における樹状細胞数やその機能調節を行うことにより、ウイルスに対する宿主の免疫応答を改善し、HBV 排除に向けた新しい治療方法の開発が可能になると考えられる。また、HBV 由来 HLA-A24 拘束性 CTL エピトープには未知のものが多く存在すると考えられることから、今後、DC の機能解析に有用なものをさらに同定していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCR molecules from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. Nature Medicine. 19:1542-6, 2013.

2) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 57: 1448-57, 2013.

3) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. Increase in CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. 62:1421-30, 2013.

2.学会発表

なし。

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし

厚生労働省科学研究費
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

HBV に対する自然免疫応答の解析

研究分担者： 竹原 徹郎
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学・教授

研究要旨：ウイルス感染に対する宿主免疫応答において自然免疫は重要な役割を果たす。Hepatitis B Virus (HBV) に対する自然免疫応答を解析することにより、B型肝炎におけるウイルス排除および慢性化の機序を解明することを目的とした。自然免疫において Natural killer (NK) 細胞は重要な役割を果たすが、多数の抑制型レセプターと活性型レセプターの発現によりその機能は調整されている。本年度は、B型肝炎患者及び健常者血液から末梢血単核球を分離し、NK細胞ならびにそのレセプターの表現型・IFN 応答性について Flow Cytometry で解析を行った。末梢血における CD56⁺CD3⁻ NK細胞の頻度は、HBVDNA \geq 4 log copies/ml の B型肝炎患者で、健常者および HBVDNA $<$ 4 log copies/ml の B型肝炎患者よりも低下した。また、NK細胞は活性型レセプター-NKp46 と抑制性レセプター-NKG2A との発現程度によって、NKp46⁻NKG2A⁻、NKp46⁺NKG2A⁻、NKp46⁺NKG2A⁺、NKp46^{high}NKG2A^{high} に分類された。その中で NKp46⁺NKG2A⁻ 亜分画は HBVDNA 量と負の相関関係を、NKp46^{high}NKG2A^{high} は HBVDNA 量と正の相関関係を認めた。*in vitro* での IFN- α 刺激で誘導されるリン酸化 STAT1 の程度は4つの亜分画によって異なっており、NKp46⁺NKG2A⁻ とで STAT1 リン酸化の程度が強かった。4つのNK細胞亜分画のうち、NKp46⁺NKG2A⁻ 亜分画は、活性型レセプター陽性かつ抑制性レセプター陰性で、さらに IFN- α 刺激による STAT1 リン酸化の程度も大きいことから、最もNK細胞活性が強力な亜分画であると考えられる。この亜分画がウイルス量と負の相関関係で、ウイルス量高値の際には減少しており、B型肝炎の宿主免疫からの逃避に関連している可能性があると考えられた。また、NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画はサイトカインを分泌能が高いとされている NK bright の割合が1/3程度を占めるが、ウイルス量とは正の相関関係にあり、ウイルス感染の結果宿主免疫応答が起こり、割合が増加している可能性が考えられた。B型慢性肝炎の病態形成において、NK細胞の各亜分画の関与が示唆された。

共同研究者

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 助教

A. 研究目的

B型肝炎ウイルスの排除において、自然免疫は重要な役割を果たす。ウイルス感染時、宿主の免疫から逃れ慢性化する機序を解明するには、初期応答である自然免疫の役割を解析する必要がある。本研究では自然免疫の中でもNK細胞とそのレセプターに注目し、B型肝炎ウイルス感染時のNK細胞の表現型やIFN応答性について解析することで、B型肝炎ウイルスに対する宿主免疫応答およびその慢性化の機序を明らかにすることとした。

B. 研究方法

B型肝炎患者64例と健康人28例を対象とし、末梢血単核球を単離しFlow Cytometryで解析を行った。B型肝炎患者はさらに高ウイルス群19例(HBVDNA \geq 4 Log copies/ml)と低ウイルス群45例(HBVDNA $<$ 4 Log copies/ml)に分けて解析を行った。細胞表面マーカーとしてCD56 \cdot CD3によりNK細胞を同定した。またNK細胞活性型レセプターNKp46と抑制型レセプターNKG2Aとの発現程度によって亜分画に区別した。それぞれの亜分画において、HBVDNA量との相関及びIFN- α によって伝達される細胞内シグナルをSTAT1リン酸化で評価した。

C. 研究成果

(1) 末梢血単核球に占めるCD56 $^+$ CD3 $^-$ NK細胞の頻度は、B型肝炎患者全体と健康人とで有意差を認めなかったが、高ウイルス群は低ウイルス群及び健常群に比べて有意にNK細胞の頻度が減少した。

(2) CD56 $^+$ CD3 $^-$ NK細胞はNKp46とNKG2Aの発現程度によって亜分画に分けることが可能であった。すなわち、NKp46 $^-$ NKG2A $^-$ 、NKp46 $^+$ NKG2A $^-$ 、NKp46 $^+$ NKG2A $^+$ 、NKp46 $^{\text{high}}$ NKG2A $^{\text{high}}$ 、に分類された。NKp46 $^{\text{high}}$ NKG2A $^{\text{high}}$ 亜分画はNK bright分画の約32-46%を占める集団であることが確認された。

(3) 上記亜分画のうちNKp46 $^+$ NKG2A $^-$ 分画は高ウイルス群で頻度が低下し、HBVDNA量と負の相関を認めた(P $<$ 0.05)。またNKp46 $^{\text{high}}$ NKG2A $^{\text{high}}$ 亜分画は高ウイルス群で頻度が増加し、HBVDNA量と正の相関を認めた(P $<$ 0.05)。

(4) *in vitro*でのIFN- α 刺激でリン酸化されるSTAT1の程度が、4つの亜分画によって異なっていた。すなわち、NKp46 $^-$ NKG2A $^-$ \doteq NKp46 $^+$ NKG2A $^-$ $>$ NKp46 $^{\text{high}}$ NKG2A $^{\text{high}}$ $>$ NKp46 $^+$ NKG2A $^+$ となっていた。この亜分画間の差異は、B型肝炎患者・健康人ともに認められた。

D. 考察と結論

高ウイルス群で NK 細胞の頻度が有意に低下した。この結果は B 型肝炎ウイルスが宿主の自然免疫を回避する機構の表現型の一部である可能性がある。

また NK 細胞が活性型レセプター NKp46 と抑制型レセプター NKG2A の発現様式によって亜分画に分類されることが明らかにされ、さらに NKp46+NKG2A⁻ 亜分画および NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画は HBVDNA 量とそれぞれ負および正の相関があることが明らかとなった。NK 細胞の活性は、活性型レセプターからのシグナルと抑制性レセプターからのシグナルとのバランスによって決まり、これらの亜分画によって、NK 細胞活性が異なっているものと考えられる。NKp46+NKG2A⁻ 亜分画は、活性型レセプターが陽性かつ抑制性レセプターが陰性で、さらに IFN- α 刺激による STAT1 のリン酸化の程度も大きいことから、最も NK 細胞活性が強力な亜分画であることが予想される。また NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画にはサイトカイン分泌能が高いとされる bright NK が多く含まれており、高い細胞障害機能を有している可能性がある。NKp46+NKG2A⁻・NKp46^{high}NKG2A^{high} はそれぞれウイルス量と負及び正の相関関係があり、NKp46⁺NKG2A⁻ は B 型肝炎の宿主免疫からの逃避・慢性化に、NKp46^{high}NKG2A^{high} はウイルスによる NK 細胞の活性化に関連している可能性があると考えられる

これらの亜分画ごとに IFN 分泌能や細胞障害活性を測定しその機能を明らかにすることで、B 型肝炎慢性化の機序あるいは新たな治療標的の開発につながる可能性があると考えられた。

E. 研究発表

論文発表

1. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. *J Hepatol* 59: 1239-1245, 2013
2. Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res* 43: 339-346, 2013

学会発表

本研究に関する今年度の学会発表はなし

F. 知的所有権の取得状況

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（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究
研究分担報告書

HBV 感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給

分担研究者 齋藤 泉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）に対する治療用として、肝臓における発現効率の高い非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）を用いて、インターフェロンと治療用遺伝子を同時発現する日本発の HBV 治療用デュアルベクターを開発する。本年度は HBV ゲノム高度保存領域に設定した 6 種類の shRNA を発現する AdV をウイルス随伴 RNA（VA RNA）欠失 AdV として作製し、その評価を行った。HBV ゲノム複製を効率的に検出するシステムの開発中であるため、shRNA の評価は、設計した shRNA 配列を発現単位内に有する preCore を発現する AdV を用いて行った。その結果、6 種類の shRNA はいずれも良好な発現抑制効果を示した。そのうち、最も発現抑制効率の高いものでは、60%の発現抑制効果を示した。shRNA の有効性の検討のため、HBV ゲノム複製を効率的に検出するシステムの開発も同時に行い、HBV プレゲノム量を上昇するための CMV プロモーターを併用したアデノウイルスベクターを用いたシステムの開発に成功した。

A. 研究目的

HBV に対する治療法として、ウイルス mRNA に対する siRNA の応用が期待されるが、非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）は肝臓への遺伝子導入効率、発現効率ともに優れており有用性の高いツールである。しかし従来の AdV にはウイルス由来の 2 種類の VA RNA が発現しており、治療用遺伝子として導入した short-hairpin RNA（shRNA）と競合拮抗して抗ウイルス効果を減弱する例を HCV で見いだした。VA RNA 欠失 AdV の効率的な作製は困難であったが、齋藤は新規作製法の開発に成功した。本研究では、この新規 VA RNA 欠失 AdV に HBV に対する shRNA の候補を複数挿入し、最も有用性の高い shRNA を同定後、インターフェロン遺伝子を同時に発現するデュアルベクターを開発し、作用機序の異なる 2 つの治療用遺伝子に依る相加的効果を有した AdV を開発する。

B. 研究方法

HBV に対する shRNA は HBV ゲノムの DR1 領域近傍の高度保存領域に 6 種類設計した。shRNA をヒト U6 プロモーターから発現する発現単位をアデノウイルスゲノムの E4 領域右側に挿入した VA 欠失 AdV を作製した。

VA 欠失 AdV は、VA RNA コード領域の両側に FLP の標的配列 FRT を持つプレベクターを通常の 293 細胞で作製し、十分に力価を上昇した後、ヒト型温度安定型 FLP 発現 293 細胞へ感染することにより 90%以上の VA RNA 領域が環状に切り出されていたことを確認し、実験に供した。

shRNA の効果判定には、設計した shRNA をコード領域中に持つ preCore 発現 VA 欠失 AdV との共感染により行った。preCore を特異的に検出可能なリアルタイム PCR 用プライマーを用いて preCore の RNA 量を定量し、shRNA の効果を判定した。

HBV ゲノム複製は極めて効率が低いため、HBV プレゲノム量を上昇するために CMV プロモーターを応用した。HBV ゲノムの S コード領域に Pol 発現に影響を与えないように点変異を加えた 1.2 倍長 HBV-DNA(kS)を CMV プロモーターから発現する AdV を作製し、HuH-7 細胞に導入後 3 日目に細胞総 DNA を抽出し、Southern 法により複製した HBV ゲノム検出を試みた。

（倫理面への配慮）

本年度の研究に当たっては、既に報告されてい

る HBV を用いており、特に倫理面に抵触する検討は行っていない。

C. 研究結果

本研究で新たに設計した 6 種類の shRNA は全て有意に preCore の RNA 発現を抑制した。特に shRNA-1 は多重感染価 (MOI) 4 でも 40%、MOI 20 では 60% の高い抑制効果を示した。本研究で応用した VA 欠失 AdV は、HCV を用いた解析から shRNA と VA RNA の競合拮抗が起こらないため、shRNA による特異的 RNA 量減少効果を高めることが期待できるため、有用性が高いと考える。

今後は、本研究で開発した shRNA の効果を HBV ゲノム複製システムで検討するが、HBV ゲノム複製効率は極めて低い。本研究ではスクリーニングにおける安全性を考慮して S コード領域に点変異を加えることで Pol の発現に影響を与えないが S のみをノックアウトした S 欠失 HBV ゲノム (kS) を用いて解析を行っているが、汎用されている 1.2 倍長の S 欠失 HBV ゲノムを持つプラスミドを用いた予備的な検討では複製した完全二本鎖 DNA (CCC) や不完全二本鎖 DNA (RC) の検出は困難であった。そこで CMV プロモーターを応用してプレゲノム量を増加したところ、同じ HBV ゲノムを用いても CCC と RC の検出に成功した。

そこで、肝臓細胞への導入効率が高い AdV に CMV プロモーターから S 欠失 HBV ゲノム (kS) を発現する発現単位を挿入し、HuH-7 細胞を用いて同様の解析を行ったところ、プラスミドよりも良好な HBV ゲノム複製が容易に確認されたため、今後の解析にはこの AdV を用いることに決定した。

班員への供与に関しては、ZFN を発現する AdV や VA 欠失 AdV などの供給が可能になったことを周知した。

D. 考察

本年度は、昨年度に設定した shRNA の有用性が高いことを明らかにした。VA RNA は成熟の過程で shRNA と同様の機序でプロセスされるため、shRNA の効果を減弱する可能性が示唆されてきたが、HCV を用いた検討によりこの可能性を実証し報告した (Pei *et al.*, *Sci. Rep.*, 2013)。本研究で応用している VA 欠失 AdV は HBV に対する shRNA においても同様に有用性が高いと考える。

また、これまで構築してきた各々の HBV 遺

伝子を独立して発現する AdV と RNA 定量システムを応用して、shRNA の効果判定が可能となり、効率よく研究が推移した。

HBV ゲノム複製検出システムについては、1.2 倍長 HBV ゲノムでは検出が困難であったが、CMV とアデノウイルスベクターの併用により Southern 法での CCC 及び RC の検出が可能となった。今後は定量性と簡便性を兼ね合わせた半定量 PCR やリアルタイム PCR のシステムを開発し、定量的な解析と Southern 法の併用により、shRNA の HBV ゲノム複製抑制効果の検討を進めていく。

また HCV の shRNA では、効果の異なる複数の shRNA の共感染により HCV ゲノム複製抑制効果が上昇していたため、HBV においても 6 種類の shRNA の効果的な組み合わせを検討する。

E. 結論

HBV に対する有用性の高い shRNA を同定し、HBV ゲノム複製検出システム確立もほぼ目処がたった。今後は shRNA の HBV ゲノム複製抑制効果について検討を行う。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 3575.
- 2 Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda F, Kondo S, Saito I and Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 1136.

2. 学会発表

- 1 近藤小貴、宿主 RNAi 経路に影響を与える virus-associated RNA を欠失したアデノウイルスベクターの高効率作製法、第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会、岡山、7 月 4-6 日、2013
- 2 近藤小貴、アデノウイルスベクター

- から発現しているウイルス由来 miRNAs は細胞増殖関連遺伝子を制御する、第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 3-5 日、2013
- 3 Zheng Pei, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Saki Kondo, Izumu Saito, Therapeutic strategy of HBV using VA-deleted adenovirus vectors dually expressing shRNA and interferon. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Fudan University, Shanghai, October 20-23, 2013.
 - 4 Yumi Kanegae, Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Dual-safe adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes enhanced shRNA activity. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
 - 5 Saki Kondo, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Izumu Saito, First-generation adenovirus vector expresses viral-associated (VA) RNAs that disturb cellular gene expressions. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
 - 6 Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Yumi kanegae, Very efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery: safer alternative to current vector. The European Society of Gene and Cell Therapy 2013 Annual Meeting, Palacio Municipal de Congresos, Spain/Madrid, Octber 25-28, 2013.
 - 7 近藤小貴、アデノウイルスベクターから常に発現している virus-associated (VA) RNA は標的細胞内の遺伝子発現に影響を与える、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
 - 8 鈴木まりこ、アデノウイルスベクターの目的遺伝子挿入領域と向きはベクター作製や発現効率に影響を与えるか：Dual 発現 vector 作製に向けた検討、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
 - 9 近藤小貴、アデノウイルスベクターの問題点：ベクターがコードする Virus-associated (VA) RNA は宿主遺伝子発現に影響を与える、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 10 裴崢、1 つの細胞に多数の DNA コピーを導入できるマルチコピーを保持したコスミドのトランスフェクションにおける有用性：B 型肝炎ウイルスゲノム複製研究への応用、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 11 前川 文、細胞特異的長期発現持続型 mini-adenovirus vector (mini-AdV) の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 12 鈴木まりこ、E3 領域への目的遺伝子の挿入はアデノウイルスベクターの作製効率に影響を与えるか：ベクター/目的遺伝子キメラ mRNA の生成、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柘植雅貴 茶山一彰	HBV の感染実験系	田中榮司 竹原徹郎 持田智	Hepatology Practice 第1巻 B型肝炎の診療	文光堂	東京	2013	185-192
柘植雅貴 茶山一彰	B型肝炎、D型肝炎	浅香正博 菅野健太郎 千葉勉	カラー版 消化器病学	西村書店	東京	2013	1150-1155
渡邊綱正 田中靖人	B型肝炎ウイルス (HBV)研究の進歩	林紀夫 日々紀文 上西紀夫 下瀬川徹	Annual Review 消化器 2014	中外医学 社	東京	2014	99-103

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
Kato N, (加藤)	Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems.	PLoS One	9	e91156	2014
Mori K, (加藤)	Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin.	Hepatology	58	1236-1244	2013
Dansako H, (加藤)	Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells.	PLoS Pathogens	9	e1003345	2013
Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., <u>Hijikata M</u>	Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection	PLoS ONE		DOI: 10.1371/journal.pone.0089869	2014

Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, <u>Matsuura Y</u> .	Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation.	J.Virol.	87	489-502	2013
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, <u>Matsuura Y</u> , Wakita T, Suzuki T.	Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2	PLoS Pathog		doi:10.1371/journal.ppat.1003589	2013
Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, <u>Matsuura Y</u> , Saitoh T, Akira S.	Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus	Proc Natl Acad Sci U S A	110	12379-12384	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, <u>Matsuura Y</u> , Hayashi N, Mizokami M, Takehara T.	Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus	Hepatology	57	1705-1715	2013
Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, <u>Matsuura Y</u> , Yamamoto M, Takeda K.	Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA	J Virol	87	9997-10003	2013
Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, <u>Matsuura Y</u> , Mizuguchi K.	Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach	J Proteome Res	12	2537-2551	2013
Kosaka K., Hiraga N., Imamura M., Yoshimi S., Murakami E., Nakahara T., Honda Y., Ono A., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Abe H., Hayes C.N., Miki D., Aikata H., Ochi H., Ishida Y., Tateno C., Yoshizato K., Sasaki T. and Chayama K.	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun	441(1)	230-5	2013
Ohishi W., Cologne J.B., Fujiwara S., Suzuki G., Hayashi T., Niwa Y., Akahoshi M., Ueda K., <u>Tsuge M.</u> and Chayama K.	Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: A nested case-control study.	Int J Cancer	134(1)	154-63	2013

Naeshiro N., Kakizawa H., Aikata H., Kan H., Fujino H., Fukuhara T., Kobayashi T., Honda Y., Miyaki D., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Ishikawa M., Awai K. and Chayama K.	Percutaneous transvenous embolization for portosystemic shunts associated with encephalopathy: Long-term outcomes in 14 patients.	Hepatol Res.		doi: 10.1111/he pr.12181	2013
<u>Tsuge M.</u> and Chayama K.	Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy.	J Gastroenterol	48(6)	779-80	2013
Masaki K., Takaki S., Hyogo H., Kobayashi T., Fukuhara T., Naeshiro N., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Nagaoki Y., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Aikata H., Ochi H., Takahashi S., Arihiro K. and Chayama K.	Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases.	Hepatol Res.	43	1182–1189	2013
Arataki K., Hayes C.N., Akamatsu S., Akiyama R., Abe H., <u>Tsuge M.</u> , Miki D., Ochi H., Hiraga N., Imamura M., Takahashi S., Aikata H., Kawaoka T., Kawakami H., Ohishi W. and Chayama K.	Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis	J Med Virol	85(5)	789-98	2013
<u>Tsuge M.</u> , Murakami E., Imamura M., Abe H., Miki D., Hiraga N., Takahashi S., Ochi H., Nelson Hayes C., Ginba H., Matsuyama K., Kawakami H. and Chayama K.	Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients.	J Gastroenterol	48(10)	1188-204	2013
Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, <u>Watanabe T.</u> , Poovorawan Y, Tanaka Y	Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population.	PLoS One.	9(1)	e86007.	2014
<u>Watanabe T.</u> , Wong DK, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF	Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese.	PLoS One	8	e66920	2013
Arata S, Nozaki A, Takizawa K, Kondo M, Morimoto M, Numata K, Hayashi S, <u>Watanabe T.</u> , Tanaka Y, Tanaka K	Hepatic failure in pregnancy successfully treated by online hemodiafiltration: Chronic hepatitis B virus infection without viral genome mutation.	Hepatol Res.	43(12)	1356-60	2013

Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M	Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication.	J Viral Hepat.	20(4)	e27-36	2013
Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A.	A new cloning and expression system yields and validates TCR molecules from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days.	Nature Medicine.	19	1542-6	2013
Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S.	Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.	Hepatology.	57	1448-57	2013
Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S	Increase in CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis.	Cancer Immunol Immunother.	62	1421-30	2013
Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T	Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice.	J Hepatol	59	1239-1245	2013
Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T.	Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic.	Hepatol Res	43	339-346	2013
Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y.	Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication.	Scientific Rep.	3	3575	2013
Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda F, Kondo S, Saito I and Kanegae Y.	Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery.	Scientific Rep.	3	1136	2013