

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15140

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスのin vitro 感染系の確立と感染防御

研究課題名(英文) Establishment of in vitro infection system of hepatitis B virus and infection prevention

研究代表者

黒木 和之 (KUROKI, Kazuyuki)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：20178122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝炎、肝がん発生の原因ウイルスであるヒトB型肝炎ウイルス(HBV)のLife cycleを理解することは、このウイルスの感染・増殖を阻止する新たな方策を探る上で大切である。本研究では、まだあまりよくわかっていないHBVの肝細胞特異的な感染の分子機構を解明する足がかりとして、また、感染防御・制御のための抗HBV創薬の基盤として、新たに作製したiPS細胞のなかから分化誘導後の肝細胞でより効率がよく再現性の高い安定したHBV in vitro感染系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Understanding the Life cycle of human hepatitis B virus (HBV), the causal virus of hepatitis and liver cancer, is important in exploring new ways to prevent the infection and proliferation of HBV. In this study, as a foothold to elucidate the molecular mechanism of hepatocyte-specific infection of HBV which is not well understood yet, and as a basis for anti-HBV drug discovery, we established HBV in vitro infection system with more efficient and reproducible effect on differentiated hepatocytes from newly prepared iPS cells.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス HBV iPS細胞 肝細胞 ウイルス 感染

1. 研究開始当初の背景

世界ではおよそ4億人、日本ではおよそ140万人がHBV慢性キャリアでありHBV感染の制御・克服は人類の重要な課題である。

HBV感染の分子機構解明の手がかりとしての宿主レセプター探索は、これまでにpolyalbumin、transferrin receptor、HDL receptor、IL6、ApoH、LPL、ASGR、Heparan Sulfate、さらに有力な候補NTCPがあげられ検証が続けられていた。HBV感染に関わる分子(群)の同定はたいへん重要なテーマである。私は、感染に関わるHBVエンベロープアミノ末端部の機能解析を行い、さらにHBVレセプター探索へと研究を進めたが目的分子を同定することはできなかった。そこでモデルとしてのダックB型肝炎ウイルス(DHBV)に注目し研究を進めることにした。DHBVはモデルとして分子生物学的に非常に良く研究されていること、また、HBVではヒト初代培養肝細胞にさえ感染の再現が容易ではないのに対して、DHBVでは感染効率が高い(ほぼ100%)初代培養肝細胞への感染系が唯一確立されていることに着目した。結果、我々はDHBV粒子やエンベロープと特異的に強く結合する分子量18万の宿主膜蛋白質を発見しgp180と命名、この蛋白質が新規の膜結合性カルボキシペプチダーゼであることを発表した。gp180がDHBV receptorであることはSchallerやWandsらによって支持された。さらに、DHBV感染の成立にはgp180以外の未知の宿主因子(群?)が関与することがわかり、B型肝炎ウイルスの感染機構は複雑であることが予想された。

一方、HBVでは、ヒト初代培養肝細胞への感染は再現性にとぼしく、何より供給上の問題を抱えていた。ヒト肝がん由来HepaRG細胞でHBVが感染成立することを培養細胞系で示されているが効率は高くなく培養条件・ライセンス等使用上の制約が多い。分化誘導された肝細胞は元のiPS細胞によって性質が異なることが知られておりHBVに対する感受性についてもiPSC由来肝細胞間で異なると推測される。HBV感染能を高く持つ肝細胞へと分化誘導するiPSC lineを選び出し、HBV in vitro感染実験に適した系を確立することが、HBV初期感染機構の解明、新規抗HBV創薬の推進に必要であると考えた。

2. 研究の目的

肝炎、肝がん発生の原因ウイルスであるヒトB型肝炎ウイルス(HBV)のLife cycleを理解することは、ウイルス学上重要であるとともに、このウイルスの感染・増殖を阻止する新たな方策を探る上で大切である。本研究の目的は、まだあまりよくわかっていないHBVの肝細胞特異的な感染の分子機構を解明する足がかりとして、また、感染防御・制御のための抗HBV創薬の基盤技術として、新たに作製するiPSC lineから分化誘導した肝細胞を用いてこれまでにない効率がよく再現性

の高い安定したHBV in vitro感染系を確立することである。

3. 研究の方法

(1) レポーター遺伝子を組み込んだHBVベクターの作製：感染実験に用いるHBV粒子は、UCOE Expression vector (Novagen)を用いてすべてのHBV蛋白質を産生・供給できるように新規に作製したパッケージング細胞へGFPやNanoLuc、GLuc等レポーター遺伝子を組み込んだHBVベクタープラスミドを導入し組換えHBVを産生させる。

(2) iPS細胞の作製：入手した各種ヒト細胞、正常ヒト皮膚繊維芽細胞(成人)(PromoCell社)、OUMUS-36細胞(JCRB Cell Bank)、HE-1細胞(JCRB Cell Bank)、CD34⁺細胞(ロンザ社)、肝細胞(ロンザ社)、肝非実質細胞(ロンザ社)についてiPS細胞誘導用遺伝子が搭載されているセンダイウイルス系ベクターCytoTune-iPS2.0(ディナベック社)を用いてマニュアルに従いiPS細胞を作製する。

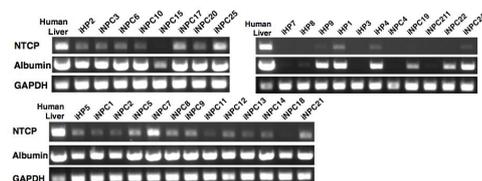
(3) iPS細胞から肝細胞への分化誘導：iPS細胞は、100ng/ml Activin A、3μM CHIR99021処理を3日、つぎに1% DMSO、20% KSR処理を5日、最後に20ng/ml HGF、20ng/ml OSM処理を5日間行って肝細胞へと分化誘導する。

(4) B型肝炎ウイルスの感染：iPS細胞より分化した肝細胞へのHBV感染実験にはHBV血清(フェニックス社)や組換えHBVベクターを用いた。感染成立はHBV mRNAのRT-PCR法による検出あるいはレポーター蛋白質活性の測定により確認する。

4. 研究成果

(1) iPS細胞誘導用遺伝子が搭載されているセンダイウイルス系ベクターCytoTune-iPS2.0(ディナベック)を用いて正常ヒト皮膚繊維芽細胞(成人)より8、OUMUS-36細胞より14、HE-1細胞より4、CD34⁺細胞より12、肝細胞より8、肝非実質細胞より23の合計69のiPS細胞を樹立した。

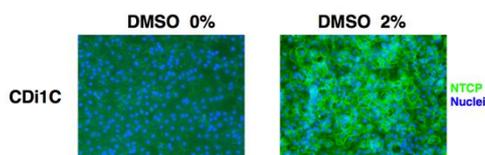
(2) 樹立した69のiPS細胞のうち肝細胞へと分化誘導できるものが37あった。アルブミン等肝細胞特異的な遺伝子の発現プロファイルは元となるiPS細胞によって異なっている。



肝細胞および肝非実質細胞より作製した32のiPS細胞のうち27細胞で肝細胞への分化が認められる。

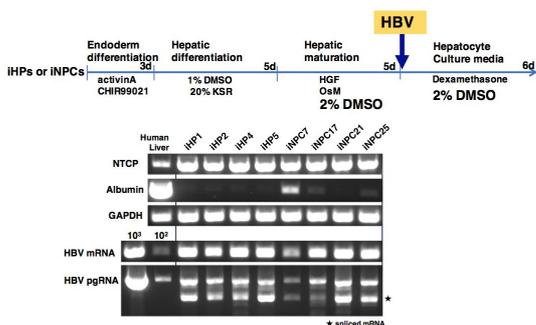
また、HBVレセプターであるNa⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)の発現量は肝臓に比べいずれのiPS細胞

胞由来の肝細胞も低い。



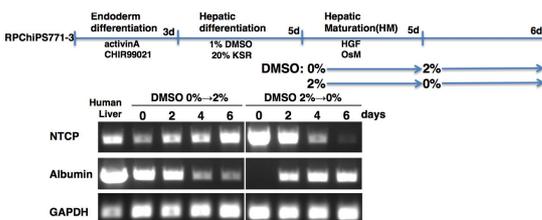
分化誘導最終段階でのDMSOの添加はHBVレセプターであるNTCPの発現を亢進する。

しかし、分化誘導の HGF、OSM 処理最終段階を DMSO を 2% の濃度で添加することによりアルブミンの発現は抑制されるが一方で NTCP の発現を高めることがわかった。



HBVは分化誘導により得られた肝細胞へ感染する。

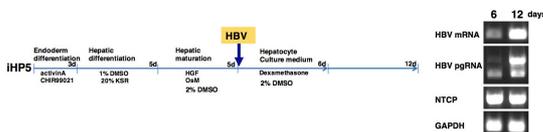
この DMSO 添加の効果は可逆的であり DMSO の除去はアルブミンの発現を促進し NTCP の発現を抑制した。



DMSOの効果は可逆的である。

iPS 細胞からの分化誘導で得られた肝細胞では HBV の感染は NTCP の発現量と相関している。

(3) 本研究で得られた iPS 細胞 iHP5 からは長期間安定した状態の肝細胞が得られ、DMSO の添加 (2%) によって HBV レセプターである NTCP や転写因子 HNF4A の発現も亢進させることができる。



iPS細胞iHP5から分化誘導して得られた肝細胞は長期間HBV感染を維持する。

この iHP5 細胞より分化誘導して得られた肝細胞では HBV の感染状態を 12 日以上維持することができ、またエンテカビルやスラミン

による感染阻害効果を確認しており、感染メカニズムの解明および HBV 感染・増殖を阻止する化合物の探索に有用な HBV in vitro 感染系が得られた。

(4) 本研究で作製した HBV ベクターは組換え HBV 産生量が低い (10^5 GE/ml 以下)、HBV 感染アッセイに有用である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

黒木和之、志村瞳：DMSO は iPS 細胞より分化誘導した肝細胞への HBV 感染を高める 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017 年

黒木和之、志村瞳：iPS 細胞より分化誘導した肝細胞を用いた HBV in vitro 感染系 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年

黒木和之、志村瞳：iPS 細胞より分化誘導した肝細胞と HBV 感染 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 和之 (KUROKI, Kazuyuki)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授
研究者番号：20178122

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()