

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15282

研究課題名(和文) マウス肝細胞を用いたHBV in vitro-in vivo感染系構築の試み

研究課題名(英文) Establishing in vitro-in vivo HBV infection system using mouse hepatocytes

研究代表者

上田 啓次(Ueda, Keiji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00221797

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)：HBVはNTCPを必須のレセプターとして肝実質細胞に感染するが、マウス肝細胞にヒトNTCPを発現しても、感染は成立しない。HBV産生ベクターをトランスフェクションすることでウイルス産生がみられることから、マウス肝細胞はHBV侵入の際に制限因子を有していると考えられる。HBVコア蛋白相互作用因子の観点からこの制限因子を明らかにするためにHBVコア蛋白発現マウス肝細胞を樹立した。

研究成果の概要(英文)：HBV can not establish the infection in mouse liver cells expressing human NTCP, which is the most important molecule for HBV entry. Since an HBV producing vector transfection into mouse hepatocytes leads to HBV production, there should be some restriction factors to block HBV entry into the cells. In order to clarify the factors in terms of HBV core protein interacting factors, we have established an HBV core protein expressing mouse hepatocyte line.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV receptor NTCP restriction factor HBV core mouse hepatocyte entry

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は極めて種特異性が高く、哺乳類へパドナウイルス (orthohepadnavirus) にヒトを含めた類人猿との相互感染は成立しない。HBV 感染には極めて高度に分化した正常肝実質細胞を要し、脱分化していると思われるヒト肝癌由来培養細胞株には感染しない。HBV の生活環の解明には、より簡便な *in vitro* 感染系の構築は勿論だが、HBV の個体内侵入機構、病態発生機構の解明とそれに基づいた治療薬・治療法の開発にはマウスのような小動物を用いた個体レベルでの感染系の構築が不可欠である。NTCP (Na-taurocholate co-transporting peptide) が HBV の感染受容体として同定され、このような困難な研究状況は一気に解決されたかと思われた。が、ヒト NTCP をマウス肝細胞由来 (ML や BNL など正常肝細胞に近いとされる) 細胞株で発現させても HBV 感染が許容されないことを見出した。

## 2. 研究の目的

NTCP 以外のヒト型肝細胞因子の存在やマウス肝細胞における抵抗 / 規制因子 (HBV コア蛋白に対する抵抗 / 規制性因子を含む) の存在が示唆される。本研究ではこれらの因子を見出し、発現、ノックアウト、ノックダウンなどを施し、個体レベルでの HBV 感染系の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

1) ヒト肝癌由来培養細胞株 (HepG2) 及びマウス肝細胞株 (ML) を用いて HA タグ付き HBV コアタンパク (HA-HBc) 発現細胞株 (HA-HBc/G2、HA-HBc/ML) を樹立し、比較しながら、HBc と相互作用する細胞因子を免疫沈降で分離・同定する。2) NTCP・V5・His6 を発現する HepG2 細胞 (NTCP・V5His/G2) から NTCP 相互作用因子 (co-receptor) の分離・同定する。3) マウス shRNA を NTCP 発現 ML 細胞 (NTCP/

ML) に導入し、nano-Luc を発現するリコンビナント HBV (rHBV/N-LUCneo) を用いた感染スクリーニングにより、感染を許容する shRNA クローンを同定、RF 因子を特定する。これら 3 つの主実験から得られた因子について、その機能・作用機序の解析を進め、まず、NTCP/ML を用いた HBV 感染系の構築を試みる。進捗状況によっては、それまでの知見を統合し、マウスを用いた個体レベルでの *in vivo* HBV 感染系の構築を目指す。

## 4. 研究成果

HBV は NTCP を必須のレセプターとして肝実質細胞に感染するが、マウス肝細胞にヒト NTCP を発現しても、感染は成立しない。HBV 産生ベクターをトランスフェクションすることでウイルス産生がみられることから、マウス肝細胞は HBV 侵入の際に制限因子を有していると考えられる。HBV コア蛋白相互作用因子の観点からこの制限因子を明らかにするために HBV コア蛋白発現マウス肝細胞を樹立した。

## 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 4 件)

1. H. Jacques Garrigues, Kellie Howarda, Serge Barcya, Minako Ikoma, Ashlee V. 5 Mosesb, Gail H. Deuschc, David Wud, Keiji Ueda and Timothy M. Rose.  
“ Full-length isoforms of KSHV LANA accumulate in the cytoplasm of cells undergoing the lytic cycle of replication.” J. Virol.  
doi:10.1128/JVI.01532-17.
2. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Eriko Kudo, Yutaka Okuno, Keiji Ueda, Harutaka Katano and Seiji Okada.

“Restoring PU.1 induces apoptosis and modulates viral transactivation via interferon-stimulated genes in primary effusion lymphoma” *Oncogene* doi: 10.1038/ onc.2017.138.

3. Hossain, Md. G., and Ueda, K.  
“ Investigation of a novel hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) escape mutant affecting immunogenicity.” *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal. pone. 0167871, 2017.
4. Ohsaki, E., and Ueda, K. “ A chimeric protein composed of NuMA fused to the DNA binding domain of LANA is sufficient for the ori-P-dependent DNA replication.” *Virology* 500: 190-197, 2017.

[学会発表](計7件)

1. Md. Golzar Hossain, Eriko Ohsaki, Tomoyuki Honda and Keiji Ueda.  
“ Investigation of functional significance of promyelocytic leukemia protein(PML) on Kaposi ’ s sarcoma associated herpesvirus lytic replication.” 第31回ヘルペスウイルス研究会 2017年6月15～17日 . 松江ニューアーバンホテル .
2. Zunlin Yang, Tomoyuki Honda, Keiji Ueda. “ vFLIP is involved in elongated/spindle cell shape formation in KSHV infected endothelial cells through IKK upregulation.” 第31回ヘルペスウイルス研究会 2017年6月15～17日 . 松江ニューアーバンホテル .
3. Hossain, M.; Ueda, K.  
“ Investigation of a Novel Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Escape Mutant Affecting

Immunogenicity.” Annual meeting of American Society of Virology, University of Wisconsin June 23-28, 2017. Madison, Wisconsin, USA.

4. Yang, Z., Honda, T., and Ueda, K.  
“ vFLIP is involved in elongated/spindle cell shape formation in KSHV infected endothelial cell through IKK-epsilon upregulation. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. October 24-26, 2017, Osaka.
5. Ohsaki, E., and Ueda, K.  
“ Inhibition mechanism of hit compound by drug screening targeting HBV RT.” The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. October 24-26, 2017, Osaka.
6. Rahayu, R., Ohsaki, E., Honda, T., Okamoto, T., Watashi, K., and Ueda, K. “ Analysis of HBV life cycle in the HepG2 expressing human NTCP cell line. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. October 24-26, 2017, Osaka.
7. Hossain, Md. G., Ohsaki, E., Honda, T., and Ueda, K. “ Promyelocytic leukemia protein (PML) plays beneficial role on Kaposi ’ s sarcoma-associated herpesvirus lytic infection. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. October 24-26, 2017, Osaka.

[図書](計1件)

1. 上田啓次. 「B型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴」 B型肝炎ウイルスの現状とワクチン定期接種化の意義 化学

療法の領域 医薬ジャーナル社 33 :  
2135-2141, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

取得年 :

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

上田啓次 (Ueda Keiji)

大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究者番号 : 00221797

### (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

( )