

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790664

研究課題名（和文） 肝炎ウイルスの3次元新規培養系の開発

研究課題名（英文） Development of a novel three-dimensional culture system for hepatitis viruses

研究代表者

村上 周子（MURAKAMI SHUKO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50454848

研究成果の概要（和文）：培養細胞株は3次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。本研究では、*in vitro* においてB型肝炎ウイルス（HBV）増殖機構を長期的に解析することを目的として、HBVの3次元培養系を検討した。培養には不死化ヒト正常肝細胞株と、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用い、ウイルス粒子を含むHBV感染患者血清を感染源として添加した。その結果、いずれの細胞においても、感染初期から経時的に培養上清中のHBV-DNAの増加を確認し、培養上清中のHBV-DNA量は 10^5 copies/ml以上で検出された。また、培養上清中にHBs抗原が検出された。特にキメラマウス肝細胞を用いたスフェロイド形成による培養系において、高いHBs抗原値を維持した。以上より、肝細胞の3次元培養系はHBV感染モデルとして非常に有用である。

研究成果の概要（英文）：Investigation of hepatitis B virus (HBV) has been hampered by the absence of accessible *in vitro* modeling tools. The aim of this study is to design an *in vitro* model of HBV infection that would support long-term replication. Immortalized normal human hepatocytes, or primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with human liver were cultured with three-dimensional (3D) culture system to obtain a tissue-like formation and exposed to HBV-infected serum samples. The HBV-DNA level in supernatants of the culture was higher than 10^5 copies/ml and continued to be detectable for >1 month. The extracellular HBsAg was detected during the culture period. The 3D culture system with hepatocytes provides an accessible *in vitro* tool to investigate HBV cell entry, replication and susceptibility to new anti-viral agents for multiple HBV genotypes/subgenotypes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：HBV、肝細胞、3次元培養、キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は約 40 年前に発見されたが、未だに本邦で約 150 万人、アジアで約 2 億人、世界中で約 4 億 2 千万人の持続感染者が存在し、本邦では年間約 6,000 人、世界中で年間百万人が HBV による肝硬変や肝細胞癌で死亡している。しかし、HBV による発癌メカニズムは不明であり、その治療法は確立されていない (WHO 2004)。

研究代表者の研究グループでは、HBV 感染の臨床像が世界各国で大きく異なる点に着目して研究を進めてきた。その結果、臨床像の地域差は、HBV 遺伝子型 (genotype) に依存していることを明らかにした (Hasegawa I et al., J Virol. 2004, 78: 7575-7578; Tanaka Y et al., Hepatology 2004, 40: 747-755; Osioy C et al., J Virol. 2006, 80: 10307-10314)。HBV genotype による発癌率や予後、抗ウイルス剤の治療効果に差がみられ、臨床的には重要な因子と考えられている。そこで、*in vitro* において、HBV 感染を長期的に検討できる培養系の確立が求められている。

一般的な単層での細胞培養系と比較して、3次元培養系ではウイルスと細胞の親和性が高いことが知られている。しかしながら、現状の3次元培養系では肝炎ウイルスの感染効率が十分ではなく、HBVの感染実験系は未だ実用性に乏しいのが現状である。特に培養細胞系では、持続的な感染を可能とする細胞株は得られていない。現状の3次元培養系を最適化し、効率的に長期間安定してウイルスが感染しアッセイ等の解析にも適した簡便な培養系が開発できれば、感染、慢性化、さらには肝発癌メカニズムの解析、新規治療薬の探索など多岐にわたる研究をHBVの全生活環を対象に進める事ができ、研究のさらなる発展が期待される。

2. 研究の目的

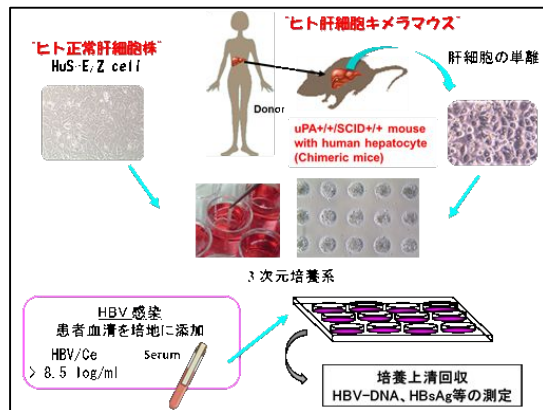
肝細胞を3次元環境で培養することにより肝細胞が組織化されて感染感受性が回復し、HBV感染下での長期培養系の確立が可能となると考え、新たな3次元培養系の開発と、HBVの*in vitro*感染・複製実験の可能性について検討した。

3. 研究の方法

中空系モジュール、あるいは特殊なナノレベルの加工を底面に施した培養プレートを用いて3次元培養系を作成した。細胞は不死化ヒト正常肝細胞株 (HuS-E/2) と、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用いた。

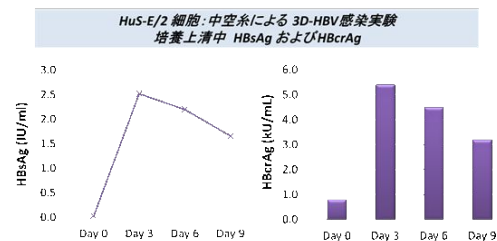
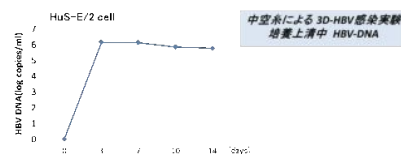
感染源としてHBVのウイルス粒子を含む患者血清を用い、 10^5 copies/well となるよ

うに投与することで感染を成立させ、その後培養上清中のHBV-DNAおよびHBs抗原、細胞内のHBV core関連抗原を測定し、HBVの感染・複製を確認した。



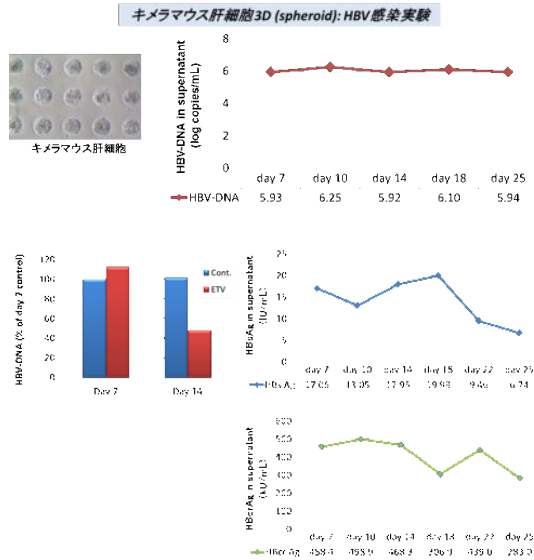
4. 研究成果

HuS-E/2細胞、キメラマウス肝細胞ともに中空系を用いた培養系では約1ヶ月間の培養が可能であった。また、特殊加工の培養プレートを用いた培養においてスフェロイドを形成し、3次元化することができた。スフェロイド形成は2週間-1ヶ月間持続することを認めた。



HBVの3次元培養において、培養上清中にHBV-DNAやHBs抗原、細胞内にHBV core関連抗原が検出された。また、上清中にもHBV core関連抗原の検出を認めた。上清中のHBV-DNA量が培養期間を通じて 10^4 - 10^6 copies/mlで継続的に検出され、少なくとも1ヶ月間は培養の継続が可能であった。特にキメラマウス肝細胞をスフェロ

イド化した培養系では、抗原量の増加を認め、上清中の HBs 抗原と HBV-DNA 量が培養期間を通じて継続的に検出され、感染の持続を確認した。さらに、感染源と同時に核酸アナログ製剤であるエンテカビル (ETV) を添加したところ、HBV-DNA 量の抑制が認められた。



細胞株を用いた *in vitro* の試験では、同一の環境下で多様な検討を繰り返すことが利点である。本研究で用いた HuS-E/2 細胞は正常肝細胞株であり、安定したコンディション下で長期間の HBV 検討ができる。一方、キメラマウス肝細胞は肝組織より単離した初代培養であることからより生体に近い状態の細胞と考えられる。このように、細胞それぞれの長所を活かした検討方法を選択することが可能となった。3次元培養系を用いた長期間での培養実験により、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索と検証、粒子放出過程などを解析できる。

臨床的には、患者血清を直接培地に添加しても感染が成立すること、さらに ETV によるウイルス複製の抑制作用を確認できたことから、この 3次元培養系は非常に有用な感染モデルであり、検体別の解析による個別化治療への応用が期待できる。引き続き、個々の検体における感染効率の比較検討を行っている。また、HBV 培養上清から *in vitro* での再感染を試みており、今後、長期培養を用いて慢性肝炎や肝線維化に関連した因子の解析への展開をめざす。

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 Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, 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. 査読有
DOI: 10.1111/jvh.12022
- ② Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- λ in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.*, 2012 Nov 7. [Epub ahead of print] 査読有
DOI: 10.1136/gut.jnl-2012-302553
- ③ Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.*, 84(4): 587-95, 2012. 査読有
DOI: 10.1002/jmv.23234
- ④ Sa-nguanmoo P, Tanaka Y, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res.*, 158 (1-2): 209-15, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.virusres.2011.04.002

[学会発表] (計 4 件)

- ① Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Endo M, Shinkai N, Fujiwara K, Miyaki T, Nojiri S, Kusakabe A, Orito E, Joh T, Mizokami M: IL28B genetic variants and serum IP-10 level associated with virological response to PEG-IFN/RBV and PEG-IFN/RBV/Telaprevir therapy. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012. 11. 9-13, Boston in USA.
- ② 新海登, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 村上周子, 宮木知克, 藤原圭, 日下部篤宣, 飯尾悦子, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人: 核酸アナログを投与した B 型慢性肝炎患者における interferon-inducible protein-10

値の動態. 第 20 回日本消化器関連学会週間 (第 16 回日本肝臓学会大会), 2012. 10. 10-12, 神戸市.

- ③ 飯島沙幸, 渡邊 綱正, 松浦健太郎, 飯尾悦子, 新海登, 村上周子, 田中靖人: 末梢血単核球を用いた C 型慢性肝炎患者 PEG-IFN/RBV 投与直後の ISG 挙動. 第 20 回日本消化器関連学会週間 (第 16 回日本肝臓学会大会), 2012. 10. 10-12, 神戸市.
- ④ 松浦健太郎, 飯尾悦子, 日下部篤宣, 新海 登, 藤原 圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 村上周子, 渡邊綱正, 折戸悦朗, 城卓志, 田中靖人: 2 剤, 3 剤併用療法における, IP-10 の治療前, 治療開始早期の推移と治療効果, ウイルス動態に与える影響. 第 20 回日本消化器関連学会週間 (第 16 回日本肝臓学会大会), 2012. 10. 10-12, 神戸市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 周子 (MURAKAMI SHUKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 50454848