

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670366

研究課題名(和文)肝幹細胞分化を基軸としたHBV cccDNAの完全排除を目指す新規治療の創成

研究課題名(英文) Human iPS-derived hepatocyte-like progenitor cells susceptible for hepatitis B virus infection

研究代表者

朝比奈 靖浩 (ASAHINA, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：00422692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)は成熟肝細胞でのみで複製するとされるが、肝細胞が一定の速度でturn overしているにも関わらず、複製中間体のcccDNAが核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、ヒトiPS細胞から肝幹・前駆細胞を分化・誘導し、純化することにより継代可能な培養法を確立した。これを用いてHBV感染実験を行ったところ、成熟肝細胞より未分化なヒトiPS細胞由来肝幹・前駆細胞においても感染が認められ、幹細胞類似形質を持つ細胞においてcccDNAが保存されることが慢性化の一因である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is unclear the mechanism responsible for persistence of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in mature hepatocyte, which constantly turn over in steady state of the liver. In the present study, we established culture system of human induced pluripotent stem (iPS) cell -derived hepatocyte-like progenitor cells. Using this culture system, we investigated infection of HBV, and demonstrated that HBV infected iPS-derived hepatocyte-like progenitor cells. Hence, it is possible HBV infection in hepatic progenitor cell may be one of the reasons for persistence of HBV in steady state of the liver. Moreover, the establishment of human iPS cell technology has led to innovative iPS-based models for drug discovery. Our data suggested iPS-Hep cells, as a promising new tool for HBV research, will facilitate our understanding of the biology of HBV and the development of anti-HBV drugs.

研究分野：消化器内科

キーワード：HBV iPS細胞 肝幹・前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)の潜伏・持続感染者は国内に2000万人以上と推定され、肝硬変・肝癌のみならず健常既感染者における致死性 de novo 肝炎の原因となる。現在治療薬として核酸アナログが広く用いられているが、本薬剤はHBVの逆転写のみを阻害するため核内に潜伏するHBV複製中間体である(covalently closed circular) cccDNAの直接排除は起こらない。cccDNAが核内に終生持続的に留まることがHBV感染の完全制圧を困難としており、現行治療を補完する新規クラスの抗ウイルス治療薬の開発が望まれている。

2. 研究の目的

HBVは成熟肝細胞でのみで複製するとされるが、定常状態の肝細胞が一定の速度でturn overしているにも関わらず、複製中間体のcccDNAが核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、「細胞周期が静止し幹細胞類似形質を持つ細胞においてcccDNAが保存されることが一因」との仮説に基づき、肝細胞の分化状態の違いがHBVライフサイクルに与える影響を解明し、従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を標的とした新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立することを目的とする。具体的には、ヒトiPS細胞由来肝幹・前駆細胞株を用いた細胞分化度を調節し得る培養系の確立し、細胞分化度の変化がHBVライフサイクルに与える影響を解析することを目指す。

3. 研究の方法

幹細胞形質/分化度の異なるヒトiPS細胞を用いて、肝細胞系譜におけるHBV感染・増殖系を新規に確立し、細胞分化の変化とHBVライフサイクルに関連する新たな機構を解析し、cccDNAの機能停止・排除可能な薬物創出を目指す。

(1)ヒトiPS細胞由来肝幹・前駆細胞株を用いた細胞分化度を調節し得る培養系の確立：ヒトiPS細胞に各種サイトカインを段階的に添加し肝細胞系への分化誘導を行う。肝幹・前駆細胞は肝幹細胞マーカーであるCD13、CD133を用いてFACSで分離し、純化・培養を行う。

(2)細胞分化度を調節し得る細胞培養系におけるHBV増殖系の構築：感染実験にはHepG2.2.15細胞由来の培養上清を濃縮して得られるHBVと、蛍光色素を組み込んだ組み換えHBVを用いる。これらのHBVを用いて各種条件下でHBV感染や増殖および粒子形成が起こるかを解析し、HBV培養・増殖系を確立する。

4. 研究成果

ヒトiPS細胞株にactivin A、FGF、BMP4、HGFを段階的に添加することにより肝細胞系譜へと分化誘導した。これらのうちCD13+CD133+陽性細胞をFACSにより繰り返し

分離することでiPS由来肝幹/前駆細胞(iPS-Hep細胞)を純化することが可能となった。肝細胞系譜へと誘導したヒトiPS由来細胞は、AFP、HNF4aを高度に発現しており、FACSを用いてCD13+CD133+陽性細胞(iPS-Hep細胞)を純化することにより、一定期間の継代培養が可能であった。純化したiPS-Hep細胞において、HBVの受容体であるNTCPのmRNA発現を解析したところ、肝癌細胞株と比較して100倍以上の高発現量を認められた。また、iPS-Hep細胞におけるIFN添加時のIFN誘導遺伝子の発現誘導能はHepG2-NTCPに比しiPS-Hep細胞で有意に高かった($p < 0.001$)。次にiPS-Hep細胞におけるHBVの感染性を検討するために、HepG2.2.15細胞由来HBVを培養上清に添加したところ、細胞内に0.3copies/cellのcccDNAと 2×10^8 copies/mlのHBVDNAが上清中に確認され、HBV感染がiPS-Hep細胞において成立することが示唆された。

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20件)

1. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kusano-Kitazume A, Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired induction of IL28B and expression of IFN 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 30:1075-1084. doi: 10.1111/jgh.12902. 査読有

2. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzuka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res* 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421. 査読有

3. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP

Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; 9: e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449. 査読有

4. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013; 58: 1253-1262. doi: 10.1002/hep.26442. 査読有

5. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013; 49:1152-1162. doi: 10.1007/s00535-013-0858-2. 査読有

6. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2013; 43: 1-34. doi: 10.1111/hepr.12020. 査読有

7. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I

interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57: 46-58. doi: 10.1002/hep.26017. 査読有

8. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 2013; 57: 2502-2513. doi: 10.1002/hep.26293. 査読有

[学会発表](計15件)

1. Asahina Y, Kawai-Kitahata F, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M,

Kakinuma S, Tanaka S, Tanabe M, Enomoto N, Watanabe M. Gene Alterations in TERT promoter, CTNNB1, and TP53 are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma:

comprehensive analyses by next generation sequencing technology. The 50th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2015), Vienna, Austria, April 2015.

2. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Gene alterations in β -catenin and p53/ cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma:

Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014. [Oral presentation]

3. Nakagawa M, Asahina Y, Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based- direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

4. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN γ in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

5. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. The 65th

Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

6. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Yamamoto K, Sasazuki T, Sugiyama M, Seto W, Yuen M, Poovorawan Y, Ahn SH, Han K, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang J, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

7. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN 4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.

8. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN 4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

9. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

10. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wk, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki

K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashina M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analysis of HLA-DPA1, DOB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

11. Asahina Y, Nakagawa M, Taniguchi M, Kawai F, Fujiki J, Otani T, Yamanaka H, Murakawa M, Nitta S, Kitazume A, Watanabe T, Sakurai Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Serum interleukin-6 levels during treatment correlate with resistance to telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C. The 48th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2013), Amsterdam, Netherlands, April 24-28, 2013.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

朝比奈 靖浩 (ASAHINA, Yasuhiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・寄附講座教授
研究者番号：00422692

(2) 研究分担者

柿沼 晴 (KAKINUMA, Sei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：30372444

中川 美奈 (NAKAGAWA, Mina)
東京医科歯科大学・医歯学融合教育センター・准教授
研究者番号：30401342