

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293178

研究課題名(和文) ゲノム改変型ヒト多能性幹細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of hepatitis virus infection / replication mechanism using genome-modified human pluripotent stem cells

研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30321904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型、C型肝炎ウイルス(HBV、HCV)の持続感染は本邦における肝硬変・肝癌等の大きな要因であるが、その感染性の種特異性から解析が困難な問題があった。本研究ではヒトiPS細胞から肝細胞を誘導し、HBV感染解析系を構築する目的で、1. HBV感染受容体の高発現型ヒト肝細胞の作製、2. 肝細胞の高機能化を担う遺伝子のスクリーニング、といった研究を行った。その結果、Ntcpを強制発現したヒトiPS細胞由来肝細胞で効率的にHBVが感染・増幅することやKLF15が肝細胞の高機能化に重要なことなどを見出している。

研究成果の概要(英文)：Chronic infection of hepatitis B virus (HBV, HCV) is a major cause of cirrhosis, liver cancer etc in Japan. However, it was difficult to analyze because of the species specificity of its infectivity. In this study, for the purpose of deriving hepatocytes from human iPS cells and constructing an HBV infection analysis system, 1) preparation of highly expressed human hepatocytes of HBV receptors, 2) genes responsible for high function of hepatocytes Screening, etc. were conducted. As a result, it has been found that HBV is efficiently infected / amplified in human iPS cell-derived hepatocytes overexpressing Ntcp, and that KLF 15 is important for enhancing hepatocyte function.

研究分野：肝細胞生物学

キーワード：ヒトiPS細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦において、B型、C型肝炎ウイルス (HBV, HCV) の持続感染に起因する慢性肝炎は、肝硬変・肝癌の最大の原因となっている。ウイルスの種特異性 (ヒト選択性) によりマウス、ラットといった簡便な実験動物による研究が困難なことから、HBV および HCV ゲノムの複製に必要な部分で構成されたレプリコン RNA や JFH-1 等の特定のウイルス株とヒト肝癌細胞株等を組み合わせることで、ウイルスの複製機構の解析・インターフェロン等への反応性の研究が行われている (Wakita, et al., 2005 など)。肝炎ウイルスに幅広い感染能力のある正常ヒト肝細胞としては、現在では脳死等の移植ドナー肝臓の残肝部分から得られた肝細胞等が利用できるのみで、安定かつ大量のヒト肝細胞の供給が今後の研究の進展に必須である。

多能性幹細胞 (ES, iPS 細胞) は、多様な臓器・組織の機能細胞への多分化能と高い増殖性を持ち、再生医療等の重要なソースである。ヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の分化誘導では、Fibroblast growth factor (FGF) や Hepatocyte Growth factor (HGF) といった肝発生に重要なサイトカインを連続的に添加するプロトコルが報告されており、申請者が幼弱肝細胞の成熟促進因子として以前同定したオンコスタチン M (Kamiya et al., 1999) も、ヒト ES, iPS 細胞からの成熟肝細胞分化誘導に利用され、薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP450) や各アミノ酸代謝酵素などの成熟肝特異的遺伝子の発現に寄与している (Si-Tayeb K et al., 2010, Inamura et al., 2011 など)。しかし、成熟肝細胞は *in vivo* での高い再生能力に比べて *in vitro* では限定された増殖能力しか持たないことから、大量のヒト肝細胞を iPS 細胞から得るには様々なコスト面・技術面の問題点がある。

2. 研究の目的

B型、C型肝炎ウイルス (HBV, HCV) の持続感染は本邦における肝硬変・肝癌等の致死性肝疾患の最大の要因となっている。直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) の登場により HCV 治療の成績が急激に改善され、ほぼ寛解が見込める状況であるのに対し、HBV はリバビリン等を用いたウイルス増殖抑制の状況でも発癌が見られるなど、未

だ重要な課題となっている。ウイルスのヒト選択性から、感染関与遺伝子を改変した動物モデル等での HBV の感染実験は困難であり、HBV ウイルス感染の分子機構の解明の障害となっていた。申請者らは、ヒト iPS 細胞から肝幹・前駆細胞、そして成熟肝細胞を誘導する培養系を独自に開発している。また最近、トランスポゾンやゲノム上の任意の配列を切断できるゲノム編集酵素を用いたヒト iPS 細胞等の遺伝子改変法が報告され、申請者らも特定の遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞の作製に成功している。

そこで本研究では、高機能なヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製し、HBV 感染・解析系の構築を行う。

3. 研究の方法

申請者は、ヒト iPS 細胞をサイトカイン処理により肝臓系細胞へと分化誘導したのちに肝幹細胞マーカー特異的抗体による純化法とフィーダー細胞を用いた培養法により、長期増殖可能な肝幹・前駆細胞様の細胞を得ることに成功している。本研究では、このヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞を大量に培養した後に、肝炎ウイルス感染可能な高機能な成熟肝細胞へと分化誘導することで、感染実験に適したヒト肝細胞を大量・簡便に得る系を構築する。

近年、HBV ウイルスの感染に必要な受容体として Ntcp や ASGPR が関与することが報告された。そこで、本研究ではトランスポゾン遺伝子導入などの方法を用いて、Ntcp 強制発現ヒト肝細胞を iPS 細胞から樹立し、HBV 感染に用いることを行った。

また、ヒト肝細胞の成熟過程で HBV の感染性が変化するか解析するとともに、より高機能な肝細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導する系の構築を進めた。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞に Piggybac トランスポゾンを用いて、薬物誘導性 Ntcp および ASGPR 発現カセットを導入した。この細胞を用いて、肝臓系への分化誘導を行い、肝前駆細胞画分をフローサイトメーターを用いて分取・フィーダー細胞上で培養した。この細胞は通常の細胞と同様に長期増殖が可能な一方で、ドキシサイクリン刺激によって Ntcp および ASGPR の発現誘導が可能である。そこで、HepG2.2.15.7

細胞を用いて採取した HBV をこの細胞に感染させた結果、Ntcp の発現誘導によって HBV 感染が誘導され、HBV cccDNA などが検出された。興味深いことに、この細胞にインターフェロンや tenofovir を投与することでウイルス増殖の抑制が可能であり、この培養系が HBV の抗ウイルス薬などのスクリーニングに使用可能と考えられた。今後、iPS 細胞にゲノム編集等を行うことで、ウイルスの感染を抑制できるような遺伝子の探索を目指す。

また、HBV 感染と肝細胞の成熟化の関連性を解析する目的で、肝機能を制御する転写因子群の網羅的解析を行った。マウス胎仔肝前駆細胞および成体肝細胞を分離・純化し、マイクロアレイを用いて肝発生過程で発現が変化する転写調節因子のスクリーニングを行った。得られた候補遺伝子群をマウス胎仔肝前駆細胞に遺伝子導入し、肝機能遺伝子の発現を解析した結果、Kruppel 型転写調節因子ファミリーに属する KLF15 を遺伝子導入することで、複数の肝機能遺伝子の発現を誘導できることを見出した(図 1)。そこで、次にヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞で同様の実験を行った。

ヒト iPS 細胞をサイトカインの連続添加により肝細胞系へと分化誘導した後にラミニン上で継代培養することで持続増殖可能な肝前駆細胞が得られる。このヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞に KLF15 をレトロウイ

ルスを用いて遺伝子導入し、成熟肝細胞としての機能遺伝子の発現変化などを解析した。その結果、KLF15 によって種々の肝機能遺伝子の発現や薬物代謝活性が誘導されることを見出した。さらに一部の肝機能遺伝子のプロモーター活性を KLF15 が上昇させることを見出している。

そこで、Ntcp 発現と KLF15 との関連を解析した結果、KLF15 によって Ntcp が誘導されることを見出している。今後、このような高機能ヒト肝細胞における HBV の感染実験・解析等を行う予定である。

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 6 件)

(1) Nakano Y, Nakao S, Sumiyoshi H, Mikami K, Tanno Y, Sueoka M, Kasahara D, Kimura H, Moro T, Kamiya A, Hozumi K, Inagaki Y, Identification of a novel alpha-fetoprotein-expressing cell population induced by the Jagged1/Notch2 signal in murine fibrotic liver. *Hepatol Commun.* 27, 215-229, 2017. doi: 10.1002/hep4.1026. (査読有)

(2) Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Asano Y, Nagata H, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Iwamoto M, Watashi K, Wakita T, Watanabe M. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci Rep.* 6, 29358, 2016 (査読有)

(3) Anzai K, Chikada H, Tsuruya K, Ida K, Kagawa T, Inagaki Y, Mine T, Kamiya A*. Foetal hepatic progenitor cells assume a cholangiocytic cell phenotype during two-dimensional pre-culture. *Sci Rep.* 6, 28283, 2016. (*Corresponding Author) (査読有)

(4) Yanagida A, Mizuno N, Yamazaki Y, Kato-Itoh M, Umino A, Sato H, Ito K, Yamaguchi T, Nakauchi H, Kamiya A*. Investigation of bi-potent differentiation of hepatoblasts using inducible diphtheria toxin

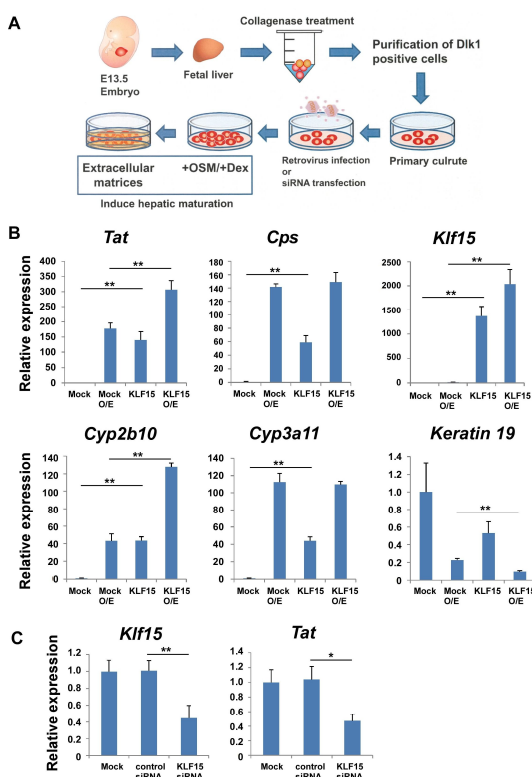


図1 KLF15による肝機能遺伝子の発現誘導

receptor-transgenic mice. Hepatol Res. 46, 816-28, 2016 (*Corresponding Author)
(査読有)

(5) Chikada H, Ito K, Yanagida A, Nakauchi H, Kamiya A*. The basic helix-loop-helix transcription factor, Mist1, induces maturation of mouse fetal hepatoblasts. Sci Rep. 12, 14989, 2015. (*Corresponding Author) (査読有)

(6) Kamiya A*, Ito K, Yanagida A, Chikada H, Iwama A, Nakauchi H. MEK-ERK activity regulates the proliferative activity of fetal hepatoblasts through accumulation of p16/19cdkn2a. Stem Cells Dev. 24, 2525-35, 2015. (*Corresponding Author) (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

(1) **紙谷聡英**、安齋和也、鶴谷康太、近田裕美 肝前駆細胞の成熟化を誘導する転写調節機構 第17回日本再生医療学会 2018 3/21-23 神奈川・パシフィコ横浜

(2) **紙谷聡英**、安齋和也、近田裕美、峯徹哉 肝発生過程における肝前駆細胞の胆管様細胞への分化誘導機構 第23回肝細胞研究会 2016 0708-09 大阪大学中之島センター・大阪

〔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：
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

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号： 30321904

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

柿沼 晴 (KAKINUMA, Sei)
東京医科歯科大学・医学部・准教授
研究者番号： 30372444

(4) 研究協力者

()