

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15169

研究課題名(和文) HBV高感受性ヒト肝細胞株の樹立とHBV増殖制御因子の解析

研究課題名(英文) Establishment of HBV-sensitive human hepatocyte lines and analysis of HBV essential factors

研究代表者

上田 優輝 (Ueda, Youki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90756074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HBVの基礎研究では肝がん細胞株由来のHepG2/NTCP細胞株が世界的に汎用されている。我々はHepG2とは遺伝子プロファイルが大きく異なる肝がん細胞株由来のLi23/NTCP細胞にHBV感受性を新たに見出したが、その感受性はHepG2/NTCP細胞の1/100以下であった。今回の研究において、我々はLi23/NTCP細胞を限界希釈法によるサブクローニングを繰り返すことによってHepG2/NTCPと同等のHBV感受性を示すA8.15.78.10細胞の樹立に成功した。これらの細胞株を用いて、我々は抗HBV剤の正当な評価には異なるタイプの細胞株を用いたHBVアッセイ系が必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのHBVの基礎研究においてはHepG2/NTCP細胞という1種類の細胞株のみを用いた研究が大半である。我々は本研究において、抗HBV剤の正当な評価には異なる細胞株を用いたHBVアッセイ系を使用することが必要であることを示した。複数のHBVアッセイ系を用いた評価を行うことで、抗HBV活性の評価結果の信頼性が上がり、臨床応用に向けた研究の効率化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cells derived from the human hepatoma cell line HepG2 and engineered to overexpress NTCP: a receptor for HBV, termed HepG2/NTCP cells, are widely used as the cell-based HBV infection and replication systems for HBV research. We recently found that human hepatoma cell line Li23-derived cells overexpressing NTCP (A8 cells subcloned from Li23 cells) were also sensitive to HBV infection. However, the HBV susceptibility of A8 cells was around 1/100 that of HepG2/NTCP cells. In the present study, we successfully established a Li23/NTCP-derived A8.15.78.10 cell line exhibiting high HBV susceptibility equivalent to that of the HepG2/NTCP cells widely used for HBV research. Using A8.15.78.10 and HepG2/NTCP cells, we demonstrated the necessity of plural HBV assay systems using different types of cells for the objective and impartial evaluation of anti-HBV reagents.

研究分野：B型肝炎ウイルス

キーワード：B型肝炎ウイルス(HBV) Li23/NTCP細胞 サブクローニング A8.15.78.10細胞 HepG2/NTCP細胞 cGAS, STING経路 薬剤感受性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

HBV の感染により引き起こされる慢性肝炎は長期に渡って肝細胞の破壊と再生を繰り返すことにより肝硬変や肝細胞がんを発症する。HBV は全世界では3億5千万人以上、日本においても約130~150万人が感染していると推定されており、世界的な感染症である。B型慢性肝炎の治療はインターフェロンや核酸アナログ製剤などが用いられているものの、HBV を体内から完全に排除することは難しく、薬剤耐性ウイルスの出現や再活性化などが問題になっている。そのため新しいタイプの抗HBV剤が求められている。しかしながら、多くの核酸アナログ製剤はヒト免疫不全ウイルスに対する薬剤として開発されたものを流用したものが多く、HBV の感染増殖機構自体は未だ未解明な部分が多いことから新薬の開発はほとんど進んでいない。近年、HBV の研究では胆汁酸トランスポーターのNTCPがHBV の感染に必要な因子であることが発見された。ヒト肝がん由来の細胞株であるHepG2細胞株にNTCPを発現させるとHBV に高い感受性を示すようになることから、現在、NTCPを発現させたHepG2細胞が世界的に汎用されている。しかしながら、1種類の細胞株のみで行う研究では比較対象が存在しないことから得られる情報が偏り、HBV に寄与する宿主因子や抗HBV剤候補など多くのものを見逃している可能性が高い。我々は、昨年HepG2細胞株とは異なるヒト肝がん由来の細胞株であるLi23細胞にNTCPを発現させるとHBV に感受性を示すようになることを見出し報告した(Dansako, Ueda et al., The FEBS J, 2016)。また、Li23細胞以外の異なる細胞株にもHBV感受性を見出している(未発表)。残念ながら、Li23細胞を含むこれらの細胞のHBV感受性はHepG2細胞の1/100以下と低いことが分かった。これらの細胞ではHBVの感染増殖に必要なNTCP以外の宿主因子が不足しているためではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では、「HepG2細胞株だけで行われる研究では見逃されたものがあるのか」という問いに応えるために、HepG2細胞とは異なる細胞株でHBVに高い感受性を示すサブクローン化細胞株を樹立し、抗HBV剤候補の探索及びHBV増殖制御因子の解析を行うために以下の3項目を目的とした。

- (1) HepG2細胞株以上のHBV感受性を示す細胞株を樹立する
- (2) 新規抗HBV剤候補を見出す
- (3) HBVの感染増殖に寄与する新規宿主因子を同定する

## 3. 研究の方法

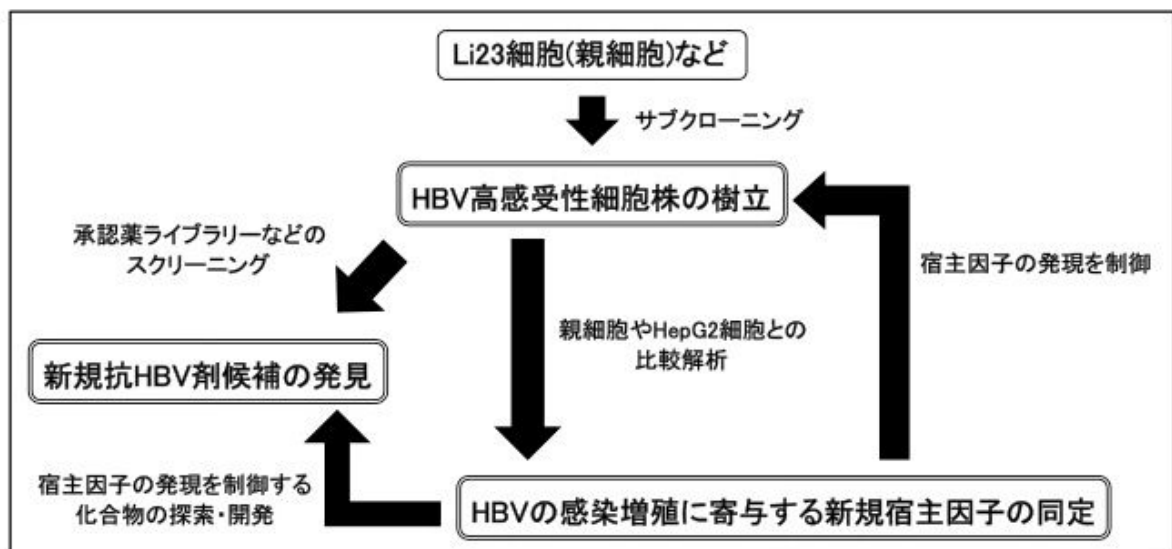


図1. 研究計画の概要

研究の方法は図1の概略図に記した3点を柱として行った。

### 『1』 HBV に高い感受性を示すサブクローン化細胞株の樹立

NTCPを発現させたLi23細胞(Li23/NTCP細胞：親細胞)を限界希釈法によりサブクローニングを行い、数十種類のサブクローン化細胞を作成する。これらの細胞にHBV/secNL(HBVの感染増殖性を定量的に評価できるレポーターアッセイ系：Nishitsuji H et al., Cancer Sci, 2015)を感染させ、HBVに感受性が高い細胞クローンを選択する。選択した細胞クローンを1ヶ月程培養して再び細胞に多様性を持たせた後に、再度細胞のサブクローニングを行う。そして、さらにHBV感受性の高い細胞クローンの選択・取得を試みる。必要に応じて、このサブクローニングを繰り返し行う。これにより『2』及び『3』で使用可能なサブクローン化細胞株を2種類以上樹立

する。『 3 』で HBV の感染増殖に寄与する新規宿主因子が同定できた場合は、新規宿主因子の発現をレトロウイルスベクターや CRISPR/Cas9 システムなどを用いて人工的に制御することにより、さらに HBV 感受性の高い細胞の作出ができるか、或いは他の種類の肝細胞株においても HBV 感受性を獲得させることができるかどうかを検討する。

## 『 2 』新規抗 HBV 剤候補の探索

『 1 』で得られた HBV 高感受性サブクローン化細胞株を用いて承認薬ライブラリーから薬剤のスクリーニングを行う。抗 HBV 活性は HBV/secNL や HepG2.2.15 細胞から産生される HBV ウイルスを用いた感染実験によりウイルスのどの段階を阻害しているかを詳細に評価・検討する。候補となる薬剤が見つかった場合は、HepG2 など異なる細胞株での薬剤感受性も評価し臨床応用が可能かを検討する。『 3 』で HBV の感染増殖に必要な新規宿主因子が同定できた場合は、宿主因子を標的とする化合物の探索・開発も並行して行う。

## 『 3 』HBV の感染増殖に必要な新しい宿主因子の同定

前項の研究で得られる予定の Li23 細胞株由来で HBV に高感受性を示すサブクローン化細胞、親細胞である Li23 細胞および HepG2 細胞を用いて、cDNA マイクロアレイやタンパク質のリン酸化アレイなどによる比較解析を行う。これらの解析により HBV の感染増殖に寄与する可能性のある宿主因子を選択する。得られた候補因子については、RT-PCR や Western Blot 解析により mRNA やタンパク質レベルでの発現レベルの差を確認した後に、CRISPR/Cas9 システムによる候補因子のノックアウトやレトロウイルスベクターを用いた候補因子の過剰発現の手法を用いて、候補因子が HBV の感染増殖に寄与しているかどうかを明らかにする。以上の手法により HBV の感染増殖に必要な新たな宿主因子を同定する。同定ができた場合は免疫染色や免疫沈降などにより HBV の感染増殖にどのようにして寄与しているかを明らかにする。また、宿主因子に変異を導入したり欠損させたりすることで、宿主因子の機能のどの部分が HBV に重要であるかを明らかにする。

## 4. 研究成果

Li23/NTCP 細胞はサブクローニングによって徐々に HBV 感受性が上がり、最終的に 4 回のサブクローニングによって、HepG2/NTCP 細胞と同等以上のサブクローン化細胞 (A8.15.78.10) が得られた。サブクローニングによる HBV 感受性上昇の要因を解明するため、まず、HBV 感染に必要な NTCP のタンパク質発現レベルについて調べた。その結果、サブクローニングをする毎に NTCP のタンパク質発現レベルが上昇し、また NTCP のリン酸化レベルも同様に上昇していた。次に、我々は自然免疫応答に關与する cGAS-STING 経路が HBV 感受性に影響を与えることを既に発見 (Dansako et al., FASEB BioAdv, 2019) していたことから、Li23/NTCP 由来サブクローン化細胞での発現レベルの解析を行った。その結果、cGAS および STING の mRNA 発現レベルはサブクローニングをする毎に低下していくことがわかった。これらの要因が A8.15.78.10 細胞の高い HBV 感受性に寄与することが示唆された。Li23 細胞は HepG2 細胞と遺伝子発現プロファイルが大きく異なるため、薬剤感受性に差がでることが予想された。そこで、HBV の感染阻害活性が報告されているいくつかの化合物について HBV/secNL レポーターアッセイ系を用いて評価した。その結果、Cyclosporin A については両細胞株での薬剤感受性に大きな差は認められなかった。しかし Rosiglitazone は HepG2/NTCP 細胞では既報通り抗 HBV 活性が認められるものの、A8.15.78.10 細胞では抗 HCV 活性は認められなかった。このことから、細胞株の違いによって薬剤感受性に大きな差が認められた。従って、抗 HBV 剤の正当な評価には異なる細胞株を用いた HBV アッセイ系が必要であることが示唆された。基礎研究における抗 HBV 剤の評価結果の信頼性が上がることで臨床応用にむけた研究の効率化がより進むことができる。目的(3)については今回の研究では同定するまではいかず、今後より詳細な比較検討を行うことが必要である。これらの結果は国際学会 (Ueda et al., HBV meeting 2019 など) や国際誌 (Ueda et al., BBRC, 2019) などに発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueda Youki, Gu Weilin, Dansako Hiromichi, Nishitsuji Hironori, Satoh Shinya, Shimotohno Kunitada, Kato Nobuyuki	4. 巻 515
2. 論文標題 A new hepatoma cell line exhibiting high susceptibility to hepatitis B virus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 156 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoh Shinya, Onomura Daichi, Ueda Youki, Dansako Hiromichi, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Kato Nobuyuki	4. 巻 476
2. 論文標題 Ribavirin-induced down-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein leads to suppression of lipogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 137 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20180680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nobuyuki Kato, Youki Ueda, Hiroe Sejima, Weilin Gu, Shinya Satoh, Hiromichi Dansako, Masanori Ikeda, Kunitada Shimotohno	4. 巻 165
2. 論文標題 Study of Multiple Genetic Variations Caused by Persistent Hepatitis C Virus Replication in Long-Term Cell Culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 331~343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-019-04461-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dansako Hiromichi, Imai Hirotaka, Ueda Youki, Satoh Shinya, Shimotohno Kunitada, Kato Nobuyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 High-level expression of STING restricts susceptibility to HBV by mediating type III IFN induction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 67 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1096/fba.1022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Youki, Gu Weilin, Dansako Hiromichi, Kim Hye-Sook, Yoshizaki Sayaka, Okumura Nobuaki, Ishikawa Tomohiro, Nishitsuji Hironori, Kato Fumihiko, Hishiki Takayuki, Satoh Shinya, Ishii Koji, Masuda Michiaki, Shimotohno Kunitada, Ikeda Masanori, Kato Nobuyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Multiple antiviral activities of the antimalarial and anti-hepatitis C drug candidates N-89 and N-251	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imai Hirotaka, Dansako Hiromichi, Ueda Youki, Satoh Shinya, Kato Nobuyuki	4. 巻 504
2. 論文標題 Daunorubicin, a topoisomerase II poison, suppresses viral production of hepatitis B virus by inducing cGAS-dependent innate immune response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 672~678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ueda Y, Gu W, Dansako H, Nishitsuji H, Satoh H, Shimotohno K, Kato N.
2. 発表標題 A new human hepatoma cell line exhibiting high susceptibility to HBV infection.
3. 学会等名 The 2019 international HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 優輝、Gu Weilin、團迫 浩方、西辻 裕紀、佐藤 伸哉、下遠野 邦忠、加藤 宣之
2. 発表標題 HBV高感受性新規肝がん細胞株の樹立
3. 学会等名 第34回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 團迫 浩方、今井 大誉、上田 優輝、佐藤 伸哉、加藤 宣之
2. 発表標題 ヒト不死化肝NKNT-3細胞において、細胞外小胞を介する細胞間自然免疫伝達機構の解明
3. 学会等名 第34回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 伸哉、小野村 大地、渡士 幸一、上田 優輝、團迫 浩方、本多 政夫、金子 周一、加藤 宣之
2. 発表標題 転写因子C/EBP を標的にした中性脂肪合成阻害剤の探索
3. 学会等名 第3回中性脂肪学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野村 大地、佐藤 伸哉、團迫 浩方、上田 優輝、加藤 宣之
2. 発表標題 抗HCV薬リバビリンによるGPAM発現抑制機序の解析
3. 学会等名 第3回中性脂肪学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda Y, Gu W, Dansako H, Nishitsuji H, Satoh S, Shimotohno K, Kato N.
2. 発表標題 A new hepatoma cell line exhibiting high susceptibility to HBV infection.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dansako H, Imai H, Ueda Y, Satoh S, Kato N.
2. 発表標題 HBV-triggered antiviral signaling is transduced to neighboring cell by mediating extracellular vesicles in human immortalized hepatocyte NKNT-3.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 伸哉、小野村 大地、上田 優輝、團迫 浩方、本多 政夫、金子 周一、加藤 宣之
2. 発表標題 抗ウイルス薬リバピリンによる転写因子C/EBP タンパク質の分解亢進は細胞内中性脂肪量を低下させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野村 大地、佐藤 伸哉、團迫 浩方、上田 優輝、加藤 宣之
2. 発表標題 抗HCV薬リバピリンによるGAPM発現抑制機序の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda Y, Dansako H, Satoh H, Shimotohno K, Kato N
2. 発表標題 Analysis of new host factors necessary for susceptibility to HBV using plural human cell lines
3. 学会等名 The 2018 international HBV meeting, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 優輝、Gu Weilin、團迫 浩方、金 惠淑、吉崎 佐矢香、奥村 暢章、石川 知弘、西辻 裕紀、加藤 文博、日紫喜 隆行、佐藤 伸哉、石井 孝司、増田 道明、下遠野 邦忠、池田 正徳、加藤 宣之
2. 発表標題 抗マラリア及び抗HCV薬候補N-89とN-251が有する幅広い抗ウイルス活性
3. 学会等名 第28回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 優輝、Gu Weilin、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之
2. 発表標題 HCV以外の広範なウイルスにも有効性を示した抗マラリア薬候補N-89とN-251
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 團迫 浩方、今井 大誉、上田 優輝、佐藤 伸哉、下遠野 邦忠、加藤 宣之
2. 発表標題 ヒト不死化肝NKNT-3細胞におけるB型肝炎ウイルスの感染増殖性を制御する宿主因子の探索
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井 大誉、團迫 浩方、上田 優輝、佐藤 伸哉、加藤 宣之
2. 発表標題 ヒト不死化肝NKNT-3細胞におけるtopoisomerase II阻害剤によるcGAS依存的な自然免疫応答の誘導
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Shimotohno K, Kato N
2. 発表標題 Screening of the new host factors necessary for HBV proliferation using plural human cell lines
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dansako H, Imai H, Ueda Y, Satoh S, Shimotohno K, Kato N
2. 発表標題 Highly expression of STING restricts HBV infection by mediating the induction of type III interferon in human immortalized hepatocyte NKNT-3
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imai H, Dansako H, Ueda Y, Satoh S, Kato N
2. 発表標題 Topoisomerase II inhibitor triggers cyclic GMP-AMP synthase-dependent innate immune response in human immortalized hepatocyte NKNT-3
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究代表者の業績一覧  <a href="http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/uedayouki.html">http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/uedayouki.html</a></p>
--

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷 イ琳  (Gu Weilin)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学・大学院生(博士課程)  (15301)	