

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15773

研究課題名(和文) 病態進行を反映する三次元B型肝炎ウイルス持続感染モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of three dimensional HBV infection model which reflects the pathological progression

研究代表者

姫野 美沙緒 (Himeno, Misao)

東京大学・定量生命科学研究所・特別研究員

研究者番号：80706416

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)：iPS細胞由来の各種肝臓構成細胞を用いたHBV感染モデルを構築した。iPS細胞由来肝前駆細胞は肝がん細胞株には発現していないHBV感染受容体であるNTCPを発現した。類洞内皮細胞はHBV感染の共役因子であるEGFRの細胞表面発現を誘導し、HBV感染複製効率を上げることを明らかにした。これまでに開発していたiPS細胞由来肝星細胞の一部は活性化していることを明らかにし、新たに静止期星細胞の分化誘導方法を確立した。この静止期星細胞を三次元共培養することでHBV感染複製効率の亢進が見られた。以上の結果から、新規HBV感染モデルを確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVに感染し持続感染の状態になると、その排除が困難である上、肝硬変や肝細胞がんへと移行するリスクがあり治療法の開発が急務である。

現在、研究に用いられているHBV感染モデルは、材料の入手が困難である、または、臨床での多様な患者や生体内での感染に伴う反応を反映していないなど課題があった。本研究で開発したHBV感染モデルはiPS細胞を用いるため多様な患者背景を反映することが可能である。また、肝細胞単独培養では得られない細胞間の影響を調べることが可能となった。このモデルを用いることで新規創薬開発や病態の解明に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：I constructed an HBV infection model using liver parenchymal or non-parenchymal cells derived from iPS cells in this project.

I found that the liver progenitor cells derived from iPS cells expressed NTCP, an HBV infection receptor, which is not expressed in liver cancer cell lines. We clarified that liver sinusoidal endothelial cells induce cell surface expression of EGFR on the hepatocytes, which is a coupling factor of HBV infection, and increase the efficiency of HBV infection. And we also clarified that the hepatic stellate cells derived from iPS cells which we had been developed before are partially activated, therefore, we established a new differentiation method for quiescent stellate cells. Three-dimensional co-culture of these quiescent stellate cells and hepatocytes showed a development of HBV replication efficiency.

By all results stated above, we could establish a new HBV infection model which could be used for drug discovery or elucidation of pathology.

研究分野：基礎医学

キーワード：B型肝炎ウイルス 星細胞 類洞内皮細胞 iPS細胞 三次元培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)による感染者は世界で20億人、持続感染者は3.5億人報告されている。HBV感染を予防するワクチンは開発されている一方、一旦HBVに感染し持続感染の状態になると、その排除が困難である上、肝硬変や肝細胞がんへと移行するリスクがあることが知られている。HBVの病態解明や創薬研究には長らくヒトの病態を再現する効率の良いモデルがなかった。近年、ヒト初代培養肝細胞や肝がん細胞株を用いたHBV感染系が確立されつつあるが、肝臓から分離した肝細胞は培養することで急速にその機能を失うことや、肝がん細胞株は自然免疫系を欠損し、本来の肝細胞の性質を失っている等、課題が多い。また、HBVの持続感染によって肝炎が慢性化すると、星細胞が活性化しコラーゲン等の細胞外基質を産生することで肝線維化へと進行し、肝がんへと至る。このため、培養系においてHBVの病態進行を反映するには、各種の肝構成細胞を使用したHBV持続感染モデルの開発が必要である。当研究室ではこれまでに、ヒトiPS細胞から肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有する肝前駆細胞や類洞内皮細胞、星細胞の効率的な分化誘導系を確立し、さらにこれらの肝構成細胞を使用したヒト肝臓モデルの開発に成功している(Kido et al. Stem Cell Reports 2015, Kouji et al. Stem Cell Reports 2017, 特許「肝細胞及び肝非実質細胞、並びにそれらの調製方法」)

### 2. 研究の目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染者数は多く、感染が持続すると肝線維化を経て肝細胞がんを引き起こす要因となるため治療法の開発が急務である。現在のHBV感染試験においては、ヒト肝臓から分離した初代培養肝細胞が主に利用されている。しかし、初代培養肝細胞を長期的に維持することは困難であり、未だHBV持続感染モデルは確立されていない。さらに、肝臓内で炎症に応答し、線維化を誘導する星細胞も無いことから、HBV感染から肝線維化等の病態発症に至る過程も再現出来ていない。そこで本研究では、iPS細胞から分化誘導した肝前駆細胞と類洞内皮細胞や星細胞といった非実質細胞との共培養により肝組織を構築し、HBV持続感染モデルを開発する。また、HBV持続感染における非実質細胞の機能解析や疾患バイオマーカーの探索を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS細胞由来の肝細胞を用いたHBV持続感染モデルの確立

iPS細胞の肝分化誘導系からCPMの発現を指標に肝前駆細胞を分離し、増幅する。これまでに確立したコラーゲンゲル上高密度培養系において成熟肝細胞を誘導する他、マトリゲル、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン等の細胞外マトリクス上で成熟肝細胞を誘導する。誘導した肝細胞において、HBVレセプターNTCP、HBV複製に関与する宿主因子の発現に加え、成熟肝細胞のマーカーであるアルブミン/尿素合成、薬物代謝酵素群について遺伝子、タンパク質レベルで評価、比較する。また、10週間以上の長期培養を行い、経時的に肝細胞の機能を評価し、HBV持続感染モデルを確立する。このように誘導したiPS細胞由来の肝細胞においてHBV感染・複製をHBVレポーターアッセイ系や細胞内HBVcccDNAの定量により解析する。また、iPS細胞株の違いによる肝細胞の誘導効率の差については、CPM陽性肝前駆細胞を濃縮、増幅することで均一化する。

## (2) 肝細胞と肝非実質細胞の共培養系を用いた三次元 HBV 持続感染モデルの確立

iPS 細胞由来の肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞を同一の培養系で長期に維持、増幅可能な培養条件を決定する。それぞれの細胞の混合比については、生体肝臓内での細胞比(肝細胞:類洞内皮細胞:星細胞 = 12:4:1)を参考に、決定する。培養液の組成については、各種細胞の維持、増幅に用いている培地を組み合わせ、サイトカインやインヒビター類を添加し、最適化する。このように決定した、細胞比、培養条件下において、低接着性マイクロウェルプレート上で肝組織を構築し、三次元 HBV 持続感染モデルを確立する。また、非実質細胞の HBV 感染に対する役割を解析するため、肝細胞のみを用いた肝細胞スフェロイドを同時に作製し、コントロールとする。誘導した iPS 細胞由来の肝組織および肝細胞スフェロイドにおいて HBV 感染・複製を HBV レポーターアッセイ系や細胞内 HBV cccDNA の定量により解析する。

## (3) HBV の感染・複製に対する非実質細胞の機能解析

樹立した iPS 細胞由来の肝細胞(二次元培養)、肝組織(三次元培養)、肝細胞スフェロイド(三次元培養)の HBV 持続感染モデルにおいて、HBV 感染・複製を経時的に解析、比較し、三次元培養あるいは非実質細胞の HBV の感染・複製に与える影響について考察する。さらに次世代シーケンズ解析やマイクロアレイ解析などを用いて、どのような因子が HBV 複製に寄与したのか詳細に解析する。また、HBV 感染時に細胞内で働く自然免疫応答に關与する因子についても検討する。得られた因子については、HBV 感染後に定量的 PCR 法及び IFN 応答遺伝子のレポーターアッセイにより解析する。以上の結果から、非実質細胞の肝細胞の成熟化、HBV の感染・複製、自然免疫系応答に關与する因子に着目し、その効果を明らかにする。

## (4) 三次元 HBV 持続感染モデルにおける感染バイオマーカーの探索

構築した三次元 HBV 持続感染モデルを用いて、肝障害については経時的に培養上清中に放出される ALT, AST の測定や組織化学的に評価する。星細胞においてはコラーゲン等の細胞外基質の産生、蓄積について、遺伝子/タンパク質レベルで解析する。以上より、HBV 感染後の時間と疾患の進行について関連付けする。培養上清、肝組織をサンプルとしてプロテオーム、メタボロミクスなど多変量解析を行い、疾患の早期診断を可能にするバイオマーカーの探索を行う。

## 4. 研究成果

### (1) iPS 細胞由来の肝細胞を用いた HBV 持続感染モデルの確立

iPS 細胞由来の肝前駆細胞およびそこから分取した CPM 陽性細胞を用いた HBV 複製モデルに最適な細胞外マトリクスを同定した。これらの細胞に HBV 感染を行い、感染 14 日後の培養上清中 HBs 抗原および細胞中の HBV cccDNA を測定し、HBV 感染を認めた。

### (2) 肝細胞と肝非実質細胞の共培養系を用いた三次元 HBV 持続感染モデルの確立

これまでに当研究室では iPS 細胞由来肝星細胞の分化誘導方法を確立していたが、一部が活性化していることがわかった。そこで新たに静止期星細胞の分化誘導方法を確立した。この静止期星細胞と肝がん細胞株を用いて三次元共培養を行う培地、細胞培養器、添加因子、培養日数、細胞数を決定した。得られた培養条件で星細胞と肝細胞はスフェロイドを形成した。HBV 感染 14 日後に培養上清中 HBs 抗原量を測定し、星細胞の細胞数依存的に HBs 抗原量が上昇することを明らかにした。このことから静止期星細胞は HBV 複製を亢進することが明らかとなった。

### (3) HBV の感染・複製に対する非実質細胞の機能解析

静止期星細胞と肝細胞の三次元共培養によりHBV複製が亢進した細胞において、HBV複製に関与する肝細胞の宿主因子発現が上昇していることをqPCR解析により明らかにした。静止期星細胞は平面培養すると直ちに活性化する性質を持つ。平面培養による共培養系あるいは活性化した星細胞との共培養では肝細胞におけるHBV複製の亢進は見られなかった。このことから静止期星細胞のみHBV複製を亢進する機能を有することが分かった。

iPS細胞由来類洞内皮細胞はトランスウェルを用いた共培養により肝細胞におけるHBV複製の亢進が認められた。培養上清のサイトカインアレイによりEGFを産生していることが明らかになった。EGFのレセプターであるEGFRは肝細胞表面に発現し、HBV感染の共役因子であることが報告された。類洞内皮細胞はEGF産生により肝細胞表面へのEGFR発現を誘導しHBV感染を調節していることを明らかにした。

### (4) 三次元 HBV 持続感染モデルにおける感染バイオマーカーの探索

星細胞は肝細胞死など各種の刺激により活性化され、細胞外マトリクスを産生することで肝線維化を主導する。星細胞の活性化を調べるために、星細胞活性化マーカーである SMAの下流にレポーターを導入したレポーター星細胞を樹立した。肝細胞と星細胞の共培養系においてHBV感染に伴う星細胞の活性化を調べた。樹立した培養系では星細胞の活性化は見られず、免疫細胞の共培養が必要である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shin-Wei Chen, Misao Himeno, Yuta Kouji, Masaya Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Masashi Mizokami, Kunitada Shimotohno, Atsushi Miyajima, Taketomo Kido	4. 巻 10(1):14349
2. 論文標題 Modulation of hepatitis B virus infection by epidermal growth factor secreted from liver sinusoidal endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71453-5.	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 Kouji Yuta, Himeno Misao, Mori Yusuke, Nakano Yasuhiro, Saijou Eiko, Tanimizu Naoki, Kamiya Yoshiko, Anzai Hiroko, Maeda Natsuki, Wang Luyao, Yamada Tadanori, Sakai Yasuyuki, Nakato Ryuichiro, Miyajima Atsushi, Kido Taketomo	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of human iPSC-derived quiescent hepatic stellate cell-like cells for drug discovery and in vitro disease modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3050 ~ 3063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.11.002	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shin-Wei Chen, Misao Himeno, Yuta Kouji, Masaya Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Masashi Mizokami, Kunitada Shimotohno, Atsushi Miyajima, Taketomo Kido
2. 発表標題 Modulation of Hepatitis B virus Infection by Epidermal Growth Factor.
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 姫野 美沙緒、厚井 悠太、陳 欣蔚、西辻 裕紀、杉山 真也、溝上 雅史、木戸 丈友、宮島 篤
2. 発表標題 星細胞と肝細胞の三次元共培養モデルによるB型肝炎ウイルス感染系の確立
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 厚井悠太、木戸丈友、大山裕棋、Shin-Wei CHEN、姫野（黒木）美沙緒、宮島篤
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝星細胞の活性化制御
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山裕棋、木戸丈友、厚井悠太、Shin-Wei Chen、姫野美沙緒、宮島篤
2. 発表標題 機能的胆管様構造の導入による肝組織の構築
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Oyama, Taketomo Kido, Yuta Kouji, Shin-Wei Chen, Misao Himeno, Atsushi Miyajima
2. 発表標題 GENERATION OF HUMAN LIVER TISSUE WITH FUNCTIONAL BILIARY STRUCTURE
3. 学会等名 ISSCR annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 厚井悠太、大山裕棋、チェン シンウェイ、姫野（黒木）美沙緒、宮島篤、木戸丈友
2. 発表標題 肝構成細胞の共培養によるin vitro肝モデルの構築
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山裕棋、厚井悠太、チェン シンウェイ、姫野（黒木）美沙緒、國富芳博、高井治美、宮島篤、木戸丈友
2. 発表標題 肝スフェロイドの積層による胆管ネットワークを備えた肝組織の構築
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 厚井悠太、大山裕棋、CHEN Shin-Wei、姫野（黒木）美沙緒、宮島篤、木戸丈友
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来静止期星細胞の樹立とその活性化制御
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姫野 美沙緒、木戸 丈友、久保田大貴、大栗 博毅、宮島 篤
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスの感染・複製を阻害するアルカロイド類似化合物の探索
3. 学会等名 肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 姫野 美沙緒、木戸 丈友	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アークメディア	5. 総ページ数 7
3. 書名 iPS細胞から肝類洞壁細胞への分化誘導法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------