

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17042

研究課題名（和文）蛍光活性化タンパク質を用いたB型肝炎ウイルス検出系の構築とその応用

研究課題名（英文）Construction and application of hepatitis B virus reporter system using fluorescence-activating protein

研究代表者

姫野 美沙緒（Himeno, Misao）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

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）：本研究は蛍光活性化タンパク質(Y-FAST)を有する組換えB型肝炎ウイルス(HBV)を作製し、それを用いたウイルスの病態解析や薬剤スクリーニングへの応用を目的とした。本研究において、HBVにY-FASTを挿入した組換えウイルスを作製することに成功した。ウイルスを複製した細胞の培養上清を回収し密度勾配遠心法にて成熟ウイルス粒子であるDane粒子を分離したところ野生型ウイルスと同じ画分に分離され、ウイルス粒子が形成されていることを確認した。しかし感染細胞を効率よく検出するためには複製レベルの亢進が必要であることがわかった。肝硬変モデルや薬剤スクリーニングへの応用を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のHBV複製系ではウイルスを検出するために、細胞の固定や溶解が必要である。本研究で用いた蛍光活性化タンパク質は細胞に毒性のない細胞透過性蛍光活性化試薬の添加によって検出可能であるため、HBV複製を経時的に観察可能な新規の手法を提供する。HBV感染症は現在ワクチンが存在するものの、ウイルスを完全に排除する治療法がなく、また治療後の再活性化と肝硬変・肝細胞がんが問題となっている。本研究が応用されれば、大規模な新規治療薬のスクリーニングや、治療後再活性化と肝硬変を再現するモデルとなり得るため、治療薬開発という社会的意義と、病態解明という学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project was construction and its application of recombinant hepatitis B virus (HBV) bearing a fluorescence-activating protein (Y-FAST) sequence. The recombinant HBV was successfully constructed and expressed well in HepG2 cells by plasmid transfection. The cell culture supernatant was collected and its Dane particles, which mean matured virus particles, were separated into the same fraction as the wild-type virus by using density gradient centrifugation. That indicates the recombinant virus formed mature particles. However, it was found that enhanced replication levels are required to detect infected cells efficiently. These results were investigated its applications to liver cirrhosis model and drug screening.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス レポーターアッセイ 肝硬変 肝星細胞 薬剤スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は世界で 20 億人の感染者、3.5 億人の持続感染者が報告されている。HBV 感染を予防するワクチンは開発されている一方、一度 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。このため治療法の開発が急務である。現在 HBV の感染実験にはヒト肝細胞キメラマウスやウイルスの細胞表面レセプターである NTCP を強制発現した肝がん細胞株が用いられている。ウイルス粒子は HBV 持続産生細胞の培養上清を濃縮して用いる。これらの感染系では HBV に感染し複製する細胞の割合を検出し、その複製レベルを定量するために、免疫染色、RNA-seq、qPCR などが用いられる。それらの方法は細胞の固定や溶解を必要とし操作が煩雑である上、解析後に継続して同じ細胞を観察することが出来ない。その問題を解決するためこれまでに、蛍光タンパク質 EGFP を HBV のエンベロープタンパク質に結合させたウイルス産生系や、ルシフェラーゼ活性によりウイルス複製レベルを測定する系が開発されてきた。しかし前者は感染細胞の検出には向かず、後者はウイルス複製レベル定量のために細胞を溶解しなくてはならないなどの課題が残されている。

## 2. 研究の目的

蛍光活性化タンパク質を用いた HBV 複製検出系の開発とその応用を目的とする。HBV は治療法が開発が急務であるが、現在研究に用いられている HBV 感染系は HBV 定量の操作が煩雑であり、創薬開発を推し進める上での障壁になっている。また定量のために細胞を溶解することが必要であり、そのため抗 HBV 薬治療後の HBV の再活性化なども継続的に観察することが出来ない。本研究では作製した蛍光 HBV が抗 HBV 薬のスクリーニングに有効かどうかを調べる。研究現場では HBV の免疫染色に用いる有効な抗体も不足しているため、組織学的な見地からの HBV 感染と炎症との関わりを調べることも容易ではない。本研究では、当該研究室において開発した iPS 細胞から分化誘導した肝組織の構成細胞である肝星細胞および肝類洞内皮細胞を使用した三次元的な肝組織における HBV 感染部位や肝星細胞による炎症の役割について解明するも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)HBV 感染蛍光検出システムの開発

HBV をコードするプラスミドに蛍光活性化タンパク質である Y-FAST を導入した。HBV のプラスミドは日本において最も頻度の高い遺伝型 C で、複製効率の良い 1.2 倍長のものを用いた。次に作製したプラスミドを肝がん細胞株 HepG2 にトランスフェクションし、蛍光を確認した。蛍光を確認後、培養上清を回収しポリエチレングリコールでウイルス粒子を沈殿することで純化、濃縮した。このウイルス濃縮液をショ糖密度勾配遠心法に供し、HBV ゲノムがウイルス粒子に正しくパッケージングされているかどうかを調べた。濃縮した HBV を、ウイルスのレセプターである NTCP を強制発現させた HepG2-NTCP 細胞に感染させ、感染の成立と感染後における蛍光の経時変化について調べた。

### (2)薬剤スクリーニングと HBV 感染による肝星細胞炎症反応の検出

HBV 複製に影響を与える薬剤をスクリーニングした。薬剤には新規に合成した、近年注目されている共有結合形成医薬品候補を用いた。

また、iPS 細胞から誘導した肝組織の構成細胞である肝星細胞と HBV 複製細胞を共培養することで、HBV 複製のストレスによる肝星細胞の活性化を観察した。

## 4. 研究成果

### 研究の主な成果

#### (1)HBV 感染蛍光検出システムの開発

本研究において HBV ゲノム内に蛍光活性化タンパク質 (Y-FAST) を持つ組換え HBV を作製することができた。組換え HBV をコードする plasmid を HepG2 細胞に transfection し、上清からウイルス液を回収した。濃縮したウイルスを密度勾配遠心法に供し、HBV 成熟粒子である Dane 粒子が組換えウイルスが野生株と同じ画分に分離され、成熟ウイルス粒子が形成されていることを確認した。また、その複製レベルは他の組換えウイルスである HBV/NL と同程度であることを qPCR により確認した。

## (2)薬剤スクリーニングとHBV感染による肝星細胞炎症反応の検出

HBV複製を抑制または亢進する化合物を複数同定した。

HBV複製細胞とiPS細胞由来肝星細胞の共培養系を試行した。共培養可能な条件下において肝星細胞の活性化マーカーの上昇がみられず、さらなる条件検討や共培養による炎症抑制の可能性の解析が必要であることが分かった。

### 得られた成果の国内外での位置づけとインパクト

現在も経時的にHBV複製を観察できるHBV感染モデルは存在せず、このため、創薬開発やHBV再活性化の病態解明等を困難にしている。本研究で得られた結果はHBV複製を細胞の固定・融解なしに観察出来る初めての手法の一つとなる。更なる複製レベルの改善が行われれば、薬剤スクリーニングや病態解明の強力なツールとなり得る。

### 今後の展望

今回得られたHBV複製を亢進する化合物の添加や、組換えウイルスの点変異などの更なる変更を加えることでウイルス複製レベルを亢進すれば、薬剤の大規模スクリーニングや感染動態の解明に役立つ。

iPS細胞由来肝星細胞との共培養系を用いることで、HBV感染による肝硬変の病態解明への応用も期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Misao HIMENO, Shin-Wei Chen, Taketomo Kido	4. 巻 2544
2. 論文標題 Co-culture Model for Hepatitis B Virus Infection Using iPSC-Derived Liver Progenitor Cells and Liver Sinusoidal Endothelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 107-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2557-6_7	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 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 -

1. 著者名 Shin-Wei Chen, Misao Himeno, Yuta Kouji, Masaya Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Masashi Mizokami, Kunitada Shimotohno, Atsushi Miyajima and 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金子信人、久保田大貴、姫野美沙緒、木戸丈友、宮島 篤、大栗博毅
2. 発表標題 マイケルアクセプターを有するアルカロイド類似化合物群の骨格多様化合成による抗B型肝炎ウイルス活性分子の創製
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2023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 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-Wei Chen, Misao Himeno, Yuta Koui, Masaya Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Masashi Mizokami, Kunitada Shimotohno, Atsushi Miyajima and 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、金子信人、久保田大貴、木戸丈友、宮島篤、杉山真也、モイメンリン、大栗博毅
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス複製阻害活性を示すマイケルアクセプター含有アルカロイド類似化合物の同定
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Misao Himeno, Kaneko Nobuto, Hiroki Kubota, Taketomo Kido, Atsushi Miyajima, Masaya Sugiyama, Meng Ling Moi, Hiroki Oguri
2. 発表標題 Development of anti-HBV agents that contain alkaloidal scaffolds bearing Michael acceptors
3. 学会等名 The Joint 24th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------