

令和 6 年 4 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02742

研究課題名（和文）B型肝炎ウイルスに感染するマウス肝臓細胞の作製

研究課題名（英文）Establishment of a mouse cell line for HBV infection

研究代表者

西辻 裕紀（Nishitsuji, Hironori）

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20573661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：HBV感染を許容するマウス細胞を作製するため、HBV coreと結合するヒト宿主因子を同定し、その機能解析を行った。Protein array、免疫沈降法によりHBV coreタンパク質と結合する因子を同定した。同定したHBV core結合因子をsiRNAやCRISPR-Cas9システムによって遺伝子ノックダウンを行った結果、HBV感染前期過程に重要な宿主因子の同定に成功した。これらの結果は、今後HBV感染マウス細胞の作製に重要な情報になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、HBVの動物モデル研究を行うには、多くの制限がかかっている。この問題を解決するには、汎用性の高いマウスを遺伝子操作によって、HBVに感染できるようにさせることが近道と考えられるが、なぜHBVがマウス肝臓細胞に感染できないのか詳細は知られていない。本研究で得られたHBV core結合タンパク質はHBV感染感受性を示すマウス肝臓細胞樹立に貢献できるものであると考える。さらにこれらの因子はヒト細胞においてもHBV感染に重要な役割を果たすことから、治療の標的としても期待できる。

研究成果の概要（英文）：To establish a mouse cell line susceptible to HBV infection, we identified HBV core binding proteins using protein array and immunoprecipitation. Candidates for HBV core binding proteins were knock-downed by siRNA or CRISPR-Cas9 system. One of them affected HBV replication at early step of HBV life cycle. These results will provide establishment of a mouse cell line for HBV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(以下HBV)の持続感染者は、全世界で3億5000万人と推計され、年間50-70万人が、HBV関連疾患で死亡している。HBV治療薬の開発は急務となっているが、現在使用されている抗HBV薬は抗HIV薬の転用で、HBVに特化した薬剤の開発には至っていない。これは、HBV感染・複製を容易に評価する系に制限があったことが大きな要因だが、最近になり、HBV感染を容易にモニターできる評価系の開発が進み、抗HBV薬の候補化合物が次々と報告されてきた。しかし、HBVはマウス肝細胞に感染しないため、これらの候補化合物の効果をマウスモデルで評価するためには、多くの場合、マウスの肝臓をヒトの肝臓に置き換えたヒト肝臓キメラマウスを使用しなければならず、大きな制限がいくつも存在する。これまで申請者はHBVをヒト培養細胞系で、簡便かつ安価に評価する系を開発し、HBV感染・複製に影響を与える宿主因子や、抗HBV薬の同定を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、マウス肝臓細胞にHBV感染を成立させるために必要な、ヒト肝臓細胞由来因子を同定し、HBV感染に感受性を示すマウス肝臓細胞を樹立することを目的とする。HBV感染感受性を示すマウス肝臓細胞は、HBV感染マウスモデルの作製に大きく貢献できるものと考えられる。こうして作製されたHBV感染マウスモデルは、1)HBVワクチン開発、2)抗HBV薬開発、3)HBV関連疾患の発症メカニズムの解明など、今までのHBV研究を抜本的に変えることができるものと期待される。さらに本研究で同定されたマウス肝臓細胞へのHBV感染に必要なヒト肝臓由来因子は、HBVのヒト肝臓細胞への感染にも必須の因子として想定できることから、この因子を標的とした新規抗HBV薬の開発に大きく貢献できるものと期待される。

3. 研究の方法

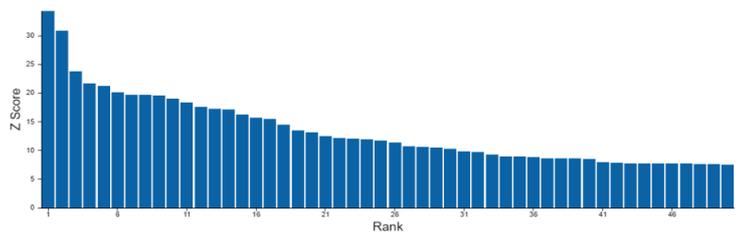
本研究ではCoreタンパク質に着目し、Coreタンパク質と結合する宿主因子の同定を行った。まずProtein arrayを行うため、ビオチン化組換えCoreタンパク質をピークル社から購入した。Protein arrayはCDI Laboratories社のHuProt Human Proteome Microarrayを使用した。さらにHepG2細胞およびHuh7細胞にHA-Core-Mycタンパク質を導入し、抗HA抗体で免疫沈降後、HA peptideで複合体を溶出し、溶出液をさらに抗Myc抗体で免疫沈降し、沈降物に含まれる宿主因子をショットガン解析で同定した。得られた3つの実験全てで結合を示したタンパク質が3種類同定された。

HBV coreタンパク質と結合を示したタンパク質のノックダウン細胞およびノックアウト細胞を作製し、HBVの感染への影響を評価した。さらにHBV感染に影響を与えるCore結合タンパク質の発現ベクターを作製し、マウス肝臓細胞であるHepa1-6-NTCP細胞に導入し、HBVの感染性を評価した。

4. 研究成果

Protein arrayの結果、Z-score3以上の遺伝子を陽性としたときに、245種類のCore結合因子が同定された(図1)。この中の上位20種類のタンパク質をsiRNAでノックダウンし、HBVを感染させた結果、SSBP3ノックダウン細胞だけがHBV感染低下が見られた。次に免疫HepG2細胞及びHuh7細胞でHBV coreタンパク質と結合する宿主因子の同定を行った。その結果、HepG2

細胞では 327 タンパク質、Huh7 細胞で 72 タンパク質が同定できた。HepG2 と Huh7 細胞の両方で同定された宿主因子は 59 タンパク質だった。さらにプロテインアレイでも同定された宿主因子(Z-score3 以上)をピックアップした結果、FIP1L1、RBMX、PARP1 の3タンパク質が同定できた。これらのタンパク質を siRNA でノックダウンし HBV を感染させた結果、RBMX ノックダウン細胞のみが HBV 感染の低下を示した (図 2)。



Rank	Protein	F635	Z Score	S Score
1	MAML2	1861.5	34.319	3.424
2	IGHG1	1682.5	30.895	7.117
3	HSD17B4	1310.5	23.778	2.028
4	SSBP3	1204.5	21.75	0.526
5	COL8A1	1177	21.224	1.024
6	IRF2BP2	1123.5	20.2	0.459
7	SORBS1	1099.5	19.741	0.086
8	AGFG2	1095	19.655	0.077
9	XIAP	1091	19.578	0.536
10	CAPRIN1	1063	19.042	0.688

図 1. Protein array による HBV core 結合タンパク質の同定

さらにこれらの因子のノックアウト(KO)細胞を作製し、HBV 感染への影響を確認した。その結果、FIP1L1-KO および RBMX-KO 細胞に HBV を感染させた細胞は、野生型細胞と比べて HBe 抗原量の減少が確認できた。しかし PARP1-KO は HBV 感染に全く影響を及ぼさなかった。

次にこれらの因子が HBV 複製サイクルのどのステップに影響しているかの検討を行うため、cccDNA、HBV RNA の定量を行った。FIP1L1-KO 細胞に HBV を感染させると野生型細胞と比較して、HBV の cccDNA、HBV RNA 量の減少が確認できた。RBMX-KO 細胞では cccDNA 量には顕著な差は見られなかったが、HBV RNA 量の減少が見られた。これらの結果から、FIP1L1 は HBV 感染前期過程に影響し、RBMX は HBV の感染後期過程に影響していることが示唆された。

したがって、今回は FIP1L1 に着目し、さらなる実験を行った。FIP1L1 の発現ベクターを作製し、マウス Hepal-6 細胞にヒト NTCP および FIP1L1 を導入した細胞(Hepal-6-hNTCP-FIP1L1)を樹立した。この細胞に HBV を感染させた結果、HBV 感染は全く成立しなかった。

以上の結果から、FIP1L1 はマウス細胞への感染へは影響しなかったが、HBV 感染前期過程を制御する宿主因子であることが示唆された。

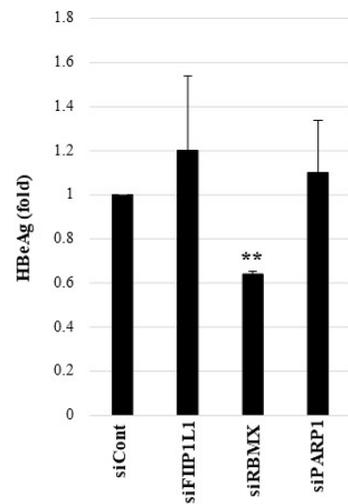


図2. HBV core結合因子のHBV感染への影響
p< 0.01

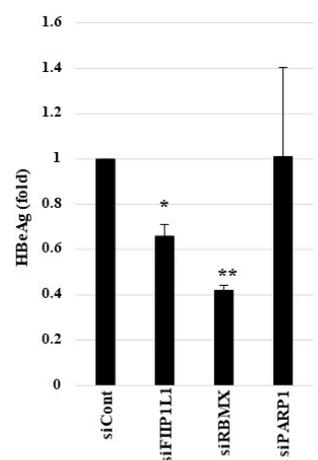


図3. HBV core結合因子ノックアウト細胞におけるHBV感染への影響
** p< 0.01, * p<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------