

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659090

研究課題名（和文） B型肝炎ウイルス感染の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of the infection of hepatitis B viruses

研究代表者

黒木 和之 (KUROKI KAZUYUKI)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：20178122

研究成果の概要（和文）：B型肝炎ウイルス感染機構研究のための新規B型肝炎ウイルスベクターの作製およびダックB型肝炎ウイルス(DHBV)の感染に関わる宿主因子の同定とB型肝炎ウイルスの*in vitro*感染系の確立を試みた。その結果、分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を組込んだB型肝炎ウイルスの効率的な産生に成功した。また、DHBVの感染に関わる宿主因子は同定できていないが、ヒト肝がん由来細胞株HuH7が*in vitro*感染系樹立に有望であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：For the study of entry pathway of hepatitis B viruses, we have constructed novel hepatitis B virus vectors and attempted to identify the host molecules related to the entry pathway and to establish *in vitro* infection systems for these viruses. As the results, we could construct novel hepatitis B virus vectors containing secretion-type luciferases as reporter genes. Unfortunately, we could not identify the host molecules relate to DHBV infection, but we were able to find human hepatoma cell HuH7 as HBV susceptible cells under the culture condition containing 2% DMSO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	360,000	2,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス、ウイルスベクター、HBV、DHBV、感染、肝細胞

1. 研究開始当初の背景

HBVの宿主レセプター探索は、1986年Cell誌に米国のNeurathらが分子種不明の低分子蛋白質を候補として発表以来ポリアルブミン、トランスフェリンレセプター、HDLレセプター、IgA、ApoH、LPL、ASGR等々があげられてきたが証明されたものはない。HBVレセプター分子の同定は重要な、また、困難なテーマであることは研究

者の一致した思いであるにちがいない。私は、米国UCSFのGanem Lab.においてHBVエンベロープpreS1の機能解析(Kuroki et al., MCB, 1989)を行い、さらにHBVレセプター探索へと研究を進めたが結局同定することはできなかった。そこで、私はモデルとしてのダックB型肝炎ウイルス(DHBV)に着目し研究を再開することにした。DHBVがB型肝炎ウイルスのモデルと

して分子生物学的に非常によく研究されていること、特に、HBV ではヒト初代培養肝細胞にさえ感染が非効率的で容易ではないのに対して、DHBV は感染効率が高い

(ほぼ 100%) 初代培養肝細胞の *in vitro* 感染系が確立されていた。これは、DHBV nonpermissive な肝癌由来培養細胞株に DHBV receptor を発現させることができれば容易に DHBV permissive となる細胞が得られることを意味すると考えた。幸いなことに、我々は DHBV エンベロープ preS 分子と特異的に強く結合する宿主膜糖蛋白質を発見でき gp180 と命名した (Kuroki et al., JV, 1994)、さらにこの分子がユニークな構造をした新規の膜結合性カルボキシペプチダーゼであることを発表した (Kuroki et al., JBC, 1995)。gp180 が DHBV receptor であることはのちにドイツの Schaller ら、米国の Wands らによっても証明され、B 型肝炎ウイルスで唯一宿主レセプターとして広く認知される分子となった。最近、DHBV 感染の成立には gp180 の他に第 2 の未知の宿主因子の関与の可能性がわかり B 型肝炎ウイルス感染の分子機構は予想以上に複雑であると考えられるようになった。

一方、HBV については最近になって HepaRG 細胞を用いた *in vitro* 感染系が報告されたが感染の効率は高くなく、また使用上の制約が多いことから新規の感染系の確立が望まれていた。

2. 研究の目的

肝炎、肝がん発生の原因ウイルスであるヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) の Life cycle を理解することは、ウイルス学上重要であるとともに、このウイルスの感染・増殖を阻止する新たな方策を探る上で大切である。本研究は、国内外の多くの研究者の四半世紀におよぶ努力にもかかわらずほとんど不明のまま今日にいたっている B 型肝炎ウイルスの肝臓特異的感染の分子機構についてふたつのアプローチ (1) 分子生物学的によく研究され、唯一 *in vitro* 感染系が確立されたダック B 型肝炎ウイルス (DHBV) をモデルとした宿主側因子の網羅的同定 (2) ヒト肝がん由来細胞株や iHep 細胞、また iPS 細胞より分化誘導した肝細胞などを用いた HBV *in vitro* 感染系の樹立から解明の端緒を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

レポーター遺伝子導入 DHBV、HBV ベクターの作出

DHBV-CLuc は、DHBV の preS プロモーター下流の領域を CLuc DNA に置換して作製す

る。また、HBV-GLuc は HBV adw2 の S プロモーター下流の領域を GLuc DNA に置換して作製する。置換によるウイルスゲノムサイズに変化は無い、また、置換する領域は B 型肝炎ウイルスゲノムの複製に影響を与えない。導入されたこれらルシフェラーゼは酵素活性が高く、培養液中へ分泌されるので活性測定が容易であり感染関連宿主因子やウイルス感受性細胞の高感度ハイスループットスクリーニングに適していると考え利用する。蛍光蛋白質 GFP を導入した DHBV、HBV ベクターはすでに作製のものを利用する。

DHBV 感染に関わる宿主因子の探索

ダック肝臓より調製した polyA⁺ RNA を材料に cDNA を合成し、これらをレトロウイルスベクター (pFBneo) およびファージミドベクター (Lambda ZAP-CMV) に組み込んだダック肝臓 cDNA 発現ライブラリーをそれぞれ作製する。

ニワトリ肝癌由来細胞株 LMH 細胞に DHBV 感染成立に必要なダック gp180 安定的に導入した細胞株 LMHhyg180 へダック肝臓 cDNA 発現ライブラリーを導入し一過性のダック肝臓 cDNA 発現細胞または G418 選択による安定発現細胞を得る。これらのなかからレポーター遺伝子を組み込んだ DHBV ベクターを用いて DHBV 感受性細胞を選択し、これら細胞に含まれるダック肝臓 cDNA の解析から感染に関わる宿主因子の探索を試みる。

HBV、DHBV 感染培養細胞系の確立の試み

4 種のヒト肝がん由来培養細胞株 (HuH7、HepG2、HLE および Hep3B) は、肝細胞特異的あるいは特徴的な遺伝子を発現しているが通常の培養条件では HBV は感染しない。これら培養細胞株でも HBV が感染可能になる条件 (成熟肝細胞への分化誘導等) を検討することから HBV 感染培養細胞系の確立を試みる。また、マウスで示された fibroblast から Hepatocyte-like cell (iHep 細胞) への direct conversion のダック及びヒトへの適用の可能性について同様の転写因子を用いて検討するとともに得られた細胞の DHBV あるいは HBV 感染成立の可能性について検討する。

4. 研究成果

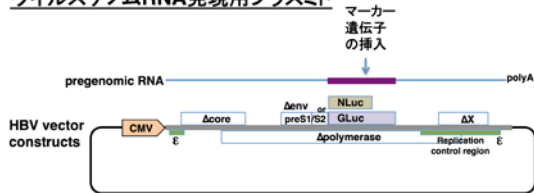
レポーター遺伝子導入 DHBV、HBV の作製

分泌性ルシフェラーゼ (CLuc) 遺伝子が組み込まれた新規ウイルスベクター (DHBV-CLuc) の構築により研究遂行に有用な CLuc 発現 DHBV ベクターの作製に成功した。また、この DHBV-CLuc を $>10^6$ /ml 培養液中に産生する安定発現株 (LMH 細胞由来) を 2 種得ることができた。

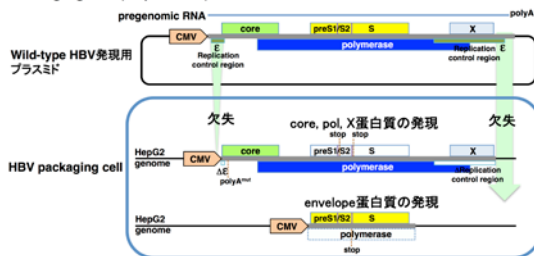
また、分泌性ルシフェラーゼ (GLuc) 遺伝子

が組み込まれた新規ウイルスベクター (HBV-GLuc) を構築した。ヘルパーHBV construct として HBV core、polymerase、X 遺伝子発現用と HBV envelope 発現用と二つに分け、また適切な mutation を導入することで組換えによる野生型 HBV の出現を抑えたより安全な系の構築に成功した。この系では組換えウイルス粒子 (>10⁷/ml 培養液) を効率よく産生しており、HBV 感染機構等の研究に有用なツールを作製できた。

ウイルスゲノムRNA発現用プラスミド

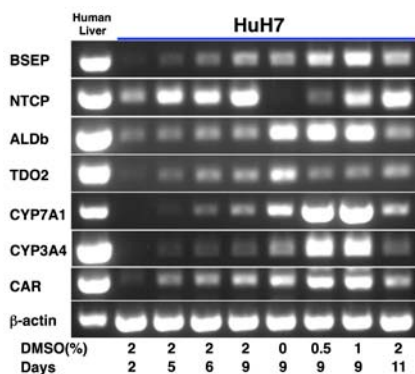


Packaging cell (HepG2由来)、HBVの全蛋白質を発現



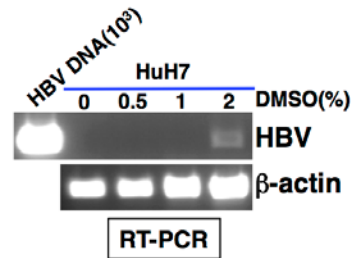
DHBV 感染に関わる宿主因子の探索

ダック肝臓 cDNA 発現ライブラリー (レトロウイルスベクター) の作製を進め DHBV レセプター gp180 導入 LMH 細胞へのトランスダクション、DHBV-CLuc 及び DHBV-GFP を用いた感染スクリーニングから DHBV コレセプター単離を試みたが DHBV コレセプター候補となるクローンは得られなかった。DHBV の感染系は予想以上に複雑と考えている。HBV、DHBV 感染培養細胞系の確立の試み
本研究で用いた4種のヒト肝がん由来培養細胞株 (HuH7、HepG2、HLE および Hep3B) における肝細胞特異的あるいは特徴的な遺伝子の発現量は多様である。



HuH7細胞はDMSO処理により肝細胞特異的遺伝子の発現が増大する
これらの内 HuH7 細胞では特定の条件下で

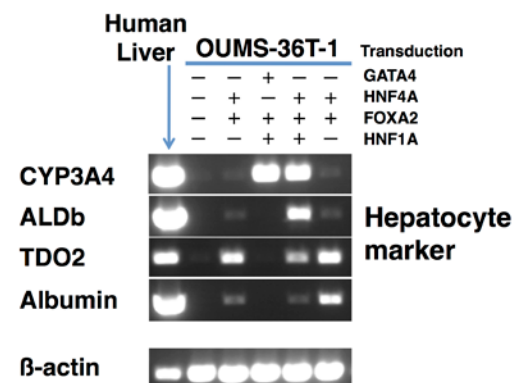
正常肝細胞に似た発現を示すようになることを見いだした。HuH7 細胞は、DMSO 添加下の培養により CYP3A4 など肝細胞特異的遺伝子の発現が増大し又 hepatic duct 様構造が認められるようになる。特に 2% DMSO 存在下で低頻度ながら HBV の感染成立が RT-PCR 法により認められた。



HuH7細胞は2% DMSO存在下の培養でHBVが感染することをHBV mRNAの検出により確認

この DMSO 濃度では肝細胞特異的 sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) の発現が最大となることを見つけたので NTCP 遺伝子導入・発現細胞を樹立し HBV 感染実験をおこなったところ低頻度ながら感染が認められた。2012 年 11 月の HBV レセプターが NTCP であるとの Yan らの発表から NTCP が HBV 感染成立に関与しているものと考えられるが、我々の NTCP 遺伝子安定発現細胞株で HBV 感染が低頻度であることから効果的な感染成立にはさらに種々の要因が関わっていることが示唆された。

新たな試みとして、マウスで証明されたことと同様に数種の転写制御遺伝子をヒトあるいはダック fibroblast に導入・発現させ direct conversion により hepatocyte-like な細胞 (iHep 細胞) を得て B 型肝炎ウイルス感染系を確立することを検討した。



iHep関連転写因子のhuman immortalized fibroblast への導入と肝臓関連遺伝子の発現

ヒトやダック fibroblasts への HNF4A、FOXA2、HNF1A、GATA4 遺伝子の導入により

アルブミン等多くの肝細胞特異的な遺伝子の発現する細胞が得られた。

これら細胞の形態は肝細胞やマウスの iHep 細胞と異なり fibroblast 様あるいは epithelial 様であった。残念ながらこれらの細胞へは B 型肝炎ウイルスが感染せず、感染に必要な因子が欠けているものと考えられる。

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)

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 和之 (KUROKI KAZUYUKI)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：20178122

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：