

不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染培養系の開発と、
これを用いた HBV 生活環の解析

赤堀 祐一

目次	
要旨	3
略語表	5
第一章 序論	6
1-1. B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) のゲノム構造と、ウイルス粒子の形態	7
1-2. HBV 生活環	
1-3. 現在用いられている抗 HBV 薬	8
1-4. HBV 感染培養系	9
第二章 実験材料と方法	11
2-1. 試薬	12
2-2. プラスミド	
2-3. 抗体	
2-4. 細胞	
2-5. NTCP 恒常発現細胞 HuS-E/2 細胞の樹立	13
2-6. 立体培養法	
2-7. イムノブロット法	
2-8. 脱糖鎖反応	
2-9. 間接蛍光免疫染色法	14
2-10. HBV 感染源	
2-10-1. 組換え体 HBV (HBVcc) について	
2-10-2. 血清由来 HBV (HBVbb) について	
2-10-3. HBVbb 感染立体培養 E/NtG8 細胞由来 HBV について	
2-11. HBV 感染実験	15
2-11-1. HepG2NTCP-C4 細胞を用いた感染実験について	
2-11-2. 平面培養 E/NtG8 細胞を用いた感染実験について	
2-11-3. 平面培養 E/NtG8 細胞を用いた感染実験について	
2-11-4. PXB 細胞を用いた感染実験について	
2-11-5. HBV 感染実験における抗 HBV 薬処理	
2-12. Short-interfering (siRNA) トランスフェクションによる遺伝子ノックダウン	

	16
2-13. 培養細胞および培養液からの核酸抽出	
2-14. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	
2-15. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) による HBV RNA の定量	17
2-16. Quantitative PCR (qPCR) による HBV DNA の定量	
2-17. Nested-PCR 法を用いた HBV cccDNA の検出	18
2-18. 塩化セシウム (CsCl) 密度勾配超遠心法	
2-19. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	19
2-20. 統計処理	
第三章 結果	20
3-1. NTCP を安定して発現する HuS-E/2 細胞クローンの樹立	21
3-2. 平面培養 E/NtG8 細胞の HBV 感染感受性の解析	
3-3. E/NtG8 細胞の HBV 感染時における SMC6 の関与の解析	22
3-4. 立体培養 E/NtG8 細胞における HBVcc 感染感受性の解析	23
3-5. 立体培養 E / NtG8 細胞における HBVbb 感染感受性の解析	
3-6. 立体培養 E / NtG8 細胞から産生された HBV 粒子の感染性の解析	25
3-7. 立体培養 E/NtG8 細胞から産生された HBV 粒子の特性	
3-8. 立体培養 E/NtG8 細胞における HBV 生活環に関与する遺伝子の解析	
第四章 考察	29
4-1. HBV 感染培養系の長所と短所について	30
4-2. 立体培養 E/NtG8 細胞の特徴について	32
4-3. HBVbb に対する高い感染感受性について	33
4-4. 今後の展望	34
第五章 文献	35
第六章 図	44
謝辞	60

要旨

B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus; HBV) は、ヘパドナウイルス科に属する DNA ウイルスである。B型肝炎の原因ウイルスであり、世界中で年間約 90 万人が肝硬変、肝がんなどの HBV 関連疾患で死亡していると推定されている。

近年、HBV 感染受容体として同定されたヒトナトリウム-タウロコール酸共役輸送体 (Na^+ -taurocholate co-transporting polypeptide; NTCP) を用いた HBV 感染培養系の確立により、HBV 生活環のほぼ全ての過程を解析することが可能となった。しかしながら、これまでに確立された HBV 培養系の多くが、正常な肝細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを持つ肝がん由来細胞株を利用していることから、生体内における HBV と宿主細胞間の相互作用の研究には一定の限界があると考えられた。また、生体内の生理的状態の大部分を再現するヒト初代培養肝細胞も、高価であることや分子生物学的手法の導入が困難であること、長期に培養できないといった問題を抱えている。

本研究は、これらの問題を解決するために、不死化ヒト肝細胞である HuS-E/2 細胞に NTCP 発現プラスミドを恒常的に導入した細胞を樹立し、これを用いて新たな HBV 感染培養系を確立することを目的として行った。

最終的に、外来性 NTCP の高い発現を示した細胞クローンから E/NtG8 細胞を選択し、Cellbed 担体を用いて立体培養した実験系を構築した。これまでの肝がん由来細胞を用いた HBV 感染培養系は肝がん由来培養細胞に産生させた組換え体 HBV (Cell culture HBV; HBVcc) に高い感染感受性を示すが、血清由来の HBV (Blood-borne HBV; HBVbb) に対する感染感受性は認められなかった。しかしながら、立体培養 E/NtG8 細胞は HBVbb と HBVcc の両方の感染を許容し、特に、HBVbb に対して初代培養ヒト肝細胞と同等の高い感染感受性を持つことがわかった。また、肝がん由来細胞を用いた HBV 感染培養系では HBVcc 感染後に効率の良い HBV 粒子の産生は認められていないが、この立体培養 E/NtG8 細胞からは、HBVbb と同様の高い感染性を持つ HBV 粒子の産生が、HBVbb 感染後から約 1 ヶ月間観察された。これらの結果は、立体培養 E/NtG8 細胞が正常ヒト肝細胞に類似した条件で、HBV 生活環の全てのステップを再現することが可能であることを示唆している。遺伝子発現解析から、この立体培養 E/NtG8 細胞では、平面培養に比較して、肝細胞の成熟化に関連し、HBV 複製を促進することが知られる、肝細胞特異的転写因子 Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 α や HNF4 α の発現や、HBV 粒子産生に関与することが報告されている脂肪酸合成系

酵素の遺伝子発現の亢進が認められ、HBV の効率的な増殖に寄与していることが推定された。一方、HBV に対する宿主制限因子として報告された **Structural maintenance of chromosomes 6 (SMC6)** の発現は平面培養に比較して減少していた。この結果を元に肝組織内のヒト肝細胞などにおける **SMC6** 遺伝子発現を検討したところ、同様にその発現は低レベルであり、生体内における制限因子としての機能については再検討する必要があることを見出した。

今後、本研究で確立された **HBV** 感染培養系は、生理的条件に類似した条件下における **HBV** と宿主細胞因子間の相互作用に関する新たな発見や、がん化などの **HBV** 感染による病原性発現メカニズムの解明に貢献することが期待された。

略語一覽

ACC; Acetyl-CoA carboxylase

APOBEC; Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

BST2; Bone marrow stromal cell antigen 2 (Tetherin)

cccDNA; Covalently closed circular DNA

CsCl; Cesium chloride

DMSO; Dimethyl sulfoxide

ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay

FAS; Fatty acid synthase

GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HBV; hepatitis B virus

HBVbb; Blood-borne HBV

HBVcc; Cell culture HBV

HCV; hepatitis C virus

HNF; Hepatocyte nuclear factor

IFN; Interferon

NTCP; Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide

PEG; Polyethylene glycol

PHH; Primary human hepatocytes

qPCR; quantitative polymerase chain reaction

qRT-PCR; quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

rcDNA; relaxed circular DNA

RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction

siRNA; Short-interfering RNA

SMC; Structural maintenance of chromosomes

tGFP; Turbo green fluorescent protein

第一章

序論

1-1. B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) のゲノム構造と、ウイルス粒子の形態

HBV はヘパドナウイルス科に属する DNA ウイルスである。ゲノム DNA は約 3200 塩基長の環状不完全二重鎖 DNA (relaxed circular DNA; rcDNA) であり、その一部が一本鎖となっている。ゲノム DNA 上には、4つの Open reading frame (ORF) が一部重複して存在することが知られている[1] (図 1A)。これらの ORF には、それぞれ HBc、HBs、HBV Polymerase、LHBs、MHBs、SHBs、そして HBx がコードされている。この HBV ゲノムからは 4 種類の HBV mRNA が転写され、合計 7 種類のタンパク質は 4 種類の HBV mRNA から巧妙に翻訳される[2] (図 1B、後述)。これらの HBV mRNA の転写開始点の近傍には、それぞれ 4 つの転写プロモーター、コアプロモーター、PreS1 プロモーター、PreS2 プロモーター、X プロモーターが存在し、さらに 2 ヶ所の転写エンハンサーにより、各 mRNA の転写調整が行われる[3]。

感染性を有するウイルス粒子は、Dane 粒子と呼ばれ、直径約 42 nm の球形である。Dane 粒子は、3 種類のエンベロープタンパク質 (LHBs、MHBs、SHBs) と脂質二重膜から構成されるエンベロープの中に、HBc が多量体化し、正二十面体となったヌクレオキャプシドと、さらにその中に HBV rcDNA と HBV polymerase を内包している[4] (図 1C)。

1-2. HBV 生活環

これまでに明らかになっている HBV 生活環の概要を図 2 に示す。HBV 粒子は肝細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan; HSPG) やナトリウム-タウロコール酸共役輸送体 (Na^+ -taurocholate co-transporting polypeptide; NTCP) に結合し (図 2-1)、その受容体共役因子である上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) を介したエンドサイトーシスにより細胞内に侵入する (図 2-2) [5], [6], [7]。細胞内に侵入した HBV は、細胞質で脱殻し (図 2-3)、ヌクレオキャプシドの形態で核内へ移行する[8]。核内へと移行した rcDNA の一本鎖部分は、宿主の DNA 修復機構により修復され[9]、完全閉環二本鎖 DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) となる (図 2-4)。この HBV cccDNA を鋳型に、長さの異なる 4 種類の mRNA (3.5 kb、2.4kb、2.1kb、0.7 kb) が転写される[3] (図 2-5)。このうち、3.5 kb の mRNA は逆転写反応の鋳型となることから、pregenomic RNA (pgRNA) と呼ばれ、また一方 HBc と HBV polymerase が異なる読み枠から翻訳される[10]。2.4kb

と 2.1kb の mRNA からは、3 種類のエンベロープタンパク質 LHBs、MHBs、SHBs が翻訳され[11], [12]、0.7 kbp の mRNA からは HBx が翻訳される (図 2-6) [13]。HBV polymerase は細胞質内で HBV pgRNA に結合し、この複合体は HBc で構成されるヌクレオキャプシドに被われる。このヌクレオキャプシド内では、HBV polymerase の逆転写酵素活性により HBV pgRNA を鋳型としてマイナス鎖 DNA が合成される (図 2-7) [14]。さらに、HBV polymerase の RNaseH 活性により pgRNA が分解された後に、その DNA 依存性 DNA polymerase 活性によりそのマイナス鎖 DNA を鋳型としてプラス鎖 DNA が合成される (図 2-8) [15]。途中、ヌクレオキャプシド内でプラス鎖 DNA 合成は停止し、rcDNA の状態になる[16]。このヌクレオキャプシドは、宿主細胞の脂質二重膜と 3 種類のエンベロープタンパク質で被われ (図 2-9)、Dane 粒子として細胞外へと産生される (図 2-10)。また、ヌクレオキャプシドの一部は核内へ再び移行し (図 2-11)、HBV cccDNA 量の維持・増加に寄与することが知られている[17]。

1-3. 現在用いられている抗 HBV 薬

現在用いられている B 型肝炎治療薬としては、HBV polymerase に取り込まれることによって直接的に HBV 複製を抑制する核酸アナログ製剤であるエンテカビルやテノホビルが第一選択薬剤として挙げられる。これらは強力な HBV DNA 複製抑制活性を有し、ほとんどの症例で HBV DNA が減少し、肝炎を鎮静化させることが可能となっている[18], [19]。しかしながら、このような核酸アナログ製剤は細胞質内における HBV ゲノム複製を阻害するだけで、核内 HBV cccDNA 量を減少させることはできない。そのため、HBV の完全な排除は達成できないため、長期の継続投与が必要となっている[20]。

またインターフェロン α (IFN α) も B 型肝炎の治療に用いられている。IFN α 投与の場合、上記核酸アナログ製剤に比較して、著効率は低いが、有効例では『drug free』を達成する場合があることが知られている。IFN α による HBV 増殖抑制は免疫細胞を活性化するだけでなく、HBV 感染細胞に働き、HBV の生活環に影響を与えていることも報告されている[21], [22], [23]。また、高濃度 IFN α 処理した培養ヒト肝細胞では、シチジンデアミナーゼ APOBEC3A と APOBEC3B の発現が誘導され、この働きにより高頻度の変異 (hypermutation) が導入された HBV cccDNA が宿主細胞の DNA 修復機構によって分解されることが報告された[24]。IFN α 治療はときに重篤な副作用を伴うが、この結果は、HBV cccDNA 排除に宿主細胞因子を利用する可能性を示唆する

ものと考えられた。今後、HBV 生活環のさらなる詳細な理解を基に、直接的に核内 HBV cccDNA 量の減少に関連する分子メカニズムの解明が進めば、『drug free』に向けた新たな創薬への道が拓けることが期待される。

1-4. HBV 感染培養系

HBV 生活環に関わる宿主細胞と HBV の相互作用の分子メカニズムを解明するためには、適切な培養細胞系が必要である。これまでに確立された HBV 培養系は、ヒト肝がん由来細胞株と初代培養ヒト肝細胞 (Primary human hepatocytes; PHH) などの正常細胞を用いたものに大別される。多くの肝特異機能を有し、肝臓に関連した研究に汎用される肝がん由来細胞株 (HepG2 細胞や HuH-7 細胞など) は、これまで HBV ゲノム複製や HBV 粒子産生の研究に利用されてきた[7], [8], [25], [26], [27], [28]。例えば、HBV 発現プラスミドを一過性に導入した HepG2 細胞では、HBV RNA の転写、翻訳が行われ、HBV ゲノム複製から HBV 粒子、培養細胞に由来する HBV (cell culture HBV; HBVcc) の産生までを再現することができた[25], [26]。そこで、HBV 生活環のこれらの過程を恒常的に再現するために、HBV 発現プラスミドを恒常的に導入した HepG2.2.15 細胞が樹立された[27]。さらに、テトラサイクリン除去により HBV 複製を誘導できる HepAD38 細胞株も樹立された[28]。これらの細胞を用いて、HBV 生活環における HBV ゲノムからの転写から HBV 粒子産生までの過程に関する研究が進められてきた。しかしながら、これら肝がん由来細胞株は、ほとんど HBV の感染を許容しなかったため [7], [29]、ウイルスの細胞への吸着から侵入、そして核内 HBV cccDNA の形成に至るまでの過程は再現することができなかった。

2012 年に Yan らは、PreS1 ドメインに特異的に結合するタンパク質として、NTCP を見出し、これが HBV 感染受容体であることを報告した[7]。NTCP を恒常的に発現させた HepG2 細胞 (HepG2-NTCP-C4 細胞など) が樹立され、感染感受性を獲得することが示された[7]。ここでようやく肝がん由来細胞株を用いて HBV 生活環の全てを再現することが可能な HBV 感染培養系を構築することができた。

一方、肝がん由来細胞株の遺伝子発現プロファイルは正常な肝細胞と異なるため、上記のような HBV 感染培養系では、生理的条件下での HBV と宿主細胞間の相互作用の研究には一定の限界があると考えられた[30], [31]。実際に肝がん由来細胞株は正常細胞とは異なる自然免疫応答を示すことも報告されている[32], [33], [34]。さらに、これらの HBV 感染培養系では、感染性 HBV 粒子の効率的な産生は観察されていないという

問題がある。したがって、これらの問題を解決するために、PHH などの正常細胞を用いた HBV 感染培養系を用いられてきた。

PHH は、生体内の生理的状態の大部分を再現することが可能であると想定されたため、HBV 感染培養系に用いられてきた[35], [36]。しかしながら、PHH の主な問題点として、非常に高価であること、同一ロットを安定して確保することができず、再現良く実験を行うことが困難であること、そして遺伝子導入などの分子生物学的手法の実施にある程度制限があることが挙げられる。したがって、できるだけ生理的条件下での HBV と宿主細胞との相互作用を解明するためには、分子生物学的手法の適用可能な、非がん細胞を用いた HBV 感染培養系が必要であると考えられた。

私が所属する研究室において樹立された不死化ヒト肝細胞 HuS-E/2 細胞は、肝がん由来細胞とは異なり、初代培養肝細胞に近い遺伝子発現様プロファイルを示していた[37]。また、樹立後から継代数 20 回の細胞を 2%ジメチルスルホキシド (DMSO) 存在下で 12 日間培養すると、低レベルの HBV 感染感受性を獲得することが報告された[38]。しかしながら、継代を継続することによって HBV 感染感受性が失われていくことも報告された[38]。私は NTCP が HBV 受容体分子であることが報告された後、継代数を重ねた HuS-E/2 細胞における NTCP の発現が非常に低いことを見出した。そこで、NTCP を恒常的に発現する HuS-E/2 細胞を樹立することで、非がん細胞を用いた新たな HBV 感染培養系の構築が可能になり、本来の生体内に近い環境における HBV 生活環を解析することが可能性になることが期待された。

以上のことから、本研究では、NTCP 恒常発現 HuS-E/2 細胞 (E/NtG 細胞) を樹立し、新たな HBV 感染培養系を確立することを第一の目的とし、また、既存の HBV 感染培養系との比較などから、HBV と宿主細胞の新たな相互作用を明らかにすることを第二の目的とした。

第二章

実験材料と方法

2-1. 試薬

HBV 感染を阻害するミリストイル化された HBV preS1 ペプチド myr-47WT、およびその変異型で感染を阻害しない myr-47N9K [7]はスクラム（東京、日本）から購入した。エンテカビル（ETV）はフナコシ（東京、日本）から購入した。ジメチルスルホキシド（DMSO）はナカライテスク（京都、日本）から購入した。siGENOME SMC6 siRNA と Non-specific control siRNA は Dharmacon (Colorado, USA) から購入した。Peptide-N-Glycosidase F（PNGase F）は New England Biolabs（Massachusetts, USA）から購入した。

2-2. プラスミド

カルボキシル末端側に Turbo Green Fluorescent Protein（tGFP）が付加された NTCP（NTCP-tGFP）発現プラスミド RG210241 [39]は OriGene Technologies（Maryland, USA）の許諾の下、藤田尚志教授（京都大学 ウイルス・再生医科学研究所）より供与された。

2-3. 抗体

ウサギポリクローナル抗 Turbo Green Fluorescent Protein（tGFP）抗体 #AB513 は Evrogen（Moscow, Russia）から購入した。マウスモノクローナル抗 GAPDH 抗体 #MAB374 は Millipore（Massachusetts, USA）から購入した。マウスモノクローナル抗 HBs 抗体 #NCL-HBsAg-2 は Leica（Wetzlar, Germany）から購入した。

2-4. 細胞

HuS-E/2 細胞は Hussein らの方法に従い培養した[37]。凍結ヒト肝細胞(#HU4224) は、Invitrogen（Massachusetts, USA）から購入し、販売元のプロトコルに従い培養した。ヒト肝細胞キメラマウス由来初代培養肝細胞(PXB 細胞)は Ishida らの方法に従い培養した[40]。HepG2.2.15.7 細胞、Hep38.7-Tet 細胞、HepG2-NTCP-C4 細胞は渡士幸一博士（国立感染症研究所）より供与され、既報に従って培養した[41], [42]。凍結保存された PXB マウスの肝臓は茶山一彰教授（広島大学大学院、医系科学研究科、消化器・代謝内科学）より供与された。

2-5. NTCP 恒常発現細胞 HuS-E/2 細胞の樹立

NTCP-tGFP 発現プラスミド RG210241 は、制限酵素 ScaI (New England Biolabs、Massachusetts、USA) でリニアライズした後、Effectene トランスフェクション試薬 (Qiagen、Hilden、Germany) を使用して HuS-E/2 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、この細胞は 500 µg/ ml G418 (ナカライテスク、京都、日本) で処理し、薬剤選択を行った。薬剤に耐性を有する細胞は単離し、500 µg/ ml G418 を添加した培養液を用いて継代培養した。

2-6. 立体培養法

高純度シリカファイバー細胞培養担体 Cellbed (日本バイリン、東京、日本) を用いた立体細胞培養は、基本的に Cellbed に添付されている製造元の使用方法に従って行った。簡単に述べると、24 ウェル用 Cellbed1 枚あたり 5×10^5 細胞をあらかじめ無血清肝細胞用培地 (SFM) (東洋紡、大阪、日本) を加えた Cellbed 上に播種し、培養した。

2-7. イムノブロット法

細胞は 2× Laemmli SDS sample buffer に溶解させ、トミー精工 UR-21P (大阪、日本) を用いて超音波破碎処理を行った後、100°C、5 分間加熱し、全タンパク質サンプルを得た。サンプルは 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離し、Poly Vinylidene Di-Fluoride (PVDF) 膜 (Perkin Elmer、Boston、USA) へ転写した。用いた一次抗体は ECL Blocking Agent (GE Healthcare、Chicago、USA) で 1000 倍希釈して使用した。二次抗体も ECL Blocking Agent で 1000 倍希釈して使用した。二次抗体の検出は、これに標識された Horseradish Peroxidase (HRP) の触媒反応を Western Lightning 試薬 (Perkin Elmer、Massachusetts、USA) を用いて行い、それによって生じた化学発光を ImageQuant LAS-4000 システム (GE Healthcare、Chicago、USA) を用いて検出することで行った。

2-8. 脱糖鎖反応

E/NtG8 細胞の全タンパク質は Radioimmunoprecipitation buffer を用いて回収した。製造元のプロトコルに従い、このサンプルに PNGase F を加え、37°C、1 時間で行った。その後、2× Laemmli SDS sample buffer を加え混合し、100°C、5 分間加熱した。

2-9. 間接蛍光免疫染色法

細胞は 4% パラホルムアルデヒド（和光純薬、大阪、日本）で固定し、Phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した 0.2% Triton X-100（ナカライテスク、京都、日本）を用いて Permeabilization 処理を行った。一次抗体として抗 HBs 抗体を 200 倍希釈で使用し、それに対する二次抗体 Alexa Fluor 546 標識抗マウス IgG 抗体（Invitrogen、Massachusetts、USA）は 1000 倍希釈で使用した。細胞核は二次抗体添加と同時に 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)（Sigma-Aldrich、Missouri、USA）で染色した。染色後は、ProLong Gold 褪色防止用封入剤（Invitrogen、Massachusetts、USA）で封入した。蛍光画像は、蛍光顕微鏡 AF6000 (Leica、Wetzlar、Germany)、またはレーザー走査型共焦点顕微鏡 FV1000（オリンパス、東京、日本）を用いて取得した。

2-10. HBV 感染源

2-10-1. 組換え体 HBV (HBVcc) について

組換え体 HBV 粒子 (HBVcc、細胞培養に由来する HBV) は、テトラサイクリンを除去し、4 日以上経過した Hep38.7-Tet 細胞の培養液から回収した。培養液は 10% ポリエチレングリコール (PEG) 8000 (Hampton Research、California、USA) を添加し、4°C、1 時間静置した後、4°C、10 分間、10,000×g で遠心した[43]。遠心により沈殿した HBV 粒子は、培養液 1 ml に懸濁した後、後述の定量 PCR によって HBV DNA を定量した。

2-10-2. 血清由来 HBV (HBVbb) について

遺伝子型 C および遺伝子型 A に感染したヒト患者血清を用いて HBV に感染し、血中に HBV 粒子を産生しているヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) の血清は、フェニックスバイオ（広島、日本）から購入した。

2-10-3. HBVbb 感染立体培養 E/NtG8 細胞由来 HBV について

HBVbb 感染から 15~27 日目の培養液を回収し、10%PEG8000 を添加し、4°C、1 時間静置した後、4°C、10 分間、10,000×g で遠心した。遠心により沈殿した HBV 粒子は、培養液 1 ml に懸濁した後、後述の定量 PCR によって HBV DNA を定量した。

2-11. HBV 感染実験

2-11-1. HepG2-NTCP-C4 細胞を用いた感染実験について

12 ウェルの BioCoat コラーゲンI コートマルチウェルプレート (Corning, New York, USA) に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した HepG2-NTCP-C4 細胞を一日間培養した。この細胞に対し、HBV DNA 量を 8000 GEq/cell となるよう調製した感染源に、4% PEG-8000 を添加した後、これを 16 時間感染させた[42]。PBS で 3 回洗浄し、さらに 2 週間培養した。

2-11-2. 平面培養 E/NtG8 細胞を用いた感染実験について

12 ウェルの BioCoat コラーゲンI コートマルチウェルプレート (Corning, New York, USA) に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した E/NtG8 細胞を一日間培養した。この細胞に対し、HBV DNA 量を 8000 GEq/cell となるよう調製した感染源に、4%PEG-8000 を添加した後、これを 16 時間感染させた。PBS で 3 回洗浄し、さらに培養を継続した。

2-11-3. 立体培養 E/NtG8 細胞を用いた感染実験について

E/NtG8 細胞を 24 ウェルの用 Cellbed1 枚あたり 5×10^5 細胞で播種し、1 週間培養した。 2×10^6 細胞/ウェルとなった E/NtG8 細胞に対し、HBVcc 8000 GEq/cell または HBVbb 5 GEq/cell となるよう調製した感染源に、4%PEG-8000 を添加した後、これを 16 時間感染させた。PBS で 3 回洗浄し、さらに培養を継続した。。

2-11-4. PXB 細胞を用いた HBV 感染実験について

フェニックスバイオ (広島、日本) から購入した、24 ウェルの BioCoat コラーゲンI コートマルチウェルプレート (Corning, New York, USA) に播種された PXB 細胞に対し、HBVcc 8000 GEq/cell または HBVbb 5 GEq/cell となるよう調製した感染源に、4%PEG-8000 を添加した後、これを 2 日間感染させた後、さらに 15 日間培養した[40]。

2-11-5. HBV 感染実験における抗 HBV 薬処理

NTCP 依存的な感染の観察を行うため、これを阻害するミリストイル化された PreS1 ペプチド (myr-47WT) と、感染を阻害しない変異型の PreS1 ペプチド (myr-47N9K) $1 \mu\text{M}$ を、感染 3 時間前と感染時にそれぞれ培養液に添加した。

細胞内における HBV ゲノム複製を確認するために、感染後に 3.75 nM エンテカビル

(ETV) を培養液に添加し、DMSO 処理と比較した[18]。

2-12. Short-interfering RNA (siRNA) トランスフェクションによる遺伝子ノックダウン

HepG2-hNTCP-C4 細胞または E/NtG 細胞を、12 ウェルの BioCoat コラーゲン I コートマルチウェルプレート (Corning, New York, USA) に 1×10^5 細胞/ウェルで播種し、その翌日に Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Massachusetts, USA) を用いて、その細胞に 100 nM siRNA をトランスフェクションした。実験は全て Lipofectamine RNAiMAX Reagent に添付されている製造元の使用方法に従った。

2-13. 培養細胞および培養液からの核酸抽出

細胞の全 RNA は、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) または NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ、草津、日本) と、RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。全ての RNA サンプルは Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて濃度を測定し、100 ng/ μ l に調製した。

培養液からの全 DNA は、HBV 感染後の培養液サンプル 100 μ l に対し、10 U の Micrococcal Nuclease (MNase) (New England Biolabs, Massachusetts, USA) を添加し、37°C で 1 時間処理を行った後、DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて培養液中 HBV DNA を精製した。

2-14. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

RT-PCR は、200 ng の全 RNA サンプルを鋳型とし、One Step RT-PCR kit (タカラバイオ、草津、日本) と、ターゲット特異的プライマーセット (表 1) を使用して行った。PCR 産物は 3% NuSieve アガロースゲルで泳動し、Ethidium Bromide 染色後、ImageQuant LAS-4000 システム (GE Healthcare, Chicago, USA) を用いて検出した。

表 1. RT-PCR に使用したプライマーの配列

GAPDH mRNA	F	5' -GCCGCATCTTCTTTTGCGTC - 3'
	R	5' -TCGCCCACTTGATTTTGGA - 3'
ALB mRNA	F	5' -TTGCCTTCATTAGCTGCTGA - 3'
	R	5' -TTGCTGCCCACTTTTCCTAGG - 3'
HNF-1 α mRNA	F	5' -GTGTCTACAACCTGGTTTGCC - 3'
	R	5' - TGTAGACACTGTCACCTAAGG - 3'
HNF-4 α mRNA	F	5' - TGC GACTCTCCAAAACCCTC - 3'
	R	5' - AGCCCGGAAGCATTCTTGA - 3'
SMC6 mRNA	F	5' - TGTTGGCGAAATGAACCGGA - 3'
	R	5' - ACTGCACTCTTCCCACTTCC - 3'
ACC mRNA	F	5' - CTCTTGGCCTTTTCCCGGTC - 3'
	R	5' - GTCTGGTTCATCCACGAGCA - 3'
GAA mRNA	F	5' - AGCAGTACCTGGACGTTGTG - 3'
	R	5' - TTGAACGTGAAGTCCCTCCG - 3'
Vps4A mRNA	F	5' - CCAAGTGC GTGCAGTACCTA - 3'
	R	5' - TCCACCGTATGTTGGGCTTC - 3'
CHMP3 mRNA	F	5' - CATGCGCAACATCCCCTAGT - 3'
	R	5' - GGCTTCTCCTGGGTCTTTCC - 3'
CHMP4 mRNA	F	5' - TCCCACTGACCCCATACACT - 3'
	R	5' - CGACATCAAGAGGCGCAAAC - 3'
BST2 mRNA	F	5' - TCCCACTGACCCCATACACT - 3'
	R	5' - CGACATCAAGAGGCGCAAAC - 3'

2-15. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) による HBV RNA の定量

HBV RNA は、100 ng の全 RNA サンプルを鋳型とし、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡、大阪、日本) を用いて逆転写した後、Universal SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) と HBV pgRNA 特異的なプライマー[7]、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, California, USA) を用いて定量した。これらの実験は全て製造元のプロトコルに従った。

2-16. Quantitative PCR (qPCR) による HBV DNA の定量

培養液中 HBV DNA 1 μ l を鋳型とし、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix と HBV DNA 特異的なプライマーとプローブ[44]、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems、California、USA) を用いて定量した。これらの実験は、全て製造元のプロトコルに従った。

2-17. Nested-PCR 法を用いた HBV cccDNA の検出

細胞内 HBV cccDNA の検出は基本的に Qu らの方法を用いて行った[45]。HBV 感染後の立体培養 E/NtG8 細胞からフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) (ナカライ、京都、日本) を使用して、細胞内全 DNA を精製した。精製した細胞内全 DNA を T5 Exonuclease (New England Biolabs、Massachusetts、USA) で処理した後、これを鋳型として用い、Taq Polymerase (タカラバイオ、草津、日本) と 2 種類の特定のプライマーセット (表 2) を使用した Nested-PCR を行った。1 回目の PCR 産物は DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen、Hilden、Germany) を用いて精製し、2 回目の PCR の鋳型として使用した。実験は、全て製造元のプロトコルに従った。

表 2. Nested-PCR に使用したプライマーの配列

1st PCR	F	5'-CCGTGTGCACTTCGCTTCA-3'
	R	5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGA-3'
2 nd PCR	F	5'-TGAACGCCACCAATTCTTG-3'
	R	5'-GAGATGATTAGGCAGAGGTG-3'

2-18. 塩化セシウム (CsCl) 密度勾配超遠心法

PEG8000 を用いて濃縮した Hep38.7-Tet 細胞由来 HBVcc、および立体培養 E/NtG8 細胞由来 HBV を SFM で 1×10^8 コピー/サンプルとなるよう調整した。HBV 感染 PXB マウス血清由来の HBVbb も同様に SFM で希釈して調製した。これらのサンプルを、BIOCOMP Gradient Station (BioComp Instruments、Terrebonne、Canada) を用いて、5~40%の密度勾配を遠心管中に作製した CsCl 溶液の上に重層し、P55ST2 ローター (日立工機、東京、日本) で 4°C、16 時間、28,000 rpm で遠心した。遠心後の溶液は、24 個のフラクションに分画した。各フラクションの密度を重量計測によって

測定した後、Microcon YM-30 (Millipore、MA、USA) を用いた限外濾過により CsCl を除去した。

2-19. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HBs の定量は、HBs S-Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid-II (ビークル、京都、日本) を用いて行った。HBc の定量は、QuickTiter HBV Core Antigen ELISA Kit (Cell Biolabs、California、USA) を用いて行った。各実験は、それぞれの製造元のプロトコルに従って行った。

2-20. 統計処理

Student の t 検定により p 値を算出し、有意水準を 0.05 とした。

第三章

結果

3-1. NTCP を安定して発現する HuS-E/2 細胞クローンの樹立

CMV プロモーター下流で Turbo Green Fluorescent Protein (tGFP) 融合 NTCP を発現するプラスミド RG210241 [39]を、制限酵素 ScaI でリニアライズし、Effectene 試薬を用いて HuS-E/2 細胞にトランスフェクションした。このプラスミドはネオマイシン耐性遺伝子を含むため、G418 を用いた薬剤選択培養を行い、RG210241 が恒常的に導入された細胞を複数単離した。継代培養後、蛍光顕微鏡を用いた観察により、tGFP 陽性の 8 クローンを選択し、それぞれ E/NtG1~E/NtG8 細胞と名付けた。各細胞の全 RNA を抽出し、NTCP 塩基配列特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、全ての細胞で、親株である HuS-E/2 細胞よりも高い NTCP 関連 RNA の発現が認められた (図 3A)。さらに、各細胞の全タンパク質を抽出し、抗 tGFP 抗体を用いてイムノブロット法による解析を行った結果、E/NtG3 細胞と E/NtG8 細胞で特に高い NTCP-tGFP の発現が認められた (図 3B)。また、蛍光顕微鏡により、これらの 2 つの細胞で NTCP-tGFP が本来の NTCP 同様に細胞膜上に存在していることを確認した (図 3C)。

一方、イムノブロット法によって検出された NTCP-tGFP 分子の分子量は約 100kDa であり、タンパク質の一次構造から推定される分子量より大きいものであった (図 3B)。NTCP はその翻訳後修飾過程でアスパラギン (N) 結合型糖鎖が付加され、その糖鎖修飾が、HBV の感染に関連していることが報告されている[46][47]。そこで E/NtG8 細胞から抽出した全タンパク質を N 結合型糖鎖の除去が可能な PNGase F で処理し、抗 tGFP 抗体を用いたイムノブロット法により処理後の NTCP-tGFP の分子量の解析を行った。その結果、PNGase F 処理によって、NTCP-tGFP のバンドがシフトし、その分子量は一次構造から推定される NTCP 約 38 kDa と tGFP 約 26 kDa を合計した約 64 kDa に低下した (図 3D)。この結果から、この細胞で産生されている NTCP-tGFP は N 結合型糖鎖付加修飾されていることが確認された。

以上の結果から、E/NtG3 細胞と E/NtG8 細胞が HBV 感染を許容する可能性が高いと考え、これら 2 つのクローンを以降の感染実験に使用した。

3-2. 平面培養 E/NtG8 細胞の HBV 感染感受性の解析

E/NtG3 細胞と E/NtG8 細胞の HBV 感染許容性を調べるため、これらの細胞に対し、HBVcc を、これまでの HepG2-NTCP-C4 細胞を用いた HBVcc 感染実験と同様の条件で感染させた。感染後 7 日目と 10 日目に各細胞から全 RNA サンプルを抽出し、

qRT-PCRにより細胞内HBV pgRNA量を定量した。その結果、E/NtG3細胞では、細胞内HBV pgRNA量が急激に減少することが認められた。一方、E/NtG8細胞においては、やはり細胞内HBV pgRNA量は経時的に減少していたが、E/NtG3細胞に比較して、その減少率は緩やかであり、比較的長期間維持されていた(図4A)。しかしながら、そのE/NtG8細胞におけるHBV pgRNA量(全RNA 1 µg中、約 5×10^3 コピー)は、他の既存のHBV培養システムで観察されるHBV pgRNA量(全RNA 1 µg中、約 $x \times 10^x$ コピー)よりも低かった[7]。そこでさらに、E/NtG8細胞の感染許容性と細胞内HBV複製を評価するために、HBV感染阻害ペプチドmyr-47WTによる感染阻害効果とエンテカビル(ETV)を用いた複製抑制効果を検討した。各処理を行い細胞外HBVDNA量を定量した結果、統計的な有意差は認められなかったが、myr-47WT処理に比較して非感染阻害ペプチドmyr-47N9K処理サンプルで、より高い細胞外HBVDNAの産生が認められ、また、ETV処理によって細胞外HBVDNAが低下することがわかった(図4B)。

これらの結果から、E/NtG3細胞は効率の高いHBV感染あるいはその複製を許容しないが、E/NtG8細胞はある程度HBV感染増殖をサポートする能力を有する可能性が考えられた。

3-3. E/NtG8細胞のHBV感染時におけるSMC6の関与の解析

近年、HBV感染を抑制する制限因子としてSMC5/6複合体が報告されている[48]。HBVcccDNAから効率的な転写には、HBxや宿主細胞因子DNA damage-binding protein 1(DDB1)が必要であることが知られていた[49], [50]。2016年にDecorsièらは、HBxがDDB1との結合を介して宿主ユビキチン・プロテアソーム系を利用し、コヒーシ/コンデンシ類似のStructural maintenance of chromosomes(SMC)5/6複合体を分解することを見出し、SMC5/6複合体はHBVmRNA転写を抑制する新たな宿主制限因子であることを報告した[48]。

このSMC6の役割は我々が用いたHepG2-NTCP-C4細胞を用いたHBVcc感染実験においても再現された。図5Aに示すようにHBVcc感染後、HepG2-NTCP-C4細胞において、SMC6 siRNAを用いてSMC6ノックダウンした場合、細胞内HBV pgRNA量は感染早期から大幅に増加した。そこで、図4で見られたE/NtG8細胞における低いHBV感染感受性に、このSMC5/6複合体が関与している可能性があるか否かを検証した。

HBVcc 感染後 E/NtG8 細胞において、SMC6 siRNA を用いて SMC6 ノックダウンした場合には、HepG2-NTCP-C4 細胞とは異なり、細胞内 HBV pgRNA 量の増加は認められなかった (図 5B)。

以上の結果から、HBVcc 感染後の E/NtG8 細胞で観察された低レベルの HBV pgRNA の発現は、SMC6 の影響によるものではないと考えられた。

3-4. 立体培養 E/NtG8 細胞における HBVcc 感染感受性の解析

E/NtG8 細胞の親株である HuS-E/2 細胞は、立体培養条件下で患者血清由来 HCV (HCVbb) の感染と増殖を再現することが報告されている [37]。そこで、本研究における HBV 感染培養系の構築にも立体培養法を導入し、E/NtG8 細胞の HBV 感染感受性の改善を試みた。

立体培養法には、ウイルスと培養細胞が直接接することが可能であることや、簡便に培養できるものということを考慮し、日本バイリン社製の Cellbed 担体を用いた。

実験スケジュールは、図 6A に示した。Cellbed 担体上で E/NtG8 細胞あるいは HuS-E/2 細胞を 1 週間培養した後、 2×10^6 細胞となった各細胞に対し、myr-47WT あるいは myr-47N9K 存在下、HBVcc を 8000 GEq/cell の条件で感染させた。感染から 15 日目に、立体培養 E/NtG8 細胞における細胞内 HBV pgRNA 量を定量した結果、myr-47WT 処理と比較して、myr-47N9K 処理で高いコピー数の HBV pgRNA が検出された (図 6B)。一方、立体培養 HuS-E/2 細胞では有意な差は見られなかった。さらに、立体培養 E/NtG8 細胞における培養液中 HBV DNA 量の顕著な増加も観察された (図 6C)。この結果は、Cellbed 担体を用いた E/NtG8 細胞の立体培養系が HBV 感染培養系として有用であることを示していると考えられた。

3-5. 立体培養 E / NtG8 細胞における HBVbb 感染感受性の解析

次に、血清由来 HBV (以降 HBVbb と表記) に対する立体培養 E/NtG8 細胞の感染感受性を解析した。PXB 細胞を用いた感染培養系の結果から、HBVbb は HBVcc に比較して高い感染性を持つことが示された [40] (図 7)。しかしながら、HepG2-NTCP-C4 細胞を用いた場合、PXB 細胞を用いた感染実験と同じ感染条件 (5 GEq/cell) では、全く HBVbb の感染は認められなかった (図 8)。そこで、立体培養 E/NtG8 細胞に対し、PXB 細胞を用いた HBVbb 感染実験と同様、HBVbb を 5 GEq/cell の感染条件で感染させて、HBVbb に対する感染感受性を検討した。

図 9A の実験スケジュールに従い、1 週間立体培養した E/NtG8 細胞に対し、HBVbb を感染させた。

まず、遺伝子型 C の HBVbb 感染後 15 日目における、立体培養 E/NtG8 細胞内 HBV pgRNA 量を定量した結果、myr-47WT 処理と比較して、myr-47N9K 処理で高いコピー数の細胞内 HBV pgRNA が検出された (図 9B)。一方で、ETV 処理による細胞内 HBV pgRNA 量の変動は予想通り認められなかった (図 9B)。感染後 15 日目の myr-47N9K 処理細胞において高い HBV pgRNA の発現が認められたことから、この細胞から精製した全 DNA を用いて、HBV pgRNA の転写のための鋳型である HBV cccDNA の形成を Nested-PCR によって検出した (図 9C)。この実験では、8 日間のテトラサイクリン除去培養により HBV 複製を誘導した Hep38.7-Tet 細胞の培養液中 DNA を HBV rcDNA サンプルとして用い、また細胞内全 DNA を HBV rcDNA と HBV cccDNA の混合サンプルとして用いた。T5 エキソヌクレアーゼは、1 本鎖および 2 本鎖 DNA に特異的なエキソヌクレアーゼであり、2 本鎖 DNA 中にギャップあるいはニックがない環状 2 本鎖 DNA は切断しないため、この酵素によって HBV rcDNA は分解されるが、HBV cccDNA は分解されない[45]。予想されたように Hep38.7-Tet 細胞の培養液中 HBV rcDNA は T5 エキソヌクレアーゼ処理により消化され、目的の長さのバンドは検出されなかった (図 9C)。一方、感染後 15 日目の myr-47N9K 処理立体培養 E/NtG8 細胞から精製した全 DNA を用いた場合には、精製した Hep38.7-Tet 細胞内 DNA と同様に T5 エキソヌクレアーゼ処理により消化されない DNA の存在を示すバンドが検出された (図 9C)。このことは、この感染後 15 日目の myr-47N9K 処理立体培養 E/NtG8 細胞において、HBV cccDNA が形成されていることを示している。したがって、図 9B で認められた高い細胞内 HBV pgRNA の発現が、HBV 生活環を反映し、この HBV cccDNA から行われたものであると考えられた。

HBVbb 感染後 15 日目における立体培養 E/NtG8 細胞の培養液中 HBV DNA を定量した結果、myr-47WT 処理時と比較して、myr-47N9K 処理時における HBV DNA 量の顕著な増加が観察された (図 9D)。この培養液中 HBV DNA 量の増加は、ETV 処理により抑制されたことから (図 9D)、立体培養 E/NtG8 細胞において HBV ゲノムが複製されていることが確認された。

次に、異なる遺伝子型である遺伝子型 A の HBVbb を用いて同様に感染実験を行った。培養液中 HBV DNA の定量を行った結果、遺伝子型 C の HBVbb と同様、myr-47WT 処理と比較して、myr-47N9K 処理時における培養液中 HBV DNA 量の顕著な増加が認

められた (図 9E)。臨床では、遺伝子型 A は、水平感染において遺伝子型 B や C と比較して慢性化しやすいことが知られているが[51]、立体培養 E/NtG8 細胞は、異なる遺伝子型のウイルス学的特徴の解析にも利用することが可能であると考えられた。

次に、抗 HBs 抗体を用いた間接蛍光免疫染色法により HBs 陽性細胞の検出を行った。その結果、myr-47N9K 処理時においてのみ HBs 陽性の HBVbb 感染細胞が検出された (図 9F、赤色蛍光)。

以上の結果は、立体培養 E/NtG8 細胞が PXB 細胞と同等の HBVbb に対する感染感受性を持ち、HBVbb 感染培養系として有用であることを示していると考えられた。

3-6. 立体培養 E / NtG8 細胞から産生された HBV 粒子の感染性の解析

次に、立体培養 E/NtG8 細胞を用いた HBVbb の感染増殖がどの程度継続して観察することが可能であるか検討した。図 6D と同様の HBVbb 感染条件で、感染から 1 ヶ月間培養を継続し、継時的に培養液中 HBV DNA を回収し、これを定量した (図 10A)。その結果、myr-47N9K 処理時において、感染後 15 日目以降も培養液中 HBV DNA 量は感染後 27 日目まで高いレベルで維持され、立体培養 E/NtG8 細胞から長期に HBV 粒子が産生されることが示された (図 10B)。そこで、次に、この期間に産生された HBV 粒子の感染性を調べるため、上記感染後 15 日目から 27 日目までの培養液を集めて濃縮し、この立体培養 E/NtG8 細胞由来 HBV (以降 Cellbed-HBV と表記) を、5 GEq/cell の感染条件で未感染の立体培養 E/NtG8 細胞に感染させた。その結果、感染後 15 日目において、myr-47N9K 処理時において、上記の HBVbb 感染時と同等の高いコピー数の培養液中 HBV DNA が認められた (図 10C)。この結果から、HBVbb に感染した立体培養 E/NtG8 細胞は、3 週間以上、HBVbb と同等の高い感染性を有する HBV 粒子を産生することがわかった。

以上、一連の HBV 感染実験の結果から、立体培養 E/NtG8 細胞は、HBVcc と HBVbb の両方に感染感受性があり、特に HBVbb に対し、高い感染感受性を持ち、比較的長期間にわたり、感染性 HBV 粒子の産生を含む HBV 生活環を再現していると考えられた。

3-7. 立体培養 E/NtG8 細胞から産生された HBV 粒子の特性

これまでの研究で、PXB 細胞と HepG2-NTCP-C4 細胞の HBVbb に対する感染感受性が大きく異なることがわかった (図 8)。また PXB 細胞の HBVbb と HBVcc に対する感染感受性が大きく異なることも明らかになった。そこでまず、HBVbb 感染源に

PXB 細胞に対する HBV 感染を促進する因子が含まれる、もしくは逆に HBVcc 感染源に感染を抑制する因子が関与している可能性を想定した。HBVbb と HBVcc の双方に感染感受性を示した PXB 細胞感染培養系を用い、HBVbb と HBVcc の感染源を混合して感染させ、この可能性について検証を行った。PXB 細胞に対し、5 GEq/cell の感染条件となる量の HBVbb 感染源と 8000 GEq/cell の感染条件となる量の HBVcc 感染源を混合して HBVbb+cc 混合感染源を作製し、これを感染させた。感染後 7 日、12 日、17 日目に培養液中の HBV DNA 量を HBVbb 由来の遺伝子型 C の HBV DNA、または HBVcc 由来の遺伝子型 D の HBV DNA についてそれぞれ定量し、HBVbb と HBVcc の単独感染の結果と比較した (図 7)。まず、HBVbb+cc 感染後、遺伝子型 C の HBV DNA を定量した結果、HBVbb+cc と HBVbb 単独感染で有意な差は認められなかった (図 11A)。また、HBVbb+cc 感染後、遺伝子型 D の HBV DNA を定量した結果、こちらも HBVbb+cc と HBVcc 単独感染で有意な差は認められなかった (図 11B)。この結果から、HBVbb と HBVcc のそれぞれの感染源に HBV の感染に因子は存在しないことがわかった。したがって、HBVbb と HBVcc の感染性の違いには、HBV 粒子自体が持つ、感染性に関わる何らかの構成因子が異なる可能性が考えられた。

そこで次に、これらの 2 つの HBV 粒子を構成する因子の違いから生じる物理化学的特性の差を、CsCl 密度勾配超遠心法により解析した。図 12 に各フラクション内に含まれる HBV DNA 量、HBs 量、HBc 量を示した。HBV DNA および HBc を最も多く含むメジャーピーク、フラクション c、c'、および c"には、感染性 HBV 粒子 (Dane 粒子) が含まれていると考えられた。そして、HBs 抗原を最も多く含む b、b'、および b"は、HBV DNA を含まない偽粒子であると考えられた。フラクション e、e'、および e"には、HBV DNA のマイナーピークが見られ、これは HBV DNA を内包したヌクレオキャプシドを示していると考えられた。これらの各フラクション内に含まれる HBV DNA、HBs 量、HBc 量の全体的な分布パターンは既報と一致した[52]。

より詳細に HBV DNA の分布パターンを観察すると、HBVbb と Cellbed-HBV の HBV DNA のメジャーピークはほぼ一致し、フラクション c と c'に単一のピークとして示された (図 12A と 12B)。この結果は、HBVbb と Cellbed-HBV の感染性 HBV 粒子が類似した物理化学的特性を持つことを示唆している。しかしながら、HBVcc では、フラクション c"から d"にかけて、そのピークに『肩』が見られ、これは HBVbb で見られたような単一のピークではなく、2 つのピークが重なっていることを示していると考えられた (図 12C)。現時点では、メジャーピークより高密度側に存在する 2 つ目

のピークに含まれる HBV 粒子の性状は不明であるが、この HBVbb と HBVcc の HBV 粒子の物理化学的特性の差異が、HBVbb と HBVcc の HBV 粒子の感染性の違いに関与し、さらには Cellbed-HBV 感染実験で見られた HBVbb と同等の高い Cellbed-HBV の感染性に関連している可能性が考えられた。

3-8. 立体培養 E/NtG8 細胞における HBV 生活環に関与する遺伝子の解析

これまでに、平面培養 E/NtG8 細胞と比較して、立体培養 E/NtG8 細胞は高い HBV 感染感受性を持つことが示された。そこで、立体培養 E/NtG8 細胞における既知の HBV 生活環に関わる宿主因子の遺伝子発現プロファイルを平面培養 E/NtG8 細胞と比較した。Cellbed 担体上で 1 週間培養した E/NtG8 細胞は、肝索様の構造を形成した (図 13A)。この立体的な形態をとる立体培養 E/NtG8 細胞で再現された HBV 生活環に関与する細胞側因子に関して、既知の HBV 複製に重要な遺伝子の発現を検出した。

まず、成熟肝細胞としての性質の獲得に関与し[53]、HBV cccDNA に直接結合して HBV RNA の転写を行う Hepatocyte nuclear factor (HNF) ファミリー遺伝子 HNF-1 α および HNF-4 α の発現を RT-PCR により検討した。その結果、平面培養 E/NtG8 細胞と比較し、立体培養 E/NtG8 細胞において、その発現が顕著に増加した (図 13B)。

次に、HBV 粒子形成から細胞外への輸送のステップに関与することが報告された、長鎖脂肪酸について [54]、これを生合成する脂肪酸合成経路 (Fatty acid biosynthesis; FABS) の律速酵素である、アセチル CoA カルボキシラーゼ 1 (ACC1) と脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase; FAS) の遺伝子発現を検討した。その結果、立体培養 E/NtG8 細胞において、ACC1 遺伝子の発現はわずかに増加し、FAS 遺伝子の発現は顕著に増加することがわかった (図 13B)。さらに、HBV 粒子産生に関連して、 α -グリコシダーゼ (GAA)、AAA (ATP associated with diverse cellular activities) 型 ATPase (Vps4)、Charged multivesicular body protein (CHMP) 3、CHMP4 など、HBV 粒子の輸送経路に必要なエンドソーム輸送必須複合体 Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) のいくつかの因子の遺伝子の発現[54], [55]は、E/NtG8 細胞でも認められた (図 13C)。

これらの HBV 複製を促進する宿主因子に加え、HBV 複製を抑制することが報告されている宿主制限因子の発現についても解析を行った。

細胞からの HBV 放出を阻害する抗ウイルス因子 BST-2/Tetherin の遺伝子発現[57]は、培養条件に関係なく、E/NtG8 細胞では低いことが観察された。

さらに、立体培養 E/NtG8 細胞における SMC6 の発現を解析した。平面培養 E/NtG8 細胞と HepG2-NTCP-C4 細胞における SMC6 の発現はほぼ同等であったが、立体培養 E/NtG8 細胞では、その発現が SMC6 siRNA をトランスフェクションした HepG2-NTCP-C4 細胞と同等にまで低下した (図 3A と図 12C)。そこで、生体内における正常ヒト肝細胞の特徴を有する PXB マウス肝臓および凍結ヒト肝細胞における SMC6 の発現を解析した。その結果、培養 48 時間後の初代培養ヒト肝細胞で、SMC6 遺伝子発現のわずかな増加が認められたが (図 13D)、PXB マウス肝臓および凍結保存ヒト肝細胞では立体培養 E/NtG8 細胞と同等の低レベルの発現が認められた (図 13D)。これらの結果から、これまでに培養細胞を用いて報告された SMC6 遺伝子の発現と、SMC5/6 複合体による HBV RNA の転写阻害メカニズムが、立体的な肝組織中の正常ヒト肝細胞では元来強く抑制されている可能性が考えられた。

以上の遺伝子発現解析の結果から、立体培養 E/NtG8 細胞の高い HBV 感染感受性は、少なくとも部分的にはこれらの既知 HBV 生活環に関わる宿主因子の遺伝子発現が関与しているものと考えられた。

第四章

考察

4-1. HBV 感染培養系の長所と短所について

本研究では HBV 受容体 NTCP を恒常発現させた不死化ヒト肝細胞 E/NtG8 細胞を樹立し、これを簡便な方法で立体培養する新たな HBV 感染培養系の開発に成功した。この HBV 感染培養系は、HBVcc および HBVbb に対して感染感受性を示し、比較的長期にこれら HBV のゲノム複製を支持し、HBVbb 同様の感染性を示す粒子を産生することが可能であった。これまでに、多くの HBV 感染培養系が報告され、HBV 生活環を解明するための分子生物学的研究に使用されている。これまでに確立された HBV 感染培養系では、ヒト肝がん由来細胞株、HepG2 細胞、HuH-7 細胞、HepaRG 細胞[58]、そして、初代ヒト肝細胞や PXB 細胞が用いられている[35], [36]。また、ヒト人工多能性幹細胞 Induced pluripotent stem (iPS) 細胞から分化誘導された肝細胞様細胞を用いた感染実験系も報告されている[59], [60]。しかしながら、これらの HBV 感染培養系には、それぞれ長所と短所がある。肝がん由来細胞株 HepG2 細胞は HBV の研究に良く使用されている細胞である。この細胞に HBV ゲノム発現プラスミドを導入した HepG2.2.15.7 細胞や Hep38.7-Tet 細胞は HBV ゲノムからの HBV mRNA の転写から粒子産生までを再現し、HBVcc を安定的に供給することに用いられている。また、HepG2 に HBV 受容体を恒常的に産生するように樹立された HepG2-NTCP-C4 細胞は、この HBVcc に感染感受性を示し、この培養系によって HBV の受容体への結合から cccDNA の形成までの過程を再現することが可能になった。

しかしながら、HepG2.2.15.7 細胞、Hep38.7-Tet 細胞由来の HBVcc はいずれも遺伝子型 D である。日本における主要な HBV の遺伝子型は C であり、臨床的にその感染の慢性化は母子感染に由来するものがほとんどであることが知られている[50]。一方、欧米型と考えられる遺伝子型 A の HBV は成人における感染でも慢性化しやすい傾向にあり、遺伝子型の相違により患者における感染増殖や病態が異なることが知られている。したがって、これらの異なる遺伝子型の HBV に特徴的な感染増殖や細胞との相互作用に関する解析は非常に重要であると考えられる。しかしながら、これまで、異なる遺伝子型の HBV に特徴的な感染増殖や細胞との相互作用を解析するための HBV 培養系は限られていた。その原因の一つは異なる遺伝子型の HBVcc の供給法がなかったことにある。それら HBV ゲノム発現プラスミドを一過性にトランスフェクションした細胞からは HBVcc が産生されるが[44]、その感染性は低いことが知られている[61]。その中でも比較的感染性の高い遺伝子型 D では PreS1 領域の N 末端側の 11 アミノ酸が欠損していることが知られている。最近では、遺伝子型 D 以外の HBV にこの 11 アミノ酸

の欠損を導入した HBV ゲノム発現プラスミドを、HepG2 細胞に一過性にトランスフェクションした結果、高い感染性を有する HBVcc の産生が可能になると報告された [62]。今後、異なる遺伝子型の HBV の感染増殖をこのようにして得られた HBVcc を用いて解析するためには、この欠損変異が各遺伝子型の HBV の生活環にどのように影響するかなどの詳細な検討が必要になると考えられる。一方、上記のように汎用されている HBV 感染許容性細胞にも問題があると考えられた。つまり、HepG2-NTCP-C4 細胞を用いた感染実験において、患者血清を用いて HBV を感染させた PXB マウスの血清を感染源に用いた場合には、初代培養ヒト肝細胞と同等であると考えられる PXB 細胞に対する感染と同じ感染条件 (5 GEq/cell) では全くその感染が観察できないことである (図 13)。このことはいろいろな遺伝子型や変異体の解析が可能な患者血清に含まれる HBV の感染実験にはこの感染実験系が使用できないことを示唆している。このことが細胞側の要因によることは、HepG2-NTCP 細胞からさらに HBV 感染感受性の高いクローンとして得られた特殊な細胞株 HepG2-NTCPsec+細胞が HBVbb 感染を許容することが報告されたことから示されている [62]。

HepaRG 細胞は、NTCP を発現する特異な肝がん由来細胞株である [58]。HepaRG 細胞は、肝分化を誘導させた後に高ウイルス量 (>200 GEq/cell) の HBVcc の感染を許容するが、HBVbb 感染を許容することは示されていない [58]。また、iPS 細胞も肝細胞への成熟化の過程で、NTCP 発現が増加し、高ウイルス量 (5000 GEq/cell もしくは 14000 GEq/cell) の HBVcc 感染感受性を獲得することが報告されたが、こちらも HepaRG 細胞と同様に、HBVbb 感染を許容することは示されていない [59], [60]。そのため、外来的な NTCP の強制発現を必要としないこれらの細胞が、生理的条件下に類似した HBV 生活環をどの程度再現しているかなどに不明な点が残されており、今後、これらの細胞を用いた HBV 感染培養系で、さらなる HBVbb に対する感染感受性についての検討が必要であると考えられる。

一方で、HBVbb が効率よく感染・複製する PXB 細胞は HBVcc に対し感染感受性が低いことがわかっている [40] (図 7B)。これらのことは、HBVcc と HBVbb には何らかの相違が存在していること、そして HepG2-NTCPsec+細胞の報告から、HepG2-NTCP 細胞はヘテロな細胞集団であり、HBVbb の感染を許容する何らかの因子の発現が欠損している、もしくは HepG2-NTCP 細胞において、HBVbb 感染を阻害する因子が発現している可能性を示している。

これらのことから、これまで用いられてきた HBV 感染培養系は、生体内における

HBV 感染を完全に再現しているものではない可能性が考えられ、HBV 生活環の解明における HBV 感染培養系の選択には、十分に注意する必要があると考えられた。

4-2. 立体培養 E/NtG8 細胞の特徴について

E/NtG8 細胞の親細胞である HuS-E/2 細胞は、立体培養条件下で、肝細胞様細胞に成熟することで HCVbb の感染と増殖をサポートすることが示され [37]、本研究においても、立体培養は E/NtG8 細胞における HBV の増殖を改善することが示された。そこで、立体培養による細胞環境の変動と、感染許容性獲得の分子メカニズムを解明するために、HBV 生活環に関与するいくつかの既知の遺伝子の発現を、平面培養条件と立体培養条件で比較した (図 12)。

肝細胞特異的な転写因子として知られている HNF-1 α と HNF-4 α 遺伝子の発現は、1 週間の立体培養により誘導された (図 12B)。これらの立体培養 E/NtG8 細胞における肝細胞特異的な転写因子の高レベルの発現は、高い肝細胞指向性を有する HBV 生活環における HBVcccDNA から HBV mRNA の転写、および HBV の感染・増殖をサポートする宿主遺伝子の転写に必要であると考えられた。

立体培養 E/NtG8 細胞は、HBVbb 感染後、長期にわたる感染性 HBV 粒子産生が大きな特徴であることから (図 9B と C)、この維持に関わる宿主因子について考察した。

2018 年に岡村らは、ACC1、FAS を含む脂肪酸生合成系により合成された炭素数 12 以上の長鎖脂肪酸が、HBV 粒子形成から細胞外への粒子産生のいずれかの過程に関与することを報告した [53]。立体培養 E/NtG8 細胞で観察された FAS の発現レベルの上昇は、長鎖脂肪酸の合成を促進し、HBV 粒子産生に有利に働く可能性が考えられた (図 12B)。

BST-2/Tetherin の遺伝子発現は、立体培養とは関係なく、E/NtG8 細胞では HepG2-NTCP-C4 細胞よりも低いことがわかった (図 12B)。BST-2/Tetherin は幅広い抗ウイルススペクトラムを有し、HBV だけでなく、ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus; HIV) や HCV などのウイルス粒子の放出を阻害することが報告されている [57], [63], [64], [65]。この結果から、E/NtG8 細胞における宿主制限因子 BST-2 の HBV 粒子産生の阻害効果は、HepG2-NTCP-C4 細胞と比較して、限定的である可能性が考えられ、このことも E/NtG8 細胞からの感染性 HBV 粒子の産生にとって有利に働いていると思われた。

次にHBV増殖を負に制御する宿主制限因子として報告されているSMC6について考察する。2016年に、SMC5/6複合体が、HBVcccDNAなどの染色体外DNAからの転写を抑制することにより、HBV複製の宿主制限因子として機能することが報告された[48]。SMC5/6複合体の宿主制限因子としての機能は、本研究でもsiRNAを用いたSMC6ノックダウンしたHepG2-NTCP-C4細胞において確認された(図5A)。特筆すべき点は、立体培養E/NtG8細胞では、SMC6の発現はSMC6ノックダウンHepG2-NTCP-C4細胞と同等のレベルにまで低下したことである(図12D)。このことから、HBVmRNA転写に対するSMC6の抑制効果は、立体培養E/NtG8細胞においては限定的であると考えられた。また、SMC6の発現は凍結保存から解凍した直後のPHHではほとんど確認することができないが、培養開始から数日後のPXB細胞やPHHを凍結保存から解凍し、播種し、培養することで増加することが観察された。特に90%以上がヒト肝細胞から構成されているPXBマウスの肝組織ではほとんどその遺伝子発現は認められなかったことから、ヒトの肝臓中の肝細胞ではSMC6遺伝子の発現は限定的である可能性が考えられた。生体内の各組織におけるSMC6の発現は、哺乳類においては精巣で特に高い発現が見られ、精原細胞の減数分裂期の染色体動態の安定性に関与することが知られている[66]。ヒト肝臓組織中の肝細胞内におけるSMC6発現およびSMC5/6複合体のHBV複製の宿主制限因子としての実態については、今後、さらなる詳細な解析が必要であると考えられた。

4-3. HBVbbに対する高い感染感受性について

HepG2-NTCP-C4細胞とは対照的に、立体培養E/NtG8細胞は、HBVccよりもHBVbbに対して、高い感染感受性を示した。このことは、立体培養E/NtG8細胞における、HBVbb感染をサポートする因子が、HepG2-NTCP-C4細胞では不足しているもしくはHepG2-NTCP細胞において、HBVbb感染を阻害する因子が発現している可能性が考えられた。このことは、HepG2-NTCP-C4細胞、HBVbb感染感受性を持つ立体培養E/NtG8細胞およびHepG2-NTCPsec+細胞[63]の遺伝子発現プロファイルの比較により、明らかになる可能性が考えられた。

HBV粒子の物理化学的特性をCsCl浮遊密度勾配遠心法によって解析した結果、HBVbbとHBVccのHBVDNA量の分布は明らかに異なるパターンを示した(図11)。これは、さらに、HBVbbと同等の高い感染効率を示した立体培養E/NtG8由来のHBVとHBVbbのピークのパターンは類似していたことから、これらの感染性の高いHBV

粒子には何らかの共通した特徴がある可能性が考えられた。これらの HBV 粒子の性状を明らかにするためには、これらフラクションに含まれる HBV 粒子のプロテオーム解析やエンベロープの脂質二重膜を構成する脂質分子のメタボローム解析など、さらなる詳細な解析が必要であると考えられた。

4-4. 今後の展望

本研究では、立体培養した NTCP 恒常発現不死化肝細胞を用いた、新たな HBV 感染培養系を確立し、非がん細胞における感染性の高い HBV 粒子の産生を含む効率的な HBV 生活環を再現した。

この HBV 感染培養系を用いることによって、これまで不明であった HBV 感染性の実体やその形成機構の解明を明らかにする手段になると考えられた。

この HBV 感染培養系は、生理的条件に類似した条件における、分子生物学的手法を用いた HBV と宿主細胞間の相互作用の研究、および HBV 感染による病原性の発現メカニズムの解明に役立つ可能性があると考えられた。

第五章

引用文献

- [1] Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Nov;72(11):4597-601. doi: 10.1073/pnas.72.11.4597.
- [2] Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature*. 1985 Oct 10-16;317(6037):489-95. doi: 10.1038/317489a0.
- [3] Quarleri J. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 14;20(2):425-35. doi: 10.3748/wjg.v20.i2.425.
- [4] Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. Apr 4;1(7649): 695-8. 1970
- [5] Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*. 2007 Dec;46(6):1759-68. doi: 10.1002/hep.21896.
- [6] Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*. 2012 Nov 13;3. doi: 10.7554/eLife.00049.
- [7] Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K, Ohki M, Nagamori S, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Yun JH, Park SY, Ohtani N, Muramatsu M, Iwami S, Tanaka Y, Sureau C, Wakita T, Watashi K. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Apr 23;116(17):8487-8492. doi: 10.1073/pnas.1811064116. Epub 2019 Apr 5.
- [8] Gallucci L, Kann M. Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses*. 2017 Jan 21;9(1):21. doi: 10.3390/v9010021.
- [9] Sohn JA, Litwin S, Seeger C. Mechanism for CCC DNA synthesis in hepadnaviruses. *PLoS One*. 2009 Nov 30;4(11):e8093. doi: 10.1371/journal.pone.0008093.
- [10] Petit MA, Pillot J. HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J Virol*. 1985 Feb;53(2):543-51. doi:

- 10.1128/JVI.53.2.543-551.1985.
- [11] Stibbe W, Gerlich WH. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol.* 1983 May;46(2):626-8. doi: 10.1128/JVI.46.2.626-628.1983.
- [12] Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol.* 1984 Nov;52(2):396-402. doi: 10.1128/JVI.52.2.396-402.1984.
- [13] Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA, Thornton GB. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science.* 1985 Jan 25;227(4685):429-33. doi: 10.1126/science.2981434.
- [14] Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.* 1992 Sep;11(9):3413-20.
- [15] Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982 Jun;29(2):403-15. doi: 10.1016/0092-8674(82)90157-x.
- [16] Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol.* 1987 Mar;61(3):904-11. doi: 10.1128/JVI.61.3.904-911.1987.
- [17] Köck J, Rösler C, Zhang JJ, Blum HE, Nassal M, Thoma C. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog.* 2010 Sep 2;6(9):e1001082. doi: 10.1371/journal.ppat.1001082.
- [18] Seifer M, Hamatake RK, Colonno RJ, Standring DN. In vitro inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Dec;42(12):3200-8. doi: 10.1128/AAC.42.12.3200.
- [19] Ying C, De Clercq E, Neyts J. Lamivudine, adefovir and tenofovir exhibit long-lasting anti-hepatitis B virus activity in cell culture. *J Viral Hepat.* 2000 Jan;7(1):79-83. doi: 10.1046/j.1365-2893.2000.00192.x.

- [20] European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012 Jul;57(1):167-85. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.010. Epub 2012 Mar 20.
- [21] Hayashi Y, Koike K. Interferon inhibits hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA. *J Virol*. 1989 Jul;63(7):2936-40. doi: 10.1128/JVI.63.7.2936-2940.1989.
- [22] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, Petersen J, Raimondo G, Dandri M, Levrero M. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):529-37. doi: 10.1172/JCI58847. Epub 2012 Jan 17.
- [23] Tsuge M, Uchida T, Hiraga N, Kan H, Makokha GN, Abe-Chayama H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Shimozono R, Iwamura T, Narumi H, Suzuki T, Kainoh M, Taniguchi T, Chayama K. Development of a Novel Site-Specific Pegylated Interferon Beta for Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 May 24;61(6):e00183-17. doi: 10.1128/AAC.00183-17. Print 2017 Jun.
- [24] Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Hüser N, Durantel D, Liang TJ, Münk C, Heim MH, Browning JL, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*. 2014 Mar 14;343(6176):1221-8. doi: 10.1126/science.1243462. Epub 2014 Feb 20.
- [25] Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K. Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(2):444-8. doi: 10.1073/pnas.84.2.444.
- [26] Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, Koike K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2678-82. doi: 10.1073/pnas.84.9.2678.

- [27] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Feb;84(4):1005-9. doi: 10.1073/pnas.84.4.1005.
- [28] Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Aug;41(8):1715-20. doi: 10.1128/AAC.41.8.1715.
- [29] Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S, Petit MA. In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J Virol*. 1990 Jun;64(6):3025-32. doi: 10.1128/JVI.64.6.3025-3032.1990.
- [30] Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 1929-1939.
- [31] Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*. 2013; 518: 335-345.
- [32] Tnani M, Bayard BA. Evidence for IRF-1-dependent gene expression deficiency in interferon unresponsive HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1451: 59-72.
- [33] Li K, Chen Z, Kato N, Gale M Jr, Lemon SM. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2005; 280: 16739-16747.
- [34] Tsugawa Y, Kato H, Fujita T, Shimotohno K, Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection. *PLoS One*. 2014; 9: e89869. doi: 10.1371/journal.pone.0089869.
- [35] Gripon P, Diot C, Thézé N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol*. 1988 Nov;62(11):4136-43. doi: 10.1128/JVI.62.11.4136-4143.1988.
- [36] Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkmann M, Schranz P, Zentgraf H. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B

- virus. *Gastroenterology*. 1994 Mar;106(3):664-73. doi: 10.1016/0016-5085(94)90700-5.
- [37] Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology*. 2009 Sep;50(3):689-96. doi: 10.1002/hep.23034.
- [38] Huang HC, Chen CC, Chang WC, Tao MH, Huang C. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol*. 2012 Sep;86(17):9443-53. doi: 10.1128/JVI.00873-12. Epub 2012 Jun 27.
- [39] Yao WL, Ikeda S, Tsukamoto Y, Shindo K, Otakaki Y, Qin M, Iwasawa Y, Takeuchi F, Kaname Y, Chou YC, Chang C, Watashi K, Wakita T, Noda T, Kato H, Fujita T. Establishment of a human hepatocellular cell line capable of maintaining long-term replication of hepatitis B virus. *Int Immunol*. 2017 Mar 1;29(3):109-120. doi: 10.1093/intimm/dxx012.
- [40] Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol*. 2015 May;185(5):1275-85. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.01.028. Epub 2015 Mar 17.
- [41] Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T. Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 26;452(3):315-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.029. Epub 2014 Aug 20.
- [42] Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 17;443(3):808-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.052. Epub 2013 Dec 14.
- [43] Lenhoff RJ, Summers J. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol*. 1994

- Jul;68(7):4565-71. doi: 10.1128/JVI.68.7.4565-4571.1994.
- [44] Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ito K, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Shimada T, Izumi N, Kaito M, Miyakawa Y, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology*. 2006; 44: 915-924.
- [45] Qu B, Ni Y, Lempp FA, Vondran FWR, Urban S. T5 Exonuclease Hydrolysis of Hepatitis B Virus Replicative Intermediates Allows Reliable Quantification and Fast Drug Efficacy Testing of Covalently Closed Circular DNA by PCR. *J Virol*. 2018 Nov 12;92(23):e01117-18. doi: 10.1128/JVI.01117-18. Print 2018 Dec 1.
- [46] Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest*. 1994 Mar;93(3):1326-31. doi: 10.1172/JCI117091.
- [47] Appelman MD, Chakraborty A, Protzer U, McKeating JA, van de Graaf SF. N-Glycosylation of the Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Determines Its Trafficking and Stability and Is Required for Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One*. 2017 Jan 26;12(1):e0170419. doi: 10.1371/journal.pone.0170419. eCollection 2017.
- [48] Decorsière A, Mueller H, van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK, Livingston CM, Niu C, Fletcher SP, Hantz O, Strubin M. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*. 2016 Mar 17;531(7594):386-9. doi: 10.1038/nature17170.
- [49] Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, Zoulim F, Hantz O, Protzer U. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*. 2011 Nov;55(5):996-1003. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.015. Epub 2011 Mar 2.
- [50] van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, Decorsière A, Zoulim F, Hantz O, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2116-24. doi: 10.1002/hep.25928. Epub 2012 Sep 24.
- [51] Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*. 2003;46(6):329-38. doi: 10.1159/000074988.

- [52] Hong R, Bai W, Zhai J, Liu W, Li X, Zhang J, Cui X, Zhao X, Ye X, Deng Q, Tiollais P, Wen Y, Liu J, Xie Y. Novel recombinant hepatitis B virus vectors efficiently deliver protein and RNA encoding genes into primary hepatocytes. *J Virol.* 2013 Jun;87(12):6615-24. doi: 10.1128/JVI.03328-12. Epub 2013 Apr 3.
- [53] Zheng Y, Li J, Ou JH. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein. *J Virol.* 2004; 78: 6908-6914.
- [54] Okamura H, Nio Y, Akahori Y, Kim S, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Fatty acid biosynthesis is involved in the production of hepatitis B virus particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 475: 87-92.
- [55] Lazar C, Durantel D, Macovei A, Zitzmann N, Zoulim F, Dwek RA, Branza-Nichita N. Treatment of hepatitis B virus-infected cells with alpha-glucosidase inhibitors results in production of virions with altered molecular composition and infectivity. *Antiviral Res.* 2007; 76: 30-37.
- [56] Lambert C, Döring T, Prange R. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol.* 2007; 81: 9050-9060.
- [57] Yan R, Zhao X, Cai D, Liu Y, Block TM, Guo JT, Guo H. *J Virol.* The interferon-inducible protein tetherin inhibits hepatitis B virus virion secretion. 2015; 89: 9200-9212.
- [58] Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99
- [59] Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Asano Y, Nagata H, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Iwamoto M, Watashi K, Wakita T, Watanabe M. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci Rep.* 2016; 6: 29358. doi: 10.1038/srep29358.
- [60] Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Mizuguchi H. Human induced-pluripotent stem

- cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Sci Rep.* 2017; 7: 45698. doi: 10.1038/srep45698.
- [61] Murayama A, Yamada N, Osaki Y, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Matsuda M, Suzuki R, Tanaka T, Moriishi K, Suzuki T, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Wakita T, Muramatsu M, Liang TJ, Kato T. N-Terminal PreS1 Sequence Regulates Efficient Infection of Cell-Culture-Generated Hepatitis B Virus. *Hepatology.* 2020 May 23. doi: 10.1002/hep.31308. Online ahead of print.
- [62] König A, Yang J, Jo E, Park KHP, Kim H, Than TT, Song X, Qi X, Dai X, Park S, Shum D, Ryu WS, Kim JH, Yoon SK, Park JY, Ahn SH, Han KH, Gerlich WH, Windisch MP. Efficient long-term amplification of hepatitis B virus isolates after infection of slow proliferating HepG2-NTCP cells. *J Hepatol.* 2019 Aug;71(2):289-300. doi: 10.1016/j.jhep.2019.04.010. Epub 2019 May 8.
- [63] Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 2008 Jan 24;451(7177):425-30. doi: 10.1038/nature06553. Epub 2008 Jan 16.
- [64] Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe.* 2008 Apr 17;3(4):245-52. doi: 10.1016/j.chom.2008.03.001. Epub 2008 Mar 13.
- [65] Dafa-Berger A, Kuzmina A, Fassler M, Yitzhak-Asraf H, Shemer-Avni Y, Taube R. Modulation of hepatitis C virus release by the interferon-induced protein BST-2/tetherin. *Virology.* 2012 Jul 5;428(2):98-111. doi: 10.1016/j.virol.2012.03.011. Epub 2012 Apr 20.
- [66] Verver DE, van Pelt AM, Repping S, Hamer G. Role for rodent Smc6 in pericentromeric heterochromatin domains during spermatogonial differentiation and meiosis. *Cell Death Dis.* 2013 Aug 1;4(8):e749. doi: 10.1038/cddis.2013.269.

第六章

図

図と説明

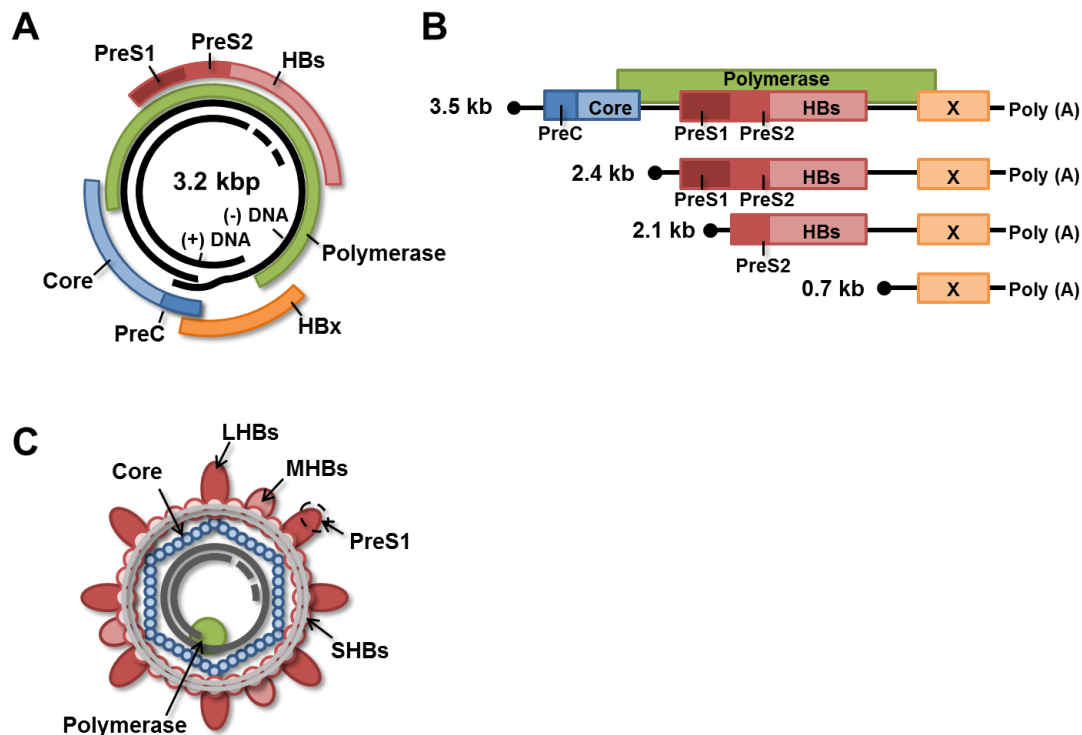


図 1. HBV ゲノムの構造と、ウイルス粒子の形態の概略

A) 3200 塩基からなる HBV ゲノム DNA 上には、互いに重複した 4 つの ORF が存在する。B) ゲノム DNA から長さの異なる 4 種類の HBV mRNA が転写され、C) HBV ゲノム DNA は、HBV polymerase と共に HBc からなるヌクレオキャプシドに囲まれ、さらにその外側を、脂質二重膜と 3 種類のエンベロープタンパク質 (LHBs,MHBs,SHBs) に囲まれる。HBV 粒子は LHBs の PreS1 ドメインを介し、HBV 感染受容体 NTCP に結合する。

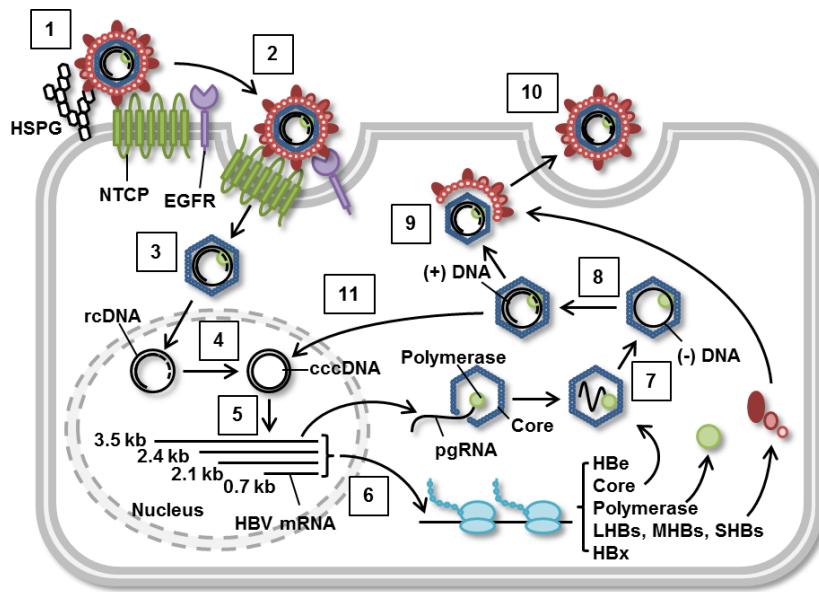


図 2. HBV 生活環の概略

図中の番号は、HBV 生活環における 1 吸着、2 侵入、3 脱殻、4 DNA 修復、5 転写、6 翻訳、7 逆転写、8 DNA 合成、9 会合、10 HBV 粒子放出、11 ノクレオキャプシドの核への再移行の各ステップを示す。

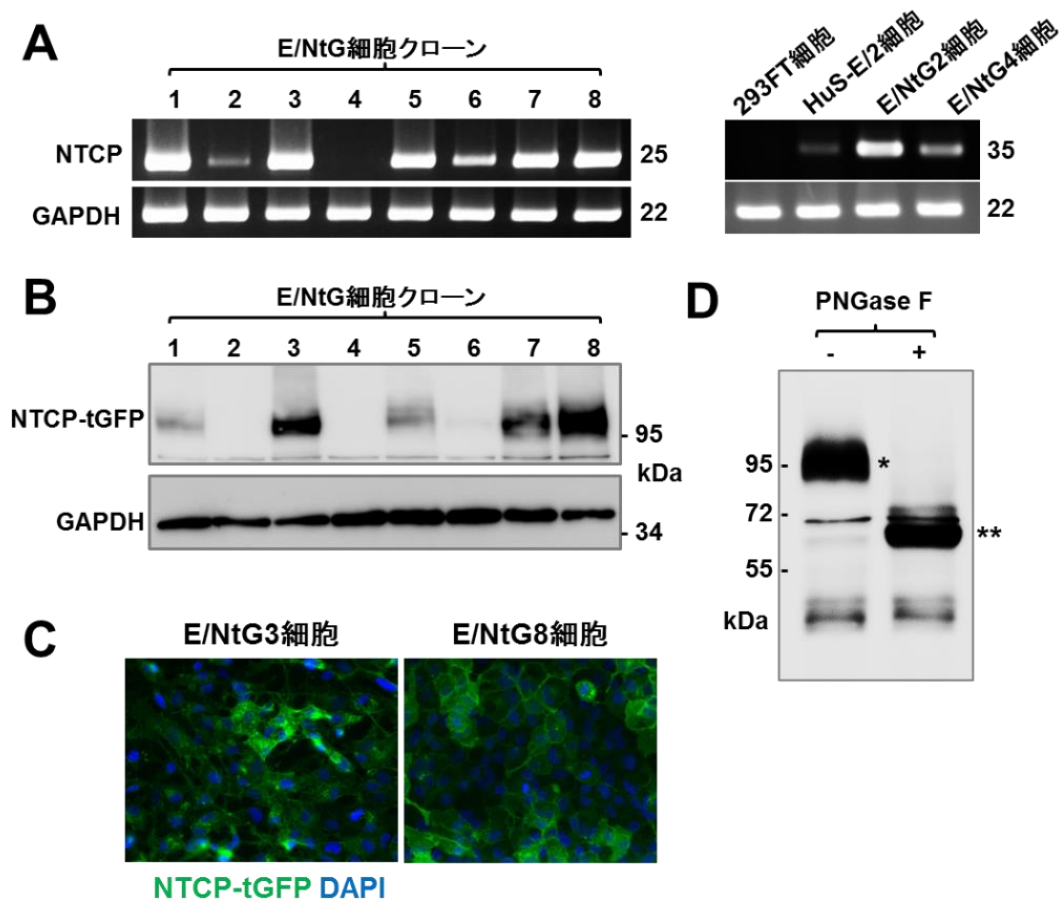


図 3. NTCP-tGFP 発現 HuS-E/2 細胞の樹立

A) RT-PCR により、親株である HuS-E/2 細胞と 8 つの E/NtG 細胞クローンにおける NTCP mRNA の発現を検出した。図の右側の数字はそれぞれの遺伝子に対応した PCR サイクル数を示す。GAPDH を内部標準として用いて、各遺伝子の発現量を評価した。

B) E/NtG 細胞クローンにおける NTCP-tGFP の発現を、抗 tGFP 抗体を使用したイムノブロット法により検出した。GAPDH は内部標準として用いた。

C) コラーゲンコートされたガラスチャンバースライド上の E/NtG3 細胞と E/NtG8 細胞を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。NTCP-tGFP および DAPI で染色された核は、それぞれ緑色および青色で示した。

D) E/NtG8 細胞から回収した全タンパク質サンプルを PNGase 処理し、NTCP-tGFP の発現を、抗 tGFP 抗体を使用したイムノブロット法により検出した。図中*は PNGase 処理前の NTCP-tGFP のバンド、**は PNGase 処理後の NTCP-tGFP のバンドを示す。

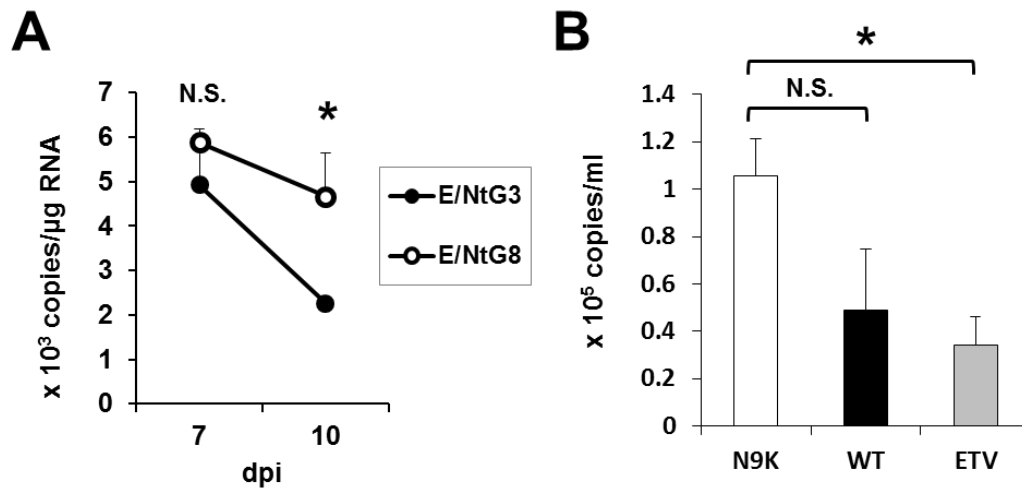


図 4. 平面培養 E/NtG 細胞への HBVcc 感染実験

A) E/NtG3 細胞 (黒丸) と E/NtG8 細胞 (白丸) に対し、HBVcc を 8000 GEq/cell で感染させた。感染 7 日目と 10 日目に回収した細胞内全 RNA サンプルにおける HBV pgRNA のコピー数を qRT-PCR により定量した。縦軸は全 RNA サンプル 1 μg 中の HBV pgRNA のコピー数を示し、横軸の dpi は「感染後の日数 (days post-infection)」を示す。B) E/NtG8 細胞に対し、1 μM PreS1 ペプチド myr-47WT (WT) (黒色バー) または myr-47N9K (N9K) (白色バー) の存在下で HBVcc に感染させた。3.75 nM エンテカビル (ETV) 存在下 (灰色バー) または非存在下で 2 週間培養した後、細胞外 HBVDNA を qPCR により定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示し横軸はそれぞれ薬剤処理を示す。有意水準: * p < 0.05。No significant difference (N.S.) は「有意差なし」を示す。

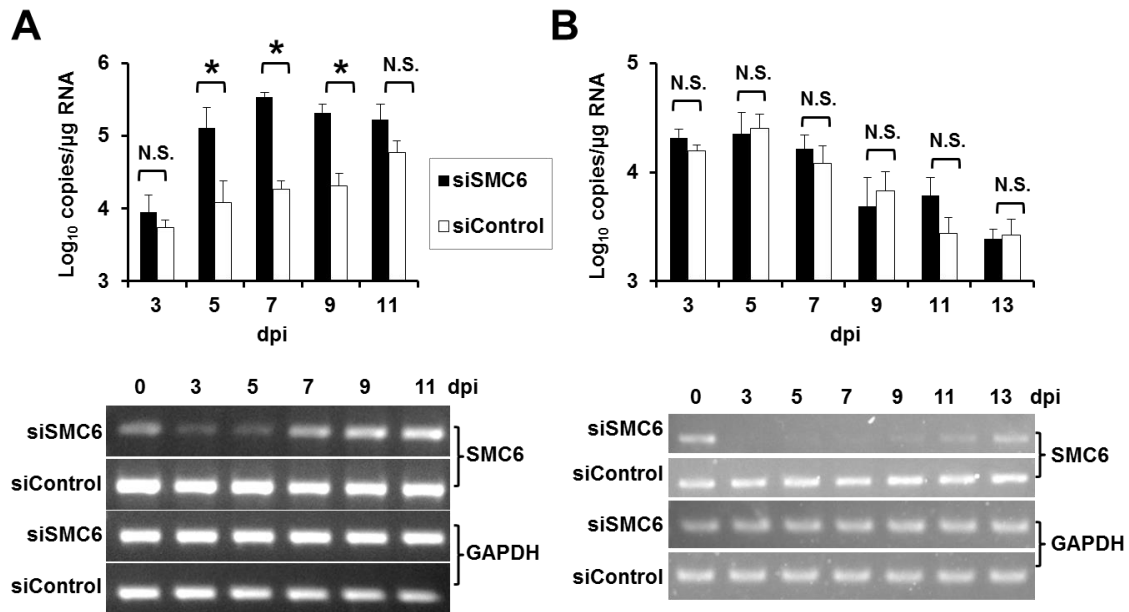


図 5. SMC6 siRNA ノックダウンによる HBV 複製への影響の解析

A) HepG2-NTCP-C4 細胞に SMC6 siRNA をトランスフェクションした後、HBVcc を 8000 GEq/cell で感染させた。HBVcc 感染後、グラフに表示された時点で細胞内全 RNA サンプルを回収し、HBV pgRNA 量を qRT-PCR により定量した。縦軸は全 RNA サンプル 1 μg 中の HBV pgRNA のコピー数を示す。SMC6 siRNA をトランスフェクションした細胞における HBV pgRNA 発現は、siSMC6 と表記し、黒色バーで示し、ネガティブ・コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞における HBV pgRNA 発現は、siControl と表記し、白色バーで示した。グラフの下の図は、RT-PCR による SMC6 mRNA 発現解析の結果を示し、これにより、感染期間中の SMC6 mRNA のノックダウンを確認した。GAPDH を内部標準として用いて、各遺伝子の発現量を評価した。B) 平面培養 E/NtG8 細胞に SMC6 siRNA をトランスフェクションした後、HepG2-NTCP-C4 細胞と同様に、HBVcc を 8000 GEq/cell で感染させた。SMC6 siRNA をトランスフェクションした細胞における HBV pgRNA 発現を黒色バーで示し、ネガティブ・コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞における HBV pgRNA 発現を白色バーで示した。図 5A と同様、グラフの下の図は、RT-PCR による SMC6 mRNA 発現解析の結果を示し、これにより、感染期間中の SMC6 mRNA のノックダウンを確認した。有意水準：* p < 0.05。 N.S.は「有意差なし」を示す。

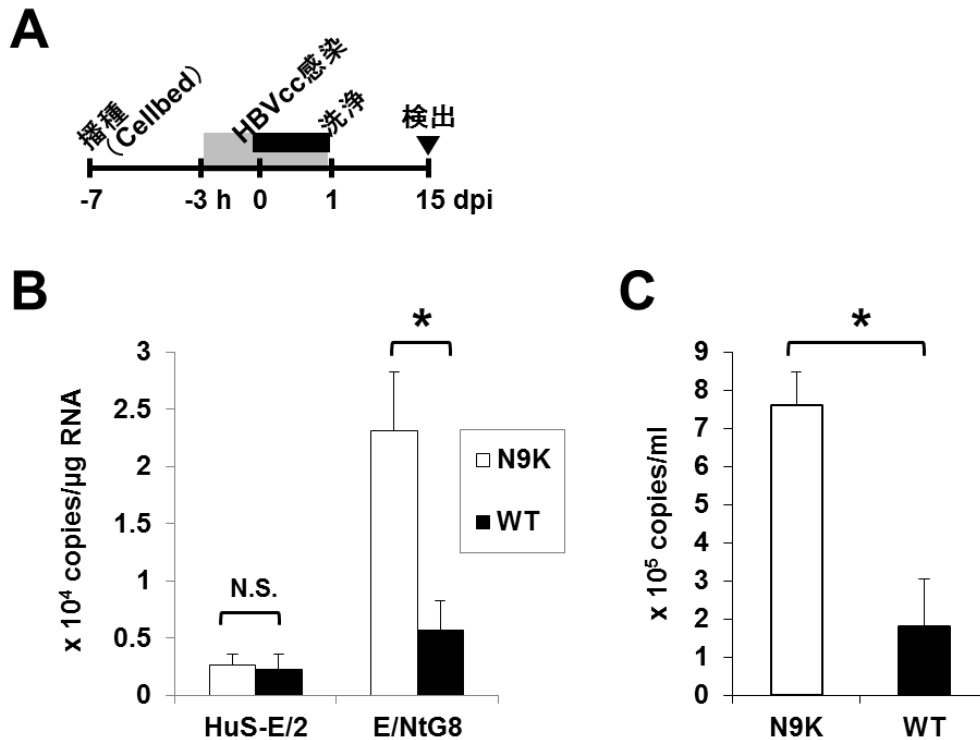


図 6. 立体培養 E/NtG8 細胞への HBVcc 感染実験

A) 感染実験スケジュールを示す。HuS-E/2 細胞および E/NtG8 細胞を Cellbed 上で培養し、1 週間後に 2×10^6 細胞となったこれらの細胞に対し、HBVcc を 8000 GEq/cell で感染させた。HBVcc を感染させた期間は黒色のボックスで示し、PreS1 ペプチドの処理時間は灰色のボックスで示した。HBVcc 感染後、これらの細胞を 2 週間培養し、サンプルの回収・検出を行った。B) HBVcc 感染後、15 日目の立体培養 HuS-E/2 細胞および E/NtG8 細胞における HBV pgRNA を qRT-PCR により定量した。縦軸は全 RNA サンプル 1 μg 中の HBV pgRNA のコピー数を示す。1 μM PreS1 ペプチド myr-47WT (WT) 処理した細胞は黒色バー、myr-47N9K (N9K) で処理した細胞は白色バーで示した。C) HBVcc を感染させた立体培養 E/NtG8 細胞の培養液は、実験期間中 2 日毎に回収し、感染 15 日目における培養液中 HBVDNA を qPCR により定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示し横軸はそれぞれ薬剤処理を示す。有意水準：* $p < 0.05$ 。N.S.は「有意差なし」を示す。

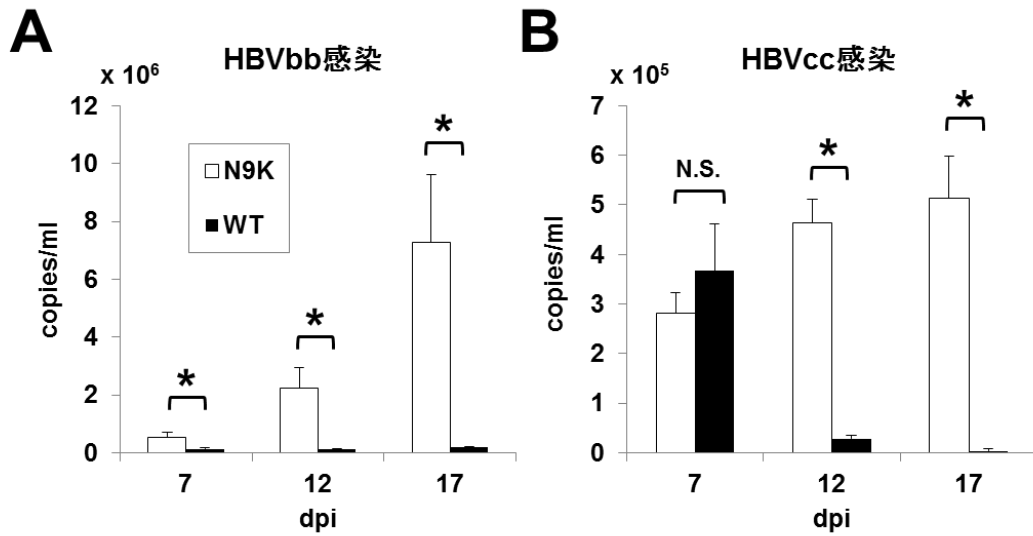


図 7. PXB 細胞 HBV 感染培養系を用いた HBVbb と HBVcc の感染性の比較

PXB 細胞に対し、HBVbb を 5 GEq/cell (A)、あるいは HBVcc を 8000 GEq/cell (B) で感染させた。2 日間の感染の後、培養液を 5 日毎に回収し、培養液中 HBVDNA を qPCR により定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示し横軸はそれぞれ薬剤処理を示す。1 μ M PreS1 ペプチド myr-47WT (WT) 処理した細胞は黒色バー、myr-47N9K (N9K) で処理した細胞は白色バーで示した。有意水準：* $p < 0.05$ 。 N.S.は「有意差なし」を示す。

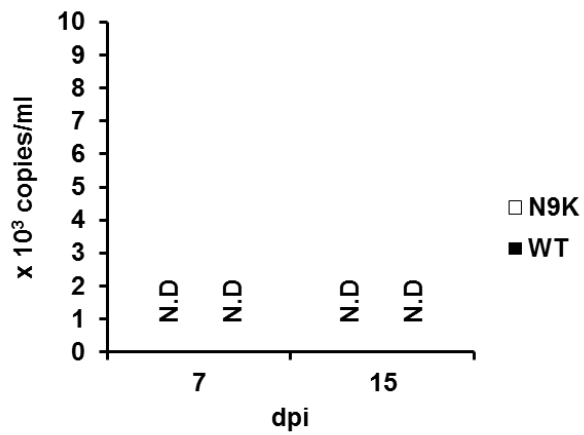


図 8. HepG2NTCP-C4 細胞への HBVbb 感染実験

HepG2-NTCP-C4 細胞に対し、HBVbb を 5 GEq/cell で感染させた。感染 7 日目と 15 日目の培養液中 HBV DNA を、qPCR によりを定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示す。N.D は「不検出 (not detected)」を示す。

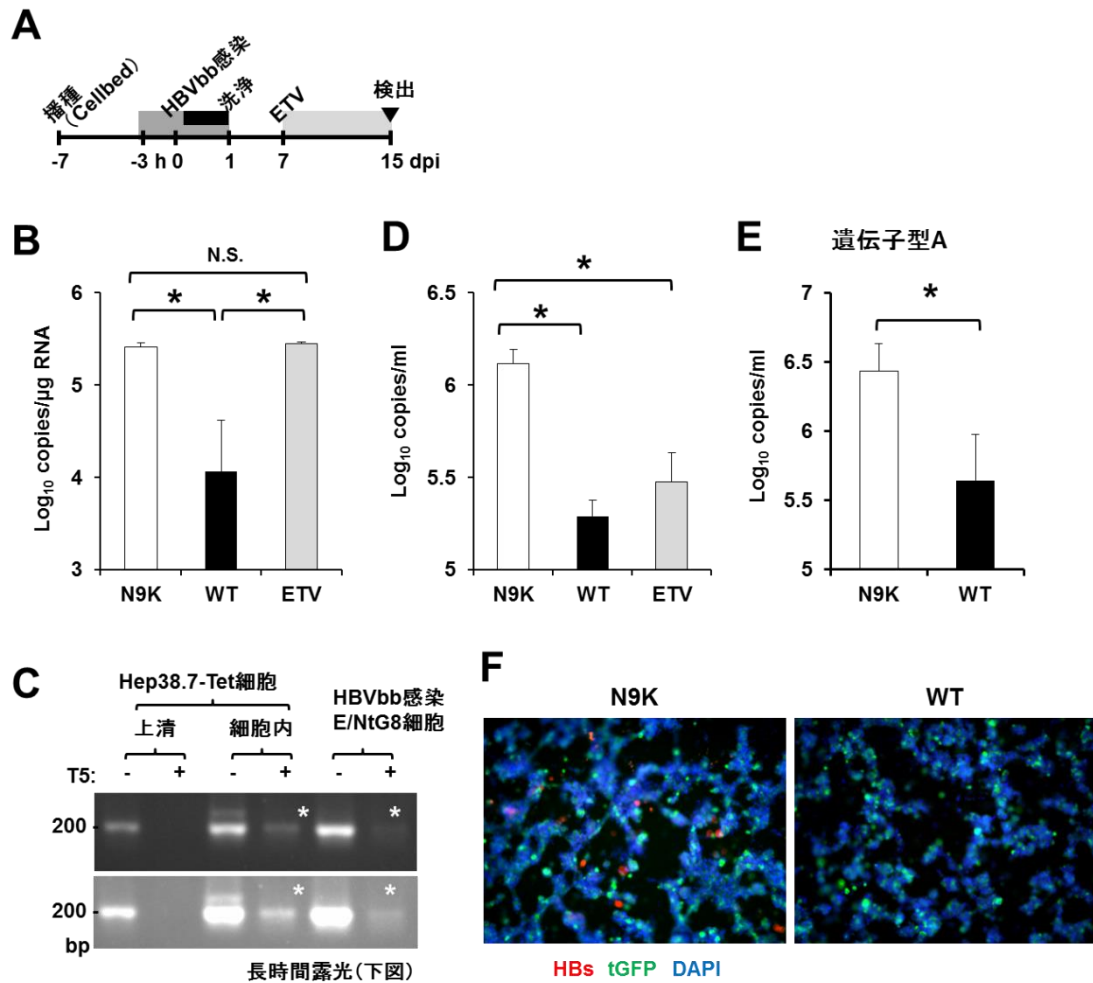


図 9. 立体培養 E/NtG8 細胞への HBVbb 感染実験

A) 感染実験スケジュールを示す。E/NtG8 細胞を Cellbed 上で培養し、1 週間後に、HBVbb を 5 GEq/cell で感染させた。HBVbb を感染させた期間は黒色のボックスで示した。HBVbb 感染を評価するための薬剤処理期間は灰色のボックスで示し、PreS1 ペプチド処理期間は濃い灰色、ETV 処理期間は薄い灰色で示した。HBVbb 感染後、これらの細胞を 2 週間培養し、サンプルの回収・検出を行った。図中 A、B、C、D、F は遺伝子型 C の HBVbb を、E のみ遺伝子型 A の HBVbb を用いた感染実験の結果である。B) HBVbb 感染後、15 日目の立体培養 E/NtG8 細胞における HBV pgRNA を qRT-PCR により定量した。縦軸は全 RNA サンプル 1 μg 中の HBV pgRNA のコピー数を示す。1 μM PreS1 ペプチド myr-47WT (WT) 処理した細胞は黒色バー、myr-47N9K (N9K) で処理した細胞は白色バー、3.75 nM エンテカビル (ETV) を処

理した細胞は灰色バーで示した。C) Nested-PCR 法を用いた HBV cccDNA の検出を行った。HBVbb 感染 15 日目の E/NtG8 細胞内全 DNA サンプルを回収し、T5 エキソヌクレアーゼ処理を行った。同時に、テトラサイクリン除去培養後の Hep38.7-Tet 細胞由来のサンプルを用意し、HBV cccDNA を含まない培養液中 HBV DNA サンプルをネガティブ・コントロール、HBV cccDNA を含む細胞内 DNA サンプルをポジティブ・コントロールとして用いた。図 8C 下のパネルは、上のパネルの長時間露光で撮影したものである。図中*は目的の HBV cccDNA のバンドを示す。D) E) HBVbb 感染させた立体培養 E/NtG8 細胞の培養液は、実験期間中 2 日毎に回収し、感染 15 日目における培養液中 HBVDNA を qPCR により定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示し、横軸はそれぞれ薬剤処理を示す。(D) は遺伝子型 C、(E) は遺伝子型 A の HBVbb の感染実験の結果である。有意水準：* $p < 0.05$ 。N.S. は「有意差なし」を示す。F) 感染 15 日目における HBVbb 感染 E/NtG8 細胞を、抗 HBs 抗体を用いた間接蛍光免疫染色法により検出した。図 8F の左パネルは、myr-47N9K (N9K) 処理した細胞を、右パネルは myr-47WT (WT) 処理した細胞を示す。重ね合わせ像で、HBs は赤色、NTCP-tGFP は緑色、DAPI で染色された核は青色で示す。

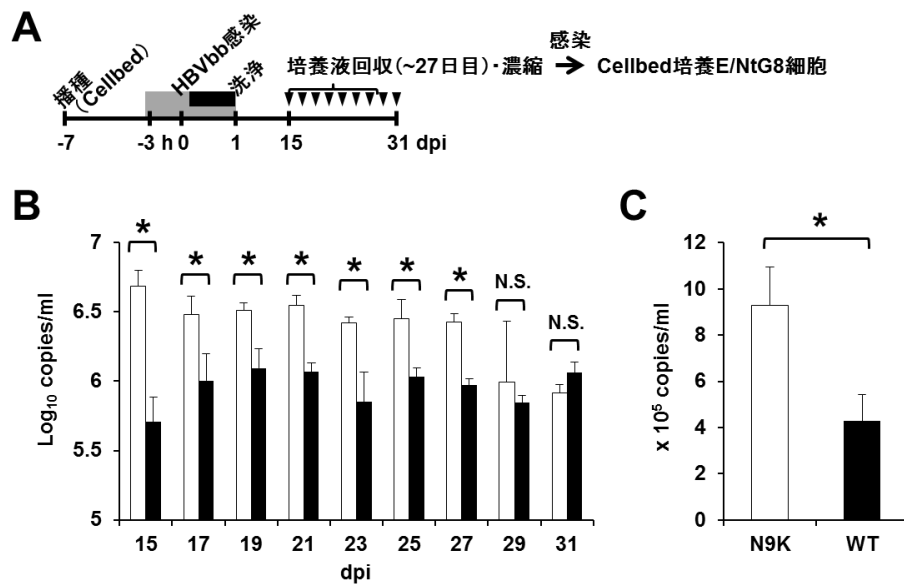


図 10. 立体培養 E/NtG8 細胞の長期 HBVbb 感染実験と、この期間に産生された HBV 粒子の感染性の解析

A) 感染実験スケジュールを示す。E/NtG8 細胞を Cellbed 上で培養し、1 週間後に、HBVbb を 5 GEq/cell で感染させた。HBVbb を感染させた期間は黒色のボックスで示し、PreS1 ペプチドの処理時間は灰色のボックスで示した。HBVbb 感染後、これらの細胞を 1 ヶ月間培養し、サンプルの回収・検出を行った。B) HBVbb 感染させた立体培養 E/NtG8 細胞の培養液は 2 日毎に回収し、培養液中 HBVDNA を qPCR により定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示す。PreS1 ペプチド myr-47WT (WT) 処理した細胞は黒色バー、myr-47N9K (N9K) で処理した細胞は白色バーで示した。C) 有意差の見られた 27 日目まで myr-47N9K (N9K) 処理細胞由来の培養液を集め、これを濃縮して感染源とし、これを 5 GEq/cell で立体培養 E/NtG8 細胞に感染させた。感染 15 日目における培養液中 HBVDNA を qPCR により定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示す。PreS1 ペプチド myr-47WT (WT) 処理した細胞は黒色バー、myr-47N9K (N9K) で処理した細胞は白色バーで示した。有意水準：* p < 0.05。N.S.は「有意差なし」を示す。

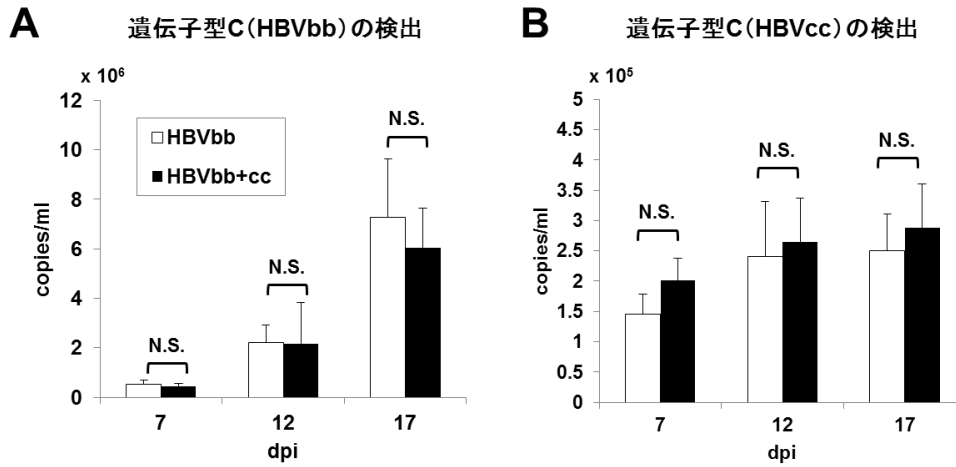


図 11. 感染上清中に含まれると推定された HBV 感染促進因子、もしくは感染阻害因子の解析

PXB 細胞に対し、HBVbb を 5 GEq/cell、HBVcc を 8000 GEq/cell となるように調製した感染源を混合し、2 日間の感染の後、培養液を 5 日毎に回収し、それぞれの遺伝子型に特異的な領域を区別して検出する qPCR により、培養液中 HBV DNA を定量した。縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示す。(A) は、HBVbb に由来する遺伝子型 C の HBV DNA の定量結果を、(B) は HBVcc に由来する遺伝子型 D の HBV DNA の定量結果を示す。白色バーは HBV 感染実験の結果を図 7 から引用し、黒色バーは混合した HBV 感染上清 (HBVbb+cc) を用いた感染実験の結果を示す。有意水準：* $p < 0.05$ 。 N.S. は「有意差なし」を示す。

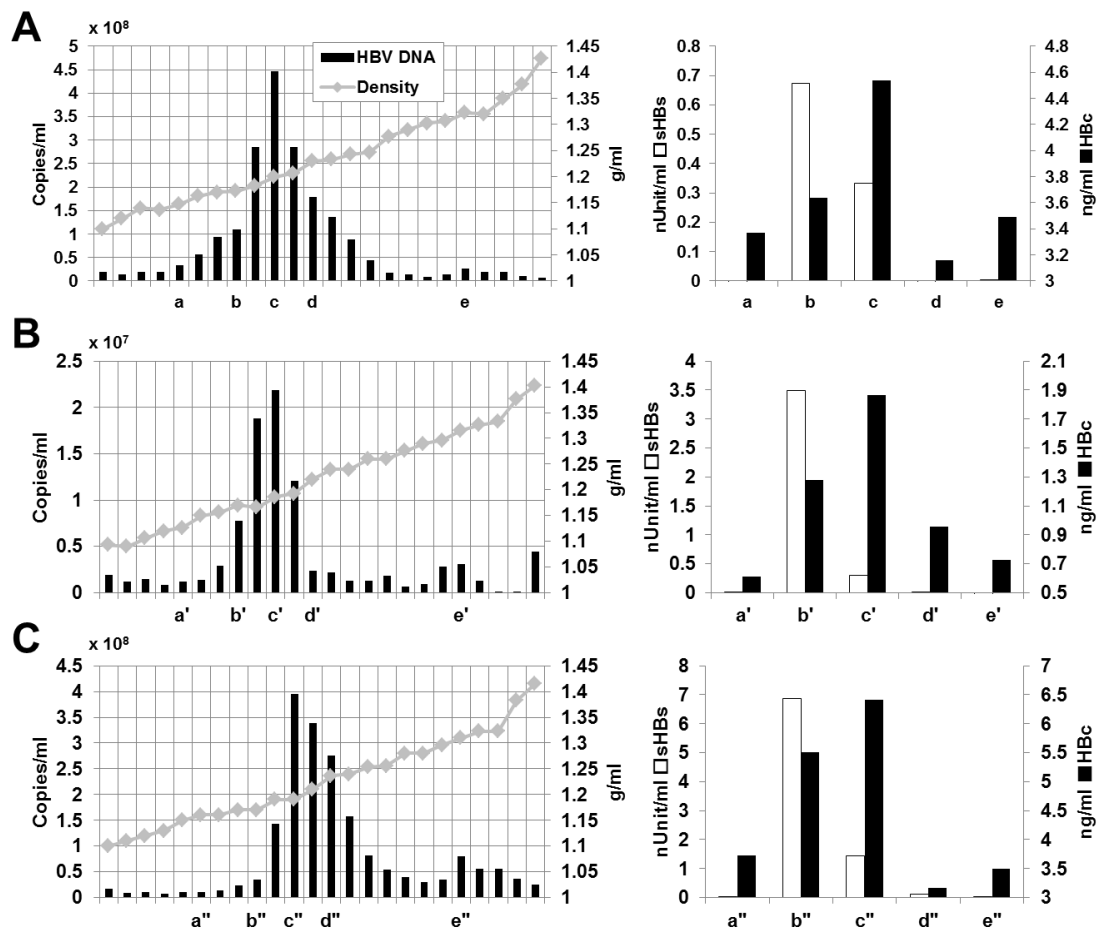


図 12. 塩化セシウム (CsCl) 密度勾配遠心法による HBV 粒子の解析

CsCl 密度勾配超遠心法により、(A) 立体培養 E/NtG8 細胞由来 HBV (B) HBVbb (C) および HBVcc を分画した。右パネルでは、各フラクションにおける、HBV DNA 量を黒色のバー、浮遊密度 (g/ml) を灰色の点で示した。右縦軸は培養液 1 ml 中の MNase 耐性 HBV DNA のコピー数を示し、左横軸は各フラクションの密度を示す。左パネルでは、フラクションの中から小文字が付いた特徴的なフラクションを選択し、ELISA による SHBs、HBc の検出を行った。縦軸は検量線から定量した、それぞれのタンパク質量 (nUnit/ml または ng/ml) を示す。白色バーは SHBs、黒色バーは HBc を示す。

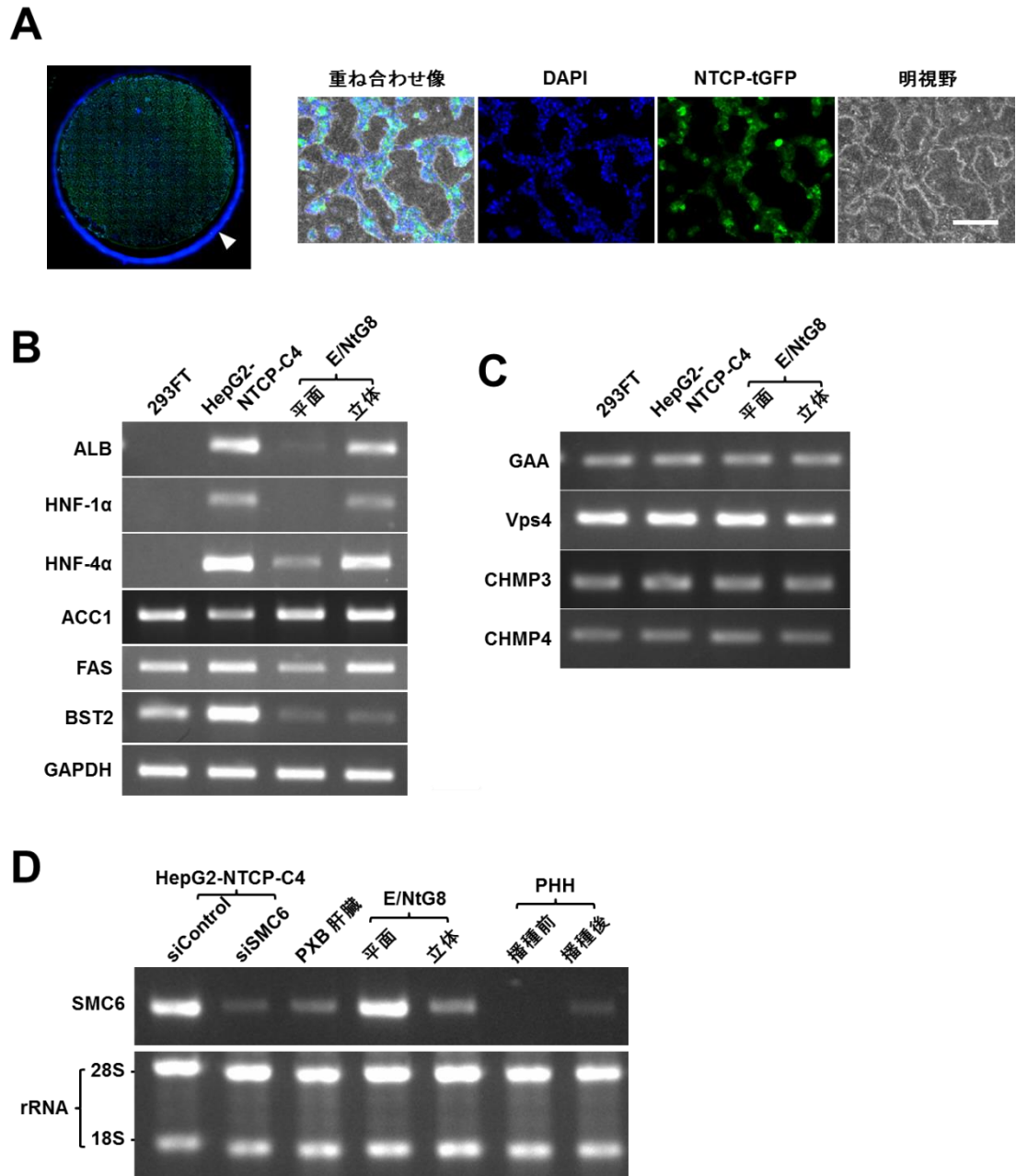


図 13. 立体培養 E/NtG8 細胞における HBV 生活環に関与する遺伝子の解析

A) Cellbed 上で 1 週間培養した E/NtG8 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。右端のパネルは直径約 13 mm の Cellbed に播種された E/NtG8 細胞を示す。白色の矢印は、ウェルの端にある非特異的なシグナルを示す。左の 4 つのパネルは高倍率画像である。NTCP-tGFP および DAPI で染色された核は、それぞれ緑色および青色で示した。白いスケールバーは 200 μm を示す。B) RT-PCR により、293FT 細胞、HepG2-NTCP-C4

細胞、平面および立体培養 E/NtG8 細胞における ALB、HNF-1 α 、HNF-4 α 、ACC1、FAS、および BST-2 の発現解析を行った。200 ng の RNA サンプルに含まれる GAPDH を内部標準として用いて、各遺伝子の発現量を相対的に評価した。C) 図 13B と同じ RNA サンプルを用いて、GAA、Vsp4、CHMP3、CHMP4 の発現解析を行った。D) RT-PCR により、siControl または siSMC6 をトランスフェクションした HepG2-hNTCP-C4 細胞、PXB マウス肝臓、平面および立体培養 E/NtG8 細胞、凍結保存されたヒト肝細胞 (PHH) および播種から 48 時間後の PHH における SMC6 の発現を解析した。1 μ g の全細胞内 RNA サンプルに含まれる 28S および 18S rRNA 量を、各サンプルの RNA 量の内部標準および品質管理の指標として使用した。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始一貫して丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 土方誠先生に心より感謝申し上げます。

また、根拠論文の共著者としてご協力いただきました、University of Bonn 加藤博己先生、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 藤田尚志先生、山梨大学大学院 森石恆司先生、熊本大学大学院 田中靖人先生、国立感染症研究所 渡土幸一先生、広島大学大学院茶山一彰先生、今村道雄先生、国立感染症研究所 脇田隆字先生に深く感謝申し上げます。

最後に、私の研究生活を応援してくれた家族に心から感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuichi Akahori, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kohji Moriishi, Yasuhito Tanaka, Koichi Watashi, Michio Imamura, Kazuaki Chayama, Takaji Wakita & Makoto Hijikata

Establishment of a novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes

Scientific Reports. 2020 Dec 10;10(1):21718.

doi: 10.1038/s41598-020-78655-x.