

培養細胞における B 型肝炎ウイルス感染動態の定量化

Quantification of Hepatitis B Virus infection dynamics in cell culture model

柿添 友輔¹, 岩本将士², 中岡 慎治³, 渡士幸一², 岩見 真吾^{3,4}

Yusuke Kakizoe¹, Masashi Iwamoto², Shinji Nakaoka³,

Koichi Watashi², Shingo Iwami^{3,4}

九州大学システム生命科学府¹, 国立感染症研究所²

科学技術振興機構 さきがけ³

九州大学理学大学院理学研究院⁴

Systems Life Sciences, Graduate School of Kyushu University¹,

National Institute of Infectious Diseases²,

JST PRESTO sakigake³,

Department of Biology, Kyushu University⁴

1.はじめに

B 型肝炎ウイルス (HBV) 粒子は標的である肝細胞に侵入した後、粒子内の不完全二重鎖 DNA が核に移行する。核移行後、不完全二重鎖が修復され閉環状二重鎖 (cccDNA) となる。そして、形成された cccDNA を鋳型としてウイルス複製を行い HBV DNA を産生する。産生された HBV DNA はほとんどが子孫ウイルス粒子の生成に利用されるが、一部の HBV DNA は cccDNA の生成にリサイクルされている。この様なウイルス複製過程の中で、cccDNA は非常に安定しており感染細胞内に長期間残存して、ウイルス複製を持続的に行なっていると考えられている¹。そのため、HBV を生体内から根絶するためには、cccDNA を感染細胞内から除去する必要がある。そこで本研究では、数理モデルとウイルス感染実験データを用いる事で、HBV 感染細胞内のウイルス複製動態の定量化、特に cccDNA 複製動態の定量化を試みた。具体的には、cccDNA の時間推移を効率的に測定できる細胞 (Hep38.7-Tet 細胞) を開発し、cccDNA 量及び感染細胞内 HBV DNA 量の時間推移を測定した。そして、取得した時系列データを数理モデルと組み合わせる事で HBV 複製動態や、cccDNA の複製動態において重要な指標である cccDNA のリサイクル率や半減期を推定した。

2.ウイルス感染実験

本章では、ウイルス感染実験の概要に関して説明する。本実験は、共同研究者である国立感染症研究所の岩本将士氏と、渡士幸一主任研究官によって行われた。まず、ヒト肝臓がん由来細胞株 HepAD38 細胞を改良し、cccDNA を効率よく発現する細胞株 Hep38.7-Tet 細胞を作成した²。これは、前述の HepAD38 細胞核内に HBV のゲ

ノムを組み込む事で発現効率の上昇を達成している。また、本細胞株は、テトラサイクリンを投与する事で核内に組み込まれた HBV ゲノムの転写を停止する事ができ、条件に合わせて制御できるような細胞株となっている。実験ではこのような細胞株を用いて、細胞内での HBV DNA 量と細胞内の cccDNA 量を経時的に測定した。また本研究ではコントロール群に加えて、核酸アナログであるエンテカビルを時刻（0日目、30日目）に投与した条件と、テトラサイクリンを時刻（9日目、30日目）に投与した条件下で同様に細胞内での HBV DNA 量と細胞内の cccDNA 量を経時的に測定し、全部で5種の異なる条件に対して行なった（図1）。

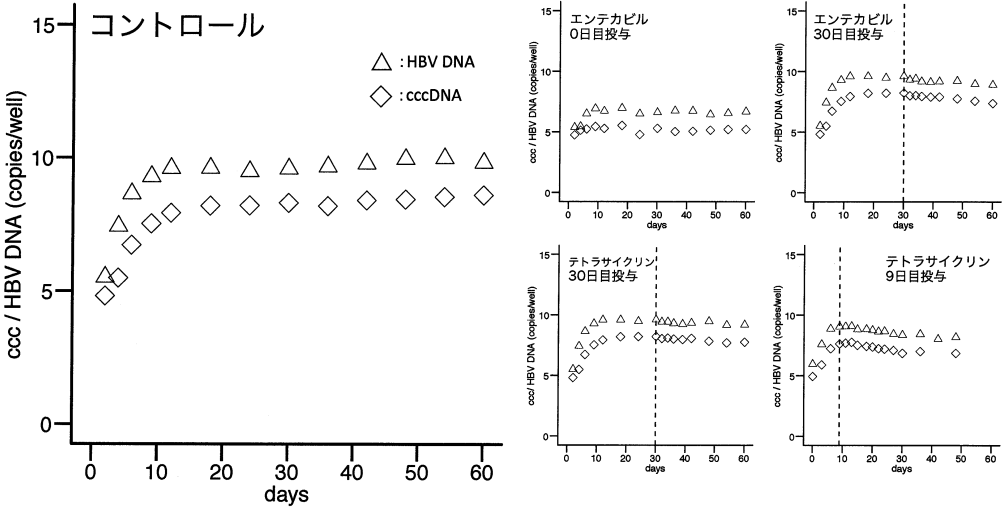


図1. Hep38.7-Tet を用いたウイルス感染実験
Hep38.7-Tet 系を用いてウイルス感染実験を実施し、細胞内の cccDNA 量（◇）及び HBV DNA 量（Δ）の時間変化を測定した。またエンテカビルや、テトラサイクリンを加え投与時間を変える事で、合計5種の異なる条件下でウイルス感染実験を行なった。

3.Hep38.7-Tet 系における数理モデル

本章では、Hep38.7-Tet 細胞を用いた実験系の HBV 感染動態を捉える数理モデルの構築に関して説明する。測定した cccDNA 量と細胞内の HBV DNA 量をそれぞれ $C(t), D(t)$ とすると、ウイルス感染実験を捉える数理モデルは以下の様になる：

$$C'(t) = f\rho D(t) - dC(t), \tag{1}$$

$$D'(t) = \lambda(1 - e^{-rt}) + \alpha C(t) - \rho D(t).$$

式 (1) において f, ρ, d, α はそれぞれ、生成された HBV DNA が cccDNA の生成にリ

サイクルされる割合、HBV DNA の細胞質中輸送速度、cccDNA の減少速度、1 cccDNA あたりの HBV DNA 産生速度を表している。また、 λ, r はそれぞれ、組み込まれた HBV ゲノムの転写速度、転写の時間遅れの効果を表している。以上の様にしてコントロール条件における数理モデルの開発を行った。ここでエンテカビルは、HBV DNA の産生を阻害するため、エンテカビル投与時の数理モデルは以下の様になる：

$$\begin{aligned} C'(t) &= f\rho D(t) - dC(t), \\ D'(t) &= (1 - \epsilon)\{\lambda(1 - e^{-rt}) + \alpha C(t)\} - \rho D(t). \end{aligned} \quad (2)$$

式 (2) において、 ϵ はエンテカビルによる HBV 複製の阻害効率を表している。また、テトラサイクリン投与時では、組み込まれた HBV ゲノムからの転写は阻害されるため、数理モデルは以下の様になる：

$$\begin{aligned} C'(t) &= f\rho D(t) - dC(t), \\ D'(t) &= \alpha C(t) - \rho D(t). \end{aligned} \quad (3)$$

以上の様にして、全ての実験条件における数理モデルの開発を行なった。以降の実験データの解析にはこれらの式 (1) ～ (3) を用いて行った。

4. ウイルス感染実験データの解析

本章では、ウイルス感染実験と数理モデルを組み合わせた解析に関して説明する。実験データを解析するために、測定された実験値と数理モデルによる予測値の差の二乗の対数を考え、以下の様に目的関数を定めた：

$$\begin{aligned} SSR(\theta) &= \sum_t \log(C_1(t) - C_1^*(t))^2 + \sum_t \log(D_1(t) - D_1^*(t))^2 \\ &\quad + \sum_t \log(C_2(t) - C_2^*(t))^2 + \sum_t \log(D_2(t) - D_2^*(t))^2 \\ &\quad + \sum_t \log(C_3(t) - C_3^*(t))^2 + \sum_t \log(D_3(t) - D_3^*(t))^2 \\ &\quad + \sum_t \log(C_4(t) - C_4^*(t))^2 + \sum_t \log(D_4(t) - D_4^*(t))^2 \\ &\quad + \sum_t \log(C_5(t) - C_5^*(t))^2 + \sum_t \log(D_5(t) - D_5^*(t))^2. \end{aligned} \quad (4)$$

ここで $C_i(t), D_i(t) (i = 1 \sim 5)$ は、それぞれ時刻 t における細胞内の cccDNA 量、細胞

内の HBV DNA 量の実測値を表しており、 $C_i^*(t), D_i^*(t) (i = 1 \sim 5)$ はそれぞれ時刻 t における cccDNA 量、細胞内の HBV DNA 量の理論値（数理モデルより計算された値）を表している。また i はそれぞれの実験条件を表しており、 $i = 1$ はコントロール条件による実験、 $i = 2$ は時刻 0 日目にエンテカビルを投与した条件による実験、 $i = 3$ は時刻 30 日目にエンテカビルを投与した条件による実験、 $i = 4$ は時刻 30 日目にテトラサイクリンを投与した条件による実験、 $i = 5$ は時刻 9 日目にテトラサイクリンを投与した条件による実験である。式（4）を最小化する事で、パラメータ $\theta = (f, \rho, d, \alpha, \lambda, r, \epsilon)$ の推定を行なった（表 1）。また、式（4）を用いてマルコフ連鎖モンテカルロ法を実施し、パラメータ $\theta = (f, \rho, d, \alpha, \lambda, r, \epsilon)$ の分布を推定した。以上の様に推定したパラメータ群を用いて式（1）～（3）についてシミュレーションを実行した。図 2 では、ウイルス感染実験での測定値とシミュレーションにより求められた 95% 信用区間をプロットしている（図 2）。図 2 より、数理モデルはウイルス感染実験をうまく再現できている事が分かる。

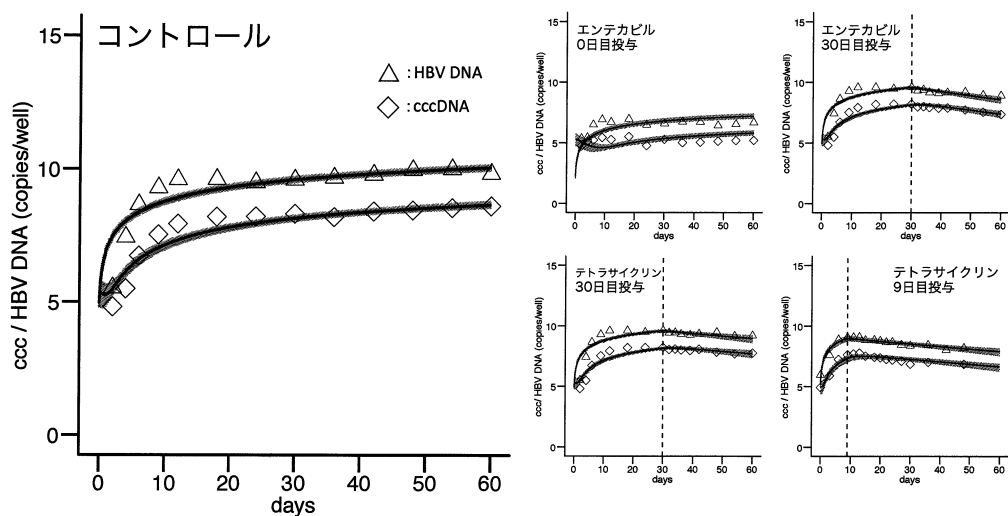


図 2. 数理モデルによるウイルス感染実験データの解析

式（1）～（3）を用いて 5 つの異なる条件下でのウイルス感染実験データを同時にフィッティングした。また MCMC によって推定されたパラメータの分布を用いて、cccDNA 量および HBV DNA 量の時間変化の 95% 信用区間を計算し、プロットした。図 2 より、精度良くフィッティングできている事がわかる。

パラメータ	単位	推定された値
α (HBV DNA の産生速度)	day ⁻¹	0.882
ρ (HBV DNA の細胞質中輸送速度)	day ⁻¹	0.099
f (HBV DNA のリサイクル率)	---	0.088
d (HBV DNA の減少速度)	day ⁻¹	0.193
ϵ (エンテカビルによる阻害効率)	---	0.998

表 1. 式 (4) を最小化するパラメータ

5.生物学的解釈

本章では 4 章で推定したパラメータ群を用いて、生物学的に重要な指標について考察していく。まず逆転写酵素阻害薬であるエンテカビルに関して、 $\epsilon = 0.99$ と推定されておりほとんど全ての逆転写を阻害している事が分かる。これは、既存のエンテカビルが非常に効果的である事を示唆している。また $f = 0.088$ と推定され、これは生成された HBV DNA の内 8 %が cccDNA の生成に再利用されている。そして、cccDNA の減少速度は $d = 0.193$ と推定されており、ここから cccDNA の半減期はおよそ 3.6 日である事が推定される。これは臨床的治験で考えられている cccDNA の半減期に比べてとても短いため、Hep38.7-Tet 系では cccDNA の自律的な複製ができていない可能性が示唆された。

6.まとめと今後の展望

本研究では細胞内の HBV 複製動態、特に cccDNA の動態を効率的に測定できる実験系 Hep38.7-Tet 系を開発した。また本実験系を解析するための数理モデルを開発し、両者を組み合わせる事で HBV 複製動態に定量的な視点を与えた。解析の結果、cccDNA の半減期はおよそ 3.6 日という推定になった。これは臨床知見より考えられている生体内での cccDNA の半減期（半年から 1 年）と比べて非常に短い。本実験系における cccDNA の半減期が非常に短い原因の 1 つは、Hep-Tet38.7 系が株化（がん化）した細胞系である事が考えられる。がん化した細胞では、通常の細胞と比較して染色体の数や遺伝子発現プロファイルの他、多くの要素が異なるため cccDNA が不安定な状態になっている可能性がある。本件を検証するために、株化していないヒト初代培養肝細胞を用いて HBV 感染実験を行い、比較することは非常に意義がある。また本研究で開発した数理モデルは、このような HBV 複製動態の定量的解析に加えて、cccDNA を減少するために効果的な阻害箇所の探索や、特定の作用機序を持つ化合物

の探索に用いたりする事が期待されており、これらは今後の研究課題である。

7. 引用文献

1. Newbold, JE, Xin, H, Tencza, M & Sherman, G. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *Journal of Virology* (1995).
2. 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 Bioph Res Co* 452, 315-321 (2014).