

B型肝炎ウイルスにおける細胞内ウイルス複製過程の定量的解析

Quantifying the intracellular dynamics of hepatitis B virus

柿添 友輔¹, 岩本将士², 九十田千子², Miles P Davenport³,

渡士幸一², 岩見 真吾⁴

Yusuke Kakizoe¹, Masashi Iwamoto², Senko Tsukuda²,

Miles P Davenport, Koichi Watashi³, Shingo Iwami⁴

九州大学システム生命科学府¹, 国立感染症研究所²

ニューサウスウェルズ大学カービー研究所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,

Kirby Institute, University of New South Wales³,

Department of Biology, Kyushu University⁴

1.はじめに

B型肝炎ウイルス（HBV）は全世界で2億4千万人以上もの人が慢性感染しているウイルスで、肝硬変や肝がんなどを引き起こす危険性のため世界規模での公衆衛生における問題である^{1,2}。HBVに対する予防ワクチンは開発されているが、発展途上国では普及率が低い。また現在まで2種類の抗ウイルス薬が認可されており、これらの薬剤を使用することで血中のウイルス量を減少させられるが、使用を中断するとウイルス量は再度上昇し、ウイルス排除達成可能な薬剤ではない。ウイルス排除が達成困難なのは、感染細胞内に長期間残存しているウイルス DNA である閉環状二重鎖（cccDNA）であると考えられている。cccDNAは種々のHBVmRNAの鋳型であり、HBVウイルス複製において必要不可欠である。ここで、cccDNAは感染細胞核内で安定して存在し、ウイルス複製過程において新たに產生されてHBV DNAがcccDNAの生成へとリサイクルされていることが、これまでの先行研究より明らかになっている³。しかしながら、cccDNAがどのようなメカニズムで、またどれほどの期間cccDNAが安定化しているかといった定量的な議論はこれまでほとんど行われてきていない。

そこで本研究では、ウイルス感染実験と数理モデルを用いることでHBVの細胞内ウイルス複製過程を定量的に明らかにし、上記のような問題について取り組むことにした。具体的には、*in vitro*の実験系の中で最も生理条件に近いと考えられている初代培養の肝細胞（PHH）を使用してウイルス感染実験をおこない、細胞内cccDNA量、HBV DNA量や細胞外HBV DNA量の経時データを取得した。このような経時

データを捉えるような数理モデルを開発・解析することによって HBV 複製過程において重要である cccDNA のリサイクリング率や半減期を推定した。そして、細胞内で cccDNA が長期間安定化している原因を調査した。

2.初代培養肝細胞を用いたウイルス感染実験

本章では、初代培養肝細胞（PHH）を用いた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博士、九十田千子博士、渡士幸一主任研究官によって行われた。まず、用意した PHH に対して非常に高濃度の HBV を接種する。この様にする事でウイルス接種時に全ての細胞を感染させ二次感染の生じないシングルサイクルによるウイルス感染実験を達成する。ここで、細胞数の変化やウイルス感染による細胞の死亡は発生していないことを確認している。ウイルス接種 1 日後より決められた日時で細胞内の cccDNA 量、HBV DNA 量、細胞外の HBV DNA 量を測定した。この様な要領で、コントロールによる条件下と抗 HBV 薬であるエンテカビル（ETV）を時刻（0 日目と 9 日目）に投与した条件下で実験を実施した（図 1）。図 1 は各々の条件で 3 回繰り返したものに対する平均値の時系列データを示している。

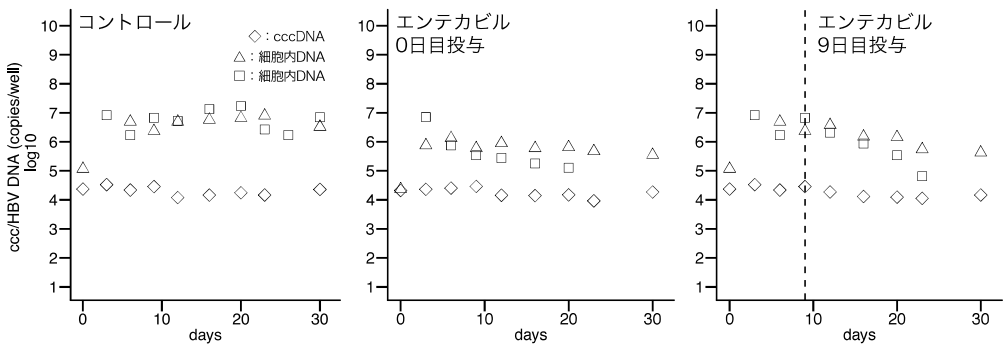


図 1. PHH を用いたウイルス感染実験
初代培養肝細胞（PHH）を用いてウイルス感染実験を実施し、細胞内の cccDNA 量（◇）及び HBV DNA 量（△）、細胞外 HBV DNA 量（□）の時間変化を測定した。またエンテカビル加え投与時間を変える事で、合計 3 種の異なる条件下でウイルス感染実験を行なった。

3.初代培養肝細胞系における細胞内ウイルス複製の数理モデル

本章では、PHH 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 $C(t), D(t), E(t)$ 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：

$$\begin{aligned}\frac{dC(t)}{dt} &= f\rho D(t) - dC(t), \\ \frac{dD(t)}{dt} &= \alpha C(t) - \rho D(t),\end{aligned}\tag{1}$$

$$\frac{dE(t)}{dt} = (1 - f)\rho D(t) - d_E E(t).$$

式 (1) において f, ρ, d, α, d_E 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 の減少速度、cccDNA の減少速度、1 cccDNA あたりの HBV DNA 産生速度を表している、細胞外 HBV DNA の減少速度を表している。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：

$$\begin{aligned}\frac{dC(t)}{dt} &= f\rho D(t) - dC(t), \\ \frac{dD(t)}{dt} &= (1 - \epsilon)\alpha C(t) - \rho D(t),\end{aligned}\tag{2}$$

$$\frac{dE(t)}{dt} = (1 - f)\rho D(t) - d_E E(t).$$

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)、(2) 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：

$$\begin{aligned}
SSR(\theta) = & \sum_t \log(C_1(t) - C_1^*(t))^2 + \sum_t \log(D_1(t) - D_1^*(t))^2 \\
& + \sum_t \log(E_1(t) - E_1^*(t))^2 + \sum_t \log(C_2(t) - C_2^*(t))^2 \\
& + \sum_t \log(D_2(t) - D_2^*(t))^2 + \sum_t \log(E_2(t) - E_2^*(t))^2 \quad (3) \\
& + \sum_t \log(C_3(t) - C_3^*(t))^2 + \sum_t \log(D_3(t) - D_3^*(t))^2 \\
& + \sum_t \log(E_3(t) - E_3^*(t))^2.
\end{aligned}$$

ここで $C_i(t), D_i(t), E(t) (i = 1 \sim 3)$ は、それぞれの測定時刻 t における細胞内の cccDNA 量、HBV DNA 量、細胞外の HBV DNA 量の実測値を表しており、 $C_i^*(t), D_i^*(t), E^*(t) (i = 1 \sim 3)$ はそれぞれの測定時刻 t における細胞内の cccDNA 量、HBV DNA 量、細胞外の 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9日目にエンテカビルを投与した条件による実験である。式（3）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（3）を用いて非線形最小二乗法を用いてパラメータ $\theta = (f, \rho, d, \alpha, \lambda, r, \epsilon)$ 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）、（2）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理論値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。

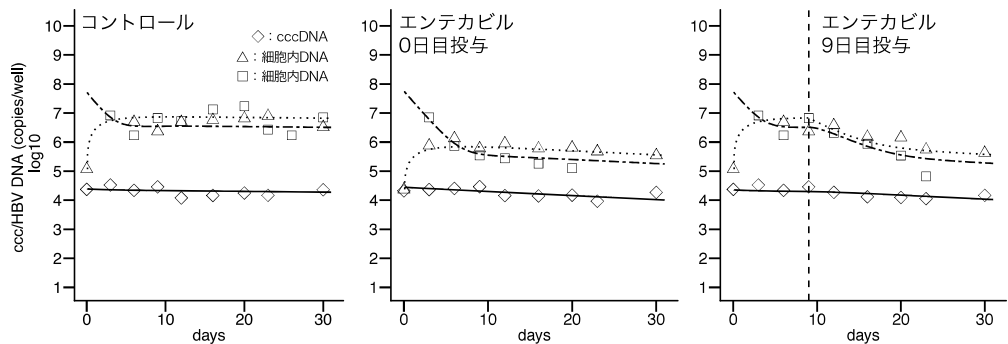


図 2. 数理モデルによるウイルス感染実験データの解析
式（１）－（２）を用いて 3 つの異なる条件下でのウイルス感染実験データを同時にフィッティングした. 図 2 より、精度良くフィッティングできている事がわかる。

パラメータ	単位	推定された値
α (HBV DNA の産生速度)	(copies/well) · day ⁻¹	126.5
ρ (細胞内 HBV DNA の減少速度)	(copies/well) · day ⁻¹	0.365
f (HBV DNA のリサイクル率)	---	2.329×10^{-4}
d (ccc DNA の減少速度)	(copies/well) · day ⁻¹	0.035
d_E (細胞外 HBV DNA の減少速度)	(copies/well) · day ⁻¹	0.76
ϵ (エンテカビルによる阻害効率)	---	0.91

表 1. 式（３）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は、 $\epsilon = 0.91$ と推定されており高効率で逆転写を阻害している事が分かる。これは、既存の治療薬であるエンテカビルが非常に効果的にウイルス複製プロセスを阻害していることが分かる。また HBV DNA のリサイクル率は $f = 2.329 \times 10^{-4}$ と推定され、これは生成された HBV DNA の内 0.02%が cccDNA の生成に再利用されているという推定であり、非常に微量の cccDNA がリサイクルしている事によると推定される。本推定結果は、HepG2-NTCP 細胞を用いてウイルス感染実験を行なった先行研究と一致している⁴。そして、cccDNA の減少速度は $d = 0.035$ と推定されており、ここから cccDNA の半減期はおおよそ 20 日である事が推定される。本結果より、cccDNA が感染細胞内で長期間残存するメカニズムは、cccDNA が非常に長い半減期を持つ事と、非常に微量の

cccDNA リサイクルにより成り立つことが示唆された。

6.まとめと今後の展望

本研究ではウイルス感染実験と数理モデルを組み合わせることで、細胞内の HBV 複製動態、特に cccDNA の動態を定量的に明らかにしようとした。数理モデルを用いた解析の結果、cccDNA の安定化要因は、cccDNA それ自身が非常に長い半減期を持つ事と、非常に微量の cccDNA リサイクルにより成り立つことが示唆された。今後は、生体内 (*in vivo*) での条件下における HBV 感染実験を実施し、*in vitro* 系による解析結果と比較する必要性が挙げられる。

また本研究で用いた HBV の細胞内ウイルス複製動態を定量的に明らかにする枠組みは、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、今後の研究が期待される。

7. 引用文献

1. Ocamo, P., Opio, C. K. & Lee, W. M. Hepatitis B virus infection: Current status. *Am. J. Med.* **118**, 15–22 (2005).
2. Ott, J. J., Stevens, G. A., Groeger, J. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* **30**, 2212–2219 (2012).
3. Allweiss, L. & Dandri, M. The Role of cccDNA in HBV Maintenance. (2017). doi:10.3390/v9060156
4. Qi, Y. *et al.* DNA Polymerase κ Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. *PLoS Pathog.* **12**, 1–26 (2016).