

3. B型肝炎ウイルス感染培養系の開発

赤堀 祐一, 土方 誠

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 がんウイルス分野

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) は急性肝炎や慢性肝炎, 肝硬変, そして肝がんといった慢性肝疾患の原因ウイルスである。1979年にそのウイルス遺伝子がクローニングされていたが, HBVの感染増殖を分子ウイルス学的解析するために必須である細胞培養系の開発が進んでいなかった。そのためHBV生活環の全容解明とそれを基にした創薬研究の進展が遅れていた。しかしながら, 2012年にHBV感染受容体としてナトリウム-タウロコール酸共役輸送体 (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide; NTCP) が同定された。この分子を安定発現させた肝がん由来細胞株を用いることで, これまで得られなかったHBV生活環の特に感染・侵入のステップを再現することが可能になったため, このステップの分子機構に関する新しい知見や, そのステップを標的とした抗HBV薬候補が次々と得られている。一方, がん細胞を用いたこれらのHBV培養系ではなく, 本来のヒト肝細胞に類似した細胞を用いたHBV培養系を開発して, 生理的なHBVと肝細胞との相互作用を研究する試みも進められている。本稿では, これら研究の進展を概説し, また我々が, NTCPを発現させた不死化肝細胞株を用いて開発した新たなHBV感染細胞培養系について紹介する。

1. はじめに

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) の同定は, 1964年にBaruch Blumbergらがオーストラリア原住民の血清から『オーストラリア抗原』を発見したことに始まる¹⁾。1968年には, 我が国の大河内一雄らによって, オーストラリア抗原と肝炎との関連が報告され²⁾, 輸血用血液中オーストラリア抗原のスクリーニングが行われるようになった。ウイルス粒子本体は, 1970年にDavid Daneらによって電子顕微鏡を用いて発見され, 『Dane粒子』と呼ばれるようになった³⁾。1979年には, Dane粒子に内包されるHBVの全ゲノム配列の決定が, 相次いで報告された^{4,5,6)}。1988年には, 我が国の岡本宏明らによって, これまでに発見されたHBVは8%以上のゲノム配列の違いからA, B,

C, Dの4種類の遺伝子型 (genotype) に分類された⁷⁾。現在では, AからJまでの10種類の遺伝子型 (IはCの亜型) が確認されている⁸⁾。ちなみにこの間の1976年にBaruch Blumbergは, 「感染症の原因と感染拡大についての新しいメカニズムの発見」によりノーベル生理学・医学賞を受賞している。

このように古くから肝炎の原因ウイルスとしてその存在が知られていたウイルスであったが, 分子ウイルス学的解析に必須であるHBVの感染増殖を正確に再現する培養系が存在しなかったため, HBV生活環の全容解明とそれを基にした創薬研究が困難であった。しかしながら, 後述するように, 近年新たなHBV培養系が開発されてきたことによりHBV研究には目覚ましい進展が見られるようになった⁹⁻¹⁶⁾。

本稿では, これまでのHBV感染培養系を概説し, 我々が新たに開発したHBV感染培養系とその特性について紹介する¹⁷⁾。

2. HBVの概要

HBVはヘパドナウイルス科に属するDNAウイルスである。ウイルス本体 (Dane粒子) は, 直径約42 nmの球形で, ゲノムDNAを内包するヌクレオキャプシドとそれを取り囲む外被 (エンベロープ) 構造から成る (図1A)。

連絡先

〒606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町53

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 がんウイルス分野

TEL: 075-751-4046

FAX: 075-751-3998

E-mail: akahori.yuichi.3s@kyoto-u.ac.jp

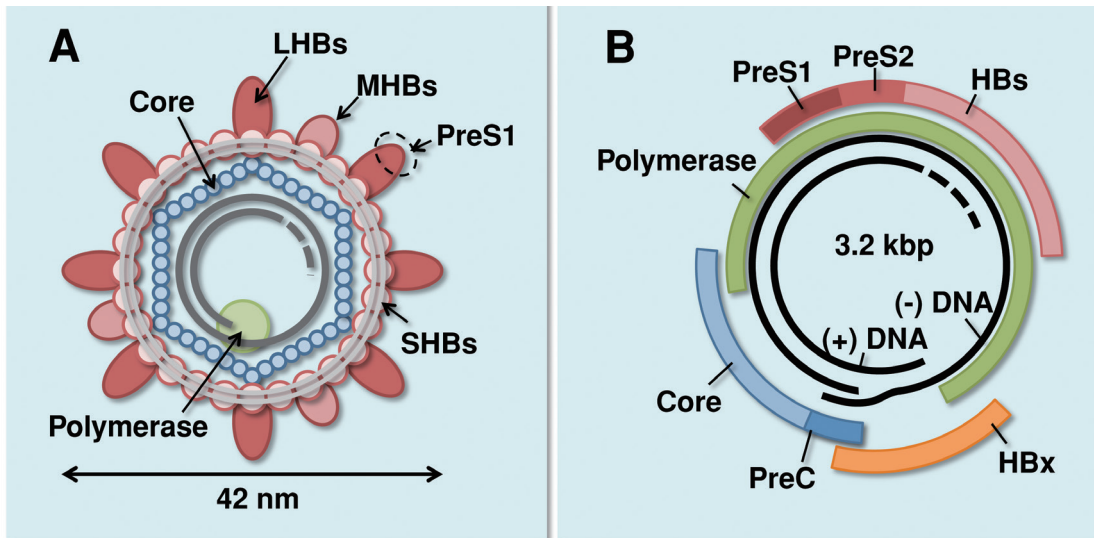


図1 HBV粒子とゲノムの構造

A) 不完全二重鎖のHBVゲノムDNAは、HBV polymeraseと共に、Core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LHBs、MHBs、SHBsの3種類のエンベロープタンパク質に囲まれている。HBVはLHBsのPreS1領域を介し、感染受容体に結合する。B) HBVゲノム上には、互いにoverlapした各HBVタンパク質に対応する4つのOpen reading frame (ORF)が存在する。

このゲノムDNAはその一部が一本鎖となっている約3200塩基長の環状不完全二重鎖DNA (relaxed circular DNA; rcDNA) という特殊な構造をとっている (図1B)。

これまでに明らかになっているHBVの生活環の概要を図2に示した。HBV粒子はまず肝細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan; HSPG) に非特異的に吸着する¹⁸⁾。その後HBV受容体として同定されたナトリウム-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として見出された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)^{10,19)}。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²⁰⁾。核内へと移行したrcDNAの一本鎖部分は、宿主細胞の遺伝子修復酵素の一つflap-endonuclease Iなどが関与するDNA修復機構により修復され^{21,22)}、完全閉環二本鎖DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) と呼ばれる構造を形成する (図2-4)。このHBV cccDNAは非常に安定で、HBV持続感染の基盤となる²³⁾。このHBV cccDNAを鋳型に、宿主細胞のDNA依存性RNAポリメラーゼIIや、hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1) などの肝細胞で特異的に発現する転写因子の働きにより、少なくとも3.5 kb、2.4 kb、2.1 kbそして0.7 kbという長さの4種類のmRNAが転写される²⁴⁾ (図2-5)。3.5 kbのmRNAはゲノムDNA複製のための逆転写反応の鋳型となる複製中間

体としての役割を持つためpregenomic RNA (pgRNA) と呼ばれるが、CoreとHBV polymeraseをコードするmRNAとしても機能する。2.4 kbと2.1 kbのmRNAからは、3種類のエンベロープタンパク質 large HBs (LHBs)、middle HBs (MHBs)、small HBs (SHBs) が翻訳され、0.7 kbのmRNAからはHBxタンパク質が翻訳される (図2-6)。産生されたHBV polymeraseはHBV pgRNAに細胞質内で結合し、Coreから構成されるヌクレオキャプシドに被われる。ヌクレオキャプシド内では、まずHBV polymeraseの逆転写酵素活性によりHBV pgRNAからマイナス鎖DNAが合成される (図2-7)。HBV pgRNAはHBV polymeraseのRNase H活性により分解され、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)。その後、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²⁵⁾。このrcDNAを含む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)、感染性HBV粒子 (Dane粒子) として細胞外に放出される (図2-10)。一方、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・増加に寄与している²⁶⁾。

現在、HBV複製を直接抑制するB型肝炎治療薬として、核酸アナログ製剤『バラクルード錠 (エンテカビル)』などが広く用いられている。エンテカビルは細胞内で活性体であるエンテカビル三リン酸に代謝され、HBV polymeraseのプライミング (HBV polymeraseとプライマーの鋳型となる最初の塩基への結合)、HBV pgRNAからの逆転写、プ

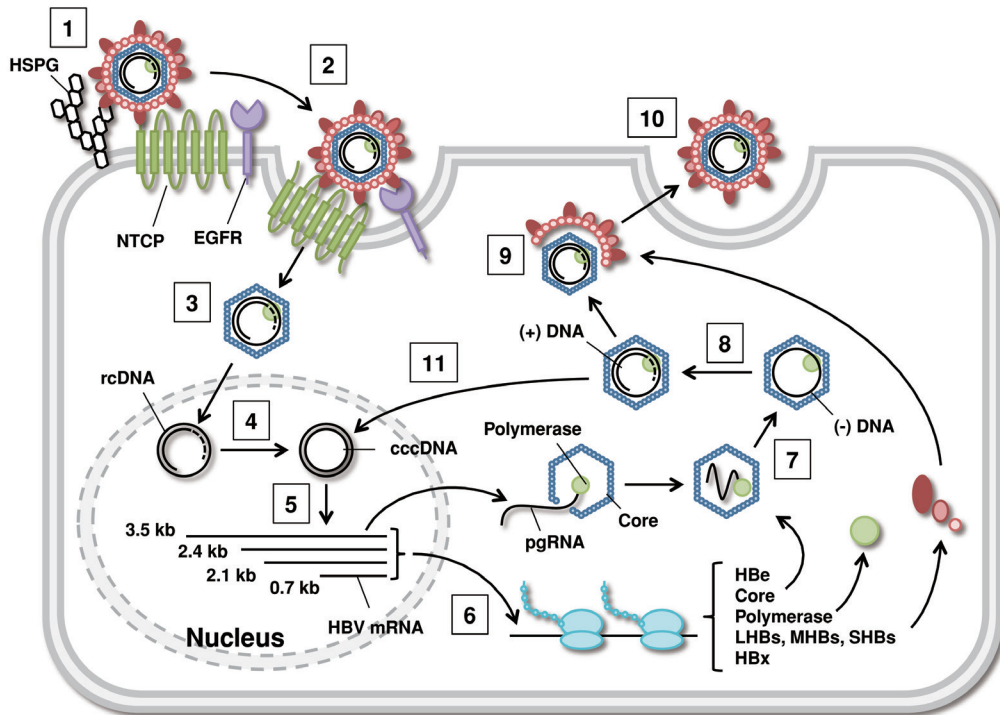


図2 HBV 生活環

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 スクレオキャプシドの核への再移行の各ステップを示した。

ラス鎖 DNA 合成の3つの活性すべてを強力に阻害する^{27,28)}。エンテカピルの副作用はほとんどなく、肝炎の鎮静化に伴って血中 HBV DNA 量は大幅に減少するが、その原理的にも核内 HBV cccDNA 量を減少させることはできず、HBV の再活性化リスクを抱えながら長期の継続投与が必要となる²⁹⁾。これに対し、著効率は低いだが、インターフェロン α (IFN α) 投与の有効例では『drug free』を達成することができる。IFN α は免疫細胞を活性化するだけでなく、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³⁰⁾。IFN α 治療はときに種々の重篤な副作用を伴うが、今後、直接的に核内 HBV cccDNA 量の減少に関連する詳細な分子ウイルス学的解析が進めば、HBV cccDNA の完全排除に向けた新たな創薬への道が拓けることが期待される。

3. HBV 培養系

HBV と宿主細胞との相互作用およびその分子メカニズムを解明するためには、生体内における HBV 生活環を再現することが可能な培養細胞系が必要である。

これまで用いられてきた HBV 感染培養系は、ヒト肝がん由来細胞株と初代培養ヒト肝細胞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、ほとんど HBV 感染を許容しなかった^{9,31)}。しかしながら、1987年に HBV 発現プラスミドを導入した肝がん由来細胞株 HepG2 細胞では HBV 発現プラスミドが HBV cccDNA を模倣するように働き、組換え体 HBV 粒子 (ここでは cell culture HBV; HBVcc と略する) が産生されることが報告された^{32,33)}。また同年には HBV 発現プラスミドを恒常的に導入した HepG2.2.15 細胞株が樹立され³⁴⁾、産生された HBVcc は HBV 感染モデル動物であるチンパンジーに感染し、急性肝炎を引き起こすことが報告された³⁵⁾。1997年には、テトラサイクリン除去により HBV 複製を誘導できる HepAD38 細胞株が樹立された³⁶⁾。テトラサイクリン除去後、HepG2.2.15 細胞株よりも多くの HBV cccDNA の形成が見られたことから、HepAD38 細胞は HBV cccDNA の動態を解析するのに有用であると考えられた³⁷⁾。このように、汎用的な肝がん由来細胞株は HBV 生活環における転写以降から HBV 粒子産生までのステップを再現した。しかしながら、感染・侵入から核内 HBV cccDNA の形成に至るまでのステップは再現することはできなかった。2002年には、分化誘導することにより HBV 感染を許容するようになるヒト肝がん由来細胞株 HepaRG 細胞株が報告されたが³⁸⁾、汎用性や感染効率などといった点から、必ずしも一般的に使用さ

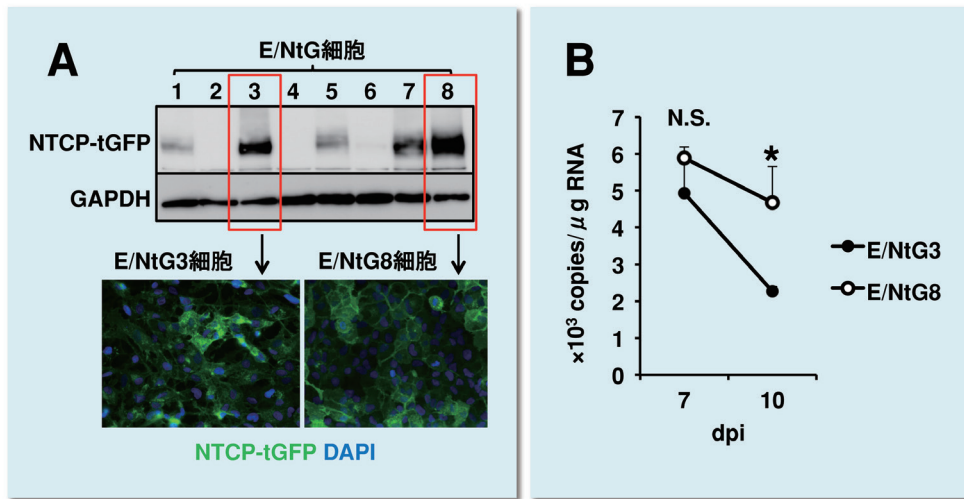


図3 E/NtG8細胞樹立と平面感染実験

A) 上図は抗 tGFP 抗体を用いた western blotting により, 各 E/NtG 細胞クローンにおける NTCP-tGFP の発現を検出した結果を示した. 内在性コントロールには GAPDH を用いた. 下パネルは E/NtG3 細胞と E/NtG8 細胞を蛍光顕微鏡により観察した結果を示した. 緑色は NTCP-tGFP を, 青色は DAPI で染色した核を示した. B) 平面培養 E/NtG3 細胞●と E/NtG8 細胞○に HBVcc を感染させた後, 感染 7 日目と 15 日目における細胞内 HBV pgRNA 量を定量した結果を示した. Student の t 検定で, not significant (N.S.) は有意差なし, * は p 値が 0.05 未満であったことを示した.

れているわけではない.

一方, 初代培養ヒト肝細胞は生体内における HBV の感染標的細胞にもっとも類似していることから, 1988 年の報告以降, これを使用した HBV 感染培養系は, 『gold standard』 であると考えられてきた^{39,40)}. しかしながら, 非常に高価であることや, ロット間の再現性, 遺伝子導入効率, 急速な機能低下により長期培養できないといった問題があり, 現実的にはその汎用性は低いと考えられる. PhoenixBio 社のヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) の肝臓から分離された初代肝細胞 PXB 細胞は, 患者血清由来の HBV を感染させた PXB マウスから得た血清を用いて HBV 感染を行なった場合, 非常に高い感染性を示し, 長期に感染増殖を維持できることが報告されている^{41,42)}. しかしながら, この細胞も非常に高価であり, また分子生物学的解析への対応に困難な点が存在するといった初代培養ヒト肝細胞と同様の問題も残されている. 正常細胞を用いた HBV 感染培養系として, iPS 細胞から分化誘導した肝細胞系譜細胞を用いた HBV 感染培養系の構築が報告された^{43,44)}. しかしながら, iPS 細胞の培養とその分化誘導には, ある程度高度な技術を要することや HBV 生活環をどの程度再現しているのかなど不明な点が残されており, 今後さらなる検討の必要性が考えられる.

この HBV 研究におけるそれまでの最大の問題を解決したのが, 2012 年の Huan Yan らによる HBV 感染受容体『NTCP』の同定である¹⁹⁾. NTCP は, 肝臓の重要な生理機能の一つである胆汁の代謝において, 本来は肝細胞で特

異的に発現し, 血中からのナトリウム依存的な胆汁酸取り込みに関与するトランスポーターである⁴⁵⁾. HBV 感染を許容する初代培養ヒト肝細胞や分化誘導した HepaRG 細胞では高い発現が見られるのに対し, 従来使用されてきた肝がん細胞株ではこれらの発現がほとんど見られなかった^{11,46)}. これが, 肝がん細胞株で感染から核内 HBV cccDNA の形成に至るまでのステップが再現できなかった最大の原因であり, NTCP を強制的に恒常発現させた肝がん細胞株において HBVcc に対し高い感染感受性を示した^{11,19)}. このような細胞株の樹立に加え, HepG2.2.15 細胞株や HepAD38 細胞から HBVcc が安定的に供給されることで, HBV 生活環を再現する安価で効率的な感染実験系が構築された. ただし, これら HepG2.2.15 細胞株や HepAD38 細胞由来の HBVcc はいずれも遺伝子型 D の HBV に相当する. 我が国における主要な HBV の遺伝子型は C であり, 慢性化しやすい欧米型の遺伝子型 A が年々増加傾向にあることから, これらの異なる遺伝子型の HBV に特異的な性質の解析は非常に重要であると考えられる. HBV 発現プラスミドを一過性に導入した細胞からも HBVcc は産生することが可能であるが, その感染性は低いことがわかっている. 一方, 遺伝子型 D 以外の HBV 発現プラスミドの PreS1 領域の 11 アミノ酸を欠損させた結果, これを導入した HepG2 細胞から高い感染性を有する HBVcc の産生が報告された⁴⁷⁾. 今後, この欠失変異が各遺伝子型の HBV の生活環にどのように影響するのかなど詳細な検討が必要になるだろう. 一方, HepG2-NTCP 細胞は血清由来 HBV (blood-borne

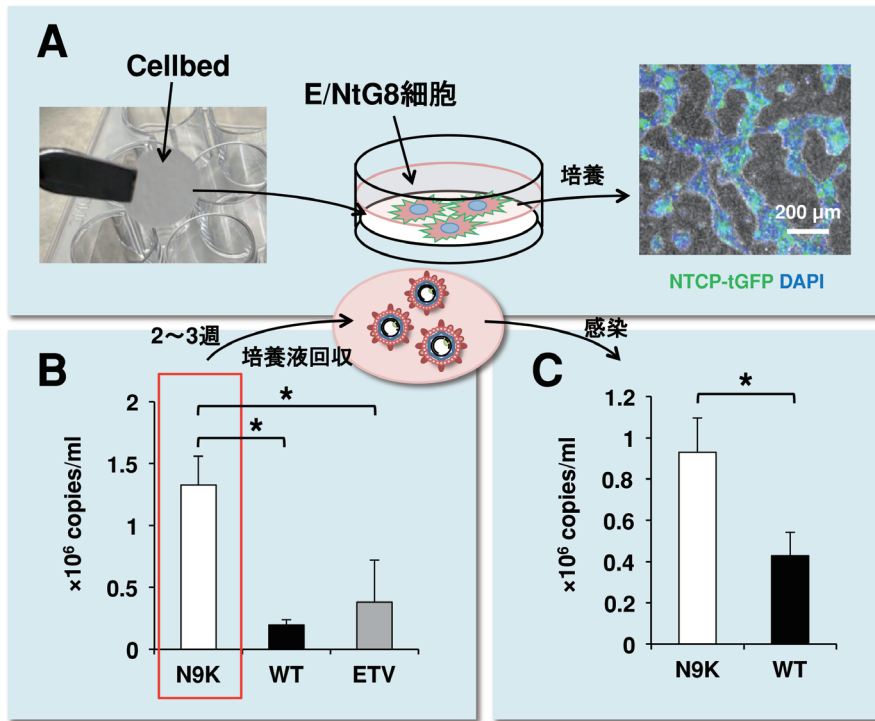


図4 Cellbed 培養法と立体培養 HBVbb 感染系

A) 24-well plate 用 Cellbed を用いた E/NtG8 細胞の立体培養の概略図である。右パネルは一週間培養後の細胞の蛍光顕微鏡写真を示した。緑色は NTCP-tGFP を、青色は DAPI で染色した核を示した。B) 立体培養 E/NtG8 細胞に HBVbb (遺伝子型 C) を感染させ、感染 15 日目における培養液中 HBV DNA 量を定量した結果を示した。この感染実験では、E/NtG8 細胞に対し HBV 感染前と感染時に NTCP 依存的な感染を阻害する PreS1 peptide を添加した。WT (黒色) は感染阻害 peptide を添加、N9K (白色) は感染を阻害しない変異型の peptide を添加した結果を示した。ETV (灰色) は感染後にエンテカビルを処理した結果を示した。C) 実験 B で、感染後 2 週目から 3 週目の間に培養液中に産生された HBV 粒子を回収し、新たな立体培養 E/NtG8 細胞に感染させ、感染 15 日目における培養液中 HBV DNA 量を定量した結果を示した。Student の t 検定で、* は p 値が 0.05 未満であったことを示した。

HBV; HBVbb) に対する感染感受性が非常に低いことがわかっている。2019 年に 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ている⁴⁸⁾。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^{17,42)}。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-NTCP 細胞はヘテロな集団の細胞であり、HBVbb の感染を許容する何らかの因子が存在し、その発現はほとんどの HepG2-NTCP 細胞では失われている可能性を示している。したがって、肝がん由来細胞株と HBVcc を用いた感染培養系は、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た。

4. 不死化ヒト肝細胞を用いた新規 HBV 感染培養系の構築

上記のような問題点を解決する目的で新たな HBV 培養

系の開発を行った¹⁷⁾。この HBV 培養系には非がん細胞由来の不死化肝細胞である HuS-E/2 細胞を用いた。HuS-E/2 細胞は、初代ヒト肝細胞にヒトパピローマウイルス (human papilloma virus; HPV) E6・E7 タンパク質とヒトテロメラーゼ発現プラスミドを導入し、不死化し、樹立した肝細胞株である。この細胞は立体培養することでヒト初代培養肝細胞と類似した遺伝子発現プロフィールを示すようになり、効率は高くないものの患者血清由来 HCV (blood-borne HCV; HCVbb) の感染を許容することがわかった⁴⁹⁾。肝臓は極めて細密で機能的に構成された組織であり、その中で肝細胞は立体的に配置される。したがって、立体培養は肝細胞本来の性質の維持に効果的な培養法であると考えられる⁵⁰⁾。ともに生体内で肝細胞に感染する血清由来の 2 種類の肝炎ウイルス HBV と HCV の感染を許容する細胞に何らかの共通性があるならば、立体培養した不死化ヒト肝細胞は HCVbb だけでなく HBVbb の感染をも許容する可能性が考えられた。

これまでに、樹立されてから継代数の少ない HuS-E/2

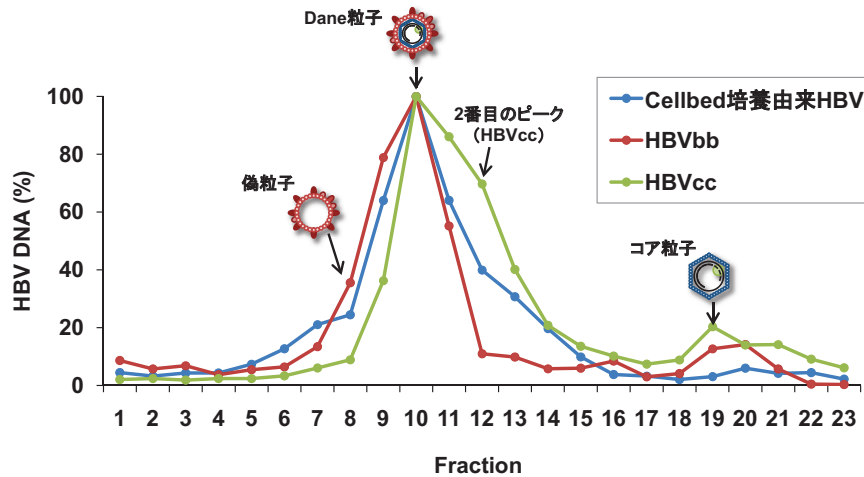


図5 塩化セシウム浮遊密度勾配遠心法によるHBV粒子の性状比較

各フラクションに含まれるHBV DNA量を定量し、最もHBV DNA量が多いフラクションを100%とした相対値で示した。ELISAによるLHBs, SHBs, Coreの定量結果(未掲載)と併せ、各フラクションに含まれるHBV粒子の形状を示した。

細胞を用いてHBVccの感染実験が行われ、この細胞がHBVccの感染を許容することが示された。この研究からHBVの感染がクラスリン(clathrin)依存的なエンドサイトーシスによって行われることが報告された⁵¹⁾。しかしながら、継代培養を繰り返したHuS-E/2細胞はその感受性を失っていることがわかった。これらのHuS-E/2細胞においてNTCP mRNAの発現量を解析した結果、HepG2細胞と同様に、それは非常に低いものであった。立体培養によりNTCP mRNAの発現のわずかな増加が認められたが、HepG2-NTCP細胞における発現と比較してHBV感染を許容できる発現レベルではないと思われる。後述するように実際に有意な感染も観察されなかった。そこで、感染効率を高めるために、HuS-E/2細胞にTurbo Green Fluorescent Protein(tGFP)を融合したNTCP(NTCP-tGFP)発現プラスミド⁵²⁾を導入し、8クローンのNTCP-tGFP恒常発現細胞を樹立し、それぞれをE/NtG1~8細胞と命名した。このうち、E/NtG3細胞とE/NtG8細胞では、その細胞膜上にNTCP-tGFPの高発現が観察された(図3A)。そこで、まずHepG2-NTCP-C4細胞を用いたHBVcc感染実験と同様、平面培養条件下においてE/NtG3細胞とE/NtG8細胞に8000 GEq/cell(GEq/cell;細胞あたり用いるHBVのゲノムコピー数)という条件でHBVccを感染させた。そして、核内HBVcccDNAからの転写産物である細胞内HBVpgRNA量と、培養液中に産生されたHBV粒子を示すnucleaseに抵抗性を示す培養液中HBV DNA量を継時的に定量することにより、その細胞のHBV感染許容性を評価した。その結果、E/NtG3細胞と比較してE/NtG8細胞では、細胞内HBVpgRNAの持続的な発現が認められた(図3B)。このことからE/NtG8細胞はある程度HBV感染を許容する可能性があると考えられ、以降の実験ではE/

NtG8細胞を使用することにした。

先述のように、E/NtG8細胞の親株であるHuS-E/2細胞は立体培養条件下でHCVbb感染許容性のある程度示すことがわかっている⁴⁹⁾。HCV研究では熱可逆性ハイドロゲルMebiol gelや中空糸を用いた立体培養が行われたが、実験操作が複雑であり、再現性を得ることに高度な技術を要した。そこで種々の培養細胞の立体培養法を検討した結果、シリカファイバーから構成された担体Cellbedを用いる方法に着目した。Cellbedの標準的なプロトコルに従い、E/NtG8細胞をCellbed上に播種し、無血清培地で1週間培養する簡易な立体培養系を構築した(図4A)。この立体培養E/NtG8細胞に対し、上記同様の感染条件でHBVccを感染させた結果、平面培養時より数倍高いHBV粒子産生が認められた。次に、HBVbbに対する感染感受性を評価するため、PXB細胞を用いたHBVbb感染実験と同様、立体培養E/NtG8細胞に対しHBV感染PXBマウス由来HBVbb(遺伝子型C)をHBV粒子量が少ない5 GEq/cellで感染させた。その結果、感染させたHBV粒子量がHBVcc感染実験と比較して極端に少ないにもかかわらず、立体培養E/NtG8細胞で高い細胞内HBVpgRNAと培養液中HBV DNA量の発現が見られ、立体培養E/NtG8細胞はPXB細胞と同様に、HBVbbに対し非常に高い感染感受性を持つと考えられた(図4B)。さらに遺伝子型Cだけでなく遺伝子型AのHBVbbの感染も許容することもわかった。また、このHBVbbの感染・増殖は4週間程度維持されることがわかった。この期間に産生されたHBV粒子を5 GEq/cellの条件で新たに準備した立体培養E/NtG8細胞に再び感染させた結果、最初の感染実験に用いたHBVbbと同様の感染性が認められた(図4C)。以上の結果から、立体培養E/NtG8細胞はHBVccとHBVbbの両

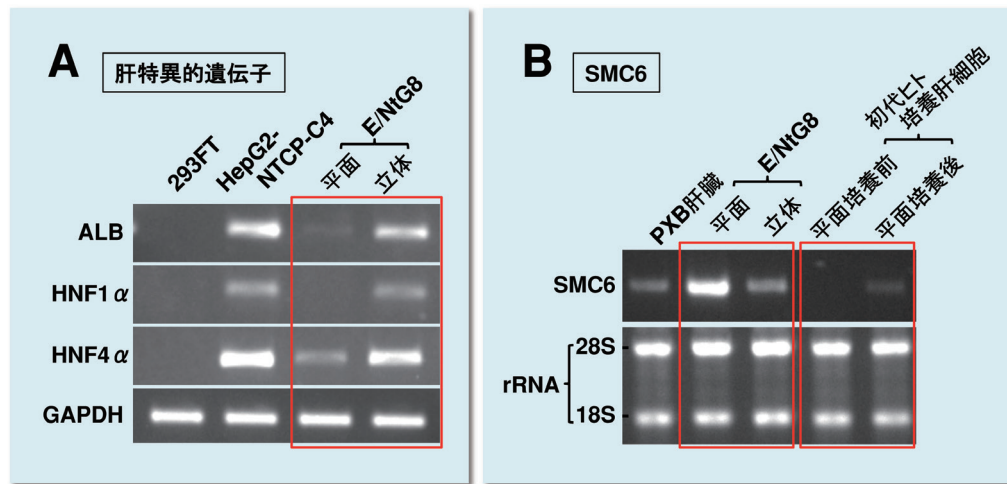


図 6 立体培養 E/NtG8 細胞における遺伝子発現解析

A) 肝特異的遺伝子 albumin (ALB), HNF1 α , HNF4 α の発現を RT-PCR により解析した結果を示した。内在性コントロールには GAPDH を用いた。293FT 細胞は非肝細胞の negative control, HepG2-NTCP-C4 細胞は positive control として用いた。B) 上パネルは RT-PCR により SMC6 の発現を解析した結果を示した。PXB 肝臓は PXB マウスから切除した肝臓から精製した total RNA 示す。下パネルは total RNA の均質性を ribosomal RNA (rRNA) で示した。

方に感染感受性を示したが、HBVbb に対し特に強い感染感受性を持ち、HBVbb 同様の高い感染性を示す HBV 粒子産生を含むすべての HBV 生活環を再現することが可能であると考えられた。

これまでに述べてきたように HBVbb と HBVcc には、その感染性に何らかの相違があると考えられた。まず我々は、HBVcc 濃縮液に感染を阻害する因子が含まれている、あるいは HBVbb に感染を促進させる因子が含まれている可能性を考えた。そこで HBVcc 濃縮液と HBVbb を混合し、PXB 細胞や HepG2-NTCP-C4 細胞を用いた感染実験をおこなった。しかしながら、HBVcc 濃縮液が HBVbb の PXB 細胞に対する感染を抑制することは認められず、HBVbb も HBVcc の感染を促進することはなかった。したがって、HBV を含む溶液ではなくそれぞれの HBV 粒子に何らかの性状の相違がある可能性が考えられた。そこでこれらの HBV 粒子を塩化セシウム浮遊密度勾配遠心法によって解析し、その物理化学的性状を比較検討した。その結果、HBVbb と HBVcc の HBV DNA 量の浮遊密度分画内の分布は明らかに異なるパターンを示した (図 5)。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、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、これら画分のプロテオーム解析やリポドーム解析など、さらなる詳細な解析が必要であると考えられた。

最後に、この HBVbb 感染を許容する立体培養 E/NtG8 細胞で、平面培養時に比較してどのような遺伝子の発現が

変動しているかを解析した結果を示す。Cellbed 上で立体培養した E/NtG8 細胞は、肝細胞特異的な遺伝子や、肝細胞としての性質を決めるマスター転写因子^{53,54}である HNF1 α mRNA と HNF4 α mRNA の発現増加が見られた (図 6A)。これらの転写因子の発現増加は、直接 HBV cccDNA に結合し HBV mRNA の転写を促進するだけでなく、肝細胞特異的な遺伝子の発現を誘導し、HBV 生活環の様々なステップに関与する可能性が考えられた。また、HBV の宿主制限因子として同定された structural maintenance of chromosomes (SMC) 6 遺伝子の発現を解析した結果、立体培養 E/NtG8 細胞において顕著な SMC6 mRNA の発現減少が見られた。SMC5/6 は複合体を形成し HBV cccDNA などの染色体外 DNA からの転写を抑制する機能を有するとされた。しかしながら、HBV 感染により産生された HBx が宿主細胞の DNA damage-binding protein 1 に結合し、ユビキチン・プロテアソーム系を介して SMC5/6 を分解し、HBV mRNA の転写を活性化することが報告された⁵⁵。したがって立体培養 E/NtG8 細胞においては、そもそもこの SMC5/6 による HBV ゲノムからの転写抑制は極めて限定的である可能性が考えられた。立体培養 E/NtG8 細胞の遺伝子発現プロフィールが肝細胞のそれに類似していたことから、改めて種々の肝関連の細胞等における SMC6 mRNA 量と比較した。図 6B に示したように、立体培養 E/NtG8 細胞における SMC6 mRNA の発現レベルは凍結保存されたヒト肝細胞における発現と同等であり、さらにはこの凍結保存ヒト肝細胞を播種するだけで SMC6 mRNA の発現がわずかに増加することが示された (図 6B)。以上の結果からは SMC6 遺伝子発現は肝臓

組織中の肝細胞内においては限定的であり、HBVへの制限機能の実態については今後さらなる検証が必要であると考えられた。

5. おわりに

2012年のHBV感染受容体の同定以降、汎用性の高いHepG2-NTCP細胞を用いたHBV感染培養系はHBV研究者間で爆発的に普及した。しかしながら、正常細胞とは異なる性質を持つがん由来細胞株をウイルスと宿主細胞間の相互作用の研究に用いるには十分に注意を払う必要がある。我々の構築したNTCP発現不死化肝細胞と立体培養法を組み合わせたHBV感染培養系はHBVbbの感染・複製、さらにはHBVbbに類似した高い感染性を有するHBV粒子を産生するというHBV生活環すべてを再現する簡便な感染実験系として有用であると考えられた。この新しい感染培養系は生理的な条件に近い状態における分子レベルのHBVと宿主細胞間の相互作用の研究、ならびにHBVの病原性発現メカニズムの理解を深め、HBV感染による肝疾患の発症予防・治療に向けた新たな展開を生み出す可能性があると考えられた。

利益相反開示について

本稿に関連し、開示すべき利益相反関係はない。

参考文献

- Blumberg BS. Polymorphisms of serum proteins and the development of isoprecipitins in transfused patients. *Bull N Y Acad Med.* 1964 May;40(5):377-86.
- Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang.* 1968;15(5):374-85. doi: 10.1111/j.1423-0410.1968.tb04078.x.
- 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
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature.* 1979 Oct 25; 281(5733):646-50. doi: 10.1038/281646a0.
- Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G, Murray K. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature.* 1979 Dec 6;282(5739):575-9. doi: 10.1038/282575a0.
- Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature.* 1979 Aug 30;280(5725):815-9. doi: 10.1038/280815a0.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988 Oct; 69(Pt 10):2575-83. doi: 10.1099/0022-1317-69-10-2575.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009 Oct;83(20):10538-47. doi: 10.1128/JVI.00462-09. Epub 2009 Jul 29.
- 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.
- 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.
- Ko C, Park WJ, Park S, Kim S, Windisch MP, Ryu WS. The FDA-approved drug irbesartan inhibits HBV-infection in HepG2 cells stably expressing sodium taurocholate co-transporting polypeptide. *Antivir Ther.* 2015;20(8):835-42. doi: 10.3851/IMP2965. Epub 2015 May 1.
- Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M, Kawai F, Ohashi H, Tsukuda S, Shimura S, Suzuki R, Aizaki H, Sugiyama M, Park SY, Ito T, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol.* 2015 Dec;89(23):11945-53. doi: 10.1128/JVI.01855-15. Epub 2015 Sep 16.
- Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Omagari K, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. *Hepatology.* 2017 Apr;65(4):1104-1116. doi: 10.1002/hep.28952. Epub 2017 Jan 17.
- Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, Iwamoto M, Tsukuda S, Takeuchi SJ, Miyake T, Sugiyama M, Ogasawara Y, Park SY, Tanaka Y, Kusuhara H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol.* 2017 Apr;66(4):685-692. doi: 10.1016/j.jhep.2016.11.009. Epub 2016 Nov 25.
- Passioura T, Watashi K, Fukano K, Shimura S, Saso W, Morishita R, Ogasawara Y, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Suga H, Wakita T. De Novo Macrocyclic Peptide Inhibitors of Hepatitis B Virus Cellular Entry. *Cell Chem Biol.* 2018 Jul 19;25(7):906-915.e5. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.04.011. Epub 2018 May 17.

- 16) Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Suzuki R, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Ogasawara Y, Watashi K. Troglitazone Impedes the Oligomerization of Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide and Entry of Hepatitis B Virus Into Hepatocytes. *Front Microbiol.* 2019 Jan 8;9:3257. doi: 10.3389/fmicb.2018.03257. eCollection 2018.
- 17) Akahori Y, Kato H, T. Fujita T, Moriishi K, Tanaka Y, Watashi K, Imamura M, Chayama K, Wakita T, Hijikata M. Establishment of a novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes. (*Scientific Reports*, in press)
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Gallucci L, Kann M. Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses.* 2017 Jan 21;9(1):21. doi: 10.3390/v9010021.
- 21) 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.
- 22) Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, Wakae K, Nakamura T, Watashi K, Wakita T, Muramatsu M. Flap endonuclease I is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog.* 2018 Jun 21;14(6):e1007124. doi: 10.1371/journal.ppat.1007124. eCollection 2018 Jun.
- 23) Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015 Dec;64(12):1972-84. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309809. Epub 2015 Jun 5.
- 24) Quasdorff M., Protzer U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J Viral Hepat.* 2010 Aug;17(8):527-36. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01315.x. Epub 2010 Jun 8.
- 25) Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015 May;479-480:672-86. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.031. Epub 2015 Mar 7.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, Kapur AJ, Colonno RJ, Tenney DJ. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):3992-4001. doi: 10.1128/JVI.02395-06. Epub 2007 Jan 31.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jul;84(13):4641-4. doi: 10.1073/pnas.84.13.4641.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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
- 39) 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.
- 40) Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkman 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.
 - 41) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004 Sep;165(3):901-12. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63352-4.
 - 42) 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.
 - 43) 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 Jul 8;6:29358. doi: 10.1038/srep29358.
 - 44) 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 Apr 4;7:45698. doi: 10.1038/srep45698.
 - 45) 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.
 - 46) Watashi K, Wakita T. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus Entry, Species Specificity, and Tissue Tropism. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Aug 3;5(8):a021378. doi: 10.1101/cshperspect.a021378.
 - 47) 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.
 - 48) 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.
 - 49) 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.
 - 50) Meng Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010 Jun;6(6):733-46. doi: 10.1517/17425251003674356.
 - 51) 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.
 - 52) 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.
 - 53) Tian JM, Schibler U. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev.* 1991 Dec;5(12A):2225-34. doi: 10.1101/gad.5.12a.2225.
 - 54) Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet.* 2003 Jul;34(3):292-6. doi: 10.1038/ng1175.
 - 55) 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.

Development of hepatitis B virus culture systems

Yuichi AKAHORI and Makoto HIJIKATA

Laboratory of Tumor Viruses, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Recent development of hepatitis B virus (HBV) culture systems has proceeded the molecular virological studies of the life cycle of HBV including infection step. However, the reproduction of HBV life cycle under the more physiological condition may be required to know the nature of HBV more precisely. The HBV culture system, we recently developed using immortalized human hepatocytes cultured in the three dimensional condition, seemed to be one of good tools for that purpose.

