

博士論文

コンパクトB型肝炎ウイルス（HBV）ゲノムを搭載した
アデノウイルスベクターによる効率的なHBVゲノム複製系の構築

鈴木 まりこ

要旨

本研究では効率的なB型肝炎ウイルス (HBV) ゲノム複製系の構築を目的とし、CMVプロモーターによって高効率にpregenomic RNAを転写するコンパクトHBVゲノム挿入アデノウイルスベクター (HBV103-AdV) を作製した。本ベクターは汎用される培養細胞株だけでなく、ヒト初代肝細胞においても効率的なHBVゲノム複製を誘導した。また、本ベクターに用いたHBVゲノムは重複配列を可能な限り短縮しており、HBVゲノム複製に関係なく出現する環状HBV DNA分子の生成の回避を可能にした。さらに、高効率なHBVゲノム複製は短時間で複製HBVゲノムの検出を可能としたため、新規抗HBV薬の探索にも応用可能であると考えられた。

目次

1. 序文	1
2. 材料及び方法	10
2.1 細胞培養	10
2.2 plasmid及びAdV作製用コスミドの構築	10
2.3 ベクター作製	12
2.4 力価測定法	13
2.5 plasmid transfection及びAdV感染	14
2.6 GFP発現効率の観察と蛍光強度測定	15
2.7 逆転写反応	15
2.8 定性PCR	16
2.9 定量PCR	16
2.10 Southern解析	17
2.11 western解析	18
2.12 96穴プレートフォーマット	19
2.13 統計解析	20

3. 結果	21
3.1 AdVによる各種細胞への遺伝子導入効率の検討	21
3.2 pg RNA発現AdVへのCMVプロモーター及び外来poly(A)配列の応用	22
3.3 HBVゲノムの重複配列で誘起される偽ccc DNAの生成	25
3.4 HepG2細胞とPXB細胞におけるHBV103-AdVシステムを用いたHBVゲノム複製	27
3.5 HBV103-AdVシステムの抗HBV活性評価への応用	29
4. 考察	31
5. 参考文献	41
6. 謝辞	53
7. 図表	54

序文

ヘパドナウイルス科オルソヘパドナウイルス属に属するB型肝炎ウイルス（HBV）はB型肝炎の病原体であり、その持続感染は肝硬変や肝細胞癌の発症の原因となる。世界に2億人を超える感染者が存在し、毎年7万人弱がHBV持続感染で引き起こされる肝硬変及び肝細胞癌によって死亡している¹。

HBVは血液等を介して感染し、感染経路としては垂直感染である母子感染や水平感染である性行為、輸血等が挙げられる²。本邦では1986年以降、母親がHBVキャリアと判明した場合は出生児に対するHBVワクチンの投与が行われ、母子感染はほぼ防げるようになった³。出産時および乳幼児期にHBVに感染した場合は持続感染となることが多い^{2,4}。乳幼児期からの持続感染者の9割程度ではHBe抗原陽性からHBe抗体陽性となるHBe抗原セロコンバージョンが起こり、HBV非活動性キャリアとなる。残りの1割ではHBe抗原陽性の状態が維持されて慢性肝炎となり、肝硬変や肝細胞癌の発症リスクが大きく上昇する²。

一方でワクチン未接種の成人におけるHBV感染は殆どの場合一過性感染となり、多くは不顕性のままHBVは排除される^{2,4}。しかし一部の感染者は数ヶ月から半年ほどの潜伏期間の後に急性肝炎を発症する。また、極僅かな確率で劇症肝炎が発症し、その場合は死に至ることもある⁴。成人後の水平感染によるHBV

感染は増加傾向にあり、近年は成人後のHBV感染でも一部の症例で持続感染が成立することが報告されている⁵。

B型肝炎の多くはHBs抗原陰性/HBs抗体陽性の状態で臨床的寛解となるが、HBV自体を患者体内から排除して完全な治癒を得ることは困難である。そのため、B型慢性肝炎の現実的な治療目標は、HBVの増殖を抑え肝硬変や肝細胞癌への進展のリスクを回避することである⁶。

B型肝炎に対する治療薬としては α -インターフェロン（IFN）と核酸アナログ製剤が挙げられる。C型肝炎ウイルス（HCV）に対して一定の抗ウイルス効果を示すIFNは、B型肝炎に対しては50%程のHBV感染者にしか効果を示さない^{4,7,8}。エンテカビルやラミブジンなどの核酸アナログ製剤は逆転写酵素阻害剤として一部のHBV患者に有効であるが、polymerase領域のアミノ酸変異によって薬剤耐性を獲得するHBVが出現するなどの問題点も残されている⁹。すなわち、現在のいずれの治療法でもHBV持続感染者の体内からHBVを完全に除去することは不可能であり、効果的で安全な抗HBV薬剤の開発が望まれている。本研究は簡便かつ効率的な*in vitro*のHBVゲノム複製系を開発して、新規抗HBV化合物のスクリーニングに応用することで、HBV持続感染者におけるゲノム複製の抑制およびウイルスの完全な排除による治療法の開発に資することを目的とする。

HBVはゲノムの塩基配列のうち8%以上の相違によってAからJまでの遺伝子型に分類され、世界的な分布が異なる^{10,11}。本邦では遺伝子型Cが最も多く、次いで遺伝子型B、A、Dが認められる。近年のHBVの水平感染では本来は欧米において高頻度で認められる遺伝子型Aの増加が報告されている¹²。

HBVは細胞質のCore粒子内や放出される感染性粒子（デーン粒子）内では完全長マイナス鎖DNAと不完全プラス鎖DNAから成る3.2 kbの環状不完全二本鎖DNA（relaxed circular DNA: rc DNA）をゲノムとして持つ（図1）。一方で感染細胞の核内では環状完全二本鎖DNA（covalently closed circular DNA: ccc DNA）の形態で安定に存在し、持続感染を成立させる（図2）。ccc DNA自体は複製せずに全てのHBV由来RNAの鋳型となり、4種類のプロモーターと共通のHBVゲノム上のpoly(A)配列を用いて3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb、0.7 kbのmRNAが転写される（図1）。3.5 kb mRNAにはcore遺伝子、pol遺伝子が、2.4 kb及び2.1 kb mRNAにはS遺伝子が、0.7 kb mRNAにはX遺伝子が含まれる。HBVゲノム内在性coreプロモーターから転写される3.5 kbのpregenomic RNA（pg RNA）は、両末端のステムループ構造である ϵ （エプシロン）領域が認識されてcore粒子内へ取り込まれる。次いで、polタンパク質の末端タンパク（TP）ドメインが共有結合したT（デオキシチミジン）塩基がプライマーとしてpg RNAの3'側DR1領域へとアニールする。

core粒子内ではTPドメインを起点としてHBV由来逆転写酵素ドメインがマイナス鎖DNAを合成しつつ、プラス鎖RNAであるpg RNAはHBV由来RNaseHによって消化される。プラス鎖RNA5'末端のキャップサイトとDR1領域を含む約18塩基は消化されずにプラス鎖のプライマーとして残存し、DR1領域と同一の配列を有するDR2領域に転移する。その後RNAプライマーを起点としてプラス鎖DNAが7割程度合成され、core粒子内でのゲノムであるrc DNAとなる。RNAプライマーの転移は約9割の確率で起こり、残りの1割程度はDR1領域に結合したままプラス鎖DNAが合成される(図2)。この場合、HBVゲノムは直鎖状二本鎖DNA(double stranded linear DNA: dsL DNA)となるが、dsL DNAのHBV生活環における役割は詳細に解析されていない。一部のcore粒子はエンベロープを被り、感染粒子として細胞外に放出される。rc DNAの一部は核内へ移行し、プラス鎖DNAの合成が完了してccc DNAを形成するが、この過程は未だ解明されていない点が多い^{13,14}。

本研究ではHBV生活環のうち、細胞内でHBVゲノムがその形態を環状不完全二本鎖DNA、環状完全二本鎖DNA、pg RNAと変化させながら増殖する過程を「ゲノム複製」と表す。

HBVゲノムには読み枠をずらしながら4つのオープンリーディングフレーム(ORF)が存在し、preCore、core、pol、Xタンパク質、及びエンベロープを構成

する3種類のSタンパク質を合わせた7種類のウイルスタンパク質が発現する（図1）。Sタンパク質は大きい順にL、M、Sと呼ばれ、3種類のタンパク質で共通するコード領域の上流でLタンパク質のみをコードする領域をpreS1、L及びMタンパク質をコードする領域をpreS2と呼ぶ。Coreタンパク質はウイルス粒子を形成する。preCoreタンパク質はcoreタンパク質のN末端にペプチドが付加された構造をしており、感染細胞での盛んなウイルス増殖に際して血中にHBe抗原として検出される。polタンパク質はTPドメイン、スパーサー領域（preS1、preS2と重複する領域はゲノム複製において欠失可能）、逆転写酵素ドメイン、RNaseHドメインから構成される¹⁵。Xタンパク質は構造タンパク質ではなく、宿主転写調節機構に影響を与えると報告されているが詳細は解明されていない^{16,17}。

HBVゲノム複製機構は複雑であり、B型肝炎に対する治療のみならずHBV研究が困難である理由の一つである。加えて、HBVの宿主域は限られており、*in vitro*、*in vivo*のほとんどのHBVゲノム複製系においては少量のウイルス複製しか得られない。HBVの基礎研究に用いられる方法として以下のものが挙げられる。(i) 1.2コピーのHBVゲノムを有するplasmidのtransfectionは、plasmidの構築が簡便なことからHBVゲノム複製系として最もよく用いられる手法の一つである。しかし、transfectionによるplasmidの導入効率は個々の細胞ごとに異なり、HBVゲノ

ム複製の定量的な解析は困難である。また、ヒト初代肝細胞等はtransfectionによる遺伝子導入効率が低く、この細胞を用いた実験も困難であった。(ii) HepG2.2.15に代表されるような複数コピーのHBVゲノムが細胞染色体に挿入された肝細胞癌由来HBV産生細胞株もHBVゲノム複製系として汎用されてきた¹⁸⁻²¹。細胞ごとに有するHBVゲノムが等量であることから、定量的なHBVゲノム複製解析に適している。一方で、細胞染色体に挿入されたHBVゲノムからのpg RNA転写量は少なく、複製HBVゲノムの検出のために10日間程度の細胞培養が必要となる。

(iii) 近年HBV感染受容体の候補としてNTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) が報告された^{22,23}。NTCP発現肝細胞株はHBV感染粒子に対して感染許容性を獲得したことから、ゲノム複製系の一つとして応用されるようになった。しかし、NTCP発現肝細胞株の実験に用いるHBVは感染粒子を形成するものに限られ、細胞への導入が必要となるような変異型HBVゲノムの複製解析は困難であった。

本研究ではアデノウイルスベクター (AdV) に着目し、細胞へのHBVゲノム導入方法として応用した新規HBVゲノム複製系を開発した。汎用されているAdVは第一世代AdVあるいは非増殖型AdVと呼ばれている (図3)。第一世代AdVには小児の風邪の原因ウイルスの一つであるアデノウイルス5型が主に応用さ

れる。第一世代AdVはウイルスの全ての初期遺伝子プロモーターをトランスに活性化するE1Aタンパク質をコードしているE1領域を欠失している。そのため、E1領域が細胞染色体に挿入されているヒト胎児腎臓細胞由来293細胞でのみ、恒常的に発現しているE1Aタンパク質によりAdVゲノム上のプロモーターが活性化されゲノムが複製する²⁴。しかし、それ以外の細胞ではウイルス由来のタンパク質は発現せずに、E1欠失領域に挿入した目的遺伝子のみが発現する。

また、AdVゲノムのE3領域にはMHCクラスI分子複合体の細胞表面への提示を減少させる機能を持つ宿主免疫制御遺伝子がコードされており、培養細胞でのウイルス増殖に関与しないことが知られている。そのため、E3領域を欠失したベクターは、最終的に7.5 kbの目的遺伝子発現単位が挿入可能である²⁵⁻²⁸。

AdVは染色体への積極的な挿入機構を持たない一過性の発現ベクターである。塩化セシウム平衡密度勾配遠心により簡便に*in vivo*への直接投与が可能な 10^{10} plaque-forming units (PFU) オーダーのベクター調製が可能である。AdVの最大の利点は血球系以外の細胞へ非常に高い遺伝子導入効率を示すことである。最も高い遺伝子導入効率を示すのは肝臓由来の細胞である。また、*in vivo*ではマウスの尾静脈からAdVを静脈注射で投与すると約90%が肝臓へ導入されることが知られている。

今までも複製可能なHBVゲノムが挿入されたpg RNA発現AdVを用いたHBVゲノム複製解析はいくつか報告されている。Sprinzlらはヒト肝細胞癌由来細胞株に限らずダック由来細胞株やヒト初代肝細胞、マウス等の様々な条件下におけるヒトHBVゲノム複製の解析のために、HBVゲノム搭載AdVを用いた。HBVゲノム搭載AdVの感染により培養細胞や初代細胞、マウス肝臓においてもHBVゲノム複製を誘導し、複製HBVゲノムやHBV抗原及びHBV感染粒子を検出した²⁹。また、Renらは*in vitro*でのより自然なHBV感染モデル構築のため、ツパイ由来初代肝細胞を応用し、HBVゲノムの細胞への導入のためにHBVゲノム搭載AdVを用いた³⁰。しかし、これらのAdVでは細胞内でのpg RNAの転写は活性の弱いHBVゲノム内在性プロモーター³¹によって行われていた。加えて、これらの研究では強力なプロモーターを有するGFP発現単位がHBVゲノムの上流に挿入される場合もあり、同一クロニング領域に存在する独立した2つのプロモーター／エンハンサーがお互いに干渉し合う恐れがあった。すなわち、既報のHBVゲノム搭載AdVは、ゲノム複製に必要なpg RNAの転写にCMVプロモーター³²等の強力な外来のプロモーターは用いていなかった。

本研究では効率的なHBVゲノム複製系の構築を目的として新規HBVゲノム挿入AdVを作製し、それをHBV103-AdVシステムと名付けた。本システムはCMV

プロモーターと外来poly(A)配列³³によってpg RNAを転写することで、HBVゲノム上の重複配列を少なくした1.03コピーのコンパクトHBVゲノムを新たに構築し応用している。CMVプロモーターからpg RNAを転写する構築は今までplasmidに限られていた³⁴。また、pg RNA上のpoly(A)配列を外来poly(A)配列に置き換えた構築は今まで報告されていない。

コンパクトHBVゲノムの応用は強力なCMVプロモーターによるpg RNAの転写のみならず、HBVゲノム複製に寄らずベクター増殖に際して出現する偽cccDNAの生成の回避を可能にした。また、本システムは汎用されているHepG2等の培養細胞株だけでなく、実験への応用方法が限られていたヒト初代肝細胞においても効率的なHBVゲノム複製を誘導することを確認した。さらに、本システムによる高効率なHBVゲノム複製は短い実験時間での複製HBVゲノムの検出を可能としたため、今後は抗HBV薬の新規候補化合物の探索にも応用可能であると考えられた。

1. 材料及び方法

2.1. 細胞培養

AdVの作製にはアデノウイルスのE1A、E1Bタンパク質を恒常的に発現するヒト胎児腎臓細胞由来293細胞を用いた³⁵。293細胞は10%牛胎児血清 (Gibco-BRL) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (10%FCS-DMEM) (コージンバイオ) を用いて、37°C、5%二酸化炭素の条件下で培養した。HBVゲノム複製効率の比較にはヒト肝細胞癌由来Huh-7細胞及びHepG2細胞を用いた。これらの細胞は高L-グルコース10%FCS-DMEMで培養した。また、AdV感染及び感染後の維持には5%FCS-DMEMを用いた。ヒト初代肝細胞としてはヒト化マウスの肝臓から樹立したPXB細胞 (フェニックスバイオ) を用いた^{36,37}。PXB細胞は2%ジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した肝細胞クローン増殖培地で培養した。

2.2. plasmid及びAdV作製用コスミドの構築

GFP発現plasmid及びGFP発現AdVの両者は、CMVプロモーターとrabbit β -globin poly(A)シグナル配列³³で構成されるGFP発現単位を有している。

実験に用いられた全てのHBVゲノムは遺伝子型 C (Accession No. AB246345) を有するplasmidであるpUC19 HBV C-JPNAT³⁸を由来とする。複製型変異型HBV

ゲノムΔpreSはpreS領域のほぼ全て（Coreタンパク質の転写開始コドンATGのAを1と設定した1040-1316 nt）を、7塩基の合成DNAと置換しており、Pol遺伝子及びS遺伝子のウイルスゲノムの読み枠は保存されている（図4上段）。この欠失構造は遺伝子型Aの変異型HBVゲノムHBVδ1³⁹と同一である。

複製型変異型HBVゲノムkSは後述の点変異を導入して構築した（図4中段）。S遺伝子の転写開始コドンと下流の2nd ATGへの変異導入として1471 ntのTをCに、1693 ntのTをCに置換した。S遺伝子の2nd ATGは遺伝子型Aにおける開始コドンに相当するため、遺伝子型CにおけるS遺伝子開始コドンのみへの変異導入はSタンパク質の発現が保存される可能性がある。続いてS遺伝子への終止コドンの導入のため、1486 ntのCをAに、1696 ntのGをCに置換した。また、識別のための制限酵素*Bsr*GIサイトの導入には1462 nt及び1465 ntのそれぞれのCをTとAに、制限酵素*Aat*IIサイトの導入には1684 ntのAをGに、1685 ntのTをAに各々置換した。Sタンパク質の発現が欠失していることをWestern解析を用いて確認した（図6）。

非複製型変異型HBVゲノムdPはPol遺伝子の一部である制限酵素*Xba*Iサイト（1560 nt）から制限酵素*Xcm*Iサイト（2009 nt）までを欠失している（図4下段）。

2728-292 ntの変異型HBVゲノムはHBVゲノム内在性プロモーターとゲノム由来poly(A)配列制御下でpg RNAが転写される。一方でCMVプロモーターの5'キャ

ップを含む-735から+3までの5'非翻訳配列をpg RNA5'キャップ (3132 nt) に連結した発現単位は、CMVプロモーター制御下で本来の5'キャップと同じ構造のpg RNAが転写される (図5a)。HBVゲノム由来poly(A)配列 (TATAAA, 16-21nt) は制限酵素*PsiI*サイトで置き換えてその機能を欠損させ、pCAGGS³³由来460塩基断片 (*BglIII-PstI*) と連結することで外来poly(A)配列であるrabbit β -globin poly(A)配列と置換した (図5b)。

HBVゲノムは全長AdVゲノムを含むコスミドカセットであるpAxcwit2²⁵もしくはpAxdV-FVF-4c⁴⁰にクローニングした。

2.3. ベクター作製

AdVの作製は、完全長ウイルスゲノム導入法⁴¹を用いて常法通り行った。AdV作製用コスミドのアデノウイルスゲノム両末端には、アデノウイルスゲノム及び発現単位を切断しない制限酵素*PacI*サイトが挿入されており、*PacI*による切断で完全長ウイルスゲノムの両末端を露出させ、293細胞にTransfast (Promega) を用いて導入した。翌日96穴プレートにまき直して約3週間培養を続け、細胞変性が確認されたウェルから培地ごと細胞を回収し、密閉型ソニケーター (BioruptorII, コスモバイオ) を用いて氷水中で、30秒間、4回の超音波処理後、

6,000rpm、5分間、4℃で遠心し、上清のウイルス液を1st seedとした。1st seedを24穴プレートの293細胞に感染し、2nd seedを得た。この際、一部のサンプルをベクターの構造確認に用いた。ベクター構造確認では、回収した細胞の総DNAを認識配列にCGを含む制限酵素により切断後、1%アガロース電気泳動を行い、DNA構造を確認した。正しいベクター構造を持つことが確認された2nd seedを新たな293細胞に感染して3rd seedとし、更に感染を行って4th seedを得て実験に供した。

2.4. 力価測定法

全てのAdVの力価はTaqMan PCRによる定量PCRを応用したAdVの迅速定量法を用いて測定した⁴² (図7)。通常の力価測定法は293細胞を用いて希釈ベクター量をウイルス増殖として測定するのに対し、迅速定量法はAdV非増殖感染細胞におけるベクターゲノムのコピー数 (Ct値に相関する) を定量PCRで求める方法である。AdV力価既知のコントロールベクターのCt値と希釈倍率との直線性を基に、目的のベクターのCt値からAdV力価 (rVT; 相対的ベクター力価) を算出した。コントロールベクターのrVT/mLはtissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) に相当し、この数値によりmultiplicity of infection (MOI) を換算した。この方法

は迅速であるだけでなく標的細胞へ導入されたベクターコピー数を相対的に表している。AdVはベクターに挿入されたDNAを標的細胞へ導入するために用いられるため、相対的ベクター力価は実際の実験における導入効率を反映する。

4th seedのAdVあるいはコントロールベクターを感染したHuh-7細胞もしくはHepG2細胞を1% SDSを含むTNE-PK溶液 (50 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM EDTA (pH8.0)、100 mM NaCl、50 mg/mL proteinase K) に懸濁後、50°C、2時間反応し、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った。続けてエタノール沈殿を行った後、RNaseA添加TE (20 µg/mL) で処理して細胞総DNAを抽出した。総DNAに対してアデノウイルスゲノム上のpIX領域とβ-アクチン遺伝子に対応するプライマー/プローブ (表1、図8b) を用いて定量PCRを行った。β-アクチン遺伝子のCt値は各サンプルのDNA量の補正に用いた。

2.5. plasmid transfection及びAdV感染

plasmid transfectionにはLipofectamine^R LTX&PLUSTM Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用い、製造元の指示書に従い操作を行った後、24時間後に培地交換を行った。

AdV感染では算出したAdV力価を基に各々のAdVをMOI 10、3及び1に調製し、

細胞に感染して培養した。回収した細胞から総DNAを抽出し、迅速定量法を用いて、改めて細胞に導入されたウイルスベクターのコピー数が揃っていることを確認した。

2.6. GFP発現効率の観察と蛍光強度測定

24穴プレートの細胞に対しGFP発現plasmidを導入若しくはGFP発現AdVを感染した後、蛍光顕微鏡（IX70, Olympus）による観察を行った。その後、培地をHanks' Balanced Salt Solution（Invitrogen）と置換し、Varioskan Flash（Thermo Fisher Scientific）を用いて、GFP蛍光強度を測定した。

2.7. 逆転写反応

AdV感染後3日目のHepG2細胞からNucleoSpin^R RNA/DNA Buffer set（Macherey-Nagel）を用いて総RNAを抽出した。続けて行った逆転写反応にはTaqMan^R Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems）キットを用いた。総RNA 0.5 µg相当に、2.5 mM MgCl₂、10mM deoxyNTPs mixture、10×RT Buffer、20 U/ µL RNase inhibitor、50 U/µL MultiScribe Reverse Transcriptaseを加え、25°C 10分間、48°C 30分間、95°C 5分間、ProFlexTM PCR system（Thermo Fisher Scientific）

を用いて逆転写反応を行った。プライマーはオリゴdTプライマーを最終濃度2.5 μ Mで用いた。

2.8. 定性PCR

24穴プレートのHepG2細胞にAdVをMOI 10、3及び1で感染し、6日間培養した。回収した細胞から細胞総DNAを抽出後、Tks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ）キットを用いてProFlexTM PCR system（Thermo Fisher Scientific）で94°C 1分間反応を行い、98°C 10秒間、60°C 15秒間、68°C 30秒間を25サイクルで増幅した。反応に用いたプライマーは表2および図8bに示した。

2.9. 定量PCR

逆転写反応後のcDNA若しくは細胞総DNAはTaqMan^R Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems）キットを用いて、ViiA7 real-time PCR system（Thermo Fisher Scientific）で95°C 20秒間反応を行い、95°C 1秒間、60°C 20秒間で40サイクル反応した。cDNAに対してはヒトGAPDH遺伝子のプライマー／プローブを、細胞総DNAに対しては β -アクチン遺伝子のプライマー／プローブで補正を行った後目的遺伝子の発現量を算出した。用いたプライマー／プローブは表1および

図8bに示した。

2.10. Southern解析

6穴プレートのHepG2細胞に3及び1 µgのplasmidを導入し、或いはAdVをMOI 3及び1で感染して6日間培養後、細胞総DNAを抽出した。20 µg相当のAdV感染細胞の総DNAは100 U *Kpn*I（タカラバイオ）で、同量のplasmid導入細胞の総DNAは100 U *Hind*IIIと100 U *Dpn*I（New England Biolabs）で処理後、1%TAEアガロースゲルを用いて100 Vで3時間電気泳動した。電気泳動したゲルをアルカリ処理後、中和処理を経て、capillary transfer法を用いてナイロンメンブレン（Hybond-N; Amersham GE）上にトランスファーした。その後定法により $1200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ のUV照射（Spectronics）を行い、DNAをメンブレン上にクロスリンクした。68°Cにて6時間以上 prehybridization を行った後プローブを加え68°Cで一晩 hybridization を行った。プローブには全長HBVゲノムの3.2 kb PCR断片をDIG DNA Labeling and Detection Kit（Roche Diagnostics）を用いてジゴキシゲニンで標識したものを用いた。

メンブレンを室温の2×SSC-SDSで3回（5分／回）洗浄した後、68°Cの0.1×SSC-SDSで2回（20分／回）洗浄した。その後30分間ブロッキングし、wash buffer

で4回（10分／回）洗浄後、20 μ Lの発光基質CDP-Star（Roche Diagnostics）を加え、LAS-4000（Fuji Film）を用いて複製HBVゲノムのバンドを検出した。

2.11. western解析

6穴プレートのHepG2細胞に3及び1 μ gのplasmidを導入し、6日間培養後にNP-40 lysis buffer（50 mM Tris-HCl（pH8.0）、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、1% NP-40）を加え、4°Cにおいて2時間攪拌後、遠心して上清を回収した。タンパク質抽出液は2 \times loading bufferを等量加え、Mini-PROTEIN^R TGXTM Gels（BIORAD）に泳動し、Trans-Blot^R TurboTM Transfer Pac（BIORAD）を用いてメンブレン上にトランスファーした。メンブレンはイムノブロット（DSファーマバイオメディカル）に浸し、一晩浸透する。一次抗体として抗SSタンパク質モノクローナル抗体（#2ABH16、特殊免疫研究所）、もしくは抗 β -Actinペプチド抗体（#sc-1616、Santa Cruz Biotechnology）を用い、室温において2時間反応した。続けて、二次抗体（goat anti-mouse IgG+IgM、#115-035-068、Jackson ImmunoResearch）で室温において1時間反応した。洗浄後、Western Lightning^R Plus-ECL（PerkinElmer）で浸透し、LAS-4000（Fuji Film）を用いてSSタンパク質のバンドを検出した。

2.12. 96穴プレートフォーマット

96穴プレートHuh-7細胞に複製型／非複製型変異型HBVゲノムを有するAdVをMOI 10で感染し一晩培養後、各濃度の逆転写阻害剤エンテカビル及びラミブジン添加して更に3日間培養した。DNA抽出buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.5)、16.6 mM 硫酸アンモニウム、5 mM 2-メルカプトエタノール、5 mM MgCl₂、0.01% SDS、5 µg Proteinase K) で50°C、2時間反応後、95°C、30分間熱処理を加えた。得られた細胞総DNAはUniversal SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いてProFlex™ PCR system (Thermo Fisher Scientific) で50°C 2分間、95°C 2分間反応を行い、95°C 15秒間、60°C 1分間を40サイクルで増幅した。反応に用いたプライマーの配列は5'-GTTGGGGGAGGAGATTAGGT-3' と 5'-GCTTGCCTGAGTGCTGTATG-3'である。

50%効果濃度 (EC₅₀) は4係数ロジスティック曲線から算出した。実験系の精度を示すZ'値は方程式 $Z' = 1 - (3\sigma_s + 3\sigma_b)/(\mu_s - \mu_b)$ から求めており、 μ_s と μ_b は各々複製型HBVゲノム搭載AdVにおけるサンプル及び非複製型HBVゲノム搭載AdVにおけるサンプルでの値、 σ_s と σ_b は各々のサンプルの標準偏差とする⁴³。Z'値として0.5以上を示す実験系はハイスループットなスクリーニングに応用可能である。変動係数は方程式 $CV = \sigma_s/\mu_s \times 100$ より、シグナルバックグラウンド (SB)

比は方程式 $S/B = \mu_s/\mu_b$ より、シグナルノイズ (SN) 比は方程式 $S/N = (\mu_s - \mu_b)/\sigma_b$ より求めた。

2.13. 統計解析

統計解析にはGraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) を用いた。得られたサンプルデータ間の分散はF検定によって分類した。独立2群間の内、等分散であるものはt検定 (両側) を、不等分散であるものはWelchの検定 (両側) を用いた。独立3群間の検定にはBonferroni法を用いた。有意差は $P<0.05$ を*、 $P<0.01$ を**で示した。

2. 結果

3.1 AdVによる各種細胞への遺伝子導入効率の検討

AdVの遺伝子導入効率をHBV研究で汎用されるplasmid transfectionによる遺伝子導入効率と比較するため、同一のGFP発現単位を有するAdVとplasmidを作製し（図9a）、各々を用いた場合のGFP発現細胞の割合とGFP蛍光強度を観察・測定した（図9b及び9c）。検証にはHBV複製ゲノムを検出するために汎用されるヒト肝細胞癌由来HepG2細胞株、及びヒト初代肝細胞として用いられるヒト化マウス肝細胞由来PXB細胞を用いた。PXB細胞は肝細胞の正常な機能を保持しているだけでなくHBV感染が成立する特性を持つため、*in vitro*におけるHBV増殖を伴う研究で用いられている^{36,37}。

細胞障害性が確認されない最大量である1 µgのplasmidを用いたHepG2細胞へのtransfectionではおよそ5%のGFP発現細胞が観察された（図9b上段、1µg）ことに
対し、AdVを多重感染度（multiplicity of infection: MOI）10で感染したHepG2細胞では視野内のほぼ全ての細胞でGFP発現細胞を確認した（図9b上段、MOI 10）。同一条件下でのGFP蛍光強度は、plasmid transfectionに対してMOI 10でのAdV感染では24倍高かった（図9c左）。PXB細胞においては、plasmid transfectionに比べAdV感染によるGFP導入効率とGFP発現効率の優位性がより顕著であっ

た。plasmid transfectionによってPXB細胞へ導入されたGFPはほぼ検出限界以下であったが（図9b中段、1 μ g）、MOI 10におけるAdVの感染では90%以上の細胞でGFP発現が観察され、MOI 3においてさえも90%程度のGFP発現細胞が確認できた（図9b中段、MOI 3及び10）。さらにPXB細胞におけるGFP蛍光はMOI 10におけるAdVの感染はplasmid transfectionに比べ450倍もの強度を示した（図9c中央）。これらの結果は、plasmidに比べAdVは遺伝子導入効率において明らかな優位性を有していること、特にplasmid transfectionによる遺伝子導入が困難であるPXB細胞などの初代肝細胞では顕著であることを示唆している。また、plasmid transfectionではHepG2細胞と同様にHBVゲノム複製実験に汎用されるHuh-7細胞は、HepG2細胞やPXB細胞よりも高い遺伝子導入効率を示したが、その発現は一部の細胞に集中し均一ではなかった（図9b下段、1 μ g及び9c右）。一方で、AdVによるGFP導入ではMOI 10の感染において顕微鏡視野内で比較的均一なGFP発現が観察された（図9b下段、MOI 10）。すなわち、AdVの細胞への遺伝子導入の応用は定量的な解析に有用であると考えられた。

3.2 pg RNA発現AdVへのCMVプロモーター及び外来poly(A)配列の応用

HBVゲノム複製を誘導する従来AdVにはHBVゲノム内在性プロモーターが

用いられてきたが^{29,30}、本研究ではCMVプロモーターを応用してpg RNAを転写した。まず、ゲノム内在性プロモーター／HBVゲノム上poly(A)配列とCMVプロモーター／ β -globin poly(A)配列を用いた場合のpg RNA転写量を比較するために2種類のAdVを構築した。 β -globin poly(A)配列はmRNAの安定性を高め、遺伝子発現量を増加させることが知られている^{44,45}。Ax-HB124- Δ preSは一般的に研究に用いられている1.24コピーのHBVゲノムを有しており、ゲノム内在性プロモーターとpoly(A)配列を用いてpreS領域を欠失したHBVゲノム（以下 Δ preSゲノムとする）からpg RNAを転写する（図10a上段）。一方でAx-CM103G- Δ preSはCMVプロモーターを用いて1.03コピーの Δ preSゲノムからpg RNAを転写する（図10a下段）。このゲノム長が1.03コピーである理由は内在性poly(A)配列を外来poly(A)配列に置換したためであり、DR1及びエプシロン配列のみが重複するコンパクトなHBVゲノムである。 Δ preSゲノムは殆どのpreS1及びpreS2領域を欠失しているが³⁹（図4上段）polのフレームは温存されており、活性は保持しているため細胞内でのHBVゲノム複製は誘導される。

HepG2細胞にAx-HB124- Δ preSもしくはAx-CM103G- Δ preSをMOI 1及びMOI 3で感染し、3日間培養後のcore/pg RNA量を定量PCRで測定した（図10b）。HBVは同一のmRNAから異なる複数のタンパク質を翻訳されるとともに、逆転写の鋳

型となるpg RNAとしても働くため、設計したプライマー／プローブ(表1、図10a)

はcore mRNAとpg RNAの両者を同時に検出する(以下core/pg RNAとする)。

Ax-CM103G- Δ preSをMOI 1で感染したHepG2細胞のcore/pg RNA量を1とした場

合の各々の感染条件下におけるcore/pg RNA量を図10bに示した。MOI 1において

Ax-CM103G- Δ preSはAx-HB124- Δ preSの36倍量のcore/pg RNAを転写した。同様に、

MOI 3においてはAx-CM103G- Δ preSがAx-HB124- Δ preSの58倍のcore/pg RNA転写

量を示した。

次に、HBVゲノム複製効率を検討した。Ax-HB124- Δ preSもしくはAx-CM103G-

Δ preSをMOI 1及びMOI 3で感染したHepG2細胞から総DNAを抽出し、HBVゲノ

ムを切断しない*Kpn*Iで処理した20 μ gのDNAをSouthern解析に供した。

Ax-CM103G- Δ preS感染下ではHBVゲノム複製産物であるrc DNAを示すバンド

が強く確認されたのに対して(図10c左)、Ax-HB124- Δ preS感染下では露光過度

条件において初めてrc DNAのバンドが検出された(図10c右)。各々のウイルス

感染量はAdVゲノム由来のバンド(◆)の比較によって揃っていることを確認

した。以上の結果からAdVにおいてpg RNAの転写にCMVプロモーター／

b-globin poly(A)配列の応用によって大幅にゲノム複製量が増加し、定量的な

HBVゲノム複製の検討が可能となることが示唆された。

3.3 HBVゲノムの重複配列で誘起される偽ccc DNAの生成

HBVゲノム内在性プロモーターはXタンパク質のORF 3'からpreCoreタンパク質のORF 5'までの領域に重複するように存在する。そのため、従来のHBVゲノム複製実験に応用されるHBVゲノム挿入AdVには、全てのHBV由来タンパク質を発現するために920塩基の重複領域を持つ1.29コピーHBVゲノムが用いられている^{29,30}。しかしながら、AdV産生に用いる293細胞内では細胞あたり 10^6 コピーにまでベクターゲノムが増殖するため、ベクター作製過程においてベクターゲノム上のHBVゲノムにある重複領域は相同組換を引き起こす可能性がある。また、相同組換の結果1.29コピーHBVゲノムから切り出される環状DNAは、細胞内でHBVゲノム複製が誘導された場合の生成産物であるccc DNAと完全に同一の構造をとる。すなわち、相同組換の起きたHBVゲノム挿入AdVをHBVゲノム複製実験に用いると、PCRや定量PCR、Southern解析でccc DNAと全く同じ挙動を示す偽ccc DNAがHBVゲノム複製の有無に関わらずに検出される可能性が考えられた。

本研究においてHBVゲノム複製実験に用いたAdVでは、ゲノム内在性プロモーターの代わりにCMVプロモーターを応用するとともにHBVゲノム由来poly(A)配列を外来poly(A)配列に置き換え、HBVゲノムの重複領域をできる限り

短縮したコンパクトHBVゲノムを作製し用いている。外来poly(A)配列はHBVゲノム複製においては全長マイナス鎖の合成時に取り除かれるので、複製したHBVゲノムの構造は本来のゲノムと同一である。

Ax-CM103G-kSとAx-CM103G-dPは共に重複領域を102塩基に短縮したコンパクトHBVゲノムを搭載しており（図11a上段及び中段）、Ax-CM114-dPは従来のHBVゲノム由来poly(A)配列を残存した376塩基の重複領域を有する1.14コピーHBVゲノムが挿入されている（図11a下段）。Sタンパク質の発現がないkSゲノムはSタンパク質ORFの開始コドンに点変異を導入しつつpol遺伝子のORFを保存した複製型HBVゲノムである（図4中段及び図6）。一方でdPゲノムはpol活性ドメインの一部を欠失している非複製型HBVゲノムである（図4下段）。

重複領域を短縮したコンパクトHBVゲノムがベクター作製時における相同組換えの発生頻度の抑制に有効であるかを検討するため、環状HBV DNA分子を半定量PCRによって検出した（図11b）。上記3種類のHBVゲノム挿入AdVをHepG2細胞に感染後、総DNAを抽出し半定量PCRに供した。設計したプライマーは環状HBV DNA分子を特異的に検出するが、AdVに挿入したHBVゲノム上ではtail to tailに位置するため直鎖状HBV DNAは認識しない（図8a）。Ax-CM114-dPのMOI 10での感染においては、非複製型HBVゲノムを有しているにも関わらず環状

HBV DNAを検出した（図11b上段、右）。一方で非複製型コンパクトHBVゲノムを挿入したAx-CM103G-dPのMOI 10での感染では環状HBV DNAのバンドは1/3程度に減少した（図11b上段、中央）。これらの結果から、コンパクトHBVゲノムが挿入されたAdVによるHBVゲノム複製（HBV103-AdVシステム）は相同組換えによる偽ccc DNA生成の回避に有用であると考えられた。

3.4 HepG2細胞とPXB細胞におけるHBV103-AdVシステムを用いたHBVゲノム複製

HBV103-AdVシステムによるHBVゲノム複製効率を検証するため、Southern解析と定量PCRを用いて複製HBVゲノムの検出を行った。複製型コンパクトHBVゲノムが挿入されたAdV（Ax-CM103G-kS）若しくは非複製型コンパクトHBVゲノムを有するAdV（Ax-CM103G-dP）と、同様のHBVゲノムを有するplasmid（pCM103G-kS、pCM103G-dP）を用い、各種細胞への遺伝子導入後6日目の細胞総DNAでHBVゲノム複製効率を比較検討した。

Southern解析では、複製HBVゲノムであるrc DNAとdsL DNAを表す2本のバンドがAx-CM103G-kS感染後のサンプルで明確に観察された（図12a左）。一方でpCM103G-kS導入後のサンプルでは露光過度条件でのみ複製HBVゲノムが確認

された（図12a右）。すなわちHBV103-AdVシステムによるHBVゲノム複製は plasmid transfectionに比べ高効率であることが示された。一般的なSouthern解析による細胞内複製HBVゲノムの検出は、細胞質分画の調製や、Hirt法等による環状DNAの濃縮が必要となる。しかし本解析では如何なる濃縮処理も施さない細胞総DNAから複製HBVゲノムを検出しており、実験工程が飛躍的に簡便化されたことになる。

次に、HBV103-AdVシステムによるHBVゲノム複製における総DNA中の複製産物量の定量を行った（図12b）。定量PCRでは環状分子であるrc DNAとccc DNAは同時に検出されるが、両者とも複製産物であるため複製効率の検討に用いた。Ax-CM103G-kSをHepG2細胞へMOI 3で感染した場合には1細胞あたり約10コピーの複製HBVゲノムが検出された（図12b左）。さらに、PXB細胞での同様の条件下では1細胞あたり40コピー以上の複製HBVゲノムが認められ（図12b右）、HepG2細胞よりも高いゲノム複製効率を示した。また、複製HBVゲノム量は複製型コンパクトHBVゲノム搭載AdVの感染量に依存する可能性も示唆された。すなわち、HBV103-AdVシステムはHBVゲノム保持plasmidに比べて複製HBVゲノムの効率的な産生において有効であると考えられた。

3.5 HBV103-AdVシステムの抗HBV活性評価への応用

HBV103-AdVシステムの応用例とし、HBVゲノム複製を抑制する既知逆転写阻害剤の薬効評価を行った。逆転写阻害剤は近年のHBV治療にも用いられており、エンテカビルやラミブジンはHBV生活環におけるpg RNAの逆転写を阻害することでゲノム複製を抑制することが知られている。将来的に迅速なハイスループットスクリーニングを可能とするために、本検証では96穴プレートのHuh-7細胞を用いた実験のフォーマット化を行った。非複製型コンパクトHBVゲノムを搭載したAx-CM103G-dP感染サンプルをバックグラウンドとし、複製型コンパクトHBVゲノムを含むAx-CM103G-ΔpreS感染サンプルにおける複製HBVゲノム量を定量PCRによって測定した。96穴プレートフォーマットにおけるHBV103-AdVシステムのZ'値⁴³は 0.64 ± 0.02 であり、指標0.50を超えた適切な実験系であることが示された。また、独立した実験間の変動係数は 12.0 ± 0.8 、SB比は 7668 ± 2892 、SN比は 16815 ± 9136 であることより、薬効評価に十分な精度を有していることが示唆された。

本システムで測定した逆転写酵素阻害剤であるエンテカビルとラミブジンにおける用量反応曲線を図13に示した。この結果から求めた半数濃度（EC₅₀）はエンテカビルが0.2 nM、ラミブジンが189 nMであり、ダック初代肝細胞を用い

て求めた既報のEC₅₀（各々0.13 nM、138 nM）とほぼ同程度であった⁴⁶。すなわ

ち、HBV103-AdVシステムはHBVゲノム複製の阻害剤候補となる薬剤の薬効評

価に有用であると考えられた。

3. 考察

本研究ではAdVの各種細胞への高い遺伝子導入効率を活かし、*in vitro*での効率的な新規HBVゲノム複製系を構築した。既報の1.29コピーHBVゲノムを有するAdVはゲノム内在性プロモーターとHBVゲノム由来poly(A)配列によってpg RNA発現単位が構成されており^{29,30}、HBVゲノム複製の継時的な検討や生検由来のヒト初代肝細胞におけるHBVゲノム複製実験が行われてきた。他にもHBVゲノム挿入AdVは、免疫治療や遺伝子治療のためにHBVゲノムの一部を目的遺伝子と置換した組換えHBVゲノムを細胞内へ導入するツールとして用いられた^{47,48}。今回新規に構築したHBV103-AdVシステムはCMVプロモーターと外来poly(A)配列をpg RNA発現単位に応用することで高効率なHBVゲノム複製を*in vitro*で再現する実験系である。

AdVの作製法は現在までに改良が重ねられており、以前はベクター作製が困難であった部位特異的組換え酵素Creやゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9タック質を発現するAdVも完全長ウイルスゲノム導入法⁴¹での作製が可能となった。しかし、HBVゲノム挿入AdVはこの方法を用いても作製が容易ではなかった。CMVプロモーターからpg RNAを発現するplasmidは汎用されているが、同様のAdVの報告がこれまでなかったのは、その作製が困難であったためと思わ

れる。ベクター作製用コスミドから切り出された10 µg相当のAdVゲノムは、通常であれば96穴プレートの293細胞のほぼ全てのウェルにおいてベクターの複製によって引き起こされる細胞変性効果（CPE）を示す。しかしHBVゲノム挿入AdV作製時は1/4程度のウェルでしかCPEが確認されなかった。一方でウイルスストックは一度得られれば高力価を示すため、実験への応用に十分なベクター量が確保出来る。ベクター作製は困難であるが得られたベクター力価は高いといった現象はCre発現AdVの作製時にも同様に確認される。

組換えAdVゲノムをtransfectionによって293細胞に導入してベクターを作製する際、AdVは増殖に必須なウイルスタンパク質を十分量発現した後、周囲の細胞への感染、増殖を繰り返してCPEを引き起こす。しかしこの過程において、HBV由来タンパク質の発現等が293細胞に影響を及ぼす場合は、AdVが十分に増殖する前に293細胞がアポトーシスに向かい、AdVが得られないことが考えられる。一方、一旦AdVが293細胞の変質より速く増殖すれば細胞の抗ウイルス機構に優り、高力価なウイルスストックが得られる。

培養細胞におけるHBVゲノム複製効率は極めて低く、HBV研究の推進が困難となる要因となっている。本研究では新規に構築したHBV103-AdVシステムがリポフェクションによるplasmid transfectionよりもはるかに高効率にHBVゲノム複

製を産生することを示した。但し、本研究ではplasmid transfectionとして用いているのはリポフェクションのみであり、他の手法を用いた場合のHBVゲノム複製は検討していない。HBV103-AdVシステムの効率的なHBVゲノム複製の要因としては、i) HBV103-AdVはウェル内のほぼ100%の細胞に感染してHBVゲノムを導入すること、ii) 各細胞に導入されるHBVゲノムコピー数が一般的に多いこと、iii) 外来プロモーターとpoly(A)の応用でpg RNAを安定化させたことの結果として、pg RNA転写量が大幅に増加した可能性が挙げられる。

HBV103-AdVはPXB細胞にも高い遺伝子導入効率を示すことから、HepG2細胞と同様にPXB細胞内の複製HBVゲノムコピー数を定量した。PXB細胞はSCIDマウスの80%の肝細胞をヒト肝細胞に置き換えたヒト化マウスの肝臓由来の初代肝細胞であり、正常な肝機能を保持し本来のHBVゲノム複製に近い環境を*in vitro*で再現できる^{36,37}。倫理問題上入手が困難となったヒト検体サンプルに代わり、PXB細胞のHBVゲノム複製実験系への応用はHepG2細胞やHuh-7細胞などの樹立細胞株とは異なった実験条件となるため、有用性が高いことが期待されていた。しかし、PXB細胞はplasmid transfectionによる遺伝子導入効率が極めて低く、精製したHBV感染粒子を用いる必要があった。本研究ではS遺伝子の機能を欠失した変異型HBVゲノムを有するAdVをPXB細胞に導入し、HBVの感染ステ

ップを除いたゲノム複製実験を行った。この結果はHBV103-AdVシステムの応用により、感染性を失った変異型HBVゲノムでもPXB細胞においてゲノム複製実験が行えるようになったことを示している。

HBV103-AdVはpg RNA発現単位をCMVプロモーターと外来poly(A)配列を応用してHBVゲノム複製に必須な最低限の機能領域のみで構成することで、HBVゲノムの重複配列を短くしている。コンパクトHBVゲノムのpg RNAの5'末端(5'キャップ)の塩基は、本来のCMVプロモーターが転写するCMV mRNAの5'末端の塩基と一致させており(図6a中段)、転写開始点より上流の塩基は全てCMVプロモーター由来である。すなわち、本来のpg RNAを転写させるためには、この塩基以上に短縮することはできない。同様に、 β -globin poly(A)配列に置き換えたHBV poly(A)配列の上流にはゲノム複製に必須な ϵ 配列があり、現状より上流まで欠失するとゲノム複製を低下させる可能性がある。従って、コンパクトHBVゲノムの重複(102塩基)以上にゲノムを短縮することはほぼ不可能であると考えられる。

AdVはベクター産生細胞である293細胞では 10^5 コピーまで増幅するため、ベクターゲノム上に存在する重複配列が相同組換えの原因となると考えられた。293細胞内での相同組換えの結果ベクターゲノムから切り出される偽ccc DNAは、

AdVがHepG2細胞等へ吸着、侵入する過程でベクターと同様に細胞内へ取り込まれ、HBVゲノム複製に関わらずに環状HBV DNA分子として検出されたと考えている。また、本システムで用いたコンパクトHBVゲノムの重複配列の長さは僅か102bpであり、293細胞内での相同組換えの頻度が大幅に減少したため偽ccc DNAがほぼ検出されなかったと考えられる。

偽ccc DNAは大腸菌内でのplasmidの増幅時における相同組換えによってもAdV同様に生成する可能性があるが、細胞内のplasmid由来のDNAのみを切断する制限酵素*DpnI*による処理を経ることで偽ccc DNAは消化される。そのため、*DpnI*処理を経たDNAサンプルからは偽ccc DNAは検出されないと考えられる。また動物細胞染色体内の配列同士では、数百コピー存在するトランスファーRNAの発現ユニットが安定であることから分かるように、相同組換えが起きないため細胞ゲノム内でのHBVゲノムは安定に存在する。すなわち、HBVゲノム挿入細胞株においては複数コピーのHBVゲノムが組み込まれていても相同組換えによる偽ccc DNAの生成は起きないと考えられる。

偽ccc DNAはHBVゲノム複製産物であるccc DNAと完全に同一の塩基配列と分子構造を持ち、本来のccc DNAの正確な検出を阻害する恐れがある。HBVの生活環や、持続感染の成立においてccc DNAの形成過程は重要な役割を担っており、

加えてその分子メカニズムは未だ解明されていない点が多い。偽ccc DNAの検出はAdVを用いたHBVゲノム複製実験系に限らず、plasmid transfectionによるHBVゲノム複製実験系においても*DpnI*処理が不完全となる可能性を考え合わせると、考慮すべき要素である。

HBV103-AdVシステムの考えられる応用例の一つはHBVゲノム複製を標的とした抗HBV薬候補化合物のスクリーニングである。化合物の一次スクリーニングには大きく分けて、試験管内で特定の酵素活性を評価する低次*in vitro*解析と、培養細胞における包括的な生理、代謝活性を評価する高次*in vitro*解析が挙げられる。高次*in vitro*解析を用いたスクリーニングの利点は、化合物が細胞内へ取り込まれる効率や、化合物が細胞の生存に与える影響が、薬効と同時に評価できる点である。

培養細胞を用いた従来の高次*in vitro*抗HBV化合物のスクリーニングはHBVゲノム挿入細胞株もしくはHBVゲノムを有するplasmid transfectionが用いられてきた。HBVゲノム挿入細胞株においては細胞ごとに等コピーのHBVゲノムが存在する条件下でHBVゲノム複製が誘導されるため、測定される複製抑制効果のばらつきも小さい。しかし、限られた細胞株だけでの実験結果しか得られないといった課題がある。また、plasmid transfectionを用いる実験系は操作が簡便だが、

HBVゲノム導入効率をすべての細胞で揃えることは困難である。そのため、導入されるHBVゲノムコピー数がばらつき、HBVゲノム複製効率が異なる細胞が集合した条件下で化合物の評価を行うことになる。さらに、HBV感染粒子を用いた実験系はより自然なHBV感染条件下での検討が可能であるが、感染性粒子を扱う危険性や、複製HBVゲノムの検出までの実験所要時間が長いといった課題があった。

HBV103-AdVシステムは培養細胞内で高いゲノム複製効率を示すことから、抗HBV薬候補化合物の一次スクリーニング系として有用であると考えられた。特に、AdV感染は導入するHBVゲノムコピー数をウェル内の全ての細胞で均一に制御できるため⁴⁹、本システムはウェル間、独立した実験間においてもばらつきの少ない複製ゲノム量を示す。本システムは細胞内でのHBVゲノム複製を包括的に評価する高次*in vitro*実験系であり、i) pg RNAの転写、ii) pg RNAのcore粒子への取り込み、iii) core粒子内での逆転写、iv) RNase活性によるpg RNAの消化、v) プラス鎖DNAの伸長といった各複製ステップを統合し、化合物による複製抑制効果を複製HBVゲノム量として定量可能である。

本システムではHBVゲノム複製のためにSタンパク質発現欠損型ゲノムを用い、より高効率な*in vitro*のHBVゲノム複製系の構築を目指した。感染粒子構成

タンパク質であるSタンパク質の発現抑制はHBVゲノムが放出されず細胞内に集積する結果、複製HBVゲノム量を上昇させると報告されている⁵⁰。加えて、CMVプロモーターの応用は細胞内のHBVゲノム複製に有利なpg RNAの転写量をもたらし、外来poly(A)配列として採用した β -globin poly(A)配列はpg RNAの安定性に寄与することで、HBV103-AdVシステムにおける高効率なHBVゲノム複製を実現した。これらの工夫により一般的には10日間以上必要だった細胞培養が大幅に短縮され、わずか4日間の培養条件で複製HBVゲノムの検出が可能となった。また、実験操作においてもサンプルDNAの抽出に細胞分画の単離やcore粒子の精製を必要とせずに、細胞総DNAから複製ゲノムを検出可能であった。特に一次スクリーニングは数万化合物からヒット化合物を選択するため、複製HBVゲノムの検出への本システムの応用は、簡便で実験所要時間が短いといった観点からも適していると言える。

また、感染粒子の形成に必須のSタンパク質を欠失したゲノムを用いた本システムでは、HBVの感染性は失われており、より安全性の高い実験系である。加えて、AdVは各種細胞に高い遺伝子導入効率を示すことから、HBV103-AdVシステムに用いる細胞株は限定されず、例えばiPS細胞等のあらゆる細胞でのHBVゲノム複製を簡便に評価できる。

逆転写酵素阻害剤として抗HBV活性を示すラミブジンとエンテカビルの従来の半数効果濃度 (EC_{50}) は、ダックHBV (DHBV) を感染したダック初代肝細胞における培養12日目のゲノム量⁴⁶や、HBVゲノムを有するHepG2.2.15株の培養10日目の上清中におけるゲノム量⁵¹、もしくは plasmid transfectionによってHBVゲノムが導入されたHepG2細胞における培養1週間以上のゲノム量^{52,53}を用いて算出されている。HBV103-AdVシステムの96穴フォーマットにおいて培養4日目のHuh-7細胞を用いて求めた EC_{50} は既報値と同程度を示した。Huh-7細胞はHepG2細胞に比べAdVの感染による遺伝子導入効率は劣るものの、培養細胞の継代費用が少ないといった利点がある。HBV103-AdVシステムは96穴フォーマットのHuh-7細胞においても安定で均一なpg RNA転写量を供給し、その結果誘導されるHBVゲノム複製量からZ'値 (0.64 ± 0.02) を算出した。Z'値は得られるデータのばらつきとシグナル強度を総合的に評価した実験系の精度を示すパラメーターで、0.5以上が望まれる。すなわち、本システムの堅牢性はHuh-7細胞においても十分担保されることが示された。

HBV103-AdVシステムは化合物のスクリーニングに限らず、他の機構によるHBVゲノム複製の抑制の検討も可能にした。HBVゲノムを標的とした short-hairpin shRNA (shRNA) は既にいくつか報告されているが^{54,55}、私はPeiら

が報告したHCV複製抑制において2つの異なるshRNAが相加的効果をもたらすことに着目した⁵⁶。今までに複数のHBVゲノムに対応するshRNAを設定し、単独のshRNAによるHBVゲノム複製の抑制効果の予備的な検討を行った。今後は3種類shRNAを選び単独のAdVから同時発現する新たなベクターを構築し、複数種類shRNAによるHBVゲノム複製の抑制効率を本システムを用いて検討する予定である。

HBV103-AdVシステムは、AdVを用いて複製型コンパクトHBVゲノムを細胞内に導入することで誘導される高効率なHBVゲノム複製系である。AdVは肝細胞癌由来細胞株に限らずヒト初代肝細胞に対しても高い遺伝子導入効率を示すことから、本システムの応用によってより多様な細胞を用いたHBVゲノム複製の解析が可能となった。加えて、本システムによる定量的な解析は抗HBV薬候補となる化合物のスクリーニングや、shRNAのHBVゲノム複製抑制効果の評価に有効であると考えられる。

4. 参考文献

1. Naghavi, M., Wang, H., Lozano, R., Davis, A., Liang, X., Zhou, M., Vollset, S. E., Ozgoren, A. A., Abdalla, S., Abd-Allah, F., Aziz, M. I. A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abraham, B., Abraham, J. P., Abuabara, K. E., Abubakar, I., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., Temesgen, A. M., *et al.* Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 385, 117–171, 2015.
2. Lavanchy, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.*, 3, 1–17, 2009.
3. Yoshikawa, A., Suzuki, K., Abe, A., Tanaka, T., Yamaguchi, K., Tanaka, T., Ishikawa, Y., Minegishi, K., Gotanda, Y., Yugi, H., Uchida, S., Satake, M., Mizoguchi, H. & Tadokoro, K. Effect of selective vaccination on a decrease in the rate of hepatitis B virus-positive Japanese first-time blood donors. *Transfus. Med.*, 19, 172–179, 2009.
4. Ganem, D. & Prince, A. M. Hepatitis B Virus Infection - Natural History and

- Clinical Consequences. *N Engl J Med*, 350, 1118–1129, 2004.
5. Sugauchi, F., Orito, E., Ohno, T., Tanaka, Y., Ozasa, A., Kang, J. H., Toyoda, J., Kuramitsu, T., Suzuki, K., Tanaka, E., Akahane, Y., Ichida, T., Izumi, N., Inoue, K., Hoshino, H., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Kakumu, S., Tomita, E., Okanoue, T., Nishiguchi, S., Murawaki, Y., Hino, K., Onji, M., Yatsushashi, H., Sata, M., Miyakawa, Y., Ueda, R. & Mizokami, M. Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan. *Hepatol. Res.*, 36, 107–114, 2006.
6. 肝炎診療ガイドライン作成委員会. B型肝炎治療ガイドライン（第2.2版）. 日本肝臓学会. 2016.
7. Hoofnagle, J. H., Peters, M., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Hallahan, C., Park, Y., Meschervitz, C. & Jones, E. A. Randomized, controlled trial of recombinant human α -interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 95, 1318–1325, 1988.
8. Alexander, G. J. M., Brahm, J., Fagan, E. A., Smith, H. M., Daniels, H. M., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, K. Loss of HBsAg with Interferon Therapy in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Lancet*, 330, 66–69, 1986.

9. Perrillo, R. P. Current Treatment of Chronic Hepatitis B : Benefits and Limitations. *Semin Liver Dis.*, 25, 20–28, 2005.
10. Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol.*, 20, 5427–5434, 2014.
11. Miyakawa, Y. & Mizokami, M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*, 46, 329–338, 2003.
12. Matsuura, K., Tanaka, Y., Hige, S., Yamada, G., Murawaki, Y., Komatsu, M., Kuramitsu, T., Kawata, S., Tanaka, E., Izumi, N., Okuse, C., Kakumu, S., Okanoue, T., Hino, K., Hiasa, Y., Sata, M., Maeshiro, T., Sugauchi, F., Nojiri, S., Joh, T., Miyakawa, Y. & Mizokami, M. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 1476–1483, 2009.
13. Seeger, C. & Mason, W. S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 479–480, 672–686, 2015.
14. Nassal, M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.*, 134, 235–249, 2008.
15. Stuyver, L. J., Locarnini, S. A., Lok, A., Richman, D. D., Carman, W. F.,

- Dienstag, J. L., Schinazi, R. F., Bartholomeusz, A., Di Bisceglie, A., De Man, R. A., Dusheiko, G., Furman, P. A., La Colla, P., Lai, C. L., Lau, J. Y. N., Manns, M. P., Niesters, H. G. M., Omata, M., Ono-Nita, S. K., Otto, M. J., Pillay, D., Poynard, T., Sommadossi, J. P., Shouval, D., Soriano, V., Thomas, H., Will, H. & Zoulim, F. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 33, 751–757, 2001.
16. Siddiqui, A. Trans-activation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product. 87, 7140–7144, 1990.
 17. Twu, J. S. & Schloemer, R. H. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.*, 61, 3448–3453, 1987.
 18. Sun, D. & Nassal, M. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J. Hepatol.*, 45, 636–645, 2006.
 19. Ladner, S. K., Otto, M. J., Barker, C. S., Zaifert, K., Wang, G. H., Guo, J. T., Seeger, C. & King, R. W. 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.*, 41, 1715–1720,

1997.

20. Sells, M. A., Zelent, A. Z., Shvartsman, M. & Acs, G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J. Virol.*, 62, 2836–2844, 1988.
21. Sells, M. A., Chen, M. L. & 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*, 84, 1005–1009, 1987.
22. Iwamoto, M., Watashi, K., Tsukuda, S., Aly, H. H., 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.*, 443, 808–813, 2014.
23. 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, 1–28, 2012.
24. Ginsberg, H. S. The Adenoviruses. New York: Plenum Press (1984).

25. Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. & Saito, I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1320–1324, 1996.
26. Zabner, J., Zeiher, B. G., Friedman, E. & Welsh, M. J. Adenovirus-mediated gene transfer to ciliated airway epithelia requires prolonged incubation time. *J. Virol.*, 70, 6994–7003, 1996.
27. Crystal, R. G., McElvaney, N. G., Rosenfeld, M. a, Chu, C. S., Mastrangeli, a, Hay, J. G., Brody, S. L., Jaffe, H. A, Eissa, N. T. & Danel, C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.*, 8, 42–51, 1994.
28. Suzuki, M., Kondo, S., Pei, Z., Maekawa, A, Saito, I. & Kanegae, Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: The E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene Ther.*, 22, 421–429, 2015.
29. Sprinzl, M. F., Oberwinkler, H., Schaller, H. & Protzer, U. Transfer of Hepatitis B Virus Genome by Adenovirus Vectors into Cultured Cells and Mice : Crossing

- the Species Barrier. *J. Virol.*, 75, 5108–5118, 2001.
30. Ren, S. & Nassal, M. Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors. *J. Virol.*, 75, 1104–1116, 2001.
31. Kramvis, A. & Kew, M. C. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat*, 6, 415–427, 1999.
32. Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. & Schaffner, W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41, 521–530, 1985.
33. Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193–199, 1991.
34. Nassal, M. The Arginine-Rich Domain of the Hepatitis-B Virus Core Protein Is Required for Pregenome Encapsidation and Productive Viral Positive-Strand DNA-Synthesis but Not for Virus Assembly. *J. Virol.*, 66, 4107–4116, 1992.
35. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36,

59–74, 1977.

36. Ishida, Y., Yamasaki, C., Yanagi, A., Yoshizane, Y., Fujikawa, K., Watashi, K., Abe, H., Wakita, T., Hayes, C. N., Chayama, K. & Tateno, C. Novel Robust in Vitro Hepatitis B Virus Infection Model Using Fresh Human Hepatocytes Isolated from Humanized Mice. *Am. J. Pathol.*, 185, 1275–1285, 2015.
37. Yamasaki, C., Kataoka, M., Kato, Y., Kakuni, M., Usuda, S., Ohzone, Y., Matsuda, S., Adachi, Y., Ninomiya, S., Itamoto, T., Asahara, T., Yoshizato, K. & Tateno, C. In vitro evaluation of cytochrome P450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25, 539–550, 2010.
38. Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kato, T., Orito, E., Ito, K., Acharya, S. K., Gish, R. G., 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*, 44, 915–924, 2006.
39. Radziwill, G., Tucker, W. & Schaller, H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J. Virol.*, 64, 613–620, 1990.

40. Maekawa, A., Pei, Z., Suzuki, M., Fukuda, H., Ono, Y., Kondo, S., Saito, I. & Kanegae, Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Sci. Rep.*, 3, 1136, 2013.
41. Fukuda, H., Terashima, M., Koshikawa, M., Kanegae, Y. & Saito, I. Possible mechanism of adenovirus generation from a cloned viral genome tagged with nucleotides at its ends. *Microbiol Immunol*, 50, 643–654, 2006.
42. Pei, Z., Kondo, S., Kanegae, Y. & Saito, I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to vector titration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417, 945–950, 2012.
43. Zhang, J., Chung, T. & Oldenburg, K. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.*, 4, 67–73, 1999.
44. Guhaniyogi, J. & Brewer, G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, 265, 11–23, 2001.
45. Affolter, M., Côté, J., Renaud, J. & Ruiz-Carrillo, A. Regulation of histone and

- beta A-globin gene expression during differentiation of chicken erythroid cells.
Mol. Cell. Biol., 7, 3663–72, 1987.
46. Marion, P. L., Salazar, F. H., Winters, M. A. & Colonno, R. J. Potent Efficacy of Entecavir (BMS-200475) in a Duck Model of Hepatitis B Virus Replication.
Antimicrob. Agents Chemother., 46, 82–88, 2002.
47. Wang, Z., Zhu, K., Bai, W., Jia, B., Hu, H., Zhou, D., Zhang, X., Zhang, X., Xie, Y., Bourguine, M. M., Michel, M. L., Lan, K., Deng, Q. & Sandri-Goldin, R. M. Adenoviral Delivery of Recombinant Hepatitis B Virus Expressing Foreign Antigenic Epitopes for Immunotherapy of Persistent Viral Infection. *J. Virol.*, 88, 3004–3015, 2014.
48. Liu, J., Cheng, X., Guo, Z., Wang, Z., Li, D., Kang, F., Li, H., Li, B., Cao, Z., Nassal, M. & Sun, D. Truncated Active Human Matrix Metalloproteinase-8 Delivered by a Chimeric Adenovirus-Hepatitis B Virus Vector Ameliorates Rat Liver Cirrhosis. *PLoS One*, 8, e53392, 2013.
49. Kondo, S., Takata, Y., Nakano, M., Saito, I. & Kanegae, Y. Activities of Various FLP Recombinases Expressed by Adenovirus Vectors in Mammalian Cells. *J. Mol. Biol.*, 390, 221–230, 2009.

50. Lentz, T. B. & Loeb, D. D. Roles of the Envelope Proteins in the Amplification of Covalently Closed Circular DNA and Completion of Synthesis of the Plus-Strand DNA in Hepatitis B Virus. *J. Virol.*, 85, 11916–11927, 2011.
51. Innaimo, S. F., Seifer, M., Bisacchi, G. S., Standring, D. N., Zahler, R. & Colonno, R. J. Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1444–1448, 1997.
52. Langley, D. R., Walsh, A. W., Baldick, C. J., Eggers, B. J., Rose, R. E., Levine, S. M., Kapur, A. J., Colonno, R. J. & Tenney, D. J. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J. Virol.*, 81, 3992–4001, 2007.
53. King, R. W., Ladner, S. K., Miller, T. J., Zaifert, K., Perni, R. B., Conway, S. C. & Otto, M. J. Inhibition of human hepatitis B virus replication by AT-61, a phenylpropenamide derivative, alone and in combination with (-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 3179–3186, 1998.
54. Sun, C. P., Wu, T. H., Chen, C. C., Wu, P. Y., Shih, Y. M., Tsuneyama, K. & Tao, M. H. Studies of efficacy and liver toxicity related to adeno-associated virus-mediated RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 24, 739–50, 2013.

55. Carmona, S., Ely, A., Crowther, C., Moolla, N., Salazar, F. H., Marion, P. L., Ferry, N., Weinberg, M. S. & Arbuthnot, P. Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol. Ther.*, 13, 411–421, 2006.
56. Pei, Z., Shi, G., Kondo, S., Ito, M., Maekawa, A., Suzuki, M., Saito, I., Suzuki, T. & Kanegae, Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Sci. Rep.*, 3, 3575, 2013.
57. 斎藤 泉. アデノウイルス・ベクター. 第41回日本ウイルス学会学術集会, 北海道, 1993

5. 謝辞

本研究は東京医科学研究所 遺伝子解析施設で行われました。本研究の遂行及び論文の執筆にあたり、多大な御指導・御鞭撻を賜りました、東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設 施設長 斎藤 泉教授、近藤 小貴助教、中西 友子助教、東京慈恵会医科大学 基盤研究施設 鐘ヶ江 裕美准教授、浜松医科大学 感染症学講座 鈴木 哲朗教授、並びに微生物科学研究所 第3生物活性研究部 山崎 学上級研究員に深く感謝いたします。

また、在籍した東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設で貴重な助言を頂きましたメンバーの皆様、研究を支えてくださった秘書の方々に深く感謝致します。

6. 図表

図1 HBVゲノムの構造

図2 HBVの生活環

図3 第一世代アデノウイルスベクター (AdV)

図4 構築したHBVゲノムの塩基配列

図5 コンパクトHBVゲノムを用いたpg RNA発現単位の塩基配列

(a) CMVプロモーターとコンパクトHBVゲノムの接続配列

(b) コンパクトHBVゲノムとb-globin poly(A)配列の接続配列

図6 kSゲノムにおけるSSタンパク質の発現欠失の確認

図7 定量PCRによるAdV力価測定法

(a) 測定手順

(b) コントロールベクターの力価測定

(c) 目的ベクターの力価測定

表1 定量PCRで用いたプライマー／プローブの配列

表2 PCRで用いたプライマー／プローブの配列

図8 PCRで環状の複製HBVゲノムのみを検出するプライマーの設計

(a) 模式図

(b) HBVゲノム上のプライマー配列

図9 AdV及びplasmid transfectionによるGFP導入効率の検討

(a) GFP発現plasmid及びGFP発現AdVの構造

(b) GFP蛍光写真

(c) GFP蛍光強度

図10 HBVゲノム搭載AdVによるpg RNAの転写量

(a) AdVに挿入されたpg RNA発現単位の模式図

(b) core/pg RNAの転写量の比較

(c) 複製HBVゲノムの検出

図11 偽ccc DNAの検出

(a) AdVに挿入されたHBVゲノムの構造

(b) PCRによるHBV配列を有する環状分子、AdVゲノム、及びGAPDH
の検出

図12 複製HBVゲノムの検出及び定量

(a) 複製HBVゲノムの検出

(b) 複製HBVゲノムの定量

図13 HBV103-AdVシステムを用いたHuh-7細胞における逆転写阻害剤の

HBVゲノム複製阻止効率の検証

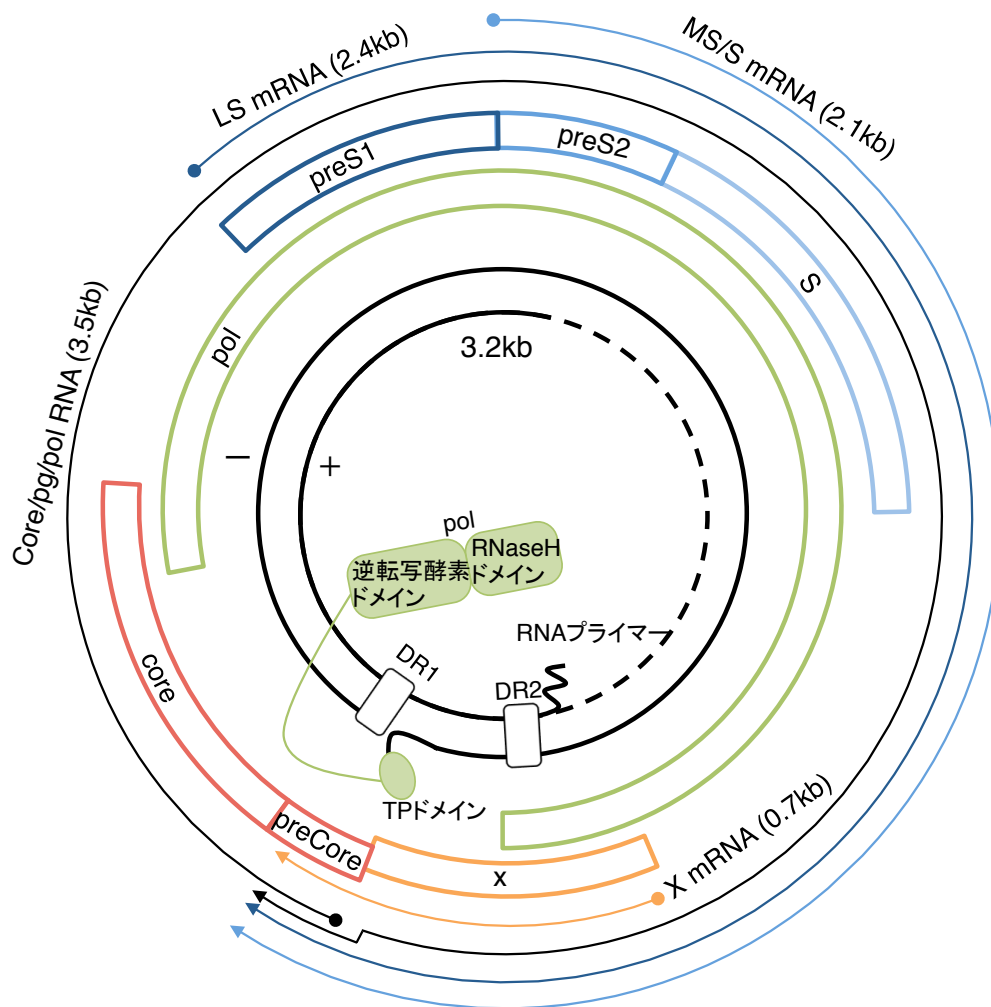


図1 HBVゲノムの構造 (Seeger *et al.*, *Virology*, 2015¹³を改変)

HBVゲノムは3.2 kbの環状不完全二本鎖DNA (relaxed circular DNA: rc DNA) である。ゲノム上にはDR1、DR2と呼ばれるゲノム複製に関わる配列が存在する。polタンパク質の末端タンパク (TP) ドメインはマイナス鎖DNAの5'側に結合し、逆転写酵素ドメイン、RNaseHドメインがHBVゲノムDNAを合成する。プラス鎖DNAではRNAプライマーが起点となりDNAが伸長する。

HBVゲノムには大きく分けてcore、pol、S、Xの4種類の遺伝子が読み枠をずらしながらコードされている。ゲノム内在性coreプロモーターからは3.5kbのcore/pol mRNAと逆転写の鋳型となるpregenomic RNA (pg RNA) が転写される。preS1プロモーターからはLS mRNAが、preS2プロモーターからはMS及びSS mRNAが転写される。XプロモーターからはX mRNAが転写される。全てのmRNAは共通のpoly(A)配列によってポリアデニル化が起きる。

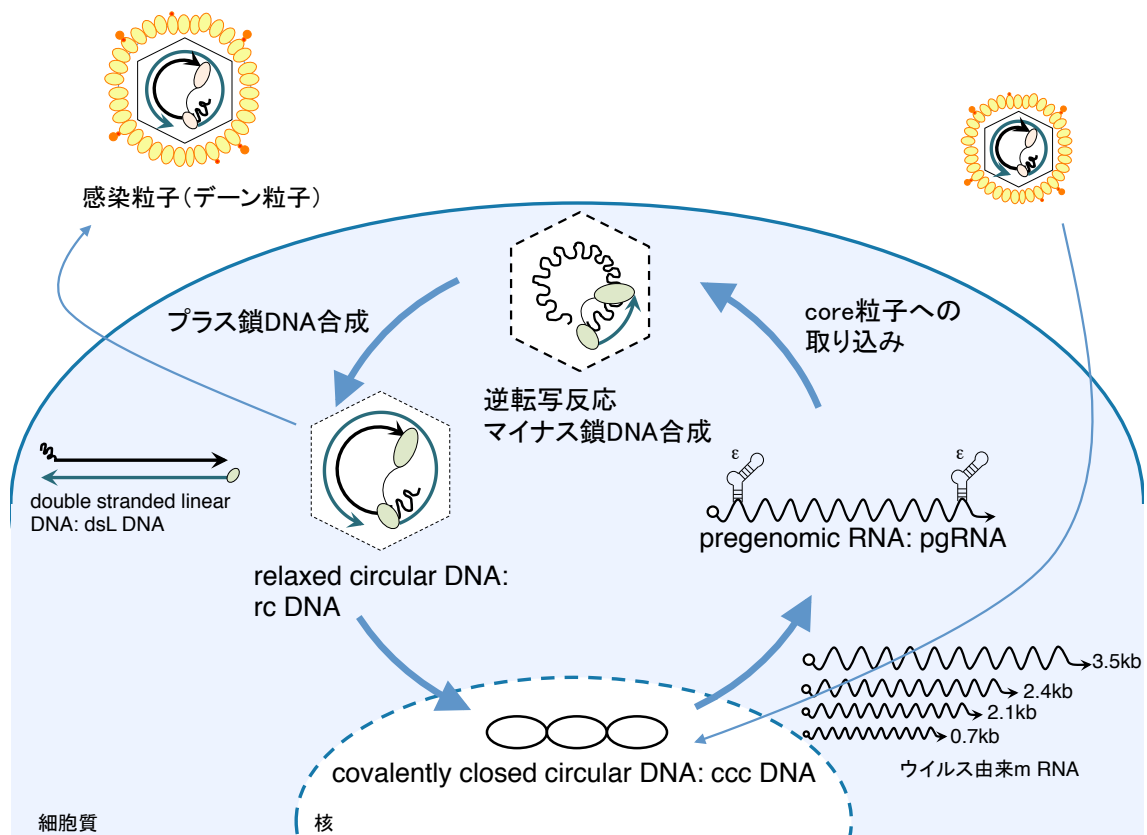


図2 HBVの生活環

HBVゲノムは核内で環状完全二本鎖DNA (covalently closed circular DNA: ccc DNA) となって持続感染が成立する。ccc DNAはウイルス由来mRNA及びゲノム複製の中間産物であるpregenomic RNA (pg RNA) を供給する。pg RNAはステムループ構造をとる ϵ (エプシロン) 領域の認識が認識されることによってcore粒子内へ取り込まれ、そこでウイルス由来polタンパク質による逆転写反応の鋳型となる。逆転写反応で合成されたマイナス鎖DNAは鋳型となり、RNAプライマーを起点としてプラス鎖DNAが7割程度伸長する。RNAプライマーの正常なアニールは約9割の確率で起こりrc DNAを形成するが、残りの1割では直鎖状二本鎖DNAが形成される。rc DNAの一部は核内へと移行し、プラス鎖が完全に合成され、ccc DNAが形成される。

rc DNAゲノムを有するcore粒子はエンベロープを被り感染粒子 (デーン粒子) として細胞外へ放出される。

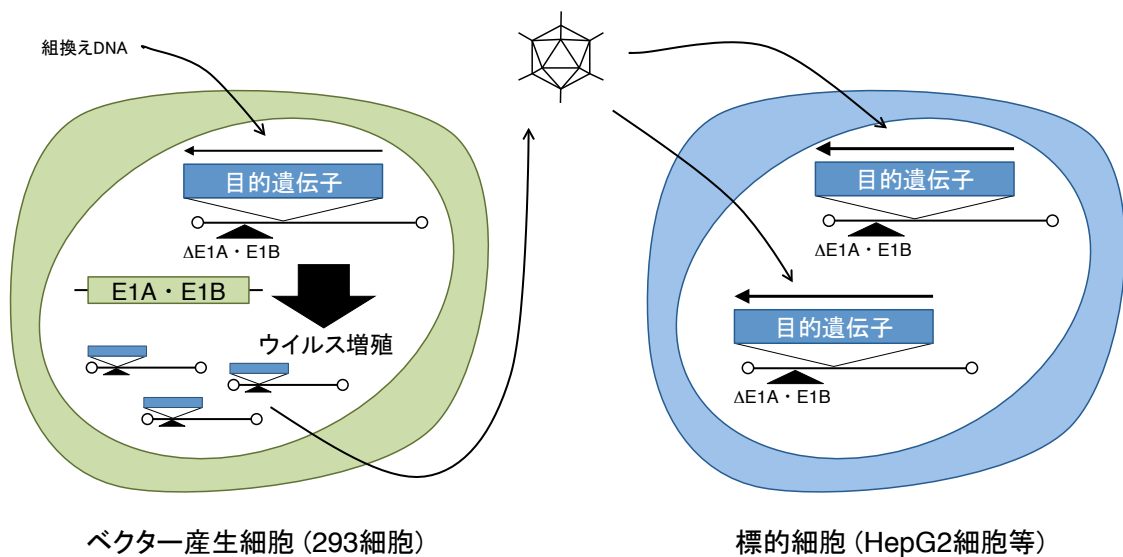


図3 第一世代アデノウイルスベクター (AdV) (Saito *et al.*, 第41回日本ウイルス学会学術総会, 1993⁵⁷を改変)

アデノウイルスの全ての初期遺伝子プロモーターはE1領域から発現するE1タンパク質によってトランスに活性化する。E1領域を目的遺伝子発現単位と置換しているAdVはE1タンパク質を恒常的に発現する293細胞でのみウイルス増殖が可能であり、標的細胞においてはウイルス由来タンパク質は発現せずに目的遺伝子のみを発現する。

Δpres

```
S frame
1001 T CCC AAT CCT CTG GGA TTC TTT CCC GAT CAC CAG TTG GAC CCG GCG TTC GGA GCC AAC TCA AAT CCA GAT TGG GAC TTC AAC CCC AAC AAG GAT CAT 1100
1101 TGG CCA GAG GCA AAT CAG GTA GGA GGG GGA GCA TTC GGG CCA GGG TTC ACC CCA CCA CAC GGC GGT CTT TTG GGG TGG AGC CCA CAG GCA GGC GTA T 1200
1201 TG ACA ACC GTG CCA GTA GCA CCT CCT CCT GGC TCC ACC AAT CCG CAG TCA GGA AGA CAG CCT ACT CCC ATC TCT CCA CCT CTA AGA GAC AGT CAT CCT CA 1300
1301 G GCC ATG CAA TGG AAC t ccg aat tcc aca ACA TTC CAC CAA GCT CTG CTA GAC CCC AGA GTG AGG GGC CTA TAT CTT CCT GCT GGT GGC TCC AGT TCC G 1400
1317
synthetic DNA carrying EcoRI site
Met (pres2)
```

kS

```
S frame
1401 AAC CCT GTT CCG ACT ACT GCC TCA CCC ATA TCG TCA ATC TTC TCG AGG ACT GGG GAC CCT GTA CAG AAC ACG GAG AAC ACA ACA TAA GGA TTC CTA GGA C 1500
1501 CC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCA CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CTA GGG GG 1600
1601 A GCA CCC ACG TGT CCT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC TCA CCA ACC TCT TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGC TGA GTC TGG ACG TCT CTG 1700
1701 CGG CGT TTT ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAC CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA CTT C 1800
```

dP

```
Pol frame
1501 C CCT GCT CGT GTT ACA GGC GGG GTT TTT CTT GTT GAC AAG AAT CCT CAC AAT ACC ACA GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TCT AGG GGG 1600
1601 AGC ACC CAC GTG TCC TGG CCA AAA TTC GCA GTC CCC AAC CTC CAA TCA CTC ACC AAC CTC TTG TCC TCC AAT TTG TCC TGG CTA TGT CTG GAT GTG TCT G 1700
1701 CG GCG TTT TAT CAT ATT CCT CTT CAT CCT GCT ATG CCT CAT CTT GTT GGT TCT TCT GGA CTA CCA AGG TAT GTT GCC CGT TTG TCC TCT ACT TC 1800
1801 C AGG AAC ATC AAC TAC CAG CAC GGG ACC ATG CAA GAC CTG CAC GAT TCC TGC TCA AGG AAC CTC TAT GTT TCC CTC TTG TTG CTG TAC AAA ACC TTC GGA 1900
1901 CGG AAA CTG CAC TTG TAT TCC CAT CCC ATC ATC CTG GGC TTT CGC AAG ATT CCT ATG GGA GTG GGC CTC AGT CCG TTT CTC CTG GCT CAG TTT ACT AGT G 2000
2001 CG ATT TGT TCA GTG GTT CGT AGG GCT TTC CCC CAC TGT TTG GCT TTC AGT TAT ATG GAT GAT GTG GGA TTT GGT GGC AGC AAG TCT GTA CAA CAT CTT GAG TC 2100
XcmI
```

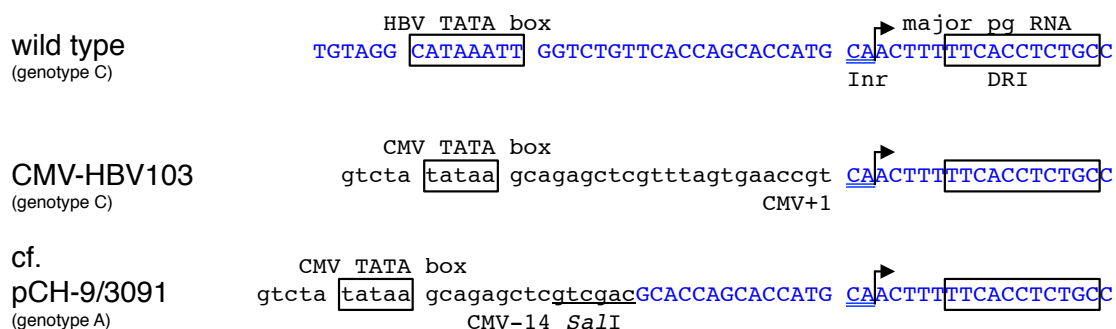
図4 構築したHBVゲノムの塩基配列

core遺伝子の開始コドンATGのAをI nt（塩基配列の起点）とする。Δpresゲノムは赤く囲ったpres領域を欠失しており、7塩基の合成DNAと置き換えている。S遺伝子、pol遺伝子の読み枠は合っており、polタンパク質は一部欠損するが機能を保持し、HBVゲノムは複製する。

kSゲノムはSSタンパク質の開始コドンと2番目のATGに変異を導入し、さらに終始コドンを導入してSタンパク質の発現を欠失させた複製型HBVゲノムである。これらの変異はpol遺伝子のアミノ酸を変更しない。

dPゲノムは赤く囲ったpolタンパク質逆転写酵素ドメインの一部を欠失しているため、ゲノム複製しないHBVゲノムである。

a



b

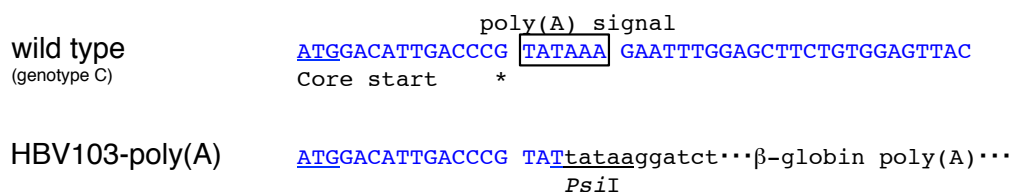


図5 コンパクトHBVゲノムを用いたpg RNA発現単位の塩基配列

大文字のアルファベットはHBVゲノム配列、小文字のアルファベット配列は外来の配列を表している。矢印は主なpg RNA転写開始点、Inrは転写開始誘導配列、下線は制限酵素認識配列、アスタリスクはHBVの遺伝子型によって異なる塩基を示している。

(a) CMVプロモーターとコンパクトHBVゲノムの接続配列。pg RNAの5'末端(キャップ)はCMVプロモーター直下にある遺伝子のmRNA 5'キャップと一致している。

(b) コンパクトHBVゲノムとβ-globin poly(A)配列の接続配列。

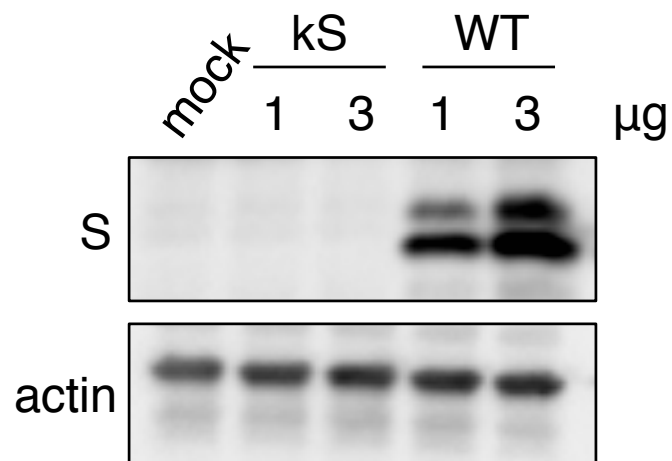
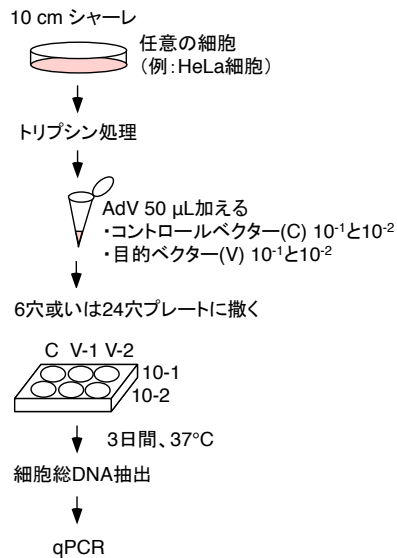


図6 kSゲノムにおけるSSタンパク質の発現欠失の確認

kSゲノムおよび野生型HBVゲノムを有するplasmidが導入されたHuh-7細胞より、細胞総タンパク質を抽出してwestern解析に供した。上段はSSタンパク質に対する抗体で、下段は β -actinに対する抗体で標識した。この抗体ではMSタンパク質とSSタンパク質の両方が検出される。

a) 手順



b) コントロールベクター: AxCAGFP

2.4×10^8 コピー/mL
 2.5×10^8 TCID₅₀/mL
 ↓
 目的ベクター算出に用いる

c) 目的ベクター力価測定
 (relative vector titer: rVT/mL)

コントロールベクターのCt値
 10^{-2} 希釈: 22.6
 $22.6 = 2.5 \times 10^6$ TCID₅₀

目的ベクターのCt値
 10^{-2} 希釈: 19.4

計算

$$\text{rVT/mL} = 2^{(\text{コントロールベクターのCt値} - \text{目的ベクターのCt値})} \times \text{希釈倍率} \times \text{コントロールベクターのTCID}_{50}$$

$$= 2^{(22.6 - 19.4)} \times 1/10^{-2} \times 2.5 \times 10^6$$

$$= 2.3 \times 10^9 \text{ rVT/mL}$$

図7 定量PCRによるAdV力価測定法 (Pei *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2012⁴²)

(a) 測定手順。AdV増殖可能な293細胞の細胞変性を応用したTCID₅₀法などで、既にベクター力価が既知のコントロールベクターAxCAGFPを基準に目的ベクターの力価を相対的に算出するための実験法を示した（相対的ベクター力価；rVT/mL）。

(b) コントロールベクターの力価測定。AxCAGFPのコピー数は 2.4×10^8 コピー/mLであり、TCID₅₀法で測定した 2.5×10^8 TCID₅₀/mLとほぼ変わらないため、これを目的ベクターの算出に用いた。

(c) 目的ベクターの力価測定。コントロールベクターのCt値に対する目的ベクターのCt値の差から目的ベクターの力価を算出した。

用途	標的	向き	塩基 (nt)	配列 (5'-3')
AdV力価測定	pIX	Forward		TGTGATGGGCTCCAGCATT
		Reverse		TCGTAGGTCAAGGTAGTAGAGTTTGC
		Probe		ATGGTCGCCCCGTCCTGCC
	Actin	Forward		CTCGCAGCTCACCATGGAT
		Reverse		ATGCCGGAGCCGTTGTC
		Probe		ATGATATCGCCGCGCTCGTCGT
core/pg RNA定量	Core	Forward	75 - 82	GCCTTCTGACTTCTTTCTTCTATTTC
		Reverse	110 - 131	GACTCTAAGGCCTCCCGATACA
		Probe	84 - 108	AGATCTCCTCGACACCGCCTCAGCT
複製HBVゲノム定量	circular genome	Forward	2641 - 2659	CGGCACCGACAACCTCTGTT
		Reverse	137 - 161	GCTGTATGGTGAGGAGAACAATGTT
		Probe	2897 - 2917	CACTTCGCTTCACCTCTGCAC

表1 qPCRで用いたプライマー／プローブの配列

HBVゲノム配列を標的とするプライマーに関しては対応する塩基数を示した。
core遺伝子の開始コドンATGを1 nt（塩基配列の起点）とする。

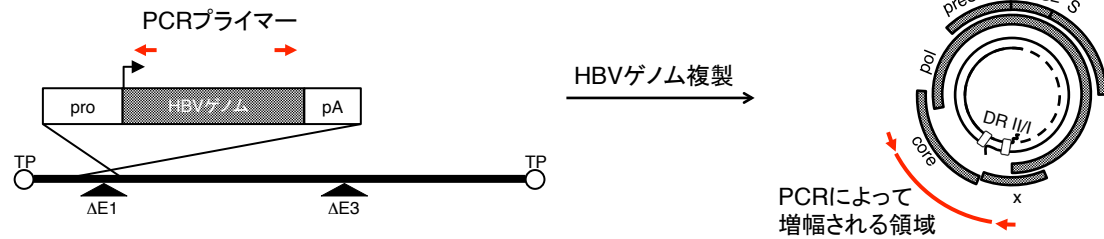
標的	向き	塩基 (nt)	配列 (5'-3')
環状HBVゲノム	Forward	3010 - 3036	GCGCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTG
	Reverse	320 - 346	GCGGAACAGTTTCTCTTCCAAAAGTAAGAC
E4	Forward		CGCGGCAGCAGCGGATGATCCTCCAGTATG
	Reverse		GCGACTACTACACAGAGCGATCTAAGCGG
GAPDH	Forward		CGCGCTTAGC ACCCCTGGCCAAGGTCATCC
	Reverse		GCGTCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACCAC

表2 PCRで用いたプライマーの配列

環状HBVゲノムを検出するPCRに用いた。HBVゲノム配列を標的とするプライマーに関しては対応する塩基数を示した。core遺伝子の開始コドンATGを1 nt（塩基配列の起点）とする。

a

HBV103-AdV



b

	1st ATG of Core					
1	atggacattg	acccgtataa	agaattttgga	gcttctgtgg	agttactctc	50
51	ttttttgcct	tctgacttct	ttccttctat	tcgagatctc	ctcgacaccg	100
				reverse for qPCR		
101	cctcagctct	gtatcgggag	gccttagagt	ctccggaaca	ttgttctcct	150
	(137-161 nt)					
151	caccatacag	cactcaggca	agctattctg	tgttgggggtg	agttgatgaa	200
201	tctggccacc	tgggtgggaa	gtaatttga	agatccagca	tccagggaat	250
251	tagtagtcag	ctatgtcaat	gttaatatgg	gcctaaaaat	cagacaacta	300
			reverse for PCR (320-346 nt)			
301	ctgtggtttc	acatttctgt	tcttactttt	ggaagagaaa	ctgttcttga	350
351	gtatttggtg	tcttttgag	tgtggattcg	cactcctcct	gcttacagac	400
	. . .					
2501	gctgacgcaa	ccccacttgg	atggggcttg	gctatcggcc	atcgccgcat	2550
2551	gcgtggaacc	tttgtggctc	cgctgccgat	ccatactgcg	gaactcctag	2600
				forward for qPCR (2641-		
2601	cagcttgttt	tgtctgcagc	cggtctggag	cgaaacttat	cggcaccgac	2650
	2659 nt)					
2651	aactctgttg	tcctctctcg	gaaatacacc	tcatttccat	ggctgctagg	2700
2701	gtgtgctgcc	aactggatcc	tgcgcgggac	gtcctttgtc	tacgtcccgt	2750
2751	cggcgctgaa	tccgcgggac	gaccgcgtctc	ggggccggtt	gggactctat	2800
2801	cgtccccttc	ttcatctgcc	gttccggccg	accacggggc	gcacctctct	2850
				probe		
2851	ttacgcggtc	tccccgtctg	tgccttctca	tctgccggac	cggtgtgcact	2900
	for qPCR (2897-2917 nt)					
2901	tcgcttcacc	tctgcacgtc	gcatggaaac	caccgtgaac	gcccaccagg	2950
2951	tcttgcccaa	ggtcttatat	aagaggactc	ttggactctc	agcgatgtca	3000
3001	acgaccgacc	ttgaggcata	cttcaaagac	tgtttgttta	aggactggga	3050
3051	ggagttgggg	gaggagatta	ggttaaagat	ttttgtacta	ggaggctgta	3100
	forward for PCR (3010-3036 nt)					
3101	ggcataaatt	ggtctgttca	ccagcaccat	gcaacttttt	cacctctgcc	3150
3151	taatcatctc	atgttcatgt	cctactgttc	aagcctccaa	gctgtgcctt	3200
3201	gggtggcttt	ggggc				

図8 PCRで環状の複製HBVゲノムのみを検出するプライマーの設計

(a) 模式図。AdVゲノム上に挿入されたHBV DNAは直鎖状である。PCRプライマーをAdVゲノム上のHBV DNAに対してtail to tailで設計した場合、HBVゲノム複製の結果生成する環状HBVゲノムでのみプライマー間が増幅される。

(b) HBVゲノム上のプライマー配列。core遺伝子の開始コドンATGを1 nt (塩基配列の起点) とする。緑で示したプライマー／プローブは複製HBVゲノムを定量するqPCRに、オレンジで示したプライマーは環状HBVゲノムを検出するPCRに用いた。

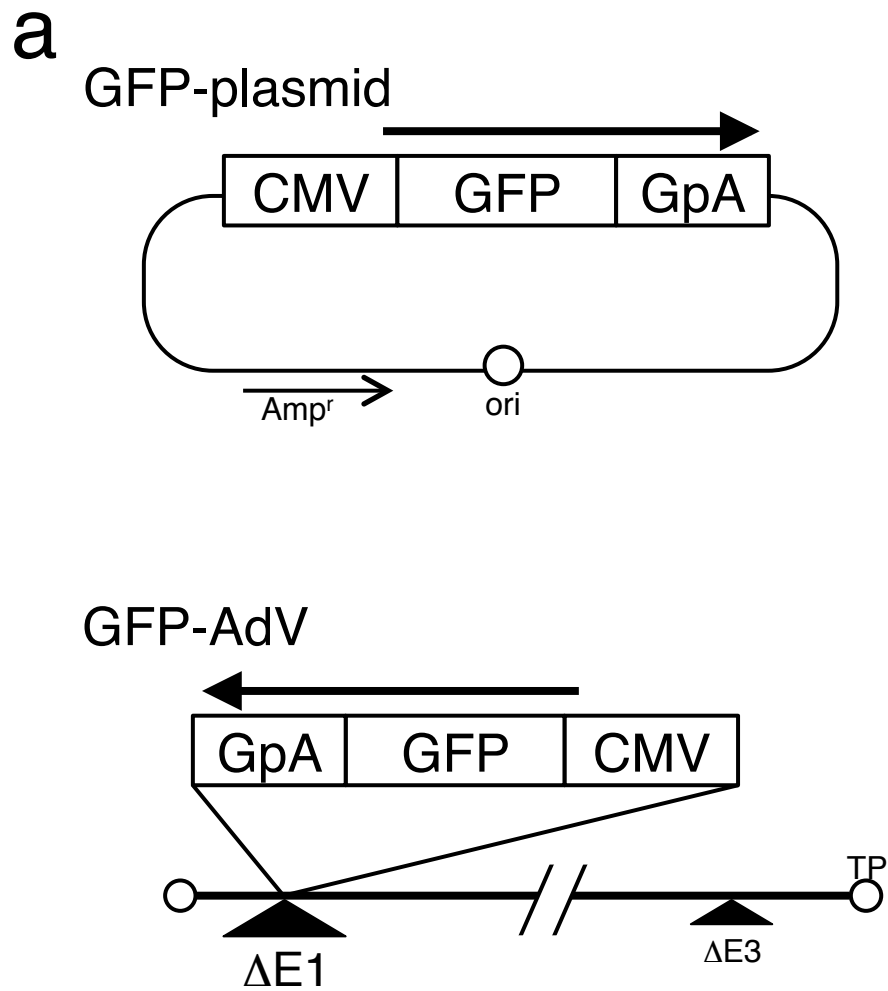


図9a AdV及びplasmid transfectionによるGFP導入効率の検討

GFP発現plasmid及びGFP発現AdVの構造。‘CMV’はCMVプロモーターを、
‘GpA’はβ-globin poly(A)配列を示す。

b

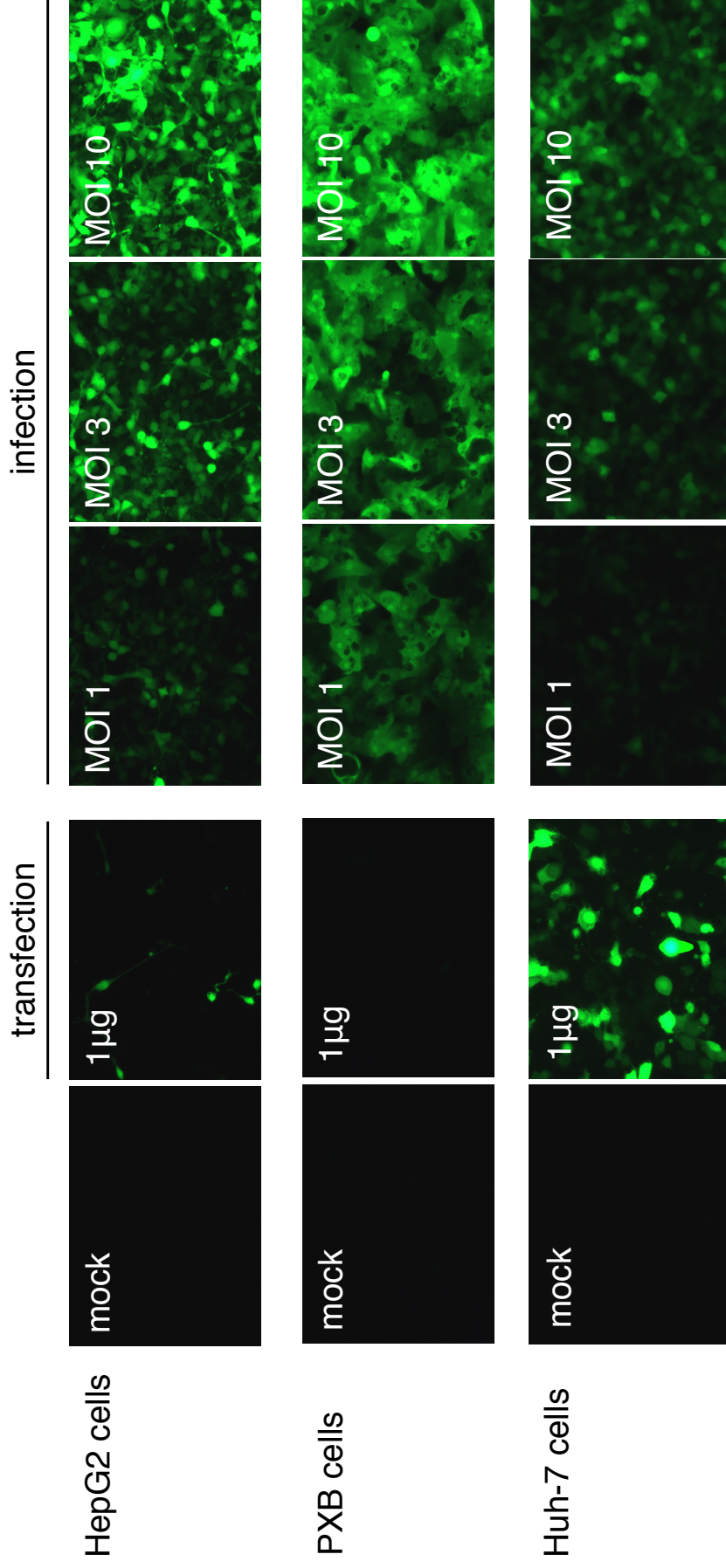


図9b AdV及びplasmid transfectionによるGFP導入効率の検討

GFP蛍光写真。表記条件でGFPを導入した細胞における3日間培養後のGFP発現を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

C

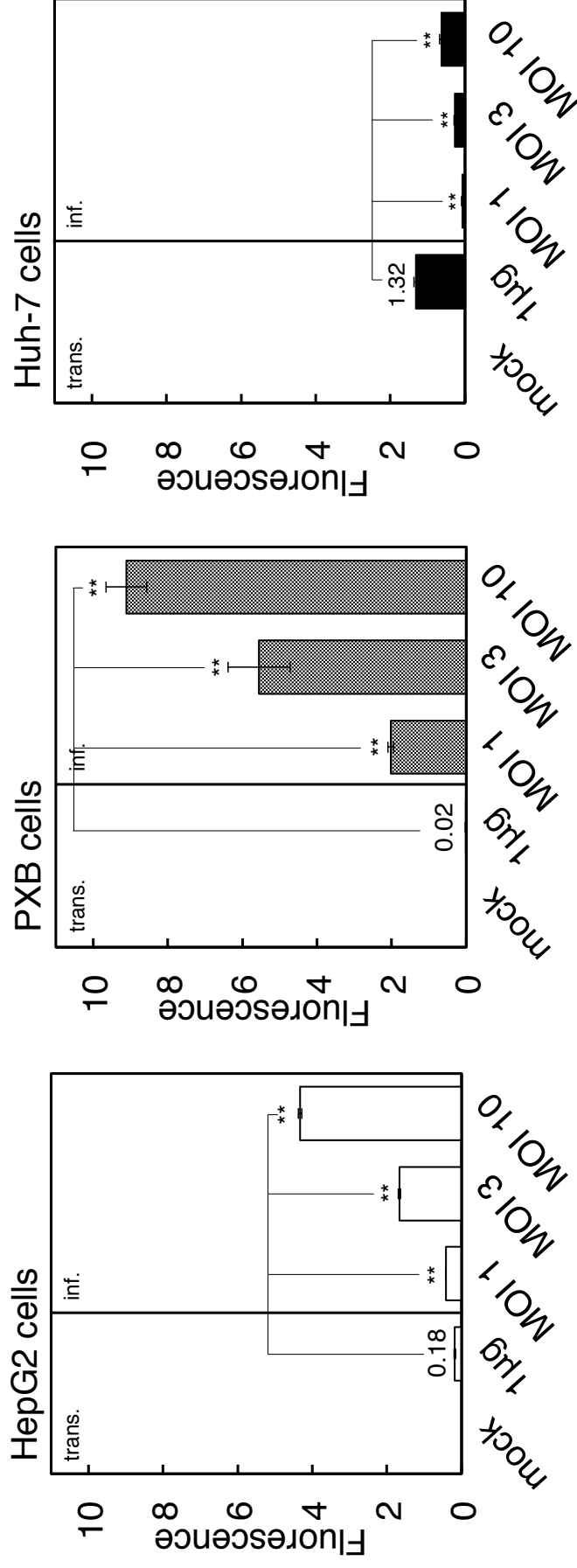


図9c AdV及びplasmid transfectionによるGFP導入効率の検討

GFP蛍光強度。(b) と同条件の細胞におけるGFP蛍光強度を測定した。独立した3回の実験の結果を示す。エラーバーは標準偏差を表す。 $**P < 0.01$

a

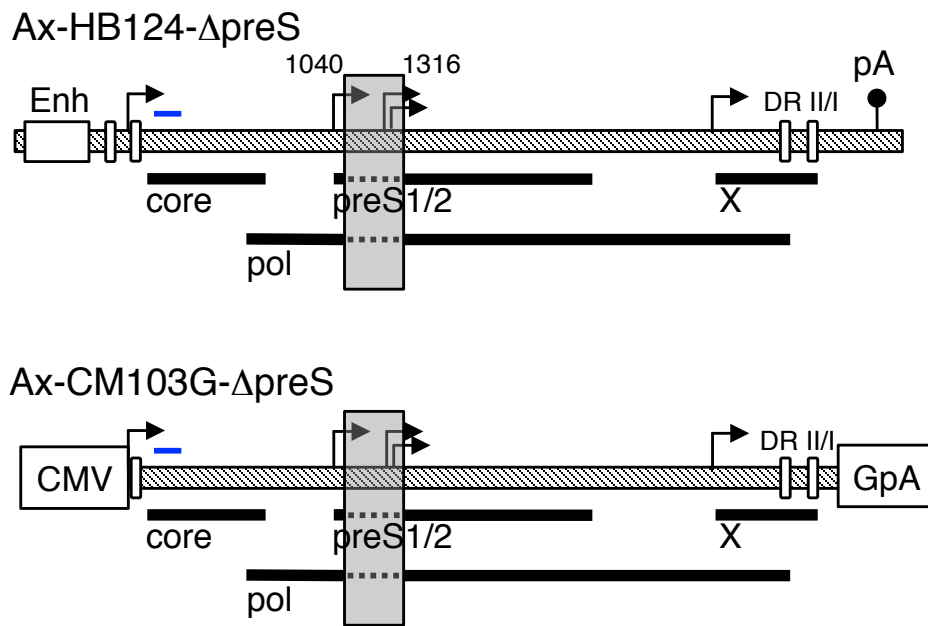


図10a HBVゲノム搭載AdVによるpg RNAの転写量

AdVに挿入されたpg RNA発現単位の模式図。Ax-HB124-ΔpreSはHBVゲノム内在性coreプロモーターとHBVゲノム上poly(A)配列によってpg RNAを転写する。Ax-CM103G-ΔpreSはCMVプロモーターとβ-globin poly(A)配列を用いてpg RNAを転写する。ΔpreSゲノムの欠失領域はグレーの四角で示した。太線はHBVゲノム上のORFを、点線はHBV由来タンパク質の発現欠失に対応するゲノム領域を示している。矢印は転写開始点を、‘Enh’は内在性coreプロモーターのエンハンサー領域を、‘pA’はHBVゲノム上のpoly(A)配列を、DR II/IはHBVゲノム複製に関わる繰り返し配列を、青線はqPCRのプライマー／プローブ設定領域を示している。

b

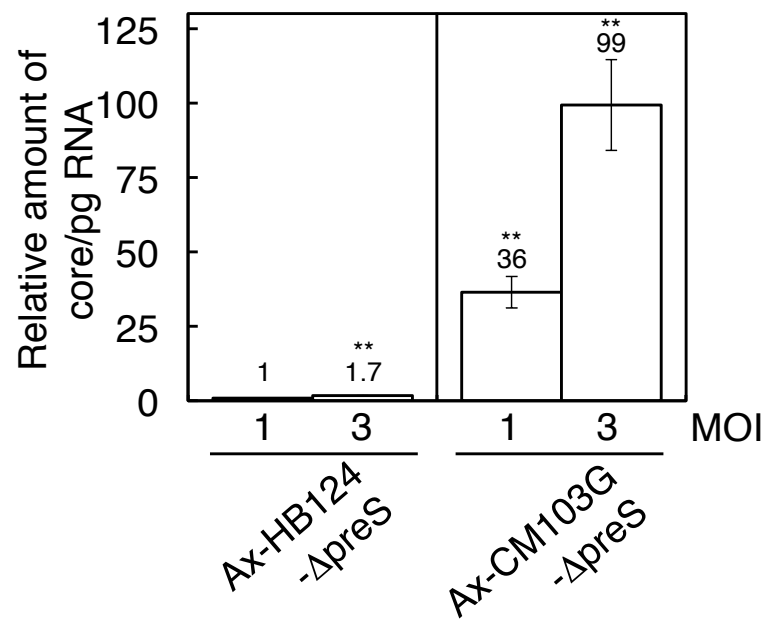


図10b HBVゲノム搭載AdVによるpg RNA転写量

core/pg RNAの転写量の比較。HepG2細胞にAx-HB124-ΔpreSをMOI 1で感染した際のcore/pg RNA量を1とした場合の、表記の条件下におけるcore/pg RNA量を定量した。独立した3回の実験の結果を示す。エラーバーは標準偏差を表す。

** $P < 0.01$

C

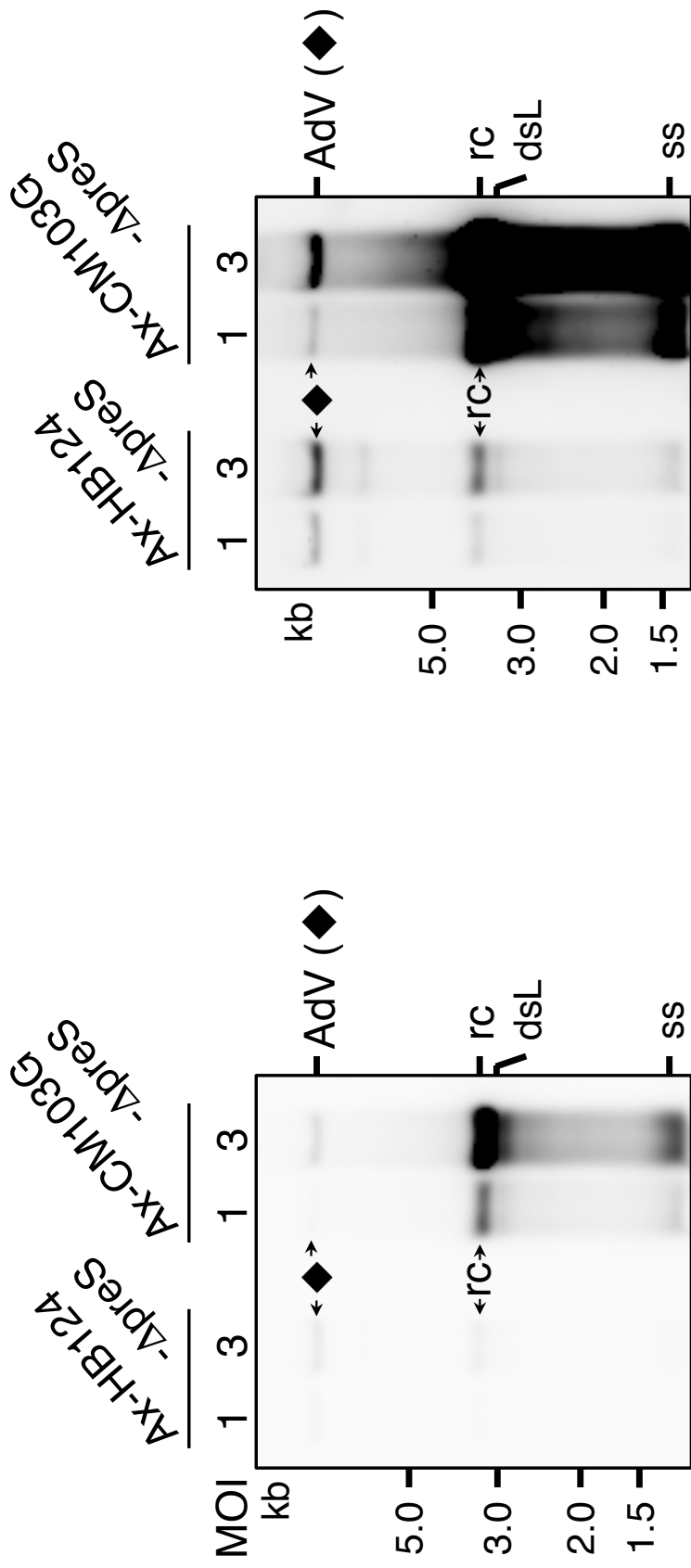
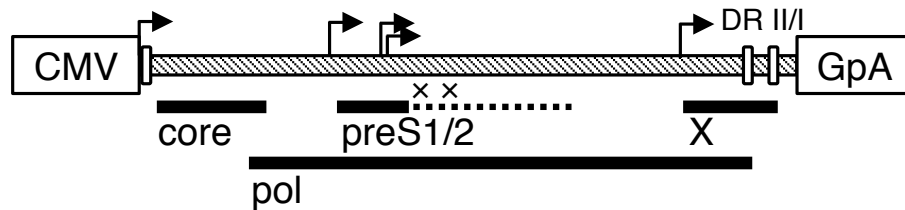


図10c HBVゲノム搭載AdVによるpg RNA転写量

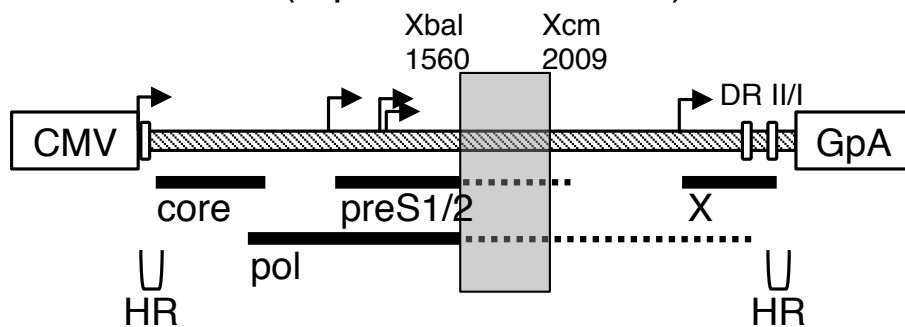
複製HBVゲノムの検出。表記条件で感染したHepG2細胞から抽出した細胞総DNAをSouthern解析に供した。AdV (◆) はKpnI処理されたAdVゲノムを、rcはrc DNAを、dsLはdsL DNAを、ssはsingle stranded DNAを表す。右図は露光過度条件における像である。

a

Ax-CM103G-kS



Ax-CM103G-dP (replication-defective)



Ax-CM114-dP (replication defective)

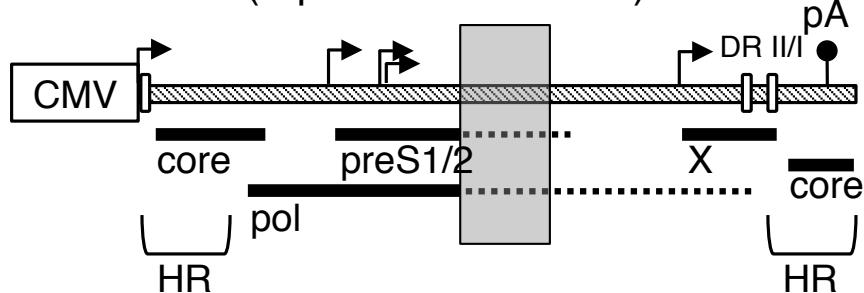


図11a 偽ccc DNAの検出

AdVに挿入されたHBVゲノムの構造。kSゲノムはSSタンパク質発現が欠失した複製型HBVゲノムである。dPゲノムはpolタンパク質発現が欠失した非複製型HBVゲノムである。‘mock’はmock感染を、‘x’はSSタンパク質における翻訳開始コドンATGに導入された変異を、‘HR’はHBVゲノムの重複配列を示す。その他の表記については図10と同様である。

b

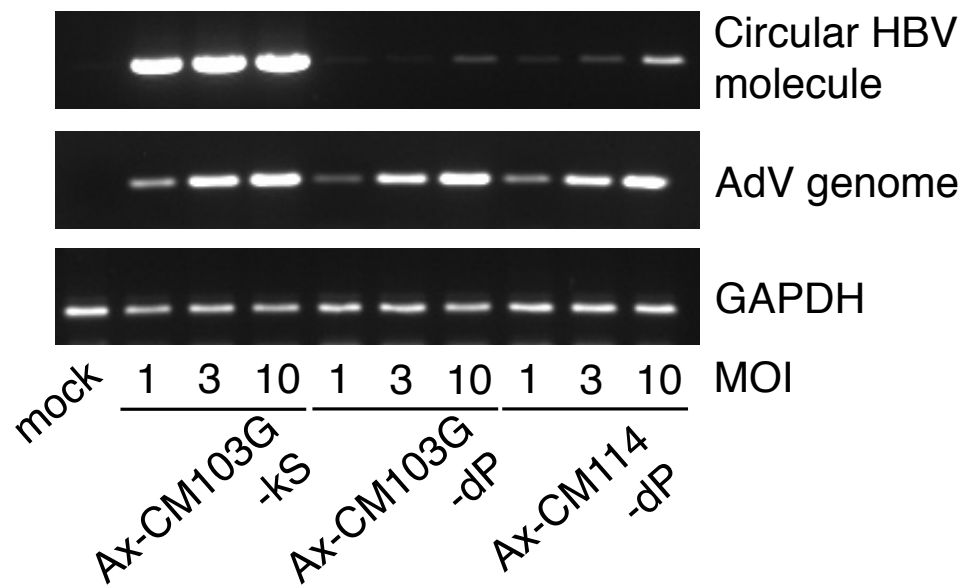


図11b 偽ccc DNAの検出

PCRによるHBV配列を有する環状分子、AdVゲノム、及びGAPDHの検出。表記条件でAdVを感染したHepG2細胞から抽出した細胞総DNAを用いて各々のDNA配列を検出した。

a

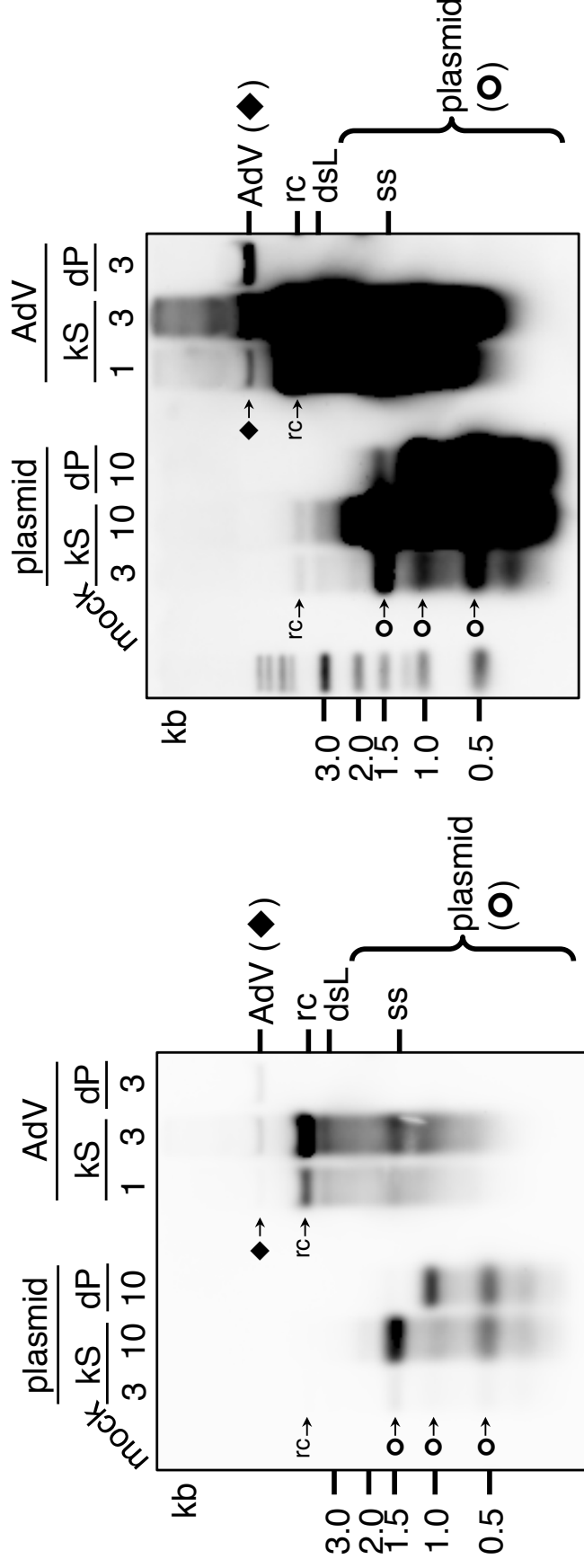


図12a 複製HBVゲノムの検出及び定量

Ax-CM103G-kSもしくはAx-CM103G-dPを感染した細胞、及び同一pgRNA発現単位を有するplasmidを導入した細胞から細胞総DNAを抽出し、実験に供した。

複製HBVゲノムの検出。表記条件における細胞総DNAを用いてSouthern解析を行い、複製HBVゲノムを検出した。‘M’はサイズマーカーを、plasmid (○) は*Hind*III及び*Dpn*I処理後のplasmid断片を表す。その他の表記は図10及び11と同様である。右図は露光過度条件における像である。

b

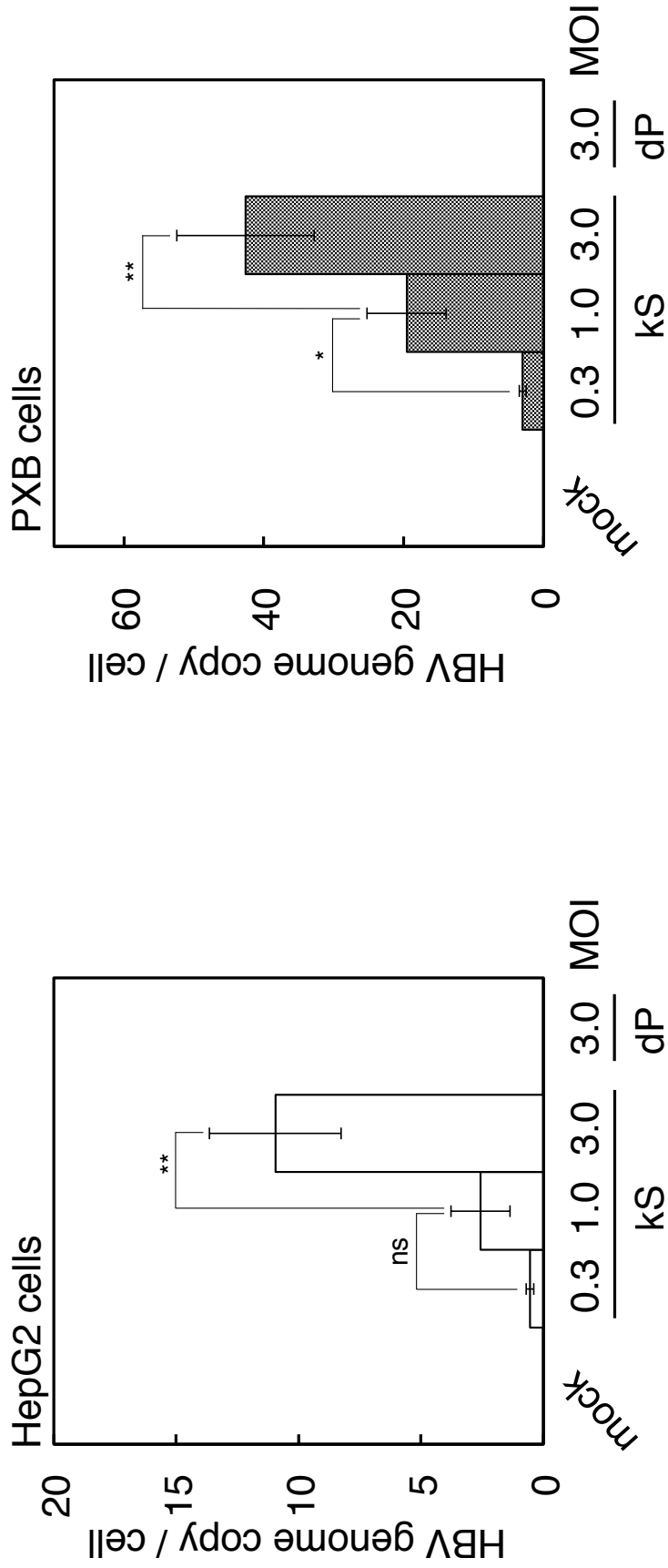


図12b 複製HBVゲノムの検出及び定量

複製HBVゲノムの定量。表記条件における細胞総DNAからqPCRを用いて求めた1細胞あたりのHBVゲノムコピー数。独立した3回の実験の結果を示す。エラーバーは標準偏差を表す。ns, not significant; * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

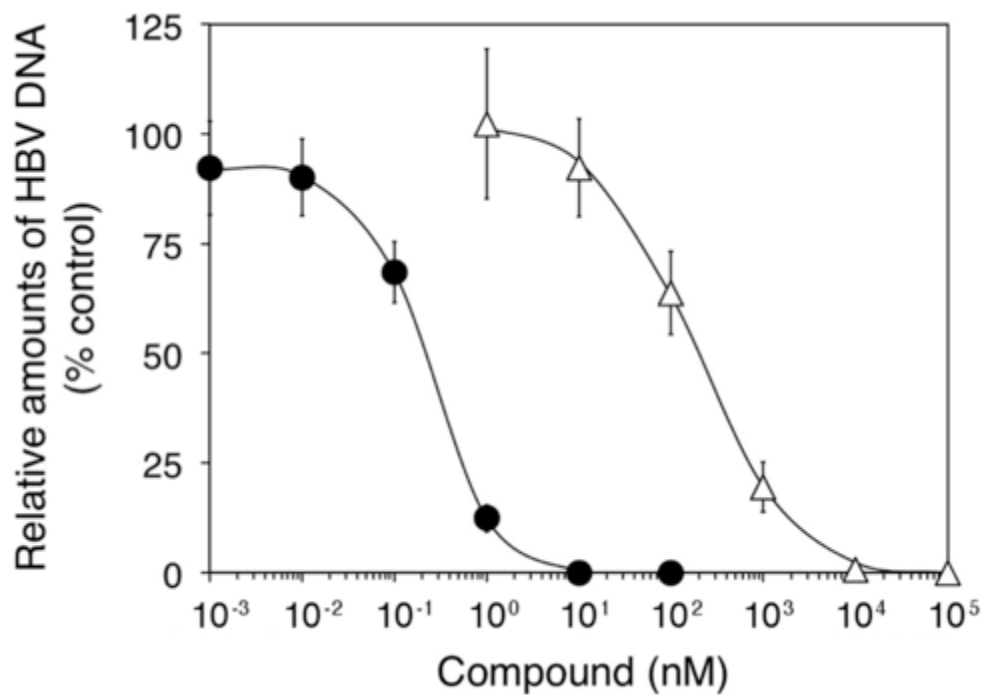


図13 HBV103-AdVシステムを用いたHuh-7細胞における逆転写酵素阻害剤のHBVゲノム複製阻止効率の検証

Ax-CM103G-ΔpreSを感染したHuh-7細胞をエンテカヴィル (●) もしくはラミブジン (△) 添加条件で培養した際の複製HBVゲノム量を、qPCRを用いて定量した。DMSO添加状態における複製HBVゲノム複製量を100%とした際の各々の条件における複製ゲノム量を比率で示した。独立した3回の実験の結果を示す。エラーバーは標準偏差を表す。