

論文の内容の要旨

論文題目 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

序文

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。HBV持続感染の最大の問題点は感染者の体内からHBVを完全に除去する薬剤が未だ開発されていないことである。すなわち、より効果的で安全な抗HBV薬剤の開発が望まれており、HBVゲノム複製及び持続感染の詳細なメカニズムの解明のためにも簡便で正確なHBVゲノム複製モデル系の開発は臨床研究のみならず基礎研究においてもニーズが高い。

HBVは細胞質のcore粒子内や放出される感染粒子内では、完全長マイナス鎖DNAと不完全長プラス鎖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。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。ccc DNA自体は複製せずに、全てのHBV由来RNAの鋳型となり、coreプロモーターからは全長HBVゲノム配列を含む3.5 kbのpregenomic RNA（pg RNA）が転写される。core粒子に取り込まれたpg RNAからはHBV由来逆転写酵素ドメインによってマイナス鎖DNAが合成され、次いでプラス鎖DNAが7割程度合成されてrc DNAゲノムを形成する。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。

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。そのためHBVの解析には、(i) 1.2コピーのHBVゲノムを有するplasmidのtransfection、(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、(iii) HBVのレセプターであるNTCP遺伝子を発現する肝細胞株へのHBV感染粒子の感染等の方法が用いられてきた。しかしいずれの方法でも簡便に、多種細胞条件で、定量的にHBVゲノム複製を検討することは困難であった。

非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）は肝細胞を始めとする各種細胞に高い遺伝子導入効

率を示すことから、これまでも複製可能なHBVゲノムが挿入された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。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によって行われていた。

本研究では効率的なHBVゲノム複製系の構築を目的とした新規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。本システムでは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、CMVプロモーターと β -globin poly(A)配列で構成される発現単位に応用することで、高効率にpg RNAを転写する。CMVプロモーターからpg RNAを転写する構築はこれまでplasmidに限られていた。また、HBVゲノム上の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ゲノム複製に関係なくベクター増殖に際して相同組換えによって出現する偽ccc DNA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が示された。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、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。

材料及び方法

CMVプロモーターと β -globin poly(A)配列、及び重複配列を短縮したコンパクトHBVゲノムで構成されるpgRNA発現単位を搭載したAdVを用いてHBVゲノム複製系（HBV103-AdVシステム）を構築した。HBVゲノム搭載AdVを培養細胞株及びヒト初代肝細胞に感染し、抽出した核酸を用いて定量性PCRによるpgRNA転写量／複製HBVゲノム量の定量、及びSouthern解析による複製HBVゲノムの検出を行った。

結果と考察

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plasmid transfectionよりもはるかに高効率にHBVゲノム複製を誘導することを、Southern解析及び複製HBVゲノムのコピー数で明らかにした。本研究ではplasmid transfectionとしてリポフェクションによる導入を採用しており、他の手法を用いたtransfectionでのHBVゲノム複製は検討していない。AdVはヒト初代肝細胞であるPXB細胞にもplasmid transfectionに比べ450倍高いGFP導入効率を示すことから、HBV103-AdVシステムを用いることでHepG2細胞と同様にPXB細胞においても高効率にゲノム複製が誘導されることを確認した。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し、HBVゲノムの重複配列を可能な限り短縮している。AdVはベクター産生細胞である293細胞内では 10^5 コピーまで増幅するため、その過程では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。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102 bpであり、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はほぼ検出されなかった。

偽ccc DNAの生成は高効率に複製したHBVゲノムを高感度で検出する本システムにおいて初めて確認された。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はAdVを用いたHBVゲノム複製実験系に限らず、大腸菌内で増幅するplasmidを用いたHBVゲノム複製実験系においても、AdVと同様に生成する可能性がある。細胞内のplasmid由来のDNAのみを切断する制限酵素*DpnI*による処理で偽ccc DNAは切断除去されるが、*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としては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が挙げられる。HBV103-AdVシステムにおける高効率なHBVゲノム複製では、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、培養4日間で検出される複製HBVゲノム量はスクリーニングに十分応用可能なレベルであることが想定された。実際に、HBV103-AdVシステムの96穴フォーマットで逆転写酵素阻害剤として抗HBV活性を示すエンテカビルとラミブジンの薬効評価を行ったところ、ダック初代肝細胞におけるダックHBV (DHBV) で算出した薬効と同程度を示した。すなわち、本システムは新規抗HBV薬の候補となる化合物の薬効評価をより短期間で定量的に行えるスクリーニング系であると考えられる。また、感染粒子の形成に必須のSタンパク質を欠失したkSゲノムを用いたことにより、HBVの感染性は失われており、より安全な実験系であると考えられる。

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、short-hairpin RNA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。